

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

**EXPRESSÃO DO CD64 COMO PREDITOR DE
CULTURAL POSITIVO EM CRIANÇAS COM
NEUTROPENIA FEBRIL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

GUSTAVO GÖHRINGER DE ALMEIDA BARBOSA

Porto Alegre, Brasil

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

**EXPRESSÃO DO CD64 COMO PREDITOR DE CULTURAL POSITIVO
EM CRIANÇAS COM NEUTROPENIA FEBRIL**

GUSTAVO GÖHRINGER DE ALMEIDA BARBOSA

Orientadora: Prof. Dra. Liane Esteves Daudt

A apresentação desta dissertação é exigência do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para a obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, Brasil

2014

CIP - Catalogação na Publicação

BARBOSA, GUSTAVO

EXPRESSÃO DO CD64 COMO PREDITOR DE CULTURAL
POSITIVO EM CRIANÇAS COM NEUTROPENIA FEBRIL /
GUSTAVO BARBOSA. -- 2014.

85 f.

Orientadora: Liane Daudt.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente,
Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Neutropenia febril. 2. Marcadores de sepse. 3.
Proteína C Reativa. 4. Citometria de Fluxo. 5.
Antígeno CD64. I. Daudt, Liane, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM

SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

ESTA DISSERTAÇÃO FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:

30/06/2014

EFOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Profa. Dra. Mariana BohnsMichalowski

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Profa. Dra. Lúcia Mariano da Rocha Silla

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profª Dra. Rita de Cássia Silveira

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dedicatória:

Dedico esse trabalho aos meus pais, Aryon e Cláudia, às minhas irmãs Heloisa e Helena, à minha esposa Graziela e à Catarina, ao Guilherme e a Gabriela. Muito obrigado por todo o apoio e carinho durante toda a jornada.

Agradecimentos

À minha orientadora, Profa. Dra. Liane Esteves Daudt por toda a confiança e apoio recebidos durante o período em que estive no Serviço de Hematologia e no Programa de pós-graduação.

À Profa. Dra. Mariana Michalowski por ter compartilhado seus conhecimentos e pelo importante apoio científico à minha dissertação de mestrado.

À Bioquímica Mariela Farias, por todo apoio e suporte técnico recebido no Laboratório de Citometria de Fluxo.

Aos doutorandos de medicina Isabel Stensmann e Matheus Fernandes pelo valioso suporte na coleta e elaboração do dados.

À Bioquímica Helena Ludwig, por todo apoio recebido no processamento das amostras na citometria de Fluxo.

Aos professores do PPGSCA e do HCPA por terem compartilhado seus conhecimentos.

Aos pacientes, por sempre terem me ensinado tanto sobre a vida.

Aos amigos e colegas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e do Hospital da Criança Santo Antônio por tudo que aprendi com vocês.

Aos meus pais, Aryon e Cláudia, por terem me proporcionado tudo.

À minha irmã Heloisa pela parceria inquestionável.

À minha irmã Helena por todo o carinho.

À minha esposa Graziela Amaral por toda a dedicação e carinho.

À Gabriela e Guilherme por todas as lições que aprendi com vocês.

À Catarina, por todo o amor que desperta.

Epígrafe

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.”

Chico Xavier/Emmanuel

RESUMO

Introdução: Uma em cada 25 crianças com câncer vai morrer devido a complicações da terapia: trata-se de uma em cada seis mortes. Das complicações do tratamento, uma importante causa de morte continua sendo a infecção. Esta frequentemente apresenta-se como febre com neutropenia, mais conhecido como “neutropenia febril”. O reconhecimento precoce de processos infecciosos em pacientes neutropênicos é dificultado pelo fato destes poderem ter apresentações clínicas variadas e não específicas, aguardando-se o início da febre para se começar um tratamento com antibióticos. O CD64 é um marcador de superfície de neutrófilos, detectável por exame de citometria de fluxo e que é pouco expressado em neutrófilos não sensibilizados. Quando o neutrófilo é exposto a TNF- alfa e outros mediadores inflamatórios, este marcador passa a ser ativado e é mensurado através da expressão do Índice de CD64. **Justificativa:** O diagnóstico precoce de sepse com hemocultura positiva em crianças neutropênicas febris é de suma importância. Os testes laboratoriais disponíveis nos ajudam pouco no momento da chegada deste paciente ao hospital. O diagnóstico mais precoce de uma infecção bacteriana nestes pacientes possibilita um melhor manejo da antibioticoterapia e, conseqüentemente, uma melhora na sobrevivência. **Objetivos:** O objetivo deste trabalho foi de avaliar a existência de relação entre o valor do índice de CD64 no primeiro dia de neutropenia febril com a positividade da hemocultura. A correlação com outros parâmetros, como número de leucócitos, PCR e VSG também foi avaliada. **Metodologia:** Este foi um estudo do tipo casos e controles, prospectivo, diagnóstico, com 64 episódios de neutropenia, sendo o grupo de casos definido como aquele com hemoculturas positivas e o controle com hemoculturas negativas. O grupo de casos contou com 14 episódios e o grupo de controle com 50. Por se tratar de uma variável não-paramétrica, utilizamos o teste de Mann-Whitney para relacionar o índice de CD64 com os resultados da hemocultura em cada grupo e com as demais variáveis. Para avaliar a capacidade de prever o resultado de uma hemocultura com o índice de CD64 e também avaliarmos suas medidas de eficácia, utilizamos curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*). **Resultados:** O grupo de casos contou com 14 pacientes. A mediana do índice de CD64 no grupo de casos foi de 2,1 ($\sigma \pm 3,9$) e para o grupo controles foi de 1,76 ($\sigma \pm 5,02$). Os testes de Mann-Whitney não foram capazes de evidenciar relação entre o valor do índice de CD64 e a positividade das hemoculturas. O índice de CD64 também não se mostrou correlacionado com a positividade do PCR. A curva ROC não evidenciou que o Índice de CD64 foi capaz de prever a positividade de uma hemocultura. Com relação às medidas de eficácia, tivemos: Sensibilidade de 64,3%, especificidade de 42% com valor preditivo positivo de 23,7% e valor preditivo negativo de 80%. O valor linear do PCR não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos das hemoculturas. Para o PCR as medidas de eficácia do exame foram: Sensibilidade de 71,4%, especificidade de 32% com valor preditivo positivo de 22,7% e valor preditivo negativo de 80%. **Conclusão:** Em desacordo com a literatura, o índice de CD64 se mostrou inadequado para prever a positividade de hemocultura nesta população específica de pacientes com neutropenia febril. O valor linear da PCR também não foi capaz de prever a positividade dos culturais nos neutropênicos febris. Deste modo, ambos os exames não são adequados para prever positividade de culturais em crianças neutropênicas febris.

Unitermos: sepse, neutropenia febril, antígenos CD64, citometria de fluxo, Proteína C Reativa.

ABSTRACT

Introduction : One in every 25 children with cancer will die from therapy complications: it means one in six deaths. Between these patients, a major cause of death remains infection. This condition often presents as fever with neutropenia, better known as "febrileneutropenia." Early recognition of infectious processes in neutropenic patients is hampered by the fact that these may have dissimilar and non-specific clinical presentations, pending the onset of fever to start treatment with antibiotics. The CD64 is a neutrophil surface marker, detectable by flow cytometry tests, and are not expressed in non-sensitized neutrophils. When the neutrophil is exposed to TNF-alpha and other inflammatory mediators, it is activated and is measured via the CD64 index. **Rationale:**The early diagnosis of sepsis with positive blood culture in febrile neutropenic children is of utmost importance. Laboratory tests available help us little in the moment this patient arrives at the hospital. The early diagnosis of a bacterial infection in these patients allows a better management of antibiotic therapy and, consequently, an improvement in survival. **Objectives:** The main objective of this paper is to evaluate the existence of a relationship between the index value of CD64 on the first day of febrile neutropenia with positive blood culture. The correlation with other parameters such as leukocyte count, CRP and ESR was also evaluated. **Methodology:** This is a cases-control, prospective, diagnosis study that included 64 episodes of neutropenia. The cases group ($n=14$) was defined by those with positive blood cultures and the control ($n=50$) one with negative blood cultures. Because it is a non - parametric variable, we used the Mann-Whitney correlation test to relate the index of CD64 with the result of blood culture in each group and with the other variables. A ROC (Receiver Operating Characteristic) curve was used to assess the competence of the CD64 index to predict the outcome of blood culture. The median rate of CD64 in the case group was 2,1 ($\sigma\pm 3,9$) and controls for the group was 1,76 ($\sigma\pm 5,02$). The Mann-Whitney tests were not able to show the relationship between the value of CD64 index and the results of blood cultures. The CD64 index was also not correlated with the positivity of CRP. The ROC curve did not show that the CD64 index was able to predict the positivity of blood culture. Regarding efficacy measurements, sensibility was 64,3%, specificity 42%, positive predictive value 23,7% and negative predictive value 80%. The linear value of CRP showed no statistically significant difference between the groups of blood cultures. For CRP, the efficacy measurements were sensibility 71,4%, specificity 32%, positive predictive value 22,7% and negative predictive value 80%. **Conclusion:** CD64 index was not suitable to predict the positivity of blood cultures in this specific population of patients with febrile neutropenia. Also the linear values of CRP showed no statistically significant difference between the blood culture groups. Therefore, both exams should not be used in order to predict positivity of cultural in neutropenic febrile children.

Keywords: sepsis, febrile neutropenia, Antigens CD64, flow cytometry, C Reactive Protein.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE ILUSTRAÇÕES: CORPO DA DISSERTAÇÃO

Figura 1: Vias de fosforilação por ativação dos Fc (QIAGEN 2014)	24
Figura 2: Granulações tóxicas em neutrófilos (van de VYVER et al., 2010)	26
Figura 3: Exemplo de análise de resultado da citometria de fluxo (DAVIS 2005).....	28
Figura 4: Histograma de frequência de culturais positivos e o índice de CD64	41
Figura 5: Histograma de frequência de culturais negativos e o índice de CD64.....	42
Figura 6: Curva ROC avaliando a capacidade de o índice de CD64, PCR, Leucócitos e Neutrófilos em prever o resultado de uma hemocultura.....	44
Figura 7: Teste de Mann-Whitney índice CD64 e Hemoculturas	47
Figura 8: Teste de Mann-Whitney CD64 e PCR-categorizado.	48
Figura 9: Teste de Mann-Whitney CD64 e VSG-categorizado.....	48
Figura 10: Teste de Mann-Whitney Leucócitos e Hemoculturas.....	49
Figura 11: Teste de Mann-Whitney PCR e Hemoculturas.	49
Figura 12: Teste de Mann-Whitney VSG e Hemoculturas.	50

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS: CORPO DA DISSERTAÇÃO

Tabela 1 – Características da amostra	40
Tabela 2 – Estatísticas descritivas do Índice de CD64 por grupo	42
Tabela 3 – Doenças de base e resultados nas hemoculturas	43
Tabela 4 – Microorganismos isolados nos culturais.....	43
Tabela 5 – Área sob a Curva ROC	45
Tabela 6 – Categorização do índice de CD64 comparado com as hemoculturas.....	45
Tabela 7 – Categorização do PCR comparado com as hemoculturas	46
Tabela 8 – Medidas de eficácia do índice de CD64 e PCR.....	46
Tabela 9 – Expressão de CD64 e hemocultura.....	51
Tabela 10 – Percentis dos Valores de PCR e Hemocultura.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

CD -*Clusterofdifferentiation*

Células NK - *Natural Killers*

DP -Desvio-padrão

FIPE-Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos

GPPG- Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação

PPGSCA-Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e Adolescente

HCPA- Hospital de Clínicas de Porto Alegre

N- Número de indivíduos na amostra

ISCMPA-Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre

UFRGS- Universidade Federal do Rio Grande do Sul

TCLE- Termo de consentimento livre e esclarecido

UTI- Unidade de terapia intensiva

UTI-Neo - Unidade de terapia intensiva neonatal

SIRS- *Systemicinflammatory response syndrome*

TCE-TraumatismoCrânioEncefálico

Fc- *Fragment, crystallizable*

FcR- *Fc Receptor*

FcγR -*Fc gammaglobulin Receptor*

PAMP- *Pathogen-associated molecular pattern*

TNF -*Tumor necrosis fator*

ITAM -*Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*

SYK - *Spleen tyrosine-kinase*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 NEUTROPENIA FEBRIL.....	18
2.2 RESPOSTA IMUNOLÓGICA INFLAMATÓRIA.....	20
2.3 ATIVAÇÃO DOS NEUTRÓFILOS.....	22
2.4 EXPRESSÃO DE CD64.....	26
2.5 UTILIDADE DO CD64.....	28
3. JUSTIFICATIVA.....	32
4. OBJETIVOS	33
4.1 OBJETIVO GERAL	33
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
5. METODOLOGIA	34
5.1 DELINEAMENTO	34
5.2 POPULAÇÃO.....	34
5.3 AMOSTRA	34
5.4 PRINCIPAIS VARIÁVEIS	35
5.5 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO.....	35
5.6 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	36
5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
6. ORÇAMENTO	39
7. RESULTADOS.....	40
8. DISCUSSÃO.....	53
9. CONCLUSÕES.....	57
10. REFERÊNCIAS	58
11. ARTIGO.....	64
RESUMO.....	64
ABSTRACT.....	65
INTRODUÇÃO	66
METODOLOGIA	68
PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS E QUANTIFICAÇÃO DE CD64	69
ANÁLISE ESTATÍSTICA	70
RESULTADOS.....	71
DISCUSSÃO	73

REFERÊNCIAS	76
FIGURAS E TABELAS	81
12.ANEXOS.....	86

1.INTRODUÇÃO

O tratamento do câncer infantil é uma das grandes histórias de sucesso dos cuidados de saúde no final do século 20(MOSCUCCI *et al.*, 2009). Nos países desenvolvidos, as crianças com neoplasias têm uma considerável chance de sobrevivência, com taxas de sobrevida global de aproximadamente 75%(PRITCHARD-JONES *et al.*, 2006).

Porém, uma em cada 25 crianças com câncer vai morrer devido a complicações da terapia: trata-se de uma em cada seis mortes(HARGRAVE *et al.*, 2001, FREYCON *et al.*, 2008). Das complicações do tratamento, uma importante causa de morte continua sendo a infecção. Esta frequentemente apresenta-se como febre com neutropenia, mais conhecido como “neutropenia febril” (HANN *et al.*, 1997).

O isolamento de bactérias em fluídos corporais, geralmente sangue, é o método mais específico para diagnóstico de sepse nestes pacientes. Alguns estudos mostraram que a incidência de choque séptico em crianças neutropênicas febris com culturais positivos é de aproximadamente 19% e que 83% dos pacientes que necessitaram de cuidados intensivos apresentam culturais positivos(HOFFMEYER *et al.*, 1997, EGYED *et al.*, 2006, SCHEINEMANN *et al.*, 2010).

O reconhecimento precoce de processos infecciosos em pacientes neutropênicos é dificultado pelo fato destes poderem evoluir com apresentações clínicas variadas e não específicas, frequentemente aguardando-se o início da febre para começar tratamento com antibióticos. O diagnóstico mais precoce de uma infecção nestes pacientes possibilita o início imediato da antibióticoterapia e conseqüentemente, uma melhora na sobrevida(PHILLIPS *et al.*, 2007).

A relevância do estudo de marcadores precoces de infecção bacteriana é evidente. Por isso, devemos priorizar nossos esforços em desenvolver marcadores de positividade de hemoculturas, para podermos iniciar o mais precocemente possível e adequar o número de dias aos quais os pacientes são expostos a antibióticoterapia.

Com isso, um exame que tenha a capacidade de definir um grupo de alto risco de pacientes neutropênicos com febre pode ser extremamente útil, não somente no diagnóstico precoce, mas também no acompanhamento e manejo destes pacientes (SCHÜTTRUMPF *et al.*, 2003).

2. REVISÃO DE LITERATURA

É frequente a internação de pacientes com neutropenia secundária à quimioterapia para tratamentos antibióticos de amplo espectro e de alto custo. Por isso, é importante identificar marcadores para diagnosticar infecção de forma rápida e para distinguir entre infecções virais e bacterianas, com o intuito de aperfeiçoar os tratamentos antibióticos.

Existem evidências que a contagem de leucócitos neste contexto possui pouco valor para diferenciar o tipo de infecção em todos os grupos de neutropênicos. Porém, alguns estudos mostraram que uma contagem absoluta de neutrófilos menor que 100/mm³ é um preditor independente de sepse em pacientes neutropênicos graves (HAKIM *et al.*, 2010).

A proteína C reativa (PCR) possui resultados controversos, com sensibilidade e especificidade limitadas (AVABRATHA *et al.*, 2009, KASSAM *et al.*, 2009, SPASOVA *et al.*, 2009).

Tanto a PCR quanto a procalcitonina são proteínas produzidas na resposta inflamatória. Ambas são bastante utilizadas na prática clínica para diagnosticar e manejar pacientes com sepse.

A função da PCR no processo inflamatório não está totalmente clara. Supõe-se que ela possa se ligar a componentes fosfolipídicos de microrganismos invasores, facilitando a remoção destes pelos macrófagos. O fato de os níveis de PCR aumentarem durante a fase aguda do processo inflamatório fez com que esta proteína fosse utilizada na clínica para evidenciar a presença de processos infeccioso-inflamatórios ativos, principalmente no contexto da pediatria(JAYE & WAITES, 1997).

Ela é melhor utilizada no início do processo inflamatório, geralmente nas primeiras 24h. Neste contexto, possui uma sensibilidade maior do que quando utilizada no diagnóstico tardio da sepse(HOFER *et al.*, 2012).

Com relação à procalcitonina, esta tem se mostrado como um método diagnóstico superior à PCR no diagnóstico precoce de infecção bacteriana. A procalcitonina é um precursor da calcitonina, um hormônio com significado fisiológico pouco conhecido em humanos, porém capaz de diminuir os níveis séricos de cálcio quando administrado de forma exógena(FAIX 2013).

Observou-se que a procalcitonina faz parte da resposta sistêmica que leva a sepse grave. Assim como a PCR, a procalcitonina pode ter efeitos pró-inflamatórios. Alguns estudos sugerem a superioridade da procalcitonina sobre a PCR, tanto com relação à sensibilidade quanto à especificidade. Observaram esta superioridade inclusive na capacidade de prever a positividade de hemoculturas em pacientes criticamente enfermos(CHIROUZE *et al.*, 2002, SIMON *et al.*, 2004, NAKAMURA *et al.*, 2009).

A única meta-análise de investigações comparando a procalcitonina com a PCR para o diagnóstico de infecção bacteriana observou 49 publicações, sendo que em 15 destas houve comparação direta entre a procalcitonina e a PCR. A conclusão deles foi de que ambos os testes foram efetivos em demonstrar a presença de processo infeccioso, porém o *oddsratio* para a procalcitonina foi 14,69, significativamente superior ao *oddsratio* da PCR, que foi de 5,43(UZZANet al., 2006).

Outros estudos evidenciaram que a procalcitonina possui sensibilidade melhor do que a proteína C reativa, porém a conclusão destes é que a procalcitonina ainda não é um parâmetro definitivo (SPASOVA et al., 2009). Com isso a necessidade de melhorar os indicadores diagnósticos para sepse persiste.

2.1 NEUTROPENIA FEBRIL.

A neutropenia é definida por uma diminuição na contagem de neutrófilos e pode ser aguda ou crônica. Por definição, a neutropenia febril é caracterizada por temperatura $> 38.3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou dois episódios consecutivos de temperatura $> 38.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ com uma hora de diferença e uma contagem absoluta de neutrófilos $< 500\text{ células/mm}^3$ (CONEN 2014).

As causas que mais comumente levam ao desenvolvimento de neutropenia são: doenças infecciosas, desordens hematológicas, neoplasias e toxicidade por quimioterápicos. Devido a considerável toxicidade medular dos quimioterápicos disponíveis atualmente, os pacientes com neoplasias submetidos à quimioterapia encontram-se em alto risco de evoluir com neutropenia.

A ocorrência de febre associada ao quadro de neutropenia é uma emergência médica e por isso os pacientes devem receber antibióticoterapia imediatamente. A urgência neste contexto se deve à possibilidade de evolução rápida ao óbito, principalmente em pacientes infectados por germes gram-negativos. A positividade de hemoculturas em pacientes neutropênicos é de 20-30%. Estudos recentes em pacientes com câncer evidenciaram que 14%

dos pacientes evoluem com choque e que a mortalidade da neutropenia febril oscila entre 5% e 20%, aumentando com a presença de outras comorbidades. (KUDERER *et al.*, 2006, PAUL *et al.*, 2006).

2.2 RESPOSTA IMUNOLÓGICA INFLAMATÓRIA.

A sepse caracteriza-se por uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica, que pode ser provocada por infecções ou devido a agressões que alterem os padrões moleculares de resposta inflamatória (DHAR & CASTILLO 2011, STEARNS-KUROSAWA *et al.*, 2011). Ela está relacionada a um aumento na mortalidade e existem evidências de que a taxa de mortalidade em crianças neutropênicas febris com sepse associada esteja entre 0,7 e 3,9% (BASU *et al.*, 2005).

O modelo inicial para explicar a sepse era baseado na resposta do sistema imunológico contra o LPS (lipopolissacarídeo) localizado nas paredes celulares de células gram-negativas (ULEVITCH & TOBIAS 1999). A endotoxina é um excelente exemplo de uma via molecular associada ao patógeno (PAMP- *pathogen-associated molecular pattern*).

As células do sistema imunológico inato reconhecem diferentes tipos de PAMPs e o LPS foi a primeira PAMP identificada em mamíferos.

Quando estimuladas, as PAMPs estimulam as células do sistema imunológico inato a produzirem TNF, IL-1 β e IL-6. Estas três citocinas pró-inflamatórias produzem uma resposta inflamatória sistêmica bastante intensa. Por isso, acreditou-se por muito tempo que a sepse deveria ser definida como uma resposta inflamatória exagerada (FAIX 2013).

Porém, alguns estudos sugerem que esta caracterização possa não ser a mais apropriada, pois evidências recentes indicam que a fisiopatologia da sepse está relacionada a um estado pró-inflamatório inicial, seguido por uma fase de imunossupressão, com uma resposta anti-inflamatória oposta, quando então o paciente fica mais suscetível a infecções nosocomiais (van DISSEL *et al.*, 1998, SKRUPKY *et al.*, 2011).

Durante o estágio pró-inflamatório inicial, as principais citocinas responsáveis por intermediar a ativação do sistema imunológico inato são o TNF (*tumor necrosis factor*), a IL-1b (interleucina-1b) e a IL-6 (interleucina-6). O TNF e a IL-1b são responsáveis por atrair polimorfonucleares ao local da infecção. Também são responsáveis pela febre e outros sintomas sistêmicos. A IL-6 é responsável pelo estímulo hepático à produção de proteínas de fase aguda, incluindo a proteína C reativa. Além disso, possui também função importante na medula óssea, onde estimula a produção de mais neutrófilos (FAIX 2013).

Após a ativação dos neutrófilos existem basicamente dois mecanismos moleculares que viabilizam o reconhecimento e a fagocitose de patógenos pelo sistema imunológico: o dependente de opsonina e o independente de opsonina.

As opsoninas são responsáveis por intermediar a ligação da superfície do patógeno com as células que realizam fagocitose, inclusive com os neutrófilos. Destas opsoninas, a que conhecemos mais a fundo são aquelas da classe das IgGs, sendo esta a mais frequente no soro, correspondendo a 75% das imunoglobulinas circulantes (HART *et al.*, 2004).

2.3 ATIVAÇÃO DOS NEUTRÓFILOS.

Os neutrófilos representam a principal linha de defesa do corpo contra a invasão de patógenos, tais como bactérias, e constituem 40-60% da população de células brancas do sangue. Na circulação de pessoas híidas, os neutrófilos encontram-se em um estado de repouso, o que garante que as suas granações tóxicas intracelulares não sejam liberadas erroneamente, de modo a não agredir inadvertidamente tecido saudável.

Ao serem expostos a antígenos bacterianos e a mediadores endógenos, os neutrófilos passam a ter papel decisivo durante o processo da resposta inflamatória aguda (RUCHAUD-SPARAGNO *et al.*, 1997).

A ativação dos neutrófilos se inicia minutos após o primeiro contato dos receptores de superfície celular do neutrófilo com citocinas e/ou produtos de degradação bacteriana, como por exemplo, TNF- α , GM-CSF, IL-8 e IFN- γ (QUAYLE *et al.*, 1997).

Estes receptores são denominados Receptores para a Porção Fc gama das Globulinas (Fc γ R). A denominação depende: do isótipo de cadeia pesada da imunoglobulina, do tipo de receptor e da população celular expressando o receptor.

Os neutrófilos podem expressar três tipos de receptor Fc gama de globulinas: Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) e Fc γ RIII (CD16), cada uma com propriedades estruturais e funcionais diferentes (LILIUS & NUUTILA 2012).

O Fc γ RI (CD64) é um receptor de IgG de alta afinidade que se liga a IgG monomérica, sendo expressa principalmente por monócitos e macrófagos, e também por muitas células

progenitoras mielóides. As outras duas classes de receptores, FcγRII e FcγRIII, por sua vez, exibem baixa afinidade para IgG monomérica.

Entretanto, os receptores FcγRII e FcγRIII são capazes de se ligar a agregados multiméricos de IgG, que são particularmente importantes para o reconhecimento e a ligação dos complexos antígeno-anticorpo durante a resposta inflamatória (QUAYLE *et al.*, 1997).

O FcγRII é expresso através de 3 isoformas: a, b e c. O FcγRIIa é expresso majoritariamente por células mielóides, monócitos, macrófagos e plaquetas. O FcγRIIb é expresso por células B, monócitos, macrófagos e o FcγRIIc apenas por células NK (*natural killers*) (LILIUS & NUUTILA 2012).

O outro receptor de baixa afinidade, o FcγRIII, possui duas isoformas: a e b, com diferenças estruturais significativas. O FcγRIIIa é uma proteína transmembrana, expressa por macrófagos, células NK e monócitos, enquanto que o FcγRIIIb não possui fração transmembrana e é expresso quase que exclusivamente por neutrófilos.

A associação não-covalente da IgG com a FcγRI (CD64) desencadeia a fosforilação da tirosina no ITAM (*Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) próximo ao receptor, na membrana celular. O ITAM ativado, por sua vez, irá iniciar um processo de sinalização intracelular através da ativação de uma enzima denominada *syk*, codificada pelo gene SYK (HARRISON *et al.*, 1995, HUTCHINSON *et al.*, 1995, GIBSON *et al.*, 2012).

A *syk* é uma tirosina-quinase que possui função mediadora nas interações das diferentes etapas metabólicas no citoplasma, que levarão à ativação de suas funções, com consequente transcrição de genes, apresentação de antígenos e fagocitose. A sinalização por meio do FcR está envolvida em rearranjos dinâmicos do citoesqueleto e também na redistribuição dos receptores de membrana (GIBSON *et al.*, 2012).

A enzima *syk* faz parte de uma via comum de ativação no citoplasma do neutrófilo. Ela é compartilhada por outros receptores Fc de superfície na membrana do neutrófilo. Porém a ativação específica do FcγRI(CD64)ativa vias com funções específicas, como asresponsáveis pela síntese e liberação de fator ativador de linfócitos B e produção de IL-10, ambas relativas à imunidade adquirida (Figura1).

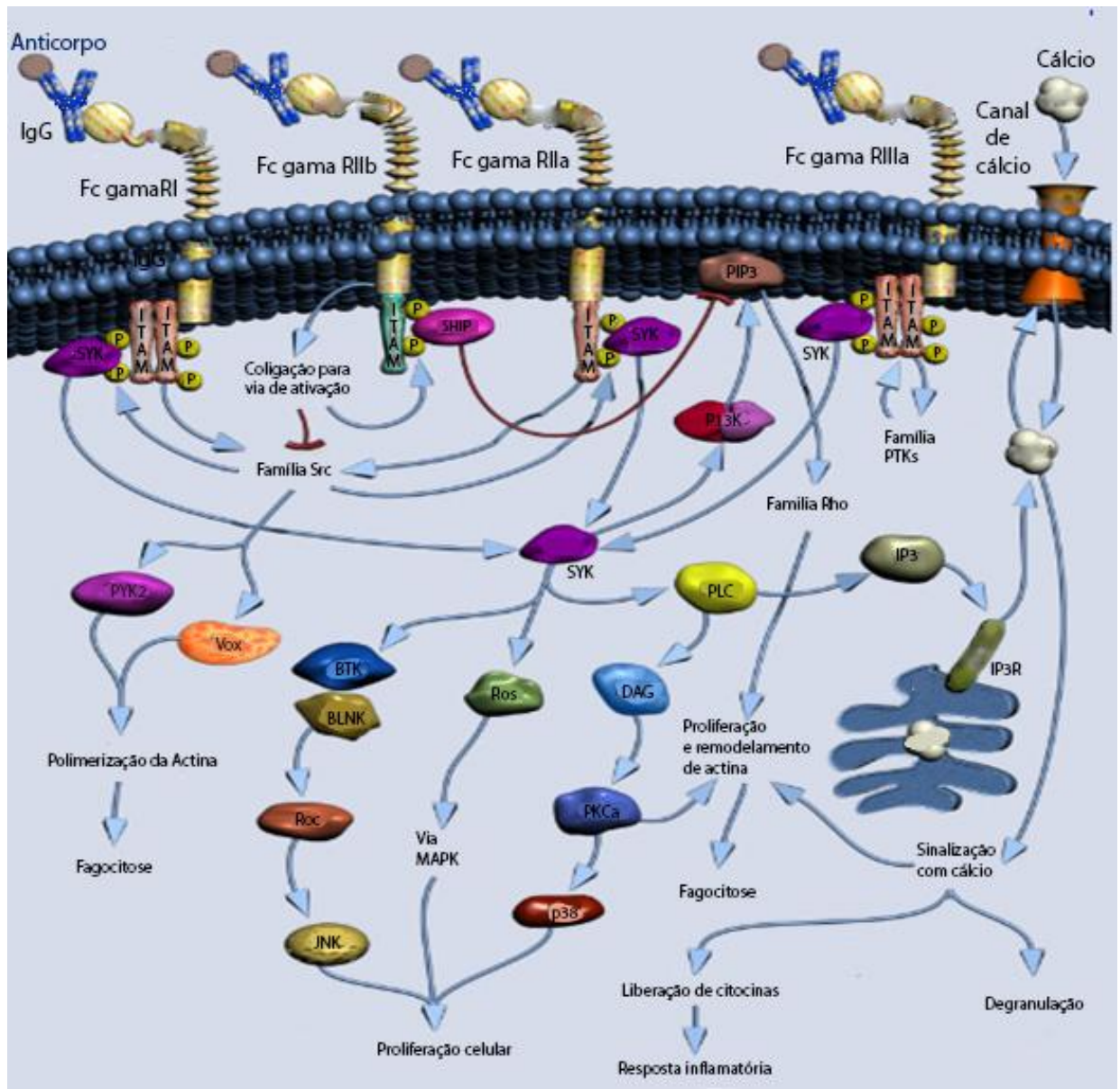


Figura 1: Vias de fosforilação por ativação dos Fc (QIAGEN 2014)

Após a ativação dos neutrófilos através da estimulação de seus receptores, há a mobilização dos grânulos intracelulares em direção à membrana celular. Os neutrófilos contêm pelo menos quatro tipos diferentes de granulações: grânulos azurofílicos primários, grânulos específicos secundários, grânulos terciários e vesículas secretoras (BORREGAARD & COWLAND 1997).

As granulações primárias são o principal local de armazenamento do arsenal de mediadores mais tóxicos existentes no neutrófilo, incluindo a elastase, a mieloperoxidase, catepsina e defensinas. As granulações secundárias e terciárias contêm majoritariamente lactoferrina. As vesículas secretórias contêm albumina, o que sugere que esse conteúdo seja derivado da endocitose de membranas plasmáticas (LACY 2006).

Quando os receptores são estimulados por um secretagogo, o neutrófilo ativa-se e seus grânulos movem-se em direção à membrana plasmática, onde se fundem e exocitam suas substâncias tóxicas.

A exocitose nos neutrófilos é um processo que se consiste basicamente de quatro etapas. A primeira delas é o recrutamento dos grânulos no citoplasma em direção à membrana plasmática, que é dependente de remodelação do citoesqueleto e da formação de microtúbulos no citoplasma (Figura 2).

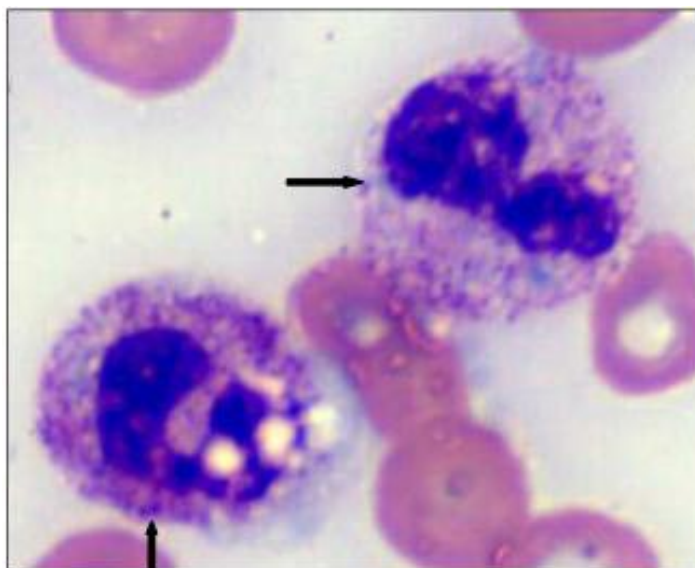


Figura 2: Granulações tóxicas em neutrófilos (van de VYVER et al., 2010)

Esta etapa é seguida pela aglutinação dos grânulos e ancoragem na membrana celular, o que faz com que a camada externa da bicamada lipídica do grânulo entre em contato com a camada interna da bicamada lipídica da membrana celular. Após, os grânulos são ativados para que fiquem mais propensos à fusão com a membrana.

O contato entre as duas membranas estabelece uma estrutura temporária, em formato de poro, que permite que o neutrófilo exocite suas substâncias tóxicas e efetue sua importante função na imunidade inata (BURGOYNE & MORGAN 2003, LACY 2006).

2.4 EXPRESSÃO DE CD64.

O CD64 é uma glicoproteína de membrana que intermedia a endocitose, a fagocitose, a toxicidade celular anticorpo-dependente, a liberação de citocinas e a geração de superóxido. Ele é expresso regularmente nas superfícies de monócitos e macrófagos (DAVIS 2005).

Em neutrófilos sem estimulação, o CD64 de superfície do neutrófilo é expresso em uma quantidade muito baixa. Entretanto, esta expressão é aumentada de forma quantitativa durante episódios de infecção bacteriana (QUAYLE *et al.*, 1997).

Isto ocorre pelo poder de estimulação que as citocinas inflamatórias exercem sobre os neutrófilos. O aumento na densidade da expressão do CD64 ocorre de maneira proporcional ao estímulo das citocinas e permanece estável por 24h(HOFFMEYER *et al.*, 1997).

Após a estimulação dos receptores, os neutrófilos ativados são então mobilizados para o local de inflamação, onde eles encontram sinais que irão induzir a formação de pseudópodos para fagocitose e iniciar a liberação de espécies reativas de oxigênio, que por fim levarão a eliminação do patógeno (HALLET & LLOYDS 1995).

Com relação à metodologia utilizada para realizar a análise do CD64 em neutrófilos por citometria de fluxo, o ensaio é realizado da seguinte forma: Uma mistura de anticorpos, com CD163 fluorescente e dois clones de CD64 é misturado com 50µL de sangue periférico por 10 minutos. Segue-se então a adição de reagente para lise de células de eritrócitos e por fim a adição de *beads* para a calibração do instrumento (Figura 3).

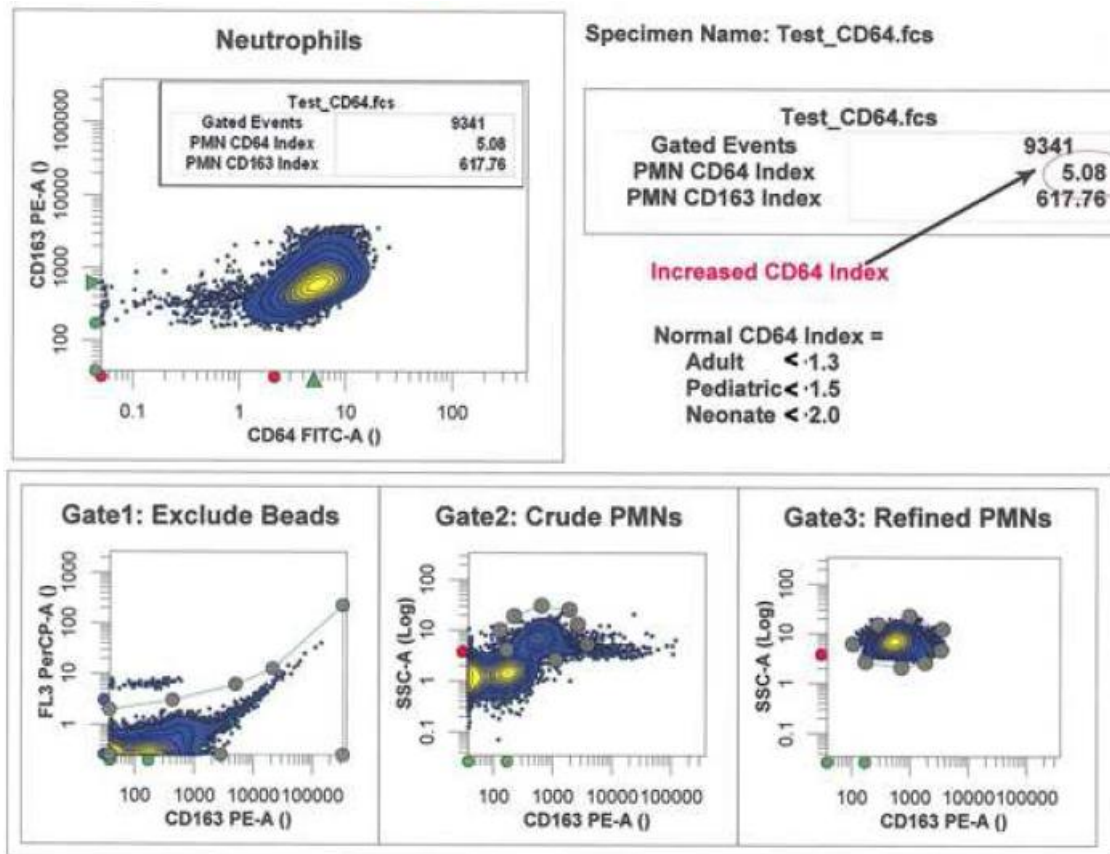


Figura 3: Exemplo de análise de resultado da citometria de fluxo (DAVIS 2005)

A análise dos dados é realizada para definir a população específica de neutrófilos, utilizando um software que determina o índice de CD64 comparando a intensidade da fluorescência dos neutrófilos com o sinal de uma suspensão de beads (MARMER 2014).

2.5 UTILIDADE DO CD64.

Recentemente observou-se que era possível utilizar a expressão de antígenos de superfície dos leucócitos como marcador de infecção bacteriana em pacientes de UTI adultos e de UTI-Neo com sensibilidade e especificidade satisfatória (GROSELJ-GRENC *et al.*, 2009, ICARDI *et al.*, 2009, ZEITOUN *et al.*, 2010).

Avanços tecnológicos no campo da citometria de fluxo tornaram possível quantificar a expressão de CD64 de forma rápida, com precisão, com mínimos volumes de amostras sanguíneas, aproximadamente 0,5 ml de sangue.

Sabe-se que em adultos, um índice de CD64 $<1,19$ é preditivo de hemoculturas negativas. Um índice $>1,19$ é preditivo de diagnóstico de culturais positivos com uma sensibilidade e especificidade de 94.6% e 88.7% respectivamente. Os valores preditivos negativos foram 89.8% e 94% (ICARDI *et al.*, 2009).

Em um estudo com adultos, uma intensidade maior de expressão de CD64 foi observada em pacientes com infecção bacteriana e SIRS (*systemic inflammatory response syndrome*), quando comparados a um grupo de paciente apenas com SIRS (QURESHI *et al.*, 2001).

Na avaliação de pacientes adultos em pós-operatório imediato, um estudo combinou resultados do PCR com a expressão de CD64 com o objetivo de aumentar a probabilidade de um diagnóstico precoce de infecção bacteriana. Foi observado que um resultado anormal para ambos os exames esteve associado com uma probabilidade de 92% de sepse. Se ambos os exames eram normais, a probabilidade de descartar sepse foi de 99%. Este estudo evidenciou que pacientes sépticos que receberam antibióticos empíricos inadequados mantinham a expressão de CD64 persistentemente elevada, enquanto que pacientes que receberam antibióticos apropriados a expressão diminuiu ao longo do tempo (DIMOULA *et al.*, 2013).

Em pacientes não sépticos, o aumento na expressão CD64 durante a internação foi capaz de prever positividade de culturais com uma sensibilidade de 88 % e uma especificidade de 65 % (DIMOULA *et al.*, 2013).

Portanto, a medição da expressão de CD64 na admissão da U.T.I., especialmente em associação com o PCR, se mostrou útil para o diagnóstico de infecção bacteriana nesta população. Além disso, dosagens seriadas foram utilizadas com sucesso para fins de controle da evolução do processo infeccioso(DIMOULA *et al.*, 2013).

Ao avaliar a expressão do CD64 em crianças com infecção bacteriana precoce e TCE, observou-se que o padrão de estresse metabólico de fase aguda nos pacientes apenas com traumatismo crânio-encefálico e SIRS sem infecção, foi diferente do padrão dos pacientes que evoluíram com sepse, cuja resposta foi associada ao aumento de proteínas de fase aguda.

O padrão de estresse metabólico precoce da sepse foi caracterizado por uma combinação de altos índices de CD64, glicose, triglicerídeos e uma diminuição no colesterol total, HDL e LDL.

No TCE sem sepse, em contraste, o aumento de CD64 e triglicerídeos não foi evidente. Deste modo o autor sugere que o CD64 foi útil para diferenciar os pacientes que evoluíram com sepse (FITROLAKI *et al.*, 2013).

Em 60 recém nascidos avaliados em UTI-Neo, observou-se que os doentes tinham a expressão mediana de CD64 significativamente maior quando comparado com os controles. Observou-se que os neonatos com culturas positivas tiveram valores medianos maiores dos que os neonatos com clínica de infecção, porém com culturas negativas. A análise da área sob a curva ROC (0,903), evidenciou que o CD64 foi capaz de prever a positividade das culturas com a sensibilidade e especificidade de 91,7 % e 88,9 %, respectivamente. Este estudo demonstrou que os índices convencionais eram inferiores para avaliar infecções bacterianas, tanto isoladamente quanto em combinação(SONI *et al.*, 2013).

Neste contexto, o índice de CD64 foi adequado para prever a positividade de culturais na população de neonatos e para orientar o manejo antibiótico.

Outro estudo em neonatos avaliou 84 recém-nascidos que foram acompanhados por suspeita de infecção neonatal.

Eles foram divididos em um grupo de infecção (n = 49) e um grupo não-infecção (n = 35). Neonatos saudáveis serviram como controle (n = 35). Foi realizada a triagem completa para se ver as expressões de CD11b, CD64 e CD62L nos neutrófilos e monócitos foram determinadas por citometria de fluxo. Observou-se que a expressão de CD64 foi significativamente maior no grupo de infecção em comparação com o grupo controle (GENE *et al.*, 2012).

3.JUSTIFICATIVA

A expressão de CD64 foi pouco estudada em pacientes neutropênicos. Apesar de haver uma indicação na bula do fabricante do produto com relação à utilização em pacientes neutropênicos, não encontramos nenhuma referência na literatura à utilização deste marcador em neutropênicos de qualquer tipo, muito menos em crianças neutropênicas febris.

Através deste estudo buscamos observar se a expressão de CD64 nos neutrófilos (um índice sensível, rápido e de fácil realização) poderia ser útil para a população em questão. Além disso, objetivamos também analisar o perfil hematológico dos pacientes e observar o comportamento da PCR com relação aos grupos de culturais.

4.OBJETIVOS

4.1OBJETIVO GERAL

Analisar a expressão de CD64 como marcador diagnóstico precoce de culturas positivas no contexto da neutropenia febril em crianças.

4.2OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Observar a relação da expressão de CD64 com a positividade de culturas.
2. Analisar a relação da expressão de CD64 com os valores de proteína C reativa.
3. Analisar a relação da expressão de CD64 com a evolução clínica dos pacientes.
4. Analisar a relação da expressão de CD64 com a velocidade de hemossedimentação.
5. Analisar a relação do PCR com a positividade de culturas.
6. Analisar a relação do número de leucócitos com a positividade de culturas.
7. Descrever os resultados das hemoculturas e sua positividade na neutropenia febril.

5.METODOLOGIA

5.1DELINEAMENTO

Estudo prospectivo, diagnóstico, do tipo casos e controles. Hipótese :A expressão de CD64 é maior na neutropenia febril por infecção bacteriana.

5.2 POPULAÇÃO

Pacientes entre zero e 18 anos em tratamento quimioterápico e internados no serviço de hematologia pediátrica no Hospital de Clínicas de Porto Alegre e no Hospital da Criança Santo Antônio.

5.3 AMOSTRA

Foram incluídos 64 pacientes em tratamento quimioterápico no Hospital de Clínicas de Porto Alegre e no Hospital da Criança Santo Antônio, independente da doença onco-hematológica de base, que apresentaram neutropenia febril e necessitaram de antibioticoterapia no período de três anos de desenvolvimento deste projeto.

A suspeita de infecção foi definida como: todos aqueles que apresentaram um episódio de febre $>38.3^{\circ}\text{C}$ ou dois episódios de febre de 38°C em 24h em vigência de neutropenia (neutrófilos totais $< 500/\text{mm}^3$) e que iniciaram antibioticoterapia empírica e investigação para sepse.

Para inclusão no grupo de casos foi considerado o episódio de neutropenia febril que evoluiu com culturais positivos. O grupo controle incluiu pacientes com suspeita de infecção nos quais a hemocultura foi negativa.

Foi considerado o episódio individual de neutropenia febril. Desta forma, o mesmo paciente poderia ser incluído mais de uma vez, tratando-se de eventos distintos.

5.4 PRINCIPAIS VARIÁVEIS

1. Índice de CD64.
2. Resultado de culturais.
3. Contagem de leucócitos, VHS e PCR.

5.5 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

1. Pacientes com menos de 18 anos.
2. Pacientes neutropênicos com contagem absoluta de neutrófilos $<500/\text{mm}^3$ ou com contagens entre $500/\text{mm}^3$ e $1000/\text{mm}^3$ que evoluíram com um declínio de $<500/\text{mm}^3$.
3. Um episódio de febre $>38.3^\circ\text{C}$ ou dois episódios de febre de 38°C em 24h.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

1. Pacientes em quimioterapia com febre, porém contagem absoluta de neutrófilos $>1000/\text{mm}^3$.
2. Não aceitar participar do estudo.

5.6 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.

Foram obtidas amostras de sangue periférico (0,5ml) após o primeiro episódio de febre no momento da coleta dos culturais.

As amostras de sangue foram imediatamente transportadas ao laboratório de citometria de fluxo do HCPA (Laboratório de Hematologia Clínica) em horários úteis, ou foram refrigeradas à (4°C) quando coletados à noite ou em finais de semana (as amostras podem ficar refrigeradas até 48h, conforme orientação do fabricante).

As amostras foram transportadas do laboratório da Santa Casa de Misericórdia para o laboratório do HCPA em recipiente apropriado (térmicamente isolado e identificado), conforme as normas de biossegurança da ANVISA (Agência nacional de Vigilância Sanitária) para transporte de material biológico.

A expressão do CD64 nos neutrófilos foi medida por citometria de fluxo quantitativa com um citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, NY, EUA) com a utilização do kit Leuko64 (TrilliumDiagnostics, LLC, Me, EUA).

Este kit é composto por três anticorpos específicos para CD64 (clones 22 e 32.2, ambos conjugados com FITC(isotiocianato de fluoresceína). A preparação da amostra foi realizada conforme orientação do laboratório produtor do kit. Com o objetivo de melhorar a qualidade do exame, foi realizada a concentração dos leucócitos (*Buffycoat*).

O método de concentração de leucócitos consiste em concentrar os elementos celulares, de modo a facilitar a análise dos neutrófilos na população leucopênica(SANTOS, BANDEIRA *et al.* 2009).

As amostras foram separadas em tubos de Fischer, centrifugadas por 12 minutos a 1500G por duas vezes. Depois da centrifugação, a nuvem de leucócitos foi separada com pipetas de *Pasteur* e por fim foi realizada a contagem de leucócitos no analisador hematológico. Após, as hemácias foram lisadas com uma solução de lise padrão. Adicionamos o reagente C (beads fluorescentes) e por fim realizamos a quantificação com o citômetro de fluxo.

Na etapa da quantificação do CD64, as células (neutrófilos) foram analisadas no citômetro de fluxo FACScalibur® (BD Biosciences, San Jose, Calif, USA) com o kit Leuko64™ (TrilliumDiagnostics, Brewer, Me, USA), que consiste em uma imunofenotipagem quantitativa por citometria de fluxo através da reação Ag-Ac com “beads” fluorescentes.

O kit é composto por três anticorpos monoclonais com especificidade para CD64 (ambos conjugado com isotiocianato de fluoresceína - FITC) e CD163 (clone Mac2-158, conjugado *phycoerythrin* - PE), por um reagente lisante concentrado e por uma suspensão fluorescente “bead”, que é usada para calibração e padronização do aparelho para a expressão de CD64 e CD163 em leucócitos no sangue de humanos.

O preparo da amostra consistiu de: 50µL de sangue total foi colocado para incubar 15 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz com 50µL do reagente A (composto por um coquetel de anticorpos monoclonais anti-CD64 FITC mais o anticorpo monoclonal anti-CD163 PE). Após, foi adicionado 1,0mL de solução TrilliumLyse e novamente se incubou por 15 minutos em temperatura ambiente na câmara escura. Em seguida, se adicionou 5,0µL do reagente C (Leuko64 beads) e adquiriu-se 100.000 eventos no citômetro de fluxo dentro de 24h.

Os linfócitos foram utilizados como controle interno negativo ($CD64 < 1,0$) e os monócitos como controle interno positivo ($CD64 > 1,0$). Os resultados das amostras ($CD64$ polimorfonuclear - PMN) só foram considerados fidedignos se o controle interno positivo e o negativo atingissem os valores esperados.

5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados descritivos, como idade e sexo foram sumarizados em média e frequências simples. Para analisar o potencial do índice de $CD64$ em prever uma hemocultura positiva foi utilizada curva ROC.

Para a correlação das variáveis leucócitos, VSG e PCR com o índice de $CD64$ e com a hemocultura foi usado o teste de Mann-Whitney. Para analisar a existência de relação entre a evolução linear dos valores do PCR com os resultados dos culturais foi utilizado um teste chi-quadrado (χ^2) de Pearson.

Todas as análises foram feitas utilizando-se do programa SPSS versão 22.0P $< 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

O cálculo do tamanho amostral foi baseado em dados prévios da literatura (ICARDI *et al.*, 2009) e para detectar uma diferença no índice de $CD64$ de $2,4 \pm 1,98$ para os negativos e $4,8 \pm 4,28$ para os positivos, considerou-se o poder de 90% e o nível de significância de 0,05 sendo necessários 78 episódios de neutropenia (60 negativos e 18 positivos).

5.9 ASPECTOS ÉTICOS

O presente projeto foi realizado através de amostras de sangue de pacientes em quimioterapia. As amostras foram coletadas simultaneamente aos exames de rotina. Portanto, não houve necessidade de expor os pacientes a nenhum novo procedimento. Foram respeitados os princípios de pesquisa em seres humanos.

As medidas para proteção ou minimização dos desconfortos e riscos resumiram-se a restringir o acesso aos dados obtidos durante a pesquisa apenas aos pesquisadores e aos envolvidos durante a coleta de dados. Os pesquisadores assinaram um termo de compromisso de confidencialidade.

Após explicação detalhada dos possíveis riscos e benefícios do trabalho aos pacientes ou aos seus responsáveis, o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi aplicado. (Anexo 1).

Só foram incluídos pacientes cujos pais ou responsáveis tenham assinado o termo de consentimento. Todos os pacientes que receberam o TCLE aceitaram participar do estudo.

6. ORÇAMENTO

Foram utilizados dois kits de reagentes para CD64. O custo dos reagentes de CD64 foi subsidiado pelo FIPE. O hemograma, VSG, PCR e os culturais foram coletados rotineiramente pela equipe assistente, não incorrendo, portanto em gastos extras para a realização deste trabalho.

7. RESULTADOS

DESCRIÇÃO DA POPULAÇÃO

As tabelas e as figuras descrevem os dados obtidos após a análise. No total foram analisados 71 episódios de neutropenia na amostra. Para melhor análise, foram excluídos 4 pacientes por apresentarem hemocultura positiva para fungos. Com relação às perdas, 3 eventos foram excluídos por não terem sido analisados no tempo previsto. 64 pacientes preencheram os critérios de inclusão e foram elegíveis para o estudo.

Foi possível observar que a idade média dos participantes da pesquisa foi de 7,6 anos, com um desvio-padrão de 5,1 anos. A distribuição por gênero também foi equilibrada, sendo 28 episódios em meninos (43,8%) e 36 em meninas (56,3%) (Tabela 1). Dos 64 episódios incluídos no estudo, 13 foram relativos a pacientes que apresentaram mais de dois episódios distintos de neutropenia e foram classificados como eventos distintos, sendo, portanto incluídos mais de uma vez no estudo. Dos 64 eventos de neutropenia incluídos, 14 apresentaram hemoculturas positivas e 50 negativas (Tabela 1).

Tabela 1 – Características da amostra

Distribuição da população por idade, sexo e cultural	
Idade média	7,6(DP 5,1)
Sexo	
Masculino	28(43,8%)
Feminino	36(56,3%)
Hemoculturas	
Positivo	14 (21%)
Negativo	50 (79%)

Com relação ao índice de CD64, no grupo positivo, a mediana foi de 2,71 com intervalo interquartílico de 1,87. É possível observar, no histograma da figura 4, que a grande maioria dos episódios do grupo positivo evoluiu com índice <4 .

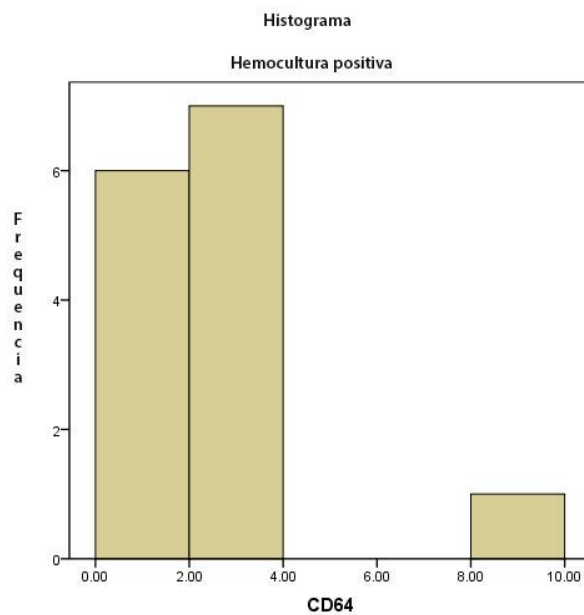


Figura 4: Histograma de frequência de culturais positivos e o índice de CD64

No grupo das hemoculturas negativas, a mediana foi de 1,76 com intervalo interquartílico de 2,9 (Tabela 2). É possível observar, no histograma da figura 2, que a grande maioria dos eventos do grupo negativo evoluiu com índice >1 , com alguns evoluindo com índices <4 .

Tabela 2 – Estatísticas descritivas do Índice de CD64 por grupo

		Índice de CD64	
Hemocultura positiva			
	Mediana	2,1	Var=3,9
	Mínimo	0,24	
	Máximo	8,06	
	Intervalo interquartílico	1,87	
Hemocultura negativa			
	Mediana	1,76	Var=5,02
	Mínimo	0,24	
	Máximo	12,4	
	Intervalo interquartílico	2,9	

Para avaliar a normalidade foi utilizado o teste deKolmogorov-Smirnov.

É possível observar, no histograma da figura 5, que a grande maioria dos episódios do grupo negativo evoluiu com índices <5.

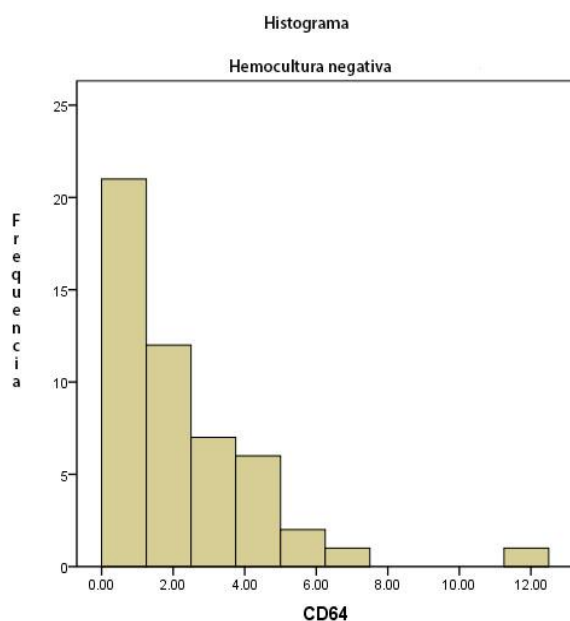


Figura 5: Histograma de frequência de culturais negativos e o índice de CD64

Na tabela 3 podemos observar a distribuição das doenças de base dos episódios de neutropenia, sendo que 45 dos episódios ocorreram em pacientes com neoplasias hematológicas e 19 com tumores sólidos. No grupo das doenças hematológicas, 9 apresentaram hemoculturas positivas e 36 negativas, enquanto que os pacientes do grupo de tumores sólidos, 5 evoluíram com hemocultura positiva e 14 com hemocultura negativas.

Tabela 3– Doenças de base e resultados nas hemoculturas

Doenças	Resultado das Hemoculturas		Total
	Positivo	Negativo	
Neoplasias hematológicas	9(20%)	36(80%)	45
Tumores sólidos	5(26%)	14(74%)	19

Observamos que houve o crescimento de *Staphylococcuscoagulase negativo* em 3 episódios, *Escherichia coli* em 2, *Pseudomonasaeruginosa* em 2, *Klebsiellapneumoniae* em 2, *Enterobactercloacae* em 1, *Haemophilus sp.* em 1, *Streptococcusdysgalactiae* em 1, *S. hominis* em 1, *Raulstoniamannitolilytica* em 1 (Tabela 4).

Tabela 4– Microorganismos isolados nos culturais

Espécies	n
<i>Staphylococcuscoagulase negativo</i>	3
<i>Escherichia coli</i>	2
<i>Pseudomonasaeruginosa</i>	2
<i>Klebsiellapneumoniae</i>	2
<i>Enterobactercloacae</i>	1
<i>Haemophilus sp.</i>	1
<i>Streptococcusdysgalactiae</i>	1
<i>S. hominis</i>	1
<i>Raulstoniamannitolilytica</i>	1

RESULTADO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA.

Na figura 6, foram analisadas curvas ROC para todas as variáveis envolvidas neste estudo. Neste gráfico é possível observar que todas passaram pelo campo negativo e também pelo campo positivo ao menos uma vez, o que sugere que nenhuma das variáveis em questão foi capaz de prever o resultado dos culturais. Na tabela 5 podemos observar os resultados referentes a Área sob a Curva (AUC).

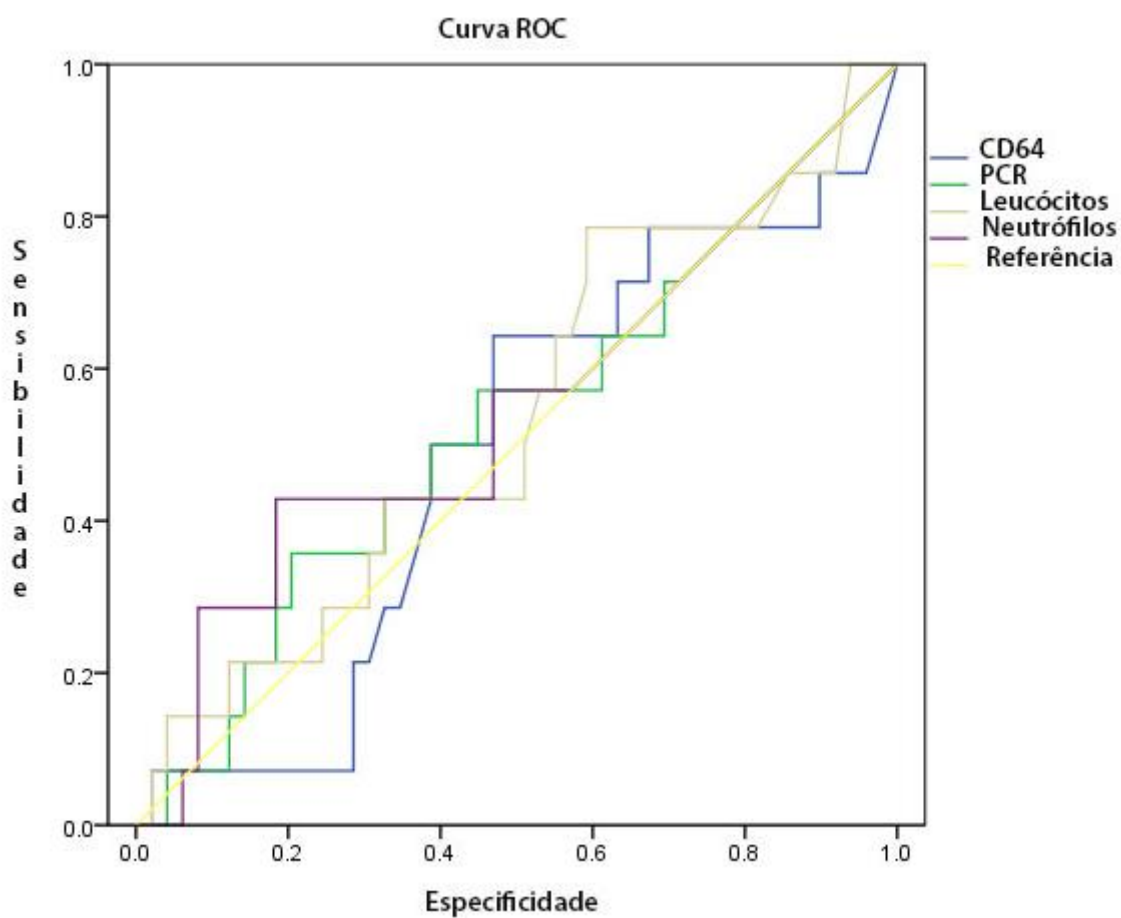


Figura 6: Curva ROC avaliando a capacidade de o índice de CD64, PCR, Leucócitos e Neutrófilos em prever o resultado de uma hemocultura.

Tabela 5– Área sob a Curva ROC

AUC (Area Under the Curve)		
	Área	Significância assintótica
CD64	0,491	0,914
PCR	0,529	0,741
Leucócitos	0,535	0,692
Neutrófilos	0,548	0,585

Tabela 6– Categorização do índice de CD64 comparado com as hemoculturas

Índice de Cd64 e hemoculturas			
Índice de CD64 categorizado	Hemocultura		Total
	positivo	negativo	
positivo	9	29	38
negativo	5	21	26
Total	14	50	64

O índice de CD64 foi categorizado considerando-se positivo quando $>1,19$ e negativo se $<1,19$ (ICARDI *et al.*, 2009). Observamos as medidas de eficácia do exame: Sensibilidade de 64,3%, especificidade de 42% com valor preditivo positivo de 23,7% e valor preditivo negativo de 80% (Tabela 6 e Tabela 8).

Tabela 7 – Categorização do PCR comparado com as hemoculturas

PCR categorizado e hemoculturas		Hemocultura		Total
		positivo	negativo	
PCR categorizado	positivo	10	34	44
	negativo	4	16	20
Total		14	50	64

O PCR foi categorizado com base no valor de referência do laboratório que realizem positivos se > 4 e negativos se < 4 . Observamos as medidas de eficácia do exame: Sensibilidade de 71,4%, especificidade de 32% com valor preditivo positivo de 22,7% e valor preditivo negativo de 80% (Tabela 7 e Tabela 8).

Tabela 8– Medidas de eficácia do índice de CD64 e PCR

Porcentagens de eficácia		
	Índice de CD64	PCR
Sensibilidade	64,3%	71,4%
Especificidade	42%	32%
Valor preditivo positivo	23,7%	22,7%
Valor preditivo negativo	80,8%	80%

Ao correlacionarmos o índice de CD64 e o resultado da hemocultura, obtivemos um resultado de teste bi-lateral de 0,63. Não houve relacionamento entre ambos (Figura 7 e Tabela9).

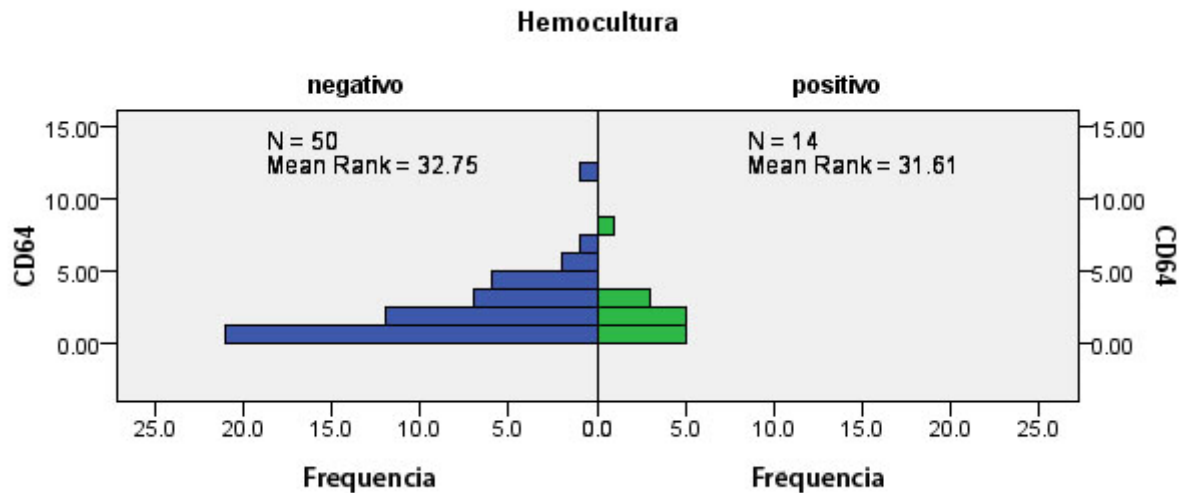


Figura 7: Teste de Mann-Whitney índice CD64 e Hemoculturas

Na figura 8 e tabela 9, quando observamos a correlação entre o CD64 e o PCR categorizado, obtivemos um resultado de teste bi-lateral de 0,84. Não houve relacionamento entre ambos.

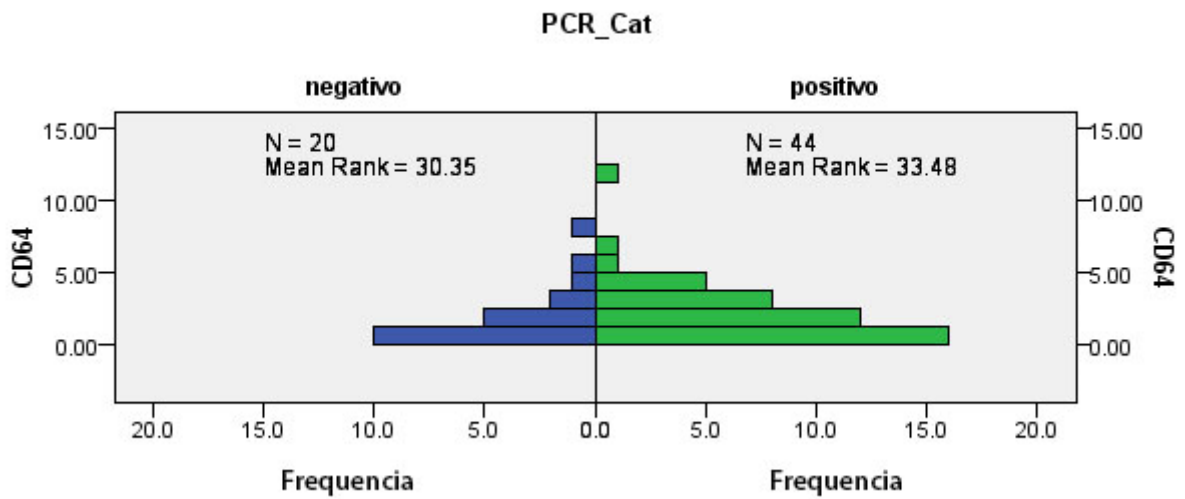


Figura 8: Teste de Mann-Whitney CD64 e PCR-categorizado.

Ao analisarmos a correlação entre o CD64 e o valor do VSG, obtivemos um resultado de teste bi-lateral de 0,02. Porém, considerando a expressiva quantidade de testes com valor zero de VSG, este resultado provavelmente deve-se ao acaso (Figura 9 e Tabela9).

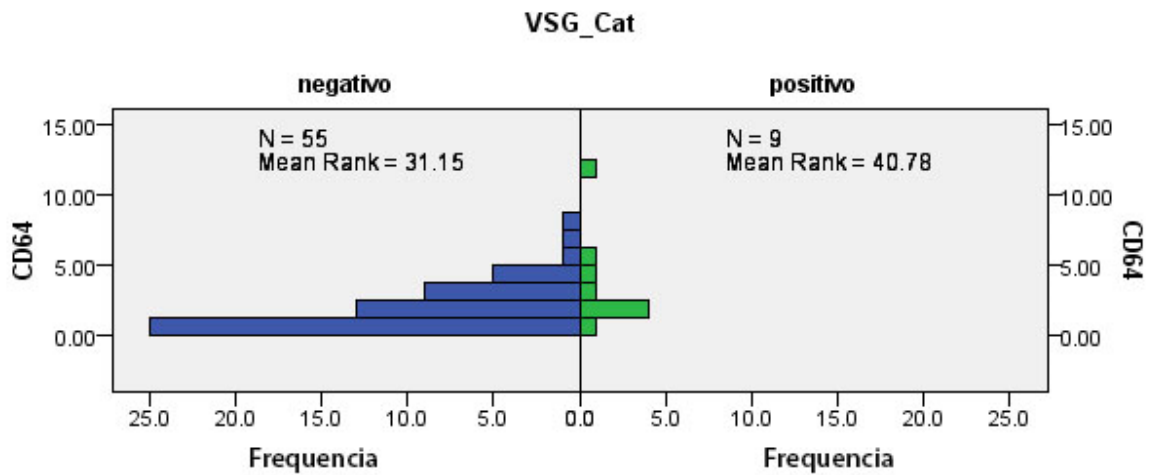


Figura 9: Teste de Mann-Whitney CD64 e VSG-categorizado.

A correlação entre o resultado da hemocultura e o número de leucócitos evidenciou um resultado de teste bi-lateral de 0,48, o que sugere não haver relacionamento entre ambos (Figura 10 e Tabela9).

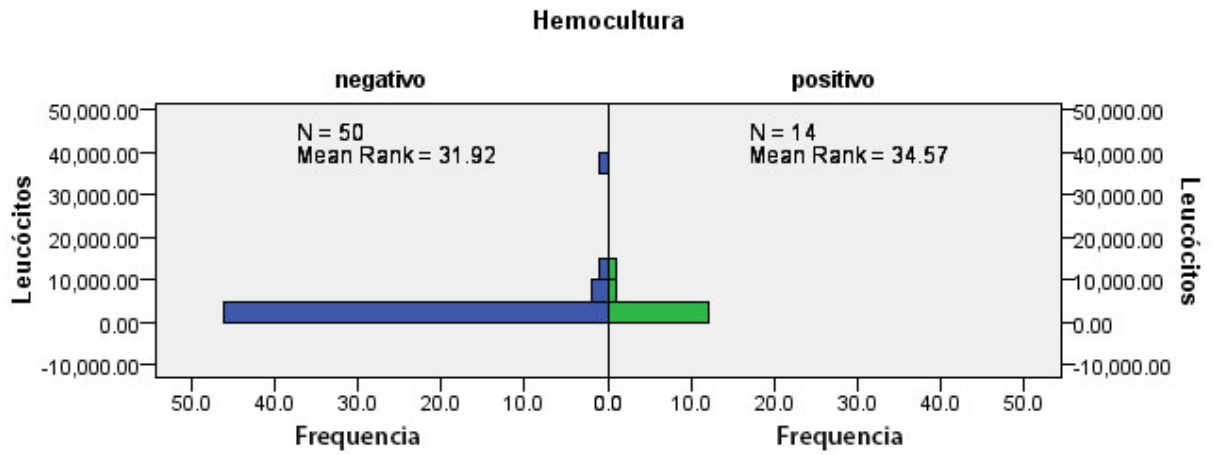


Figura 10: Teste de Mann-Whitney Leucócitos e Hemoculturas.

Quando observada a correlação entre a hemocultura e o valor da PCR, não foi possível observar uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos(Figura 11 e Tabela9).

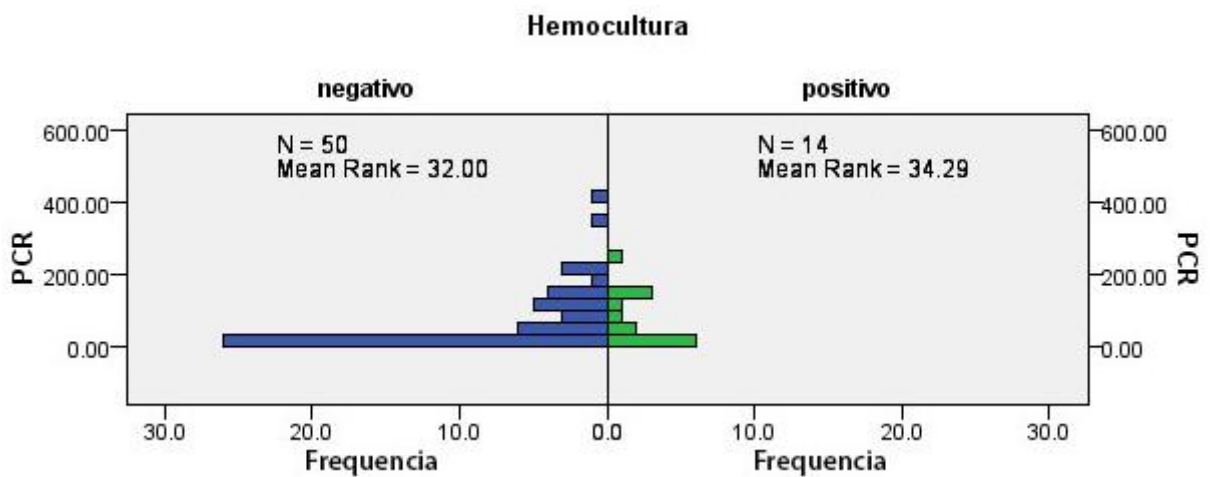


Figura 11: Teste de Mann-Whitney PCR e Hemoculturas.

Relativo à correlação entre as hemoculturas e o valor do VSG, não foi possível evidenciar diferenças significativas entre os grupos (Figura 12 e Tabela 9).

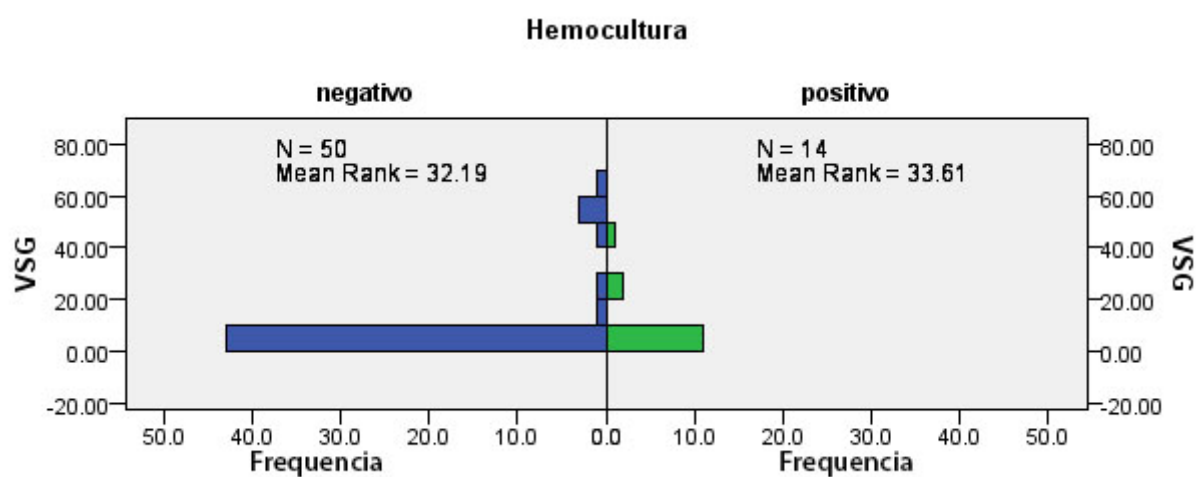


Figura 12: Teste de Mann-Whitney VSG e Hemoculturas.

Tabela 9 – Expressão de CD64 e hemocultura

Comparações entre os grupos	
CD64 e Hemocultura	U = 362 Teste bi-lateral: 0,20
CD64 e PCR categorizado	U = 357 Teste bi-lateral: 0,53
CD64 e VSG categorizado	U = 173 Teste bi-lateral: 0,15
Hemocultura e Leucócitos	U = 321 Teste bi-lateral: 0,64
Hemocultura e PCR	U = 325 Teste bi-lateral: 0,68
Hemocultura e VSG	U = 334 Teste bi-lateral: 0,70

Quando observamos o aumento linear nos valores da PCR, não conseguimos evidenciar diferença estatísticamente significativa entre os grupos positivo e negativo (Tabela 10).

Tabela 10 – Percentis dos Valores de PCR e Hemocultura

Valores lineares do PCR em mg/L	Percentis	Hemocultura		
		Positivo	Negativo	total
	0 a 1	4	15	19
	2 a 32,95	2	11	13
	32,96 a 114	3	13	16
	>114,01	5	11	16
Total		14	50	64

Para analisar a existência de relação entre a evolução linear dos valores do PCR com os resultados dos culturais foi utilizado um teste chi-quadrado (χ^2) de Pearson, obtendo-se um $p=0,74$.

8.DISSCUSSÃO

O estado de neutropenia febril coloca o paciente em risco de choque séptico, frequentemente com poucas manifestações clínicasevidentes no momento mais inicial da doença. Deste modo, os esforços em diagnosticar a positividade de hemoculturas precocemente neste paciente são de suma importância. Ao serem expostos à patógenos, os neutrófilos ficam ativados, e é possível observar este estado tardiamente através de microscopia óptica, ao visualizarmos as granulações tóxicas.

Porém, com a análise por citometria de fluxo da expressão de marcadores de superfície, podemos evidenciar o estado de ativação neutrofílica de forma mais precoce ainda (LIVADITI *et al.*, 2006).Nos últimos anos, o foco de diversos estudos para identificar estes tipos de biomarcadores de infecção bacteriana têm sido no receptor CD64 na superfície dos neutrófilos.

A elevação do índice de CD64 em um estudo com amostragem limitada em pacientes adultos com sepse grave teve uma sensibilidade comparável à da procalcitonina, porém, com melhor especificidade (CARDELLI *et al.*, 2008). Outro estudo com a quantificação do CD64 também foi capaz de correlacionar à progressão na gravidade da sepse em pacientes adultos (LIVADITI *et al.*, 2006). Ambos os estudos foram considerados pequenos, pois utilizaram uma amostragem de pacientes relativamente baixa.

Um estudo prospectivo publicado recentemente utilizando o CD64 no contexto da UTI Neoincluiu 700 pacientes e realizou mais de mil avaliações de sepse. Nesta população, a prevalência de sepse foi baixa (5%) e a maioria dos casos esteve relacionada ao desenvolvimento tardio de sepse. A elevação da expressão do CD64 nos neonatos evidenciou uma sensibilidade de 75% e uma especificidade de 77% (STREIMISH *et al.*, 2012).

Outro estudo observou que a área sob a curva ROC (0,903) evidenciou a capacidade do índice de CD64 em prever a positividade dos culturais com a sensibilidade e especificidade de 91,7 % e 88,9 %, respectivamente. (SONI *et al.*, 2013).

No presente estudo avaliamos a utilidade do CD64 para prever a positividade da hemocultura. Avaliamos também a associação da magnitude do índice de CD64 com hemoculturas positivas. A correlação do índice de CD64 com os valores do PCR e do VSG foi analisada. Foram registradas também medidas de eficácia tanto do índice de CD64 quanto da PCR.

A mediana do índice de CD64 encontrada foi semelhante nos dois grupos. Assim como os testes de Mann-Whitney e curva ROC (0,491) não foram capazes de evidenciar relação entre o valor do índice de CD64 e a positividade das hemoculturas. O índice de CD64 também não se mostrou correlacionado com a positividade da PCR.

Quando categorizado, considerando-se positivo quando $>1,19$ e negativo se $<1,19$, observamos que as medidas de eficácia do exame (sensibilidade de 64,3% e especificidade de 42%) foram inferiores às descritas na literatura (STREIMISH *et al.*, 2012). Deste modo os resultados encontrados neste estudo estão em desacordo com dados previamente relatados na literatura (ICARDI *et al.*, 2009), em populações de pacientes não neutropênicos.

Não existem dados na literatura que avaliem o CD64 em população específica de neutropênicos. Com isso índice de CD64 não se mostrou adequado para avaliar a positividade de infecção nesta população específica de pacientes com neutropenia febril.

Esta discordância pode ser por não termos alcançado o n calculado, entretanto a ausência de uma tendência sugere que o aumento da amostra não resultaria em melhores resultados. Neste estudo, nós obtivemos apenas 64 pacientes, sendo 50 do grupo negativo e 14 do grupo positivo. O percentual de hemoculturas positivas observado neste estudo foi de 20%, o que é condizente com a literatura.

É possível que muitos casos negativos também sejam de causa bacteriana, Por este motivo o delineamento foi caso controle e a não evidencia de maior expressão de CD64 poderia justificar a baixa sensibilidade do método.

O estado dos neutrófilos após a exposição à quimioterapia também pode ter influenciado o resultado observado. Em pacientes com câncer de mama que receberam quimioterápicos, houve uma supressão na capacidade migratória do neutrófilo (MENDONÇA *et al.*, 2006, MENDONÇA *et al.*, 2014). Deste modo, a toxicidade dos quimioterápicos pode ter exercido influência na capacidade de ativação dos neutrófilos nas crianças avaliadas e com isso também ter influenciado no resultado encontrado.

Quando analisamos os valores lineares da PCR entre os grupos com hemocultura positiva e negativa, não foi possível observar que houve diferença estatisticamente significativa entre estes. Isto é sugestivo de que a elevação numérica deste valor não esteja correlacionada com a presença de infecção bacteriana. Este dado está em acordo com dados publicados anteriormente (KASSAM *et al.*, 2009).

9.CONCLUSÕES

Neste estudo não se evidenciou relação entre o valor do índice de CD64 e a positividade das hemoculturas. Além disso, o índice de CD64 não se correlacionou com a positividade do PCR. Portanto, em discordância com dados publicados para populações de pacientes não-neutropênicos, o índice de CD64 não se mostrou adequado para prever a positividade de culturais nesta população específica de pacientes com neutropenia febril e assim foi falho em caracterizar pacientes com maior risco de infecção bacteriana.

Com relação ao PCR, não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de PCR nos grupos de hemoculturas. Este dado sugere que a elevação numérica deste valor não é indicativo isolado de positividade de culturais nos pacientes neutropênicos.

O PCR é frequentemente utilizado como um teste qualitativo, sendo considerados valores >4 positivos e abaixo disso negativos. É um indicador extremamente sensível de inflamação sendo útil para avaliar a presença ou a ausência de processo inflamatório. Porém, quando não se mostrou adequado quando utilizado de forma quantitativa para prever a positividade de uma hemocultura em crianças com neutropenia febril.

10.REFERÊNCIAS

1. Avabratha, K. S., A. T. Rau, P. Venkataravanamma and A. Rau (2009). "Significance of C-reactive protein during febrile neutropenia in pediatric malignancies." *Indian Pediatr* 46(9): 797-799.
2. Basu, S. K., I. D. Fernandez, S. G. Fisher, B. L. Asselin and G. H. Lyman (2005). "Length of stay and mortality associated with febrile neutropenia among children with cancer." *J Clin Oncol* 23(31): 7958-7966.
3. Borregaard, N. and J. B. Cowland (1997). "Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte." *Blood* 89(10): 3503-3521.
4. Burgoyne, R. D. and A. Morgan (2003). "Secretory granule exocytosis." *Physiol Rev* 83(2): 581-632.
5. Cardelli, P., M. Ferraironi, R. Amodeo, F. Tabacco, R. A. De Blasi, M. Nicoletti, R. Sessa, A. Petrucca, A. Costante and P. Cipriani (2008). "Evaluation of neutrophil CD64 expression and procalcitonin as useful markers in early diagnosis of sepsis." *Int J Immunopathol Pharmacol* 21(1): 43-49.
6. Chirouze, C., H. Schuhmacher, C. Rabaud, H. Gil, N. Khayat, J. M. Estavoyer, T. May and B. Hoen (2002). "Low serum procalcitonin level accurately predicts the absence of bacteremia in adult patients with acute fever." *Clin Infect Dis* 35(2): 156-161.
7. Conen, K. (2014). "[Fever with chemotherapy induced neutropenia]." *Ther Umsch* 71(1): 17-22.
8. Davis, B. H. (2005). "Improved diagnostic approaches to infection/sepsis detection." *Expert Rev Mol Diagn* 5(2): 193-207.
9. Dhar, A. and L. Castillo (2011). "Insulin resistance in critical illness." *Curr Opin Pediatr* 23(3): 269-274.
10. Dimoula, A., O. Pradier, Z. Kassenger, D. Dalcomune, H. Turkan and J. L. Vincent (2013). "Serial Determinations of Neutrophil CD64 Expression for the Diagnosis and Monitoring of Sepsis in Critically Ill Patients." *Clin Infect Dis*.
11. Egyed, M., B. Kollár, E. Karádi, P. Rajnics, L. Kocsondi and G. Rumi (2006). "[Neutropenia and sepsis in hematologic patients]." *Orv Hetil* 147(42): 2031-2033.
12. Faix, J. D. (2013). "Biomarkers of sepsis." *Crit Rev Clin Lab Sci* 50(1): 23-36.
13. Fitrolaki, D. M., H. Dimitriou, M. Kalmanti and G. Briassoulis (2013). "CD64-Neutrophil expression and stress metabolic patterns in early sepsis and severe traumatic brain injury in children." *BMC Pediatr* 13: 31.

14. Freycon, F., B. Trombert-Paviot, L. Casagrande, Y. Bertrand, D. Plantaz and P. Marec-Bérard (2008). "Trends in treatment-related deaths (TRDs) in childhood cancer and leukemia over time: a follow-up of patients included in the childhood cancer registry of the Rhône-Alpes region in France (ARCERRA)." *Pediatr Blood Cancer* 50(6): 1213-1220.
15. Genel, F., F. Atlihan, N. Gulez, E. Kazanci, C. Vergin, D. T. Terek and O. C. Yurdu (2012). "Evaluation of adhesion molecules CD64, CD11b and CD62L in neutrophils and monocytes of peripheral blood for early diagnosis of neonatal infection." *World J Pediatr* 8(1): 72-75.
16. Gibson, A. W., X. Li, J. Wu, J. G. Baskin, C. Raman, J. C. Edberg and R. P. Kimberly (2012). "Serine phosphorylation of Fc γ RI cytoplasmic domain directs lipid raft localization and interaction with protein 4.1G." *J Leukoc Biol* 91(1): 97-103.
17. Groselj-Grenc, M., A. Ihan, M. Pavcnik-Arnol, A. N. Kopitar, T. Gmeiner-Stopar and M. Derganc (2009). "Neutrophil and monocyte CD64 indexes, lipopolysaccharide-binding protein, procalcitonin and C-reactive protein in sepsis of critically ill neonates and children." *Intensive Care Med* 35(11): 1950-1958.
18. Hakim, H., P. M. Flynn, D. K. Srivastava, K. M. Knapp, C. Li, J. Okuma and A. H. Gaur (2010). "Risk prediction in pediatric cancer patients with fever and neutropenia." *Pediatr Infect Dis J* 29(1): 53-59.
19. Hallett, M. B. and D. Lloyds (1995). "Neutrophil priming: the cellular signals that say 'amber' but not 'green'." *Immunol Today* 16(6): 264-268.
20. Hann, I., C. Viscoli, M. Paesmans, H. Gaya and M. Glauser (1997). "A comparison of outcome from febrile neutropenic episodes in children compared with adults: results from four EORTC studies. International Antimicrobial Therapy Cooperative Group (IATCG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC)." *Br J Haematol* 99(3): 580-588.
21. Hargrave, D. R., I. I. Hann, S. M. Richards, F. G. Hill, J. S. Lilleyman, S. Kinsey, C. C. Bailey, J. M. Chessells, C. Mitchell, O. B. Eden and M. R. C. W. P. f. C. Leukaemia (2001). "Progressive reduction in treatment-related deaths in Medical Research Council childhood lymphoblastic leukaemia trials from 1980 to 1997 (UKALL VIII, X and XI)." *Br J Haematol* 112(2): 293-299.
22. Harrison, P. T., L. Bjørkhaug, M. J. Hutchinson and J. M. Allen (1995). "The interaction between human Fc gamma RI and the gamma-chain is mediated solely via the 21 amino acid transmembrane domain of Fc gamma RI." *Mol Membr Biol* 12(4): 309-312.
23. Hart, S. P., K. M. Alexander and I. Dransfield (2004). "Immune complexes bind preferentially to Fc gamma RIIA (CD32) on apoptotic neutrophils, leading to augmented phagocytosis by macrophages and release of proinflammatory cytokines." *J Immunol* 172(3): 1882-1887.

24. Hofer, N., E. Zacharias, W. Müller and B. Resch (2012). "An update on the use of C-reactive protein in early-onset neonatal sepsis: current insights and new tasks." *Neonatology* 102(1): 25-36.
25. Hoffmeyer, F., K. Witte and R. E. Schmidt (1997). "The high-affinity Fc gamma RI on PMN: regulation of expression and signal transduction." *Immunology* 92(4): 544-552.
26. Hutchinson, M. J., P. T. Harrison, R. A. Floto and J. M. Allen (1995). "Fc gamma receptor-mediated phagocytosis requires tyrosine kinase activity and is ligand independent." *Eur J Immunol* 25(2): 481-487.
27. Icardi, M., Y. Erickson, S. Kilborn, B. Stewart, B. Grief and G. Scharnweber (2009). "CD64 index provides simple and predictive testing for detection and monitoring of sepsis and bacterial infection in hospital patients." *J Clin Microbiol* 47(12): 3914-3919.
28. Jaye, D. L. and K. B. Waites (1997). "Clinical applications of C-reactive protein in pediatrics." *Pediatr Infect Dis J* 16(8): 735-746; quiz 746-737.
29. Kassam, A., A. K. Chan, B. Dzolganovski, J. Constantin, R. Ramphal, R. Grant and L. Sung (2009). "No association between protein C levels and bacteremia in children with febrile neutropenia." *J Pediatr Hematol Oncol* 31(9): 647-650.
30. Kuderer, N. M., D. C. Dale, J. Crawford, L. E. Cosler and G. H. Lyman (2006). "Mortality, morbidity, and cost associated with febrile neutropenia in adult cancer patients." *Cancer* 106(10): 2258-2266.
31. Lacy, P. (2006). "Mechanisms of degranulation in neutrophils." *Allergy Asthma Clin Immunol* 2(3): 98-108.
32. Lilius, E. M. and J. Nuutila (2012). "Bacterial infections, DNA virus infections, and RNA virus infections manifest differently in neutrophil receptor expression." *ScientificWorldJournal* 2012: 527347.
33. Livaditi, O., A. Kotanidou, A. Psarra, I. Dimopoulou, C. Sotiropoulou, K. Augustatou, C. Papasteriades, A. Armaganidis, C. Roussos, S. E. Orfanos and E. E. Douzinas (2006). "Neutrophil CD64 expression and serum IL-8: sensitive early markers of severity and outcome in sepsis." *Cytokine* 36(5-6): 283-290.
34. Marmer, D. (2014). <http://www.cytometry.org/newsletters/eICCS-2-2/article4.php>. P. Kingma.
35. Mendonça, M. A., F. Q. Cunha, E. F. Murta and B. M. Tavares-Murta (2006). "Failure of neutrophil chemotactic function in breast cancer patients treated with chemotherapy." *Cancer Chemother Pharmacol* 57(5): 663-670.

36. Mendonça, M. A., F. O. Souto, D. C. Micheli, J. C. Alves-Filho, F. Q. Cunha, E. F. Murta and B. M. Tavares-Murta (2014). "Mechanisms affecting neutrophil migration capacity in breast cancer patients before and after chemotherapy." *Cancer Chemother Pharmacol* 73(2): 317-324.
37. Moscucci, O., R. Herring and V. Berridge (2009). "Networking health research in Britain: the post-war childhood leukaemia trials." *20 Century Br Hist* 20(1): 23-52.
38. Nakamura, A., H. Wada, M. Ikejiri, T. Hatada, H. Sakurai, Y. Matsushima, J. Nishioka, K. Maruyama, S. Isaji, T. Takeda and T. Nobori (2009). "Efficacy of procalcitonin in the early diagnosis of bacterial infections in a critical care unit." *Shock* 31(6): 586-591.
39. Paul, M., D. Yahav, A. Fraser and L. Leibovici (2006). "Empirical antibiotic monotherapy for febrile neutropenia: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials." *J Antimicrob Chemother* 57(2): 176-189.
40. Phillips, B., K. Selwood, S. M. Lane, R. Skinner, F. Gibson, J. C. Chisholm and U. K. C. s. C. S. Group (2007). "Variation in policies for the management of febrile neutropenia in United Kingdom Children's Cancer Study Group centres." *Arch Dis Child* 92(6): 495-498.
41. Pritchard-Jones, K., P. Kaatsch, E. Steliarova-Foucher, C. A. Stiller and J. W. Coebergh (2006). "Cancer in children and adolescents in Europe: developments over 20 years and future challenges." *Eur J Cancer* 42(13): 2183-2190.
42. QIAGENGenePathway
<http://www.qiagen.com/products/genes%20and%20pathways/pathway%20details.aspx?pwid=178&action=Accept> . Acessado em junho de 2014
43. Quayle, J. A., F. Watson, R. C. Bucknall and S. W. Edwards (1997). "Neutrophils from the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis express the high affinity immunoglobulin G receptor, Fc gamma RI (CD64): role of immune complexes and cytokines in induction of receptor expression." *Immunology* 91(2): 266-273.
44. Qureshi, S. S., S. M. Lewis, V. A. Gant, D. Treacher, B. H. Davis and K. A. Brown (2001). "Increased distribution and expression of CD64 on blood polymorphonuclear cells from patients with the systemic inflammatory response syndrome (SIRS)." *Clin Exp Immunol* 125(2): 258-265.
45. Ruchaud-Sparagano, M. H., S. C. Stocks, H. Turley and I. Dransfield (1997). "Activation of neutrophil function via CD66: differential effects upon beta 2 integrin mediated adhesion." *Br J Haematol* 98(3): 612-620.
46. Santos, A. P., M. B. Bandeira and L. Siqueira (2009) "Comparação entre diversos métodos de contagem diferencial de leucócitos em pacientes leucopênicos." *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, v. 31, n. 3.

47. Scheinemann, K., M. C. Ethier, L. L. Dupuis, S. E. Richardson, J. Doyle, U. Allen and L. Sung (2010). "Utility of peripheral blood cultures in bacteremic pediatric cancer patients with a central line." *Support Care Cancer* 18(8): 913-919.
48. Schüttrumpf, S., L. Binder, T. Hagemann, D. Berkovic, L. Trümper and C. Binder (2003). "Procalcitonin: a useful discriminator between febrile conditions of different origin in hemato-oncological patients?" *Ann Hematol* 82(2): 98-103.
49. Simon, L., F. Gauvin, D. K. Amre, P. Saint-Louis and J. Lacroix (2004). "Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis." *Clin Infect Dis* 39(2): 206-217.
50. Skrupky, L. P., P. W. Kerby and R. S. Hotchkiss (2011). "Advances in the management of sepsis and the understanding of key immunologic defects." *Anesthesiology* 115(6): 1349-1362.
51. Soni, S., N. Wadhwa, R. Kumar, M. M. Faridi, S. Sharma, A. Chopra and S. Singh (2013). "Evaluation of CD64 expression on neutrophils as an early indicator of neonatal sepsis." *Pediatr Infect Dis J* 32(1): e33-37.
52. Spasova, M. I., J. G. Grudeva-Popova, S. S. Kostyanev, E. D. Genev, A. A. Stoyanova, V. I. Kirina and I. N. Moundjiev (2009). "Risk index score for bacteremia in febrile neutropenic episodes in children with malignancies." *J BUON* 14(3): 411-418.
53. Stearns-Kurosawa, D. J., M. F. Osuchowski, C. Valentine, S. Kurosawa and D. G. Remick (2011). "The pathogenesis of sepsis." *Annu Rev Pathol* 6: 19-48.
54. Streimish, I., M. Bizzarro, V. Northrup, C. Wang, S. Renna, N. Koval, F. Y. Li, R. Ehrenkranz, H. M. Rinder and V. Bhandari (2012). "Neutrophil CD64 as a diagnostic marker in neonatal sepsis." *Pediatr Infect Dis J* 31(7): 777-781.
55. Ulevitch, R. J. and P. S. Tobias (1999). "Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system." *Curr Opin Immunol* 11(1): 19-22.
56. Uzzan, B., R. Cohen, P. Nicolas, M. Cucherat and G. Y. Perret (2006). "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* 34(7): 1996-2003.
57. van de Vyver, A., E. F. Delport, M. Esterhuizen and R. Pool (2010). "The correlation between C-reactive protein and toxic granulation of neutrophils in the peripheral blood." *S Afr Med J* 100(7): 442-444.
58. van Dissel, J. T., P. van Langevelde, R. G. Westendorp, K. Kwappenberg and M. Frölich (1998). "Anti-inflammatory cytokine profile and mortality in febrile patients." *Lancet* 351(9107): 950-953.

59. Zeitoun, A. A., S. S. Gad, F. M. Attia, A. S. Abu Maziad and E. F. Bell (2010). "Evaluation of neutrophilic CD64, interleukin 10 and procalcitonin as diagnostic markers of early- and late-onset neonatal sepsis." *Scand J Infect Dis* 42(4): 299-305.

11. ARTIGO

A expressão de CD64 pode ser usada como preditor de cultura positiva em crianças com neutropenia febril?

Gustavo Göhringer de Almeida Barbosa¹
Mariela Granero Farias²
Helena Cocolichio Ludwig³
Isabel Stensmann⁴
Matheus Vanzin Fernandes⁵
Mariana Bohns Michalowski⁶
Liane Esteves Daudt⁷

RESUMO

A infecção é uma das principais causas de morte em pacientes com doença oncológica. Esta frequentemente apresenta-se como febre associada à neutropenia. O reconhecimento precoce de processos infecciosos em pacientes neutropênicos é dificultado pelo fato destes poderem ter apresentações clínicas variadas e não específicas. Por isso, o suporte de exames diagnósticos é crucial para o correto diagnóstico nesta situação. O CD64 é um marcador de superfície de neutrófilos, detectável por exame de citometria de fluxo e que é pouco expressado em neutrófilos não sensibilizados. Quando o neutrófilo é exposto a TNF-alfa e outros mediadores inflamatórios, este marcador passa a ser ativado e é mensurado através da expressão do Índice de CD64. Este trabalho avaliou a existência de relação entre o valor do índice de CD64 no primeiro dia de neutropenia febril com a positividade da hemocultura. A correlação com outros parâmetros, como número de leucócitos, PCR e VSG também foi avaliada. Este estudo foi do tipo casos e controles, prospectivo, diagnóstico, incluindo 64 pacientes, sendo o grupo de casos (n=14) definido como aquele com hemoculturas positivas e o controle (n=50) com hemoculturas negativas. A mediana do índice de CD64 no grupo de casos foi de 2,1 ($\sigma \pm 3,9$) e para o grupo controles foi de 1,76 ($\sigma \pm 5,02$). Os testes de Mann-Whitney não foram capazes de evidenciar relação entre o valor do índice de CD64 e a positividade das hemoculturas. O índice de CD64 também não se mostrou correlacionado com a positividade do PCR. A curva ROC não evidenciou que o Índice de CD64 foi capaz de prever a positividade de uma hemocultura. Com relação às medidas de eficácia, tivemos: Sensibilidade de 64,3%, especificidade de 42% com valor preditivo positivo de 23,7% e valor preditivo negativo de 80%. O valor linear do PCR não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos das hemoculturas. Para o PCR as medidas de eficácia do exame foram: Sensibilidade de 71,4%, especificidade de 32% com valor preditivo positivo de 22,7% e valor preditivo negativo de 80%. Em desacordo com a literatura, o índice de CD64 se mostrou inadequado para prever a positividade de hemocultura nesta população específica de pacientes com neutropenia febril. O valor linear da PCR também não foi capaz de prever a positividade dos culturais nos neutropênicos febris. Deste modo, ambos os exames não são adequados para prever positividade de culturais em crianças neutropênicas febris.

Unitermos: sepse, neutropenia febril, Índice de CD64, citometria de fluxo, PCR.

¹Mestrando do Programa de Pós Graduação da Saúde da Criança e do adolescente - UFRGS. Hematologista pediátrico. <http://lattes.cnpq.br/5635399041546635>

²Bioquímica do serviço de Citometria de Fluxo do HCPA. Mestre em Medicina pela UFRGS <http://lattes.cnpq.br/8536355762889964>

³Bioquímica pela PUCRS. <http://lattes.cnpq.br/3293651507787698>

⁴Acadêmica de medicina pela UFSCPA <http://lattes.cnpq.br/4862634322860426>

⁵Acadêmico de medicina pela UFSCPA <http://lattes.cnpq.br/4296188544132111>

⁶Professora adjunta do Departamento de Pediatria na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, chefe do Serviço de Oncologia e Hematologia Pediátrica do Hospital da Criança Santo Antônio (Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre). <http://lattes.cnpq.br/3623764715432223>

⁷Professora adjunta do Departamento de Pediatria e Puericultura da Faculdade de Medicina e do Programa de Pós Graduação da Saúde da Criança e Adolescente da UFRGS e médica hematologista pediátrica, chefe do Serviço de Hematologia e Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas de Porto Alegre <http://lattes.cnpq.br/3118130800838141>

Is the CD64 expression capable of predicting a positive blood cultural in patients with febrile neutropenia?

ABSTRACT

Infection is one of the main causes of death in patients with neoplastic disease . This condition often presents as fever with neutropenia, better known as "febrile neutropenia." Early recognition of infectious processes in neutropenic patients is hampered by the fact that these may have dissimilar and non-specific clinical presentations, Thus, laboratory exams have an important role in diagnosing those patients. The CD64 is a neutrophil surface marker, detectable by flow cytometry tests, and is not expressed in non-sensitized neutrophils. When the neutrophil is exposed to TNF-alpha and other inflammatory mediators, it is activated and is measured via the CD64 index. This paperevaluated the existence of a relationship between the index value of CD64 on the first day of febrile neutropenia with a positive blood culture. The correlation with other parameters such as white blood count, CRP and ESR was also evaluated. This is a cases-control, prospective, diagnosis study that included 64 episodes of neutropenia. The cases group($n=14$) was defined by those with positive blood cultures and the control($n=50$) one with negative blood cultures. Because it is a non - parametric variable, we used the Mann-Whitney correlation test to relate the index of CD64 with the result of blood culture in each group and with the other variables. A ROC (Receiver Operating Characteristic) curve was used to assess the competence of the CD64 index to predict the outcome of blood culture. The median rate of CD64 in the case group was 2,1 ($\sigma\pm 3,9$) and controls for the group was 1,76($\sigma\pm 5,02$). The Mann-Whitney tests were not able to show the relationship between the value of CD64 index and the results of blood cultures. The CD64 index was also not correlated with the positivity of CRP. The ROC curve did not show that the CD64 index was able to predict the positivity of blood culture. Regarding efficacy measurmements, sensibility was 64,3%, specificity 42%, positive predictive value 23,7% and negative predictive value 80%. The linear value of CRP showed no statistically significant difference between the groups of blood cultures. For CRP, the efficacy measurements were sensibility 71,4%, specificity 32%, positive predictive value 22,7% and negative predictive value 80%. Therefore CD64 index was not suitable to predict the positivity of blood cultures in this specific population of patients with febrile neutropenia. Also the linear values of CRP showed no statistically significant difference between the blood culture groups. Hence, both exams should not be used in order to predict positivity of cultural in neutropenic febrile children.

Keywords: sepsis, febrile neutropenia, Antigens CD64, flow cytometry, C reactive protein

INTRODUÇÃO

O tratamento do câncer infantil é uma das grandes histórias de sucesso dos cuidados de saúde no final do século 20 (MOSCUCCI *et al.*, 2009). Porém, uma em cada 25 crianças com câncer vai morrer devido a complicações da terapia: trata-se de uma em cada seis mortes (HARGRAVE *et al.*, 2001, FREYCON *et al.*, 2008). Esta frequentemente apresenta-se como febre com neutropenia, mais conhecido como “neutropenia febril” (HANN *et al.*, 1997).

O isolamento de bactérias em fluidos corporais, geralmente sangue, é o método mais específico para diagnóstico de sepse nestes pacientes. Alguns estudos mostraram que a incidência de choque séptico em crianças neutropênicas febris com culturais positivos é de aproximadamente 19% e que 83% dos pacientes que necessitaram de cuidados intensivos apresentam culturais positivos (HOFFMEYER *et al.*, 1997, EGYED *et al.*, 2006, SCHEINEMANN *et al.*, 2010).

O diagnóstico mais precoce de uma infecção nestes pacientes possibilita o início imediato da antibióticoterapia e conseqüentemente, uma melhora na sobrevida (PHILLIPS *et al.*, 2007).

Existem evidências que a contagem de leucócitos neste contexto possui pouco valor para diferenciar o tipo de infecção em todos os grupos de neutropênicos. Porém, alguns estudos mostraram que uma contagem absoluta de neutrófilos menor que 100/mm³ é um preditor independente de sepse em pacientes neutropênicos graves (HAKIM *et al.*, 2010).

Tanto a PCR quanto a procalcitonina são proteínas produzidas na resposta inflamatória. Ambas são bastante utilizadas na prática clínica para diagnosticar e manejar pacientes com sepse. O fato de os níveis de PCR aumentarem durante a fase aguda do processo inflamatório fez com que esta proteína fosse utilizada na clínica para evidenciar a presença de processos infecciosos-inflamatórios ativos, principalmente no contexto da pediatria (JAYE & WAITES, 1997).

A proteína C reativa (PCR) possui resultados controversos, com sensibilidade e especificidade limitadas (AVABRATHA *et al.*, 2009, KASSAM *et al.*, 2009, SPASOVA *et al.*, 2009). Ela parece ser melhor utilizada no início do processo inflamatório, geralmente nas primeiras 24h. Neste

contexto, possui uma sensibilidade maior do que quando utilizada no diagnóstico tardio da sepse (HOFER *et al.*, 2012).

O CD64 é uma glicoproteína de membrana que intermedia a endocitose, a fagocitose, a toxicidade celular anticorpo-dependente, a liberação de citocinas e a geração de superóxido. Ele é expresso regularmente nas superfícies de monócitos e macrófagos (DAVIS 2005).

Em neutrófilos sem estimulação, o CD64 de superfície do neutrófilo é expresso em uma quantidade muito baixa. Entretanto, esta expressão é aumentada de forma quantitativa durante episódios de infecção e/ou sepse (QUAYLE *et al.*, 1997).

Isto ocorre pelo poder de estimulação que as citocinas inflamatórias exercem sobre os neutrófilos. O aumento na densidade da expressão do CD64 ocorre de maneira proporcional ao estímulo das citocinas e permanece estável por 24h (HOFFMEYER *et al.*, 1997).

Após a estimulação dos receptores, os neutrófilos ativados são então mobilizados para o local de inflamação, onde eles encontram sinais que irão induzir a formação de pseudópodos para fagocitose e iniciar a liberação de espécies reativas de oxigênio, que por fim levarão a eliminação do patógeno (HALLET & LLOYDS 1995).

Recentemente observou-se que era possível utilizar a expressão de antígenos de superfície dos leucócitos como marcador para sepse em pacientes de UTI adultos e de UTI-Neo com sensibilidade e especificidade satisfatória (GROSELJ-GRENC *et al.*, 2009, ICARDI *et al.*, 2009, ZEITOUN *et al.*, 2010).

Avanços tecnológicos no campo da citometria de fluxo tornaram possível quantificar a expressão de CD64 de forma rápida, com precisão, com mínimos volumes de amostras sanguíneas, aproximadamente 0,5 ml de sangue.

Sabe-se que em adultos, um índice de CD64 $<1,19$ é preditivo de hemoculturas negativas. Um índice $>1,19$ é preditivo de diagnóstico de culturais positivos com uma sensibilidade e especificidade de 94.6% e 88.7% respectivamente. Os valores preditivos negativos foram 89.8% e 94% (ICARDI *et al.*, 2009).

A relevância do estudo de marcadores precoces de sepse, a exemplo do CD64 é importante , pois permite o início mais precocemente possível da terapia ,além adequar o numero de dias aos quais os pacientes são expostos a antibióticoterapia..

Com isso, um exame que tenha a capacidade de definir um grupo de alto risco de pacientes neutropênicos com febre pode ser extremamente útil, não somente no diagnóstico precoce, mas também no acompanhamento e manejo destes pacientes (SCHÜTTRUMPF *et al.*, 2003).

A expressão de CD64 foi pouco estudada em pacientes neutropênicos. Apesar de haver uma indicação na bula do fabricante do produto com relação à utilização em pacientes neutropênicos, não encontramos nenhuma referência na literatura à utilização deste marcador em neutropênicos de qualquer tipo, muito menos em crianças neutropênicas febris.

O escopo do presente estudo é observar se a expressão de CD64 nos neutrófilos (um índice sensível, rápido e de fácil realização) poderia ser útil para a população em questão. Além disso, objetivamos também analisar o perfil hematológico dos pacientes e observar o comportamento da PCR com relação aos grupos de culturais.

METODOLOGIA

Este é um estudo prospectivo, diagnóstico, do tipo casos e controles que avaliou pacientes entre zero e 18 anos e internados no Serviço de Hematologia Pediátrica no Hospital de Clínicas de Porto Alegre e no Hospital da Criança Santo Antônio. Foram selecionados 71 episódios de neutropenia febril em pacientes em tratamento quimioterápico independente da doença onco-hematológica de base e que necessitaram de antibióticoterapia no período de três anos de desenvolvimento deste projeto. Destes, 64 foram elegíveis para o estudo. Todos os pacientes e seus responsáveis assinaram o TCLE e o estudo foi aprovado nas instituições sob o numero 100559.

A suspeita de infecção foi definida como a presença de um episódio de febre $>38.3^{\circ}\text{C}$ ou dois episódios de febre de 38°C em 24h, em vigência de neutropenia (neutrófilos totais $< 500/\text{mm}^3$) e que iniciaram antibióticoterapia empírica para sepse. O diagnóstico de sepse para inclusão no grupo de casos foi considerado positivo quando da presença de culturais positivos.

O grupo sem sepse incluiu pacientes com suspeita de infecção nos quais a hemocultura foi negativa. Foi considerado o episódio individual de neutropenia febril. Desta forma, o mesmo paciente poderia ser incluído mais de uma vez. Além da expressão de CD64 e resultados das hemoculturas foram avaliados a contagem de leucócitos, VHS (velocidade de hemossedimentação) e PCR. Com relação aos critérios de inclusão, incluímos pacientes com menos de 18 anos, pacientes neutropênicos com contagem absoluta de neutrófilos $<500/\text{mm}^3$ ou com contagens entre $500/\text{mm}^3$ e $1000/\text{mm}^3$ que evoluíram com um declínio de $<500/\text{mm}^3$ associado a um episódio de febre $>38.3^\circ\text{C}$ ou dois episódios de febre de 38°C em 24h. Foram excluídos os pacientes em quimioterapia com febre, porém contagem absoluta de neutrófilos $>1000/\text{mm}^3$, com hemocultura positiva para fungos e também os que não aceitaram participar do estudo.

As amostras de sangue periférico (0,5ml) foram obtidas após o primeiro episódio de febre no momento da coleta dos culturais. A expressão do CD64 nos neutrófilos foi medida por citometria de fluxo quantitativa com um citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, NY, EUA) com a utilização do kit Leuko64 (TrilliumDiagnostics, LLC, Me, EUA).

PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS E QUANTIFICAÇÃO DE CD64

A preparação da amostra foi realizada conforme orientação do laboratório produtor do kit. Com o objetivo de melhorar a qualidade do exame e concentrar os elementos celulares, foi realizada a concentração dos leucócitos (*Buffycoat*). (SANTOS, BANDEIRA *et al.* 2009).

A população de neutrófilos foi analisada no citômetro de fluxo FACSCalibur® (BD Biosciences, San Jose, Calif, USA) com o kit Leuko64™ (TrilliumDiagnostics, Brewer, Me, USA), que consiste em uma imunofenotipagem quantitativa por citometria de fluxo através da reação Ag-Ac com “beads” fluorescentes. O kit é composto por três anticorpos monoclonais com especificidade para CD64 (ambos conjugado com isotiocianato de fluoresceína - FITC) e CD163 (clone Mac2-158, conjugado *phycoerythrin* - PE), por um reagente lisante concentrado e por uma suspensão fluorescente “bead”, que é usada para calibração e padronização do aparelho para a expressão de CD64 e CD163 em leucócitos no sangue de humanos.

O preparo da amostra consistiu de: 50 μ L de sangue total foi colocado para incubar 15 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz com 50 μ L do reagente A (composto por um coquetel de anticorpos monoclonais anti-CD64 FITC mais o anticorpo monoclonal anti-CD163 PE). Após isso, se adicionou 1,0mL de solução TrilliumLyse e novamente se incubou por 15 minutos em temperatura ambiente na câmara escura. Em seguida, se adicionou 5,0 μ L do reagente C (Leuko64 *beads*) e adquiriu-se 100.000 eventos no citômetro de fluxo dentro de 24h.

Os linfócitos foram utilizados como controle interno negativo (CD64<1,0) e os monócitos como controle interno positivo (CD64>1,0). Os resultados das amostras (CD64 polimorfonuclear - PMN) só foram considerados fidedignos se o controle interno positivo e o negativo atingissem os valores esperados.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados descritivos, como idade e sexo foram sumarizados em média e frequências simples. Para analisar o potencial do índice de CD64 em prever uma hemocultura positiva foi utilizada curva ROC. Para a correlação das variáveis leucócitos, VSG e PCR com o índice de CD64 e com a hemocultura foi usado o teste de Mann-Whitney. Para analisar a existência de relação entre a evolução linear dos valores do PCR com os resultados dos culturais foi utilizado um teste chi-quadrado (χ^2) de Pearson. Todas as análises foram feitas utilizando-se do programa SPSS versão 22.0P <0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

O cálculo do tamanho amostral foi baseado em dados prévios da literatura (ICARDI *et al.*, 2009) e para detectar uma diferença no índice de CD64 de 2,4 +- 1,98 para os negativos e 4,8 \pm 4,28 para os positivos, considerou-se o poder de 90% e o nível de significância de 0,05 sendo necessários 78 episódios de neutropenia (60 negativos e 18 positivos).

RESULTADOS

No total foram analisados 71 episódios de neutropenia na amostra. Foram excluídos 4 eventos por apresentarem hemocultura positiva para fungos. Com relação às perdas, 3 eventos foram excluídos por não terem sido analisados no tempo previsto. 64 eventos preencheram os critérios de inclusão e foram elegíveis para o estudo.

Foi possível observar que a idade média dos participantes da pesquisa foi de 7,6 anos, com um desvio-padrão de 5,1 anos. A distribuição por gênero também foi equilibrada, sendo 28 episódios em meninos (43,8%) e 36 em meninas (56,3%) (Tabela 1). Dos 64 episódios incluídos no estudo, 13 foram relativos a pacientes que apresentaram mais de dois episódios distintos de neutropenia e foram classificados como eventos distintos, sendo, portanto incluídos mais de uma vez no estudo. Dos 64 eventos de neutropenia incluídos, 14 apresentaram hemoculturas positivas e 50 negativas (Tabela 2).

Com relação ao índice de CD64, no grupo positivo, a mediana foi de 2,71 com intervalo interquartil de 1,87. No grupo das hemoculturas negativas, a mediana foi de 1,76 com intervalo interquartil de 2,9 (Tabela 2).

Na tabela 3 podemos observar a distribuição das doenças de base dos episódios de neutropenia, sendo que 45 dos episódios ocorreram em pacientes com neoplasias hematológicas e 19 com tumores sólidos. No grupo das doenças hematológicas, 9 apresentaram hemoculturas positivas e 36 negativas, enquanto que os pacientes do grupo de tumores sólidos, 5 evoluíram com hemocultura positiva e 14 com hemocultura negativas.

Observamos que houve o crescimento de *Staphylococcus coagulase negativo* em 3 episódios, *Escherichia coli* em 2, *Pseudomonas aeruginosa* em 2, *Klebsiella pneumoniae* em 2, *Enterobacter cloacae* em 1, *Haemophilus sp.* em 1, *Streptococcus dysgalactiae* em 1, *S. hominis* em 1, *Raoultstonia mannitolilytica* em 1 (Tabela 4).

ANÁLISE ESTATÍSTICA.

Na figura 1 e tabela 5, ao analisarmos a curva ROC, o índice de CD64 passou pelo campo negativo e também pelo campo positivo ao menos uma vez, o que demonstrou que o CD64 não foi capaz de prever o resultado da hemocultura (AUC=0,491).

Com relação à análise do teste de Mann-Whitney para correlacionar o índice de CD64 e o resultado da hemocultura, obtivemos um resultado de teste bi-lateral de 0,20, o que evidencia não haver relacionamento entre ambos. (Tabela 8).

Na tabela 8, quando observamos a correlação entre o CD64 e o PCR categorizado, obtivemos um resultado de teste bi-lateral de 0,53, o que evidencia não haver relacionamento entre ambos. Ao analisarmos a correlação entre o CD64 e o valor do VSG, obtivemos um resultado de teste bi-lateral de 0,15. (Tabela 8).

Quando observada a correlação entre a hemocultura e o valor da PCR, não foi possível observar uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos. (Tabela 8) Os percentis dos valores do PCR não foram significativamente diferentes entre os grupos, o que evidencia que o valor crescente da PCR não é capaz de prever o resultado das hemoculturas. (Tabela 9).

O índice de CD64 foi categorizado considerando-se positivo quando $>1,19$ e negativo se $<1,19$ (ICARDI *et al.*, 2009). Observamos as medidas de eficácia do exame: Sensibilidade de 64,3%, especificidade de 42% com valor preditivo positivo de 23,7% e valor preditivo negativo de 80% (Tabela 6 e Tabela 7).

O PCR foi categorizado com base no valor de referência do laboratório que realizem positivos se > 4 e negativos se < 4 . Observamos as medidas de eficácia do exame: Sensibilidade de 71,4%, especificidade de 32% com valor preditivo positivo de 22,7% e valor preditivo negativo de 80% (Tabela 7).

DISCUSSÃO

O estado de neutropenia febril coloca o paciente em risco de choque séptico, frequentemente com poucas manifestações clínicas evidentes no momento mais inicial da doença. Deste modo, os esforços em diagnosticar a positividade de hemoculturas precocemente neste paciente são de suma importância. Ao serem expostos à patógenos, os neutrófilos ficam ativados, e é possível observar este estado tardiamente através de microscopia óptica, ao visualizarmos as granulações tóxicas.

Porém, com a análise por citometria de fluxo da expressão de marcadores de superfície, podemos evidenciar o estado de ativação neutrofílica de forma mais precoce ainda (LIVADITI *et al.*, 2006). Nos últimos anos, o foco de diversos estudos para identificar estes tipos de biomarcadores de infecção bacteriana têm sido no receptor CD64 na superfície dos neutrófilos.

A elevação do índice de CD64 em um estudo com amostragem limitada em pacientes adultos com sepse grave teve uma sensibilidade comparável à da procalcitonina, porém, com melhor especificidade (CARDELLI *et al.*, 2008). Outro estudo com a quantificação do CD64 também foi capaz de correlacionar à progressão na gravidade da sepse em pacientes adultos (LIVADITI *et al.*, 2006). Ambos os estudos foram considerados pequenos, pois utilizaram uma amostragem de pacientes relativamente baixa.

Um estudo prospectivo publicado recentemente utilizando o CD64 no contexto da UTI Neo incluiu 700 pacientes e realizou mais de mil avaliações de sepse. Nesta população, a prevalência de sepse foi baixa (5%) e a maioria dos casos esteve relacionada ao desenvolvimento tardio de sepse. A elevação da expressão do CD64 nos neonatos evidenciou uma sensibilidade de 75% e uma especificidade de 77% (STREIMISH *et al.*, 2012).

Outro estudo observou que a área sob a curva ROC (0,903) evidenciou a capacidade do índice de CD64 em prever a positividade das culturas com a sensibilidade e especificidade de 91,7 % e 88,9 %, respectivamente. (SONI *et al.*, 2013).

No presente estudo avaliamos a utilidade do CD64 para prever a positividade da hemocultura. Avaliamos também a associação da magnitude do índice de CD64 com hemoculturas positivas. A correlação do índice de CD64 com os valores do PCR e do VSG foi analisada. Foram registradas também medidas de eficácia tanto do índice de CD64 quanto da PCR.

A mediana do índice de CD64 encontrada foi semelhante nos dois grupos. Assim como os testes de Mann-Whitney e curva ROC(0,491) não foram capazes de evidenciar relação entre o valor do índice de CD64 e a positividade das hemoculturas. O índice de CD64 também não se mostrou correlacionado com a positividade da PCR.

Quando categorizado, considerando-se positivo quando $>1,19$ e negativo se $<1,19$, observamos que as medidas de eficácia do exame (sensibilidade de 64,3% e especificidade de 42% - tabela 6 e 7) foram inferiores às descritas na literatura(STREIMISH *et al.*, 2012). Deste modo os resultados encontrados neste estudo estão em desacordo com dados previamente relatados na literatura(ICARDI *et al.*, 2009), em populações de pacientes não neutropênicos.

Não existem dados na literatura que avaliem o CD64 em população específica de neutropênicos. Com isso índice de CD64 não se mostrou adequado para avaliar a positividade de infecção nesta população específica de pacientes com neutropenia febril.

Esta discordância pode ser por não termos alcançado o n calculado, entretanto a ausência de uma tendência sugere que o aumento da amostra não resultaria em melhores resultados. Neste estudo, nós obtivemos apenas 64 pacientes, sendo 50 do grupo negativo e 14 do grupo positivo. O percentual de hemoculturas positivas observado neste estudo foi de 20%, o que é condizente com a literatura.

É possível que muitos casos negativos também sejam de causa bacteriana, Por este motivo o delineamento foi caso controle e a não evidencia de maior expressão de CD64 poderia justificar a baixa sensibilidade do método.

O estado dos neutrófilos após a exposição à quimioterapia também pode ter influenciado o resultado observado. Em pacientes com câncer de mama que receberam quimioterápicos, houve uma supressão na capacidade migratória do neutrófilo(MENDONÇA *et al.*, 2006, MENDONÇA *et al.*, 2014).

Deste modo, a toxicidade dos quimioterápicos pode ter exercido influência na capacidade de ativação dos neutrófilos nas crianças avaliadas e com isso também ter influenciado no resultado encontrado.

Quando analisamos os valores lineares da PCR entre os grupos com hemocultura positiva e negativa, não foi possível observar que houve diferença estatisticamente significativa entre estes. Isto é sugestivo de que a elevação numérica deste valor não esteja correlacionada com a presença de infecção bacteriana. Este dado está em acordo com dados publicados anteriormente (KASSAM *et al.*, 2009).

Neste estudo não se evidenciou relação entre o valor do índice de CD64 e a positividade das hemoculturas. Além disso, o índice de CD64 não se correlacionou com a positividade do PCR. Portanto, em discordância com dados publicados para populações de pacientes não-neutropênicos, o índice de CD64 não se mostrou adequado para prever a positividade de culturais nesta população específica de pacientes com neutropenia febril.

Com relação ao PCR, não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de PCR nos grupos de hemoculturas. Este dado sugere que a elevação numérica deste valor não é indicativo isolado de positividade de culturais nos pacientes neutropênicos.

REFERÊNCIAS

1. AVABRATHA, K. S., A. T. RAU, P. VENKATARAVAMMA and A. RAU **Significance of C-reactive protein during febrile neutropenia in pediatric malignancies.** Indian Pediatr. 2009; 46(9): 797-799
2. CARDELLI, P., M. FERRAIRONI, R. AMODEO, F. TABACCO, R. A. DE BLASI, M. NICOLETTI, R. SESSA, A. PETRUCCA, A. COSTANTE AND P. CIPRIANI . **Evaluation of neutrophil CD64 expression and procalcitonin as useful markers in early diagnosis of sepsis.** Int J Immunopathol Pharmacol. 2008; 21(1): 43-49
3. DAVIS, B. H. **Improved diagnostic approaches to infection/sepsis detection.** Expert Rev Mol Diagn. 2005 5(2): 193-207.
4. EGYED, M., B. KOLLÁR, E. KARÁDI, P. RAJNICS, L. KOCSONDI AND G. RUMI **Neutropenia and sepsis in hematologic patients** Orv Hetil. 2006;147(42): 2031-2033.
5. FAIX, J. D **Biomarkers of sepsis.** Crit Rev Clin Lab Sci. 2013; 50(1): 23-36.
6. FREYCON, F., B. TROMBERT-PAVIOT, L. CASAGRANDA, Y. BERTRAND, D. PLANTAZ AND P. MAREC-BÉRARD. **Trends in treatment-related deaths (TRDs) in childhood cancer and leukemia over time: a follow-up of patients included in the childhood cancer registry of the Rhône-Alpes region in France (ARCERRA).** Pediatr Blood Cancer. 2008; 50(6): 1213-1220.
7. GROSELJ-GRENC, M., A. IHAN, M. PAVCNIK-ARNOL, A. N. KOPITAR, T. GMEINER-STOPAR AND M. DERGANČIĆ. **Neutrophil and monocyte CD64 indexes, lipopolysaccharide-binding protein, procalcitonin and C-reactive protein in sepsis of critically ill neonates and children.** Intensive Care Med. 2009 ; 35(11): 1950-1958.
8. HAKIM, H., P. M. FLYNN, D. K. SRIVASTAVA, K. M. KNAPP, C. LI, J. OKUMA AND A. H. GAUR. **Risk prediction in pediatric cancer patients with fever and neutropenia.** Pediatr Infect Dis J. 2010 ; 29(1): 53-59.

9. HALLETT, M. B. AND D. LLOYDS. **Neutrophil priming: the cellular signals that say 'amber' but not 'green'** *Immunol Today*. 1995 ; 16(6): 264-268.

10. HANN, I., C. VISCOLI, M. PAESMANS, H. GAYA AND M. GLAUSER. **A comparison of outcome from febrile neutropenic episodes in children compared with adults: results from four EORTC studies. International Antimicrobial Therapy Cooperative Group (IATCG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC).** Br J Haematol. 1997 ; 99(3): 580-588.
11. HARGRAVE, D. R., I. I. HANN, S. M. RICHARDS, F. G. HILL, J. S. LILLEYMAN, S. KINSEY, C. C. BAILEY, J. M. CHESSELLS, C. MITCHELL, O. B. EDEN AND M. R. C. W. P. F. C. **Leukaemia. Progressive reduction in treatment-related deaths in Medical Research Council childhood lymphoblastic leukaemia trials from 1980 to 1997 (UKALL VIII, X and XI).** Br J Haematol. 2001 ; 112(2): 293-299.
12. HOFER, N., E. ZACHARIAS, W. MÜLLER AND B. RESCH. **An update on the use of C-reactive protein in early-onset neonatal sepsis: current insights and new tasks.** Neonatology. 2012 ; 102(1): 25-36.
13. HOFFMEYER, F., K. WITTE AND R. E. SCHMIDT. **The high-affinity Fc gamma RI on PMN: regulation of expression and signal transduction.** Immunology. 1997 ; 92(4): 544-552.
14. HUTCHINSON, M. J., P. T. HARRISON, R. A. FLOTO AND J. M. ALLEN. **Fc gamma receptor-mediated phagocytosis requires tyrosine kinase activity and is ligand independent.** Eur J Immunol. 1995 ; 25(2): 481-487.
15. ICARDI, M., Y. ERICKSON, S. KILBORN, B. STEWART, B. GRIEF AND G. SCHARNWEBER **CD64 index provides simple and predictive testing for detection and monitoring of sepsis and bacterial infection in hospital patients.** J Clin Microbiol. 2009 ; 47(12): 3914-3919.
16. JAYE, D. L. AND K. B. WAITES. **Clinical applications of C-reactive protein in pediatrics.** Pediatr Infect Dis J. 1997 ; 16(8): 735-746; quiz 746-737.
17. KASSAM, A., A. K. CHAN, B. DZOLGANOVSKI, J. CONSTANTIN, R. RAMPHAL, R. GRANT AND L. SUNG. **No association between protein C levels and bacteremia in children with febrile neutropenia.** J Pediatr Hematol Oncol. 2009 ; 31(9): 647-650.

18. LIVADITI, O., A. KOTANIDOU, A. PSARRA, I. DIMOPOULOU, C. SOTIROPOULOU, K. AUGUSTATOU, C. PAPASTERIADES, A. ARMAGANIDIS, C. ROUSSOS, S. E. ORFANOS AND E. E. DOUZINAS. **Neutrophil CD64 expression and serum IL-8: sensitive early markers of severity and outcome in sepsis.** Cytokine. 2006 ; 36(5-6): 283-290.
19. MENDONÇA, M. A., F. Q. CUNHA, E. F. MURTA AND B. M. TAVARES-MURTA. **Failure of neutrophil chemotactic function in breast cancer patients treated with chemotherapy."** CancerChemotherPharmacol. 2006 ; 57(5): 663-670.
20. MENDONÇA, M. A., F. O. SOUTO, D. C. MICHELI, J. C. ALVES-FILHO, F. Q. CUNHA, E. F. MURTA AND B. M. TAVARES-MURTA. **Mechanisms affecting neutrophil migration capacity in breast cancer patients before and after chemotherapy.**Cancer ChemotherPharmacol.2014 ; 73(2): 317-324.
21. MOSCUCCI, O., R. HERRING AND V. BERRIDGE. **Networking health research in Britain: the post-war childhood leukaemia trials.**20 Century Br Hist. 2009 ; 20(1): 23-52.
22. PHILLIPS, B., K. SELWOOD, S. M. LANE, R. SKINNER, F. GIBSON, J. C. CHISHOLM AND U. K. C. S. C. S. GROUP. **"Variation in policies for the management of febrile neutropenia in United Kingdom Children's Cancer Study Group centres."** Arch Dis Child.2007 ; 92(6): 495-498.
23. QUAYLE, J. A., F. WATSON, R. C. BUCKNALL AND S. W. EDWARDS. **Neutrophils from the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis express the high affinity immunoglobulin G receptor, Fc gamma RI (CD64): role of immune complexes and cytokines in induction of receptor expression.** Immunology. 1997 ; 91(2): 266-273.
24. SANTOS, A. P., M. B. BANDEIRA AND L. SIQUEIRA .**"Comparação entre diversos métodos de contagem diferencial de leucócitos em pacientes leucopênicos."** Rev. Bras. Hematol. Hemoter.2009 ; v. 31, n. 3.
25. SCHEINEMANN, K., M. C. ETHIER, L. L. DUPUIS, S. E. RICHARDSON, J. DOYLE, U. ALLEN AND L. SUNG. **"Utility of peripheral blood cultures in bacteremic pediatric cancer patients with a central line."** Support Care Cancer. 2010 ; 18(8): 913-919.

26. SCHÜTTRUMPF, S., L. BINDER, T. HAGEMANN, D. BERKOVIC, L. TRÜMPER AND C. BINDER. **Procalcitonin: a useful discriminator between febrile conditions of different origin in hemato-oncological patients?**Ann Hematol. 2003 ; 82(2): 98-103.
27. SPASOVA, M. I., J. G. GRUDEVA-POPOVA, S. S. KOSTYANEV, E. D. GENEV, A. A. STOYANOVA, V. I. KIRINA AND I. N. MOUMDJIEV. **Risk index score for bacteremia in febrile neutropenic episodes in children with malignancies.**J BUON.2009 ; 14(3): 411-418.
28. STREIMISH, I., M. BIZZARRO, V. NORTHRUP, C. WANG, S. RENNA, N. KOVAL, F. Y. LI, R. EHRENKRANZ, H. M. RINDER AND V. BHANDARI. **Neutrophil CD64 as a diagnostic marker in neonatal sepsis.**Pediatr Infect Dis.2012 ; J 31(7): 777-781.
29. ZEITOUN, A. A., S. S. GAD, F. M. ATTIA, A. S. ABU MAZIAD AND E. F. BELL. **Evaluation of neutrophilic CD64, interleukin 10 and procalcitonin as diagnostic markers of early- and late-onset neonatal sepsis.**Scand J InfectDis. 2010 ; 42(4): 299-305.

FIGURAS E TABELAS

Tabela 1 – Características da amostra

Distribuição da população por idade, sexo e cultural	
Idade média	7,6(DP 5,1)
Sexo	
Masculino	28(43,8%)
Feminino	36(56,3%)
Hemoculturas	
Positivo	14 (21%)
Negativo	50 (79%)

Tabela 2– Estatísticas descritivas do Índice de CD64 por grupo

Índice de CD64			
Hemocultura positiva			
	Mediana	2,1	Var=3,9
	Mínimo	0,24	
	Máximo	8,06	
	Intervalo interquartílico	1,87	
Hemocultura negativa			
	Mediana	1,76	Var=5,02
	Mínimo	0,24	
	Máximo	12,4	
	Intervalo interquartílico	2,9	

Para avaliar a normalidade foi utilizado o teste deKolmogorov-Smirnov.

Tabela 3– Doenças de base e resultados nas hemoculturas

Doenças	Resultado das Hemoculturas		Total
	Positivo	Negativo	
Neoplasias hematológicas	9(20%)	36(80%)	45
Tumores sólidos	5(26%)	14(74%)	19

Tabela 4– Microorganismos isolados nos culturais

Espécies	n
<i>Staphylococcuscoagulase negativo</i>	3
<i>Escherichia coli</i>	2
<i>Pseudomonasaeruginosa</i>	2
<i>Klebsiellapneumoniae</i>	2
<i>Enterobactercloacae</i>	1
<i>Haemophilussp.</i>	1
<i>Streptococcusdysgalactiae</i>	1
<i>S. hominis</i>	1
<i>Raulstoniamannitolilytica</i>	1

Tabela 5– Área sob a Curva ROC

AUC (Area Under the Curve)		
	Área	Significância assintótica
CD64	0,491	0,914
PCR	0,529	0,741
Leucócitos	0,535	0,692
Neutrófilos	0,548	0,585

Tabela 6– Categorização do índice de CD64 comparado com as hemoculturas

Índice de Cd64 e hemoculturas			
Índice de CD64 categorizado	Hemocultura		Total
	positivo	negativo	
positivo	9	29	38
negativo	5	21	26
Total	14	50	64

Tabela 7– Medidas de eficácia do índice de CD64 e PCR

Porcentagens de eficácia		
	Índice de CD64	PCR
Sensibilidade	64,3%	71,4%
Especificidade	42%	32%
Valor preditivo positivo	23,7%	22,7%
Valor preditivo negativo	80,8%	80%

Tabela 8 – Expressão de CD64 e hemocultura

Comparações entre os grupos	
CD64 e Hemocultura	U = 362 Teste bi-lateral: 0,20
CD64 e PCR categorizado	U = 357 Teste bi-lateral: 0,53
CD64 e VSG categorizado	U = 173 Teste bi-lateral: 0,15
Hemocultura e Leucócitos	U = 321 Teste bi-lateral: 0,64
Hemocultura e PCR	U = 325 Teste bi-lateral: 0,68
Hemocultura e VSG	U = 334 Teste bi-lateral: 0,70

Tabela 9 – Percentis dos Valores de PCR e Hemocultura

Valores lineares do PCR em mg/L	Percentis	Hemocultura		
		Positivo	Negativo	total
	0 a 1	4	15	19
	2 a 32,95	2	11	13
	32,96 a 114	3	13	16
	>114,01	5	11	16
Total		14	50	64

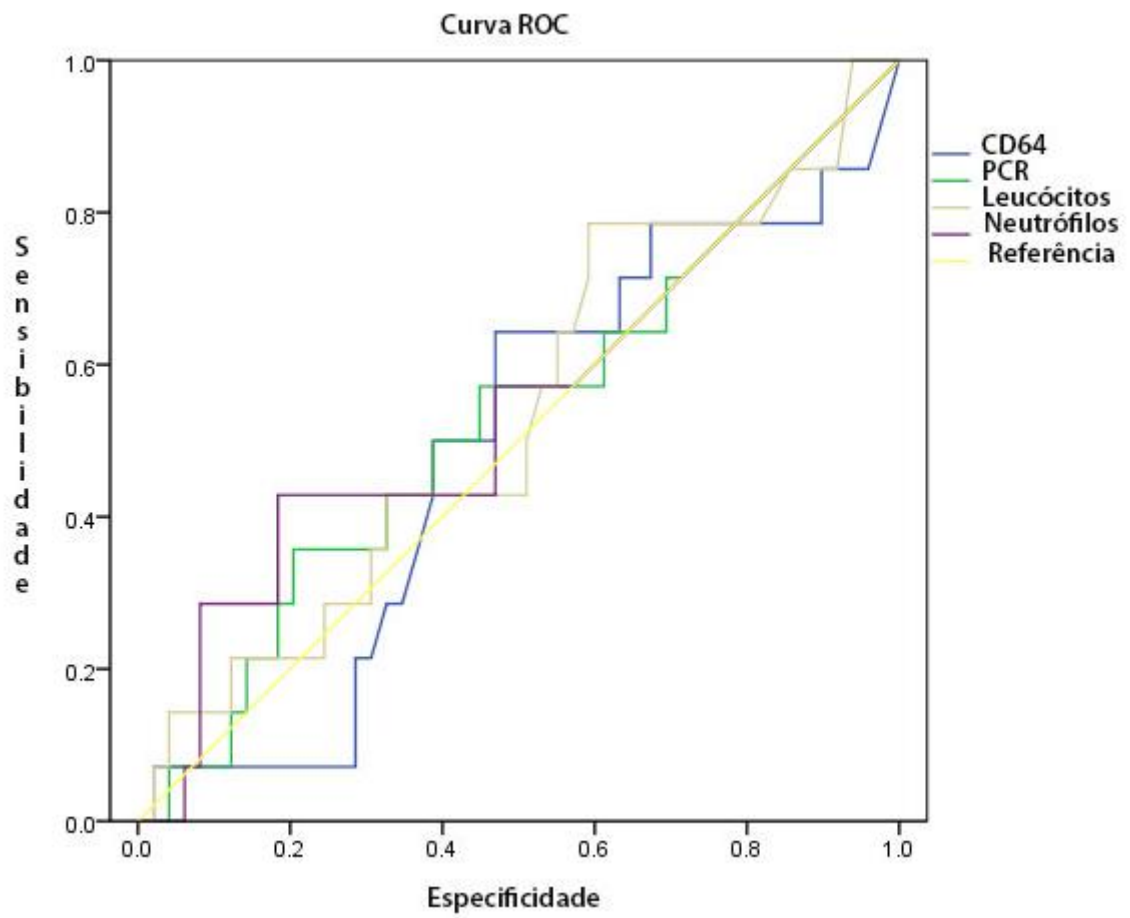


Figura 1: Curva ROC avaliando a capacidade de o índice de CD64, PCR, Leucócitos e Neutrófilos em prever o resultado de uma hemocultura.

12.ANEXOS

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido- 100559

Título da pesquisa: UTILIZAÇÃO DO CD64 COMO MARCADOR DE INFECÇÃO EM CRIANÇAS NEUTROPÊNICAS FEBRIS

Instituição/Departamento: Hematologia pediátrica.

Prezado(a) Senhor(a):

1. Você está sendo convidado(a) a participar desta pesquisa de forma totalmente voluntária.
2. Você tem o direito de desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, sem nenhuma penalidade e sem perder os benefícios aos quais tenha direito.
3. Em hipótese alguma haverão custos para você.
4. Este documento será elaborado em duas vias, sendo que uma ficará com a equipe de pesquisa e outra com o paciente participante.
5. Objetivo do estudo: O objetivo deste projeto é analisar a expressão do marcador CD64 no sangue de pacientes com neutropenia (defesas baixas) e que apresentam febre. O CD64 é um exame que tem como objetivo nos mostrar se existe infecção bacteriana ativa no paciente.
6. Procedimentos. Sua participação nesta pesquisa consistirá apenas em aceitar que a equipe de pesquisa utilize as amostras de sangue que já foram coletados nos exames de rotina para a realização do teste com o CD64.
7. Benefícios. Esta pesquisa trará maior conhecimento sobre o tema abordado, sem benefício direto para você.
8. Confidencialidade. As informações obtidas com as amostras serão confidenciais e de conhecimento apenas dos pesquisadores responsáveis. Os sujeitos da pesquisa não serão identificados em nenhum momento, mesmo quando os resultados desta pesquisa forem divulgados em qualquer forma.
9. Riscos. Toda pesquisa envolvendo seres humanos envolve risco. Porém a participação neste estudo implicará em poucos riscos de ordem física ou psicológica para você. O maior risco identificado consiste na quebra da confidencialidade dos dados coletados no decorrer do estudo. Caso identifiquemos algum risco não previsto neste termo de consentimento no decorrer do estudo, iremos suspendê-lo imediatamente.

- Antes de concordar em participar desta pesquisa, é muito importante que você compreenda as informações e instruções contidas neste documento.
- Os pesquisadores deverão responder todas as suas dúvidas antes que você se decidir a participar.

Pesquisadores:

Gustavo Göhringer de Almeida Barbosa 51-99465370

Aceito participar desta pesquisa.

Assinatura do paciente

Assinatura do responsável

Assinatura do pesquisador que aplicou o questionário.

Data / /