



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO**  
**EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**



**PERFIL DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS EM CRIANÇAS**  
**HOSPITALIZADAS COM PNEUMONIA ADQUIRIDA NA**  
**COMUNIDADE**

Ângela Gomes de Vasconcellos

Tese de doutorado

Salvador (Bahia), 2015

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde,  
SIBI - UFBA.

V331 Vasconcellos, Ângela Gomes de

Perfil de citocinas em crianças com pneumonia adquirida na  
comunidade / Ângela Gomes de Vasconcellos. – Salvador, 2015.

139 f.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cristiana M. Nascimento-Carvalho.

Tese (doutorado) – Universidade Federal da Bahia. Faculdade  
de Medicina, 2015.

1. Pneumonia. 2. Inflamação pulmonar. 3. *Streptococcus  
pneumoniae*. 4. Citocinas. I. Nascimento-Carvalho, Cristiana M. II.  
Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Medicina. III. Título.

CDU: 616.24-002-053.2



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO**  
**EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**



---

**Perfil de citocinas e quimiocinas em crianças hospitalizadas com  
pneumonia adquirida na comunidade**

Ângela Gomes de Vasconcellos

Professora-Orientadora: Cristiana M. Nascimento-Carvalho

Tese apresentada ao Colegiado do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, como pré-requisito obrigatório para a obtenção do grau de Doutora em Ciências da Saúde.

Salvador (Bahia), 2015

## DEDICATÓRIA

À minha querida família, que sempre me apoiou incondicionalmente em todos os meus passos: meus pais Telma Gomes de Vasconcellos e José Vieira de Vasconcellos Neto, minha irmã Lívia Gomes de Vasconcellos, aos meus avós Letícia Barreira de Alencar Vasconcellos e Raymundo Dória de Vasconcellos e à minha avó Vanda Batista Gomes (*in memoriam*).

À Ana Carolina da Silva Gonçalves que esteve presente e me apoiando em todos os momentos desta jornada.

## COMISSÃO EXAMINADORA

### Membros Titulares:

- Maria Ilma Andrade Santos Araújo, Professora-doutora, Pesquisadora do Serviço de Imunologia da Universidade Federal da Bahia, Professora permanente dos Programas de Pós-graduação em Imunologia e em Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.
- Teresa Cristina Martins Vincente Robazzi, Professora adjunta-doutora de Pediatria da Universidade Federal da Bahia.
- Ceuci de Lima Xavier Nunes, Professora adjunta-doutora da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública
- Magda Carneiro Sampaio, Professora titular do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Livre Docente em Pediatria da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
- Cristina de Oliveira Rodrigues, Professora titular do Departamento de Pediatria da Universidade Federal do Paraná

### Membro Suplente:

- Cristiana M. Nascimento-Carvalho (Professora-Orientadora), Professora associada-doutora, Livre Docente em Infectologia Pediátrica da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia

## **EQUIPE**

Aldina Barral, Mestre e Doutora, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - Fundação  
Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia.

Jorge Clarêncio, Mestre e Doutor, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - Fundação  
Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia.

Daniela Andrade, Mestre e Doutoranda, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz -  
Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia.

César A. Araújo-Neto, Radiologista e Doutor, Faculdade de Medicina da Bahia  
Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia.

Maria-Regina A. Cardoso, Mestre e Doutora, Faculdade de Saúde Pública da  
Universidade de São Paulo, São Paulo, Capital.

## INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES

Faculdade de Medicina da Bahia - Universidade Federal da Bahia – Salvador, Brasil

Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ – Salvador,  
Brasil

Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo – São Paulo, Brasil

Turku University Hospital - Turku, Finlândia

National Institute of Public Health and Welfare - Oulu, Finlândia

Department of Virology - University Central Hospital Laboratory Division - Helsinque,  
Finlândia

Department of Virology, Haartman Institute, University of Helsinki – Helsinque,  
Finlândia

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

- Bolsa de Doutorado da CAPES
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB)

Edital: N° PNX 0019/2009



## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Cristiana M. Nascimento Carvalho por sempre confiar em mim e sempre acreditar que podemos caminhar cada vez mais longe, sempre superando os obstáculos. Um agradecimento especial pelo apoio que recebi em um dos momentos mais difíceis da minha vida, ao longo do Doutorado.

À equipe do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz – Aldina Barral, Jorge Clarêncio, Daniela Andrade – que participou do projeto, sempre empenhada para que as etapas fossem cumpridas e superadas da melhor forma possível e pela paciência em me orientar e discutir toda a realização da parte laboratorial do projeto. E à Juqueline Cristal, que também auxiliou neste processo.

À Maria-Regina A. Cardoso, que participou na análise estatística dos dados, de forma muito solícita, e com quem aprendi muito.

À César A. Araújo-Neto, que avaliou as radiografias de tórax.

Ao Grupo de Infectologia Pediátrica, cujas reuniões e convívio me fazem sempre aprender e crescer. Em especial aos colegas Taiane Fonseca, Igor Carmo e Dafne Carvalho Andrade pela amizade e pelo auxílio, força e apoio no que eu precisasse.

Agradeço ao PPgCS e a todos os colegas do programa sempre incentivando os trabalhos uns dos outros.

Agradeço ao apoio das instituições participantes de fora do Brasil, Turku University Hospital – Finlândia; National Institute of Public Health and Welfare - Finlândia; Department of Virology - University Central Hospital Laboratory Division - Helsinque, Finlândia; Department of Virology, Haartman Institute, University of Helsinque Finlândia.

## ÍNDICE

<b>Índice de figuras, gráficos e tabelas</b>	3
<b>Índice de siglas</b>	4
<b>I. Resumo</b>	6
<b>II. Objetivos</b>	8
<b>III. Introdução</b>	9
<b>IV. Metodologia do Estudo</b>	21
<b>V. Resultados</b>	31
<b>VI. Discussão</b>	40
<b>VII. Propostas de Estudo</b>	52
<b>VIII. Conclusões</b>	53
<b>IX. Summary</b>	54
<b>X. Referências Bibliográficas</b>	56
<b>XI. Artigo</b>	68
<b>XII. Anexos</b>	99
<b>ANEXO 1. Termo de consentimento livre e esclarecido</b>	<del>100</del> 100
<b>ANEXO 2. Formulário de Avaliação Clínica</b>	102
<b>ANEXO 3 Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa e pelo Comissão Nacional de Ética em Pesquisa</b>	106

<b>ANEXO 4</b> Normas de publicação do periódico <i>Journal Of Clinical Microbiology</i> para o artigo	109
<b>ANEXO 5.</b> Carta do Periódico confirmando submissão do artigo	120
<b>ANEXO 6.</b> Trabalhos prévios com a descrição das técnicas utilizadas no presente estudo	122

## ÍNDICE DE FIGURAS GRÁFICOS E TABELAS

### FIGURA

**FIGURA 1.** Divisão da amostra para comparação das medianas de concentração de citocinas/quimiocinas séricas em cada grupo. 27

### TABELAS

**TABELA 1.** Características de Base das Crianças Hospitalizadas com Pneumonia Adquirida na Comunidade com Infecção Pneumocócica ou Não Pneumocócica. 31

**TABELA 2.** Comparação das Medianas (Intervalo Interquartil) das Concentrações Séricas das Citocinas/Quimiocinas Detectadas em 166 Crianças Hospitalizadas com Pneumonia Adquirida na Comunidade Pneumocócica ou Não Pneumocócica. 33

### GRÁFICO

**GRÁFICO 1.** Medianas das Concentrações Séricas da Interleucina-6 com o Intervalo Interquartil em Cada Grupo Etiológico. 35

**GRÁFICO 2.** Curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para Interleucina-6 predizer Pneumonia Pneumocócica Adquirida na Comunidade em Crianças. 36

## ÍNDICE DE SIGLAS

<b>CCL2</b>	Do inglês CC chemokine ligands 2
<b>CCL5</b>	Do inglês CC chemokine ligands 5
<b>CD8</b>	Do inglês cluster of differentiation 8
<b>CD4</b>	Do inglês cluster of differentiation 4
<b>CPS</b>	Do inglês pneumococcal capsular polysaccharide C
<b>CXCL9</b>	Do inglês CXC chemokine ligands 9
<b>CXCL10</b>	Do inglês CXC chemokine ligands 10
<b>DNA</b>	Do inglês deoxyribonucleic acid
<b>ELISA</b>	Do inglês enzyme-linked immunosorbent assay
<b>HIV</b>	Do inglês human immunodeficiency virus
<b>IC</b>	Intervalo de confiança
<b>IgM</b>	Imunoglobulina M
<b>IgA</b>	Imunoglobulina A
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IIQ</b>	Intervalo interquartil
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina 1 beta
<b>IL-2</b>	Interleucina 2
<b>IL-4</b>	Interleucina 4
<b>IL-5</b>	Interleucina 5
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IL-8</b>	Interleucina 8
<b>IL-10</b>	Interleucina 10
<b>IL-12</b>	Interleucina 12

<b>IL-17</b>	Interleucina 17
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	Interferon – gama
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeos
<b>NK</b>	Do inglês natural killers
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>OR</b>	Do inglês odds ratio
<b>PAC</b>	Pneumonia adquirida na comunidade
<b>PCR</b>	Do inglês polymerase chain reaction
<b>ROC</b>	Do inglês receiver operating characteristic
<b>SIDA</b>	Síndrome da imunodeficiência adquirida
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Do inglês transforming growth factor beta
<b>Th</b>	Do inglês T helper
<b>TLR</b>	Do inglês toll like receptor
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Do inglês tumor necrosis factor alpha
<b>VSR</b>	Vírus sincicial respiratório

## I. RESUMO

PERFIL DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS EM CRIANÇAS HOSPITALIZADAS COM PNEUMONIA ADQUIRIDA NA COMUNIDADE. Introdução: Pneumonia adquirida na comunidade (PAC) é a principal causa de óbito em crianças abaixo de 5 anos em todo o mundo. No entanto, o diagnóstico etiológico da PAC permanece um desafio em pediatria, além de existir uma escassez de estudos sobre a resposta inflamatória nesta doença. Objetivo: Descrever o perfil de citocinas e quimiocinas detectadas na admissão de crianças com PAC e avaliar se existe associação entre os níveis de citocinas e pneumonia pneumocócica em crianças. Metodologia: Estudo prospectivo realizado no pronto atendimento do Hospital da Universidade Federal da Bahia, em Salvador, Brasil. Crianças hospitalizadas com PAC com idade <5 anos foram avaliadas. Na admissão, dados clínicos e radiológicos foram coletados, assim como amostras biológicas para investigar 19 agentes etiológicos e dosar 14 citocinas/quimiocinas séricas (IL-8, IL-6, IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-5, IFN- $\gamma$ , CCL2, CCL5, CXCL9 e CXCL10). Resultados: Foram incluídas 166 crianças. As citocinas que apresentaram níveis detectáveis foram IL-8, IL-10 e IL-6; com as respectivas medianas (IQR): 78,0 (30,7-244,3) pg/ml, 10,6 (4,6-30,6) pg/ml e 3,6 (3,1-4,4) pg/ml. As quimiocinas detectadas foram CXCL10 e CCL2; as medianas (IQR) calculadas foram: 74,2 pg/ml (36,1-164,8) e 19,1 (10,8-22,8) pg/ml, respectivamente. Infecção pneumocócica foi detectada em 38 (22,9%) casos dentre os quais a mediana de IL-6 (pg/ml) foi 32,2 pg/ml (IIQ: 12,4-54,1 pg/ml). Outros agentes etiológicos (*Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, bactérias atípicas e vírus) foram detectados em 128 (77,1%) casos com a mediana de concentração de IL-6 igual a 9,0 pg/ml (IIQ: 4,1–22,0 pg/ml). Na análise multivariada, com pneumonia pneumocócica

como variável dependente, IL-6 foi preditor independente para infecção pneumocócica (OR=5,6; IC95% = 2,4–12,7; ponto de corte 12,5 pg/ml). O valor preditivo negativo de IL-6 na concentração sérica abaixo de 12,5pg/ml para infecção pneumocócica foi de 90% (IC95% = 82%-95%). Conclusões: Citocinas e quimiocinas inflamatórias séricas são detectáveis na admissão de criança com PAC; a concentração sérica de IL-6 na admissão esta independentemente associada com infecção pneumocócica em crianças abaixo de 5 anos de idade e com PAC.

Palavras-Chaves: 1. Pneumonia; 2. Inflamação pulmonar; 3. *Streptococcus pneumoniae*; 4. Citocinas; 5. Imunidade inata.



## **II. OBJETIVOS**

### **1. GERAL**

Descrever o perfil de citocinas e quimiocinas detectadas na admissão de crianças com pneumonia adquirida na comunidade.

### **2. ESPECÍFICO**

Avaliar se existe associação entre os níveis de citocinas ou quimiocinas e pneumonia pneumocócica em crianças.

### **III. INTRODUÇÃO**

#### **1. Trato respiratório e pneumonia adquirida na comunidade**

O trato respiratório pode ser dividido em dois compartimentos funcionalmente distintos: as vias aéreas, cobertas por tecido mucoso, e o parênquima pulmonar, o qual contém a unidade especializada na troca gasosa – o alvéolo pulmonar. A ramificação progressiva dos brônquios dá origem aos bronquíolos, que se estendem até os ductos alveolares e que continuam a se ramificar até os alvéolos. Os alvéolos são separados pelas finas paredes do interstício pulmonar, que contém os capilares pulmonares e estão em contato íntimo com o espaço alveolar (Holt et al., 2008).

As infecções agudas do trato respiratório inferior compreendem a pneumonia, a bronquiolite e a bronquite; e pneumonia é a infecção aguda do trato respiratório inferior mais agressiva. PAC é um processo patológico agudo caracterizado pela inflamação dos pulmões e preenchimento dos alvéolos por fluidos, de causa infecciosa e cujo agente etiológico foi adquirido na comunidade (Harris et al., 2011; Scott et al., 2012).

A PAC permanece a principal causa isolada de óbito em crianças abaixo de 5 anos de idade no mundo, com 1 milhão de mortes estimadas em 2013 (Liu et al., 2015). Adicionalmente, todas as diferentes infecções agudas do trato respiratório inferior juntas são as causas mais importantes de admissões hospitalares, no mundo, com aproximadamente 15 milhões de hospitalizações estimadas no ano de 2010, nesta faixa etária (Nair et al., 2013), a despeito dos avanços na assistência à saúde com utilização de antibióticos, suporte clínico e vacinas (Wardlaw et al., 2006; Scott, 2008).

Os principais sinais e sintomas da PAC em crianças são: taquipneia, dispneia, alteração na ausculta respiratória (como os crépitos), tosse, febre e dificuldade

respiratória (Harris et al., 2011). A radiografia de tórax é o exame complementar mais importante e as alterações radiográficas que confirmam pneumonia são infiltrado pulmonar (alveolar ou intersticial) e derrame pleural (Harris et al., 2011). Hiperinsuflação, espessamento peribrônquico e atelectasia não são considerados achados diagnósticos de pneumonia (Harris et al., 2011).

A PAC pode ser causada por diversos tipos diferentes de micro-organismos, principalmente vírus e bactérias. Os agentes etiológicos mais frequentemente descritos são: dentre os vírus - rinovírus, vírus sincicial respiratório (VSR), vírus influenza e vírus parainfluenza; dentre as bactérias atípicas - *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis* e *Chlamydia pneumoniae*; e dentre as bactérias piogênicas - *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catharralis* (Harris et al., 2011). Dentre estes patógenos, o *S. pneumoniae* é largamente reconhecido como o agente bacteriano mais comum nos menores de 5 anos com PAC (Stein & Marostica, 2007; Nascimento-Carvalho et al., 2008; Bradley et al., 2011).

Em pediatria, não existe uma definição unificada para diagnóstico de PAC, tanto na assistência quanto na pesquisa epidemiológica, a despeito do estabelecimento de parâmetros clínicos e radiológicos para a PAC em crianças (McIntosh, 2002; Cherian et al., 2005; Scott et al., 2012). Diante desta dificuldade, a OMS desenvolveu um algoritmo com critérios clínicos para o diagnóstico de PAC em crianças, no entanto este é apenas baseado em sinais e sintomas da doença, sem o acréscimo de exames complementares. Por este motivo, esta definição apresenta especificidade e valor preditivo negativo baixos (WHO, 2013; Scott et al., 2012).

A questão do diagnóstico de PAC em crianças está também associada com o problema do diagnóstico etiológico, o qual é extremamente difícil de ser estabelecido na pediatria. Esta dificuldade ocorre, sobretudo, devido à falta de testes diagnósticos com

sensibilidade e especificidade elevadas o suficiente e que possam ser apropriadamente utilizados em emergências e na atenção primária (Stein & Marostica 2007; Bradley et al., 2011). Além disso, existe uma dificuldade na obtenção de tecidos e fluidos pulmonares em crianças, e os critérios clínicos e radiológicos têm demonstrado valores preditivos baixos para diferenciar infecção bacteriana da infecção viral (McIntosh, 2002; Scott et al., 2012).

## **2. Resposta imunológica no trato respiratório**

A imunidade nos seres humanos é iniciada pelas barreiras naturais do organismo, que são o tecido epitelial e a mucosa do trato respiratório e gastrointestinal (Rosenzweig & Holland, 2011). Em seguida, a resposta imunológica no trato respiratório do hospedeiro engloba tanto a imunidade inata quanto a imunidade adquirida. A imunidade inata inclui: a defesa promovida pelo tecido epitelial respiratório, as moléculas antimicrobianas produzidas nas vias aéreas e a defesa realizada pelo sistema fagocítico. As defesas da imunidade inata são responsáveis pela eliminação precoce de partículas estranhas ao hospedeiro que se depositam na superfície das vias aéreas e pela eliminação de agentes patogênicos dos alvéolos pulmonares (Zhang et al., 2000).

O tecido epitelial das vias aéreas, que é o primeiro local de contato do hospedeiro com os agentes externos inalados, contribui ativamente para a resposta imunológica. As células epiteliais identificam a presença de bactérias através dos TLR e respondem a esta exposição com a liberação de mediadores como as citocinas (como o TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ), as quimiocinas e os peptídeos antimicrobianos. Estes mediadores iniciam uma reação inflamatória que desencadeia o recrutamento e ativação de células fagocíticas, células dendríticas e linfócitos. Os peptídeos antimicrobianos também são capazes de ativar vias

de sinalização, para atrair células T CD4+ e células T CD8+, células dendríticas imaturas, monócitos e induzir a liberação de citocinas como IL-6 e IL-10 a partir das células T (Zhang et al., 2000; Bals & Hiemstra, 2004; Moldoveanu et al., 2009).

Os micro-organismos que não são eliminados pelo tecido epitelial alcançam os alvéolos pulmonares e são contidos pelo sistema fagocítico, o qual é constituído por macrófagos alveolares e leucócitos polimorfonucleares (os neutrófilos). Os macrófagos alveolares são as principais células de defesa do trato respiratório e constituem a primeira linha de defesa do sistema fagocítico. Estas células possuem função fagocítica, microbicida e secretória, sendo a principal fonte de citocinas, quimiocinas e outros mediadores inflamatórios que coordenam a resposta da imunidade inata. Os macrófagos alveolares fagocitam e eliminam prontamente bactérias como *S. pneumoniae* e *H. influenzae*. No entanto, mesmo com a capacidade dos macrófagos de se proliferarem dentro dos pulmões, a sua quantidade pode não ser adequada nas ocasiões em que os patógenos invasores apresentam alta virulência ou uma carga elevada de micro-organismos; estas células então liberam citocinas e quimiocinas, que organizam o recrutamento dos leucócitos polimorfonucleares a partir da vasculatura pulmonar para o espaço alveolar (Zhang et al., 2000; Moldoveanu et al., 2009).

Os leucócitos polimorfonucleares promovem a segunda linha de defesa do sistema fagocítico, sendo que estas células circulam nos vasos periféricos e rapidamente migram para os locais de tecido infectado em resposta aos estímulos inflamatórios. Em estados normais, apenas poucos polimorfonucleares são detectados nos alvéolos; no entanto, a vasculatura pulmonar, especialmente a rede capilar, contém muitos polimorfonucleares. Na presença de infecção e inflamação dos pulmões, estes neutrófilos são recrutados para dentro dos espaços alveolares para reforçar a defesa iniciada pelos macrófagos. Estas células recrutadas se tornam funcionalmente ativas

através do estímulo de citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores liberados na região infectada. Os neutrófilos auxiliam na erradicação efetiva dos patógenos; eles fagocitam e eliminam os micro-organismos utilizando espécies reativas do oxigênio, proteínas antimicrobianas e enzimas degradativas. Além de eliminar os patógenos invasores, os neutrófilos recrutados produzem citocinas, incluindo o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6. Isto sugere que os neutrófilos também participam ativamente na regulação da resposta local do hospedeiro durante o processo de infecção pulmonar e inflamação (Zhang et al., 2000; Moldoveanu et al., 2009).

A imunidade adquirida no trato respiratório inclui a resposta mediada por células e a resposta mediada por anticorpos. A resposta imune adquirida é importante para a erradicação de infecções causadas por bactérias encapsuladas, vírus e patógenos intracelulares que sobrevivem dentro dos macrófagos alveolares (Zhang et al., 2000). As células dendríticas pulmonares são responsáveis pela ligação entre a imunidade inata e a imunidade adquirida. Elas são células apresentadoras de antígenos, que estimulam a proliferação de células T e induzem as respostas das células T CD4+ contra os agentes infecciosos. Nos processos inflamatórios em resposta à entrada de patógenos nas vias aéreas, as células dendríticas pulmonares produzem IL-12, IL-6, TGF- $\beta$  e IL-1 $\beta$  (Chen & Kolls, 2013). As células dendríticas, junto com os macrófagos, são a primeira linha de defesa no reconhecimento de agentes potencialmente patogênicos para os pulmões. As células dendríticas chegam aos tecidos através da circulação sanguínea e, nos pulmões, elas residem abaixo do tecido epitelial das vias aéreas, nos septos alveolares, nos vasos capilares e nos espaços aéreos. No momento em que a célula dendrítica identifica, fagocita e processa um antígeno, ela migra para os linfonodos e apresenta o antígeno para as células T locais, induzindo a resposta imune adquirida (Moldoveanu et al., 2009).

As células T representam um último estágio de controle dos processos

infecciosos pulmonares, principalmente para os patógenos que escapam da defesa da imunidade inata. Por outro lado, uma desregulação na resposta das células T durante uma resposta imune também pode provocar lesão nos tecidos e acarretar efeitos deletérios para o próprio hospedeiro. Esta regulação da resposta das células T nos pulmões é realizada, dentre outras formas, através da liberação de citocinas (Chen & Kolls, 2013).

As células T CD4<sup>+</sup> constituem o principal subconjunto de células T; elas exercem suas funções quando entram em contato com as células dendríticas e então se diferenciam em células efetoras e de memória. As células T CD4<sup>+</sup> auxiliam as células B na formação dos anticorpos, estimulam retroativamente as células dendríticas através da liberação de citocinas, intensificam e preservam a resposta das células T CD8<sup>+</sup> e mediam ativação macrofágica, dentre outras funções. As células T CD4<sup>+</sup> são subdivididas em diferentes subpopulações celulares de acordo com os estímulos recebidos e produzem citocinas que direcionam para um tipo específico de resposta imunológica. A subpopulação de células Th1 produz INF- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$  e estimula uma resposta pró-inflamatória contra os vírus e outros patógenos intracelulares. A subpopulação de células Th2 produz IL-4, IL-5 e IL-13 e direciona a resposta imunológica para imunidade humoral estimulando a produção de anticorpos contra patógenos e promove também uma resposta eosinofílica na atopia. As células T CD8<sup>+</sup> são células citotóxicas, que eliminam diretamente as células infectadas por vírus e contribuem para a produção de citocinas. Estas células são importantes produtoras de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2. Ambos os tipos de células T podem produzir memória imunológica (Chen & Kolls, 2013).

Quando não há doença, o sistema imunológico do trato respiratório apresenta um padrão não inflamatório e de tolerância imunológica mediada por células T. Isto ocorre,

pois as superfícies mucosas, principalmente nas vias aéreas superiores, são continuamente expostas a uma grande quantidade de antígenos ambientais não patogênicos. O objetivo é proteger o indivíduo contra potenciais consequências imunopatogênicas de uma resposta mantida a estes estímulos perenes. Este padrão de proteção é apenas parcialmente compreendido, mas parece estar sob o controle das células dendríticas locais (Holt et al., 2008).

A identificação de antígenos potencialmente patogênicos é facilitada pelos TLR, que são expressados pela rede de células dendríticas sentinelas do trato respiratório e resulta em uma interrupção deste padrão de tolerância imunológica e uma subsequente geração de uma resposta imunológica efetiva contra estes antígenos (Holt et al., 2008).

### **3. Resposta imunológica contra os patógenos respiratórios**

A resposta imunológica no trato respiratório contra as bactérias é então iniciada através da imunidade inata, sendo mediada por receptores de reconhecimento de padrões moleculares como os TLR. Estes TLR são proteínas que ativam vias de sinalização inflamatórias na presença das lipoproteínas (bactérias gram negativas), ácido teicóico (bactérias gram positivas) e do DNA bacteriano; esta ativação desencadeia o início de uma rápida resposta inflamatória e a produção de citocinas pró-inflamatórias, a exemplo de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , e de quimiocinas. Esta sinalização resulta em um aumento no tempo de vida dos neutrófilos, alterações na expressão dos receptores de quimiocinas na superfície de neutrófilos e monócitos e produção de quimiocinas por diversos tipos celulares, como os leucócitos e as células endoteliais. Outros membros da mesma superfamília de receptores estão também envolvidos na regulação da função das células Th1/Th2 (Sabroe et al., 2002).



O *S. pneumoniae* é o principal agente etiológico bacteriano de pneumonia em crianças e, ao penetrar na via aérea e causar infecção, induz uma resposta inflamatória intensa. Componentes da parede celular do pneumococo são reconhecidos nos pulmões pelos TLR (principalmente os TLR4, TLR2 e TLR9) das células epiteliais respiratórias, os quais induzem a liberação de citocinas, quimiocinas e desencadeiam a resposta imunológica contra esta bactéria (van der Poll & Opal, 2009; Calbo & Garau, 2010). Tem sido demonstrado que pacientes com imunodeficiência primária associada com mutações nas moléculas das vias de sinalização dos TLR apresentam susceptibilidade maior para a infecção por bactérias piogênicas, principalmente para o *S. pneumoniae* (Picard et al., 2011).

Macrófagos alveolares são então ativados, liberam citocinas, fagocitam a bactéria e recrutam os neutrófilos sistêmicos, os quais são as principais células na eliminação do pneumococo; proteínas de fase aguda são produzidas; ocorre opsonização pelos componentes do sistema complemento que auxiliam na fagocitose, ativação de anticorpos IgM e ativação do sistema de coagulação (Gavin & Mitchell, 2006; van der Poll & Opal, 2009; Calbo & Garau, 2010; Yang et al., 2013).

Algumas citocinas são reconhecidas por desempenharem um papel fundamental na defesa da resposta imune inata contra o pneumococo, tais como o TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , no primeiro momento da infecção, sendo então seguidas por outras citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e IL-8, e citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 (Gillespie & Balakrishnan, 2000; van der Poll & Opal, 2009; Calbo & Garau, 2010).

A ativação da imunidade inata, além de ser essencial para a primeira linha de defesa contra o pneumococo, também é crucial para a geração de uma imunidade adquirida adequada. O papel protetor das células T CD4<sup>+</sup> na defesa do hospedeiro contra o pneumococo tem sido evidenciado com o aumento significativo na frequência de

pneumonia pneumocócica em pacientes com SIDA. Estudos em modelos murinos demonstraram que o *S. pneumoniae* suscita um acúmulo precoce de células T no pulmão infectado; camundongos células T  $-/-$  são altamente susceptíveis ao pneumococo e exibem uma mobilização reduzida de neutrófilos para os tecidos pulmonares. Além disso, as células T mediam a colonização da nasofaringe pelo pneumococo (van der Poll & Opal, 2009; Marqués et al., 2012).

A importância das células T CD8<sup>+</sup> na pneumonia bacteriana também tem sido demonstrada. Em um modelo murino de infecção pelo *S. pneumoniae*, observou-se que em camundongos CD8 $-/-$ , perforina  $-/-$  e IFN- $\gamma$   $-/-$  houve aumento significativo da disseminação bacteriana, inflamação pulmonar aumentada e mortalidade elevada comparando-se com camundongos selvagens. Em uma coorte com mulheres infectadas pelo vírus HIV, contagens mais baixas de células T CD8<sup>+</sup> foram associadas com risco aumentado de pneumonia bacteriana, enfatizando o papel protetor das células T CD8<sup>+</sup> para a defesa do hospedeiro contra infecções pulmonares bacterianas (Chen & Kolls, 2013).

Recentemente foi também demonstrado que IL-17, produzida pelas células Th17, compõe a proteção contra a colonização pelo pneumococo, sendo essencial no recrutamento de macrófagos e neutrófilos para a nasofaringe. O estímulo à produção da citocina IL-17, uma regulação na expressão de IFN- $\gamma$ , em associação com o desenvolvimento de uma resposta Th17, são características relevantes na resposta imunológica de proteção contra pneumonia causada pelo *S. pneumoniae* (Marqués et al., 2012).

A resposta imunológica do hospedeiro contra os vírus respiratórios é iniciada nas células infectadas do epitélio respiratório. Estas células reconhecem os “padrões moleculares associados a patógenos” presentes nos vírus através dos receptores TLR.

Este reconhecimento, desencadeia a síntese de citocinas pró-inflamatórias (como IL-1 $\beta$  e IL-8) e quimiocinas (como CCL2, CCL5) que organizam a mobilização e ativação das células dendríticas, além de ativarem fibroblastos e outras células inflamatórias (como macrófagos alveolares). Após a ativação, ocorre um aumento na secreção da quimiocina CCL2 e das citocinas IL-12 e TNF- $\alpha$  pelas células inflamatórias, que facilita a maturação e migração das células dendríticas para os linfonodos, local onde desencadeiam e participam da resposta imune adaptativa contra os vírus respiratórios. Além disso, esta cascata de sinalização promove o recrutamento de células inflamatórias de outras partes do organismo fora do trato respiratório através da corrente sanguínea (Braciale et al., 2012). Após o encontro com as células apresentadoras de antígenos nos linfonodos de drenagem, as células T vírus específicas submetem-se a um processo de ativação, proliferação e diferenciação para se tornarem células T efetoras que podem migrar para o sítio da infecção e mediar a resposta imune antiviral. A eliminação dos vírus e uma imunidade humoral prolongada para reinfecções virais são largamente dependentes da formação de anticorpos. Estudos têm demonstrado que tanto células T CD4<sup>+</sup> como T CD8<sup>+</sup> e os tipos Th1 e Th2 das células T CD4<sup>+</sup> têm sido implicadas na resposta imunológica contra infecções por vírus respiratórios como o VSR, o rinovírus e o vírus influenza (Ogra, 2004; Chen & Kolls, 2013).

A resposta imunológica do hospedeiro contra infecção pelo VSR é caracterizada pela produção de anticorpos específicos contra o VSR dos tipos IgG, IgM e IgA, os quais podem ser encontrados tanto na secreção das vias aéreas, quanto no soro. Além do papel dos anticorpos circulantes, existem evidências de uma resposta também mediada por células T. As células T CD4<sup>+</sup> do tipo Th1 e as células T CD8<sup>+</sup> contribuem para a defesa do hospedeiro contra o VSR, enquanto que a resposta Th2 e Th17 exacerbam as doenças na infecção por este vírus (Chen & Kolls, 2013). O VSR pode causar uma inflamação

extensa, hipersecreção de muco, obstrução das vias aéreas e lesão pulmonar em hospedeiros susceptíveis, devido a uma resposta imunológica desviada para o padrão Th2 e isto pode acarretar uma hiperresponsividade persistente das vias aéreas. Uma indução efetiva para o padrão Th1 na resposta imunológica contra o VSR na infância parece balancear esta resposta Th2 e exercer uma função de proteção na defesa do hospedeiro contra o VSR (Chen & Kolls, 2013). Tem sido demonstrado que o VSR induz a síntese de citocinas presentes no processo inflamatório, a exemplo do TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, INF- $\gamma$ , IL-4 e as quimiocinas CCL2 e CCL5. Estas moléculas são importantes para iniciar a cascata inflamatória e a mobilização de células para o local da doença (Ogra, 2004; Black, 2003).

#### **4. Justificativa**

A importância epidemiológica das infecções respiratórias agudas, com ênfase para a PAC, a importância das citocinas como marcadores da resposta inflamatória e imunológica do hospedeiro, aliado ao escasso conhecimento sobre o perfil das citocinas em crianças com infecções respiratórias agudas, particularmente com PAC, justificam a realização dessa investigação.

A resposta imunológica do hospedeiro contra os patógenos respiratórios envolve tanto a imunidade inata quanto adquirida e diversos fatores podem influenciar no perfil de citocinas que pode ser detectado no momento da admissão hospitalar destes pacientes, como o tempo de início dos sintomas relacionado com a dinâmica da resposta imunológica ao longo dos dias, o tipo de agente patogênico da infecção, a gravidade da doença e o local da inflamação. Por este motivo, faz-se necessária uma análise exploratória ampla das diversas citocinas e quimiocinas, tanto da imunidade inata quanto

adquirida, implicadas na resposta imunológica do trato respiratório contra infecções em pediatria (Calbo & Garau, 2010).

Desde a década de 90, estudos prévios pesquisaram associações entre citocinas inflamatórias (como biomarcadores) e PAC bacteriana em adultos (Moussa et al., 1994; Kosmas et al., 1997; Lieberman et al., 1997; Christ-Crain & Opal, 2010). Alguns outros estudos investigaram esta questão em crianças, porém nenhum apresentou uma conclusão prática e útil (Toikka et al., 2000; Michelow et al., 2007).

##### **5. Hipótese para o objetivo específico:**

O perfil de citocinas difere entre crianças com pneumonia causada por diferentes agentes etiológicos.

## **IV. METODOLOGIA DO ESTUDO**

### **1. População de referência**

Pacientes da faixa etária pediátrica admitidos no Pronto Atendimento do Centro Pediátrico Professor Hosannah de Oliveira, do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos da Universidade Federal da Bahia, em Salvador-Bahia.

### **2. Critérios de inclusão**

- Crianças com idade menor que 5 anos
- Hospitalizadas por PAC diagnosticada pelo pediatra plantonista do pronto atendimento.
- Diagnóstico etiológico definido

### **3. Critérios de exclusão**

Doença pulmonar crônica, exceto asma; portadores de outras doenças infecciosas ou não, em curso, criança nascida de mãe com HIV, imunodeficiência ou tuberculose em tratamento.

### **4. Período de inclusão**

O período de inclusão de pacientes no estudo foi de setembro de 2003 até maio de 2005.

## **5. Técnica de amostragem**

Todas as crianças provenientes da comunidade e que preencheram os critérios de inclusão foram avaliadas. O diagnóstico de pneumonia realizado pelo pediatra plantonista no pronto atendimento foi baseado no relato, realizado pelo acompanhante da criança, de febre ou dificuldade para respirar e queixas respiratórias, associados a infiltrado pulmonar visto na radiografia de tórax. Após a obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido escrito (ANEXO 1), os pacientes foram recrutados e submetidos a uma avaliação clínico-laboratorial completa pela equipe da pesquisa, imediatamente após a admissão hospitalar (ANEXO 2). A radiografia de tórax realizada na admissão hospitalar foi enviada para um radiologista pediátrico participante da equipe da pesquisa para uma avaliação detalhada, após o paciente já ter sido recrutado para a pesquisa.

## **6. Desenho do estudo**

Estudo observacional, prospectivo do tipo corte-transversal e descritivo exploratório.

## **7. Classificação das variáveis**

7.1. Para o objetivo geral foi feita análise exploratória de dados.

7.2. Variável-dependente para o objetivo específico: pneumonia pneumocócica

7.3. Variáveis de predição para o objetivo específico: níveis das citocinas

## **8. Variáveis de confusão**

- Condição que altere a resposta imunológica do indivíduo, como as imunodeficiências primárias ou adquiridas. Processos inflamatórios decorrentes de outras causas que não a PAC e que não estejam associados com a variável dependente. Doenças pulmonares ou sistêmicas que interfiram na etiologia da pneumonia em crianças. Os pacientes com variáveis de confusão foram excluídos para evitar viés nos resultados.

## **9. Coleta de dados**

Uma anamnese e exame físico padronizados foram realizados em todas as crianças elegíveis neste estudo e os dados foram registrados no Formulário de Avaliação Clínica (ANEXO 2).

Foi coletado 5ml de sangue venoso para cultura, exames sorológicos e dosagem de citocinas, antes do início da antimicrobianaoterapia. Uma amostra de secreção nasofaríngea foi aspirada pelas narinas com sonda uretral e seringa descartável de 20ml.

Os pacientes retornaram em 2 – 4 semanas de seguimento após a admissão para a coleta da segunda amostra de sangue para os exames sorológicos.

## **10. Testes de Laboratório**

### **10.1. Estudos Microbiológicos**

A investigação etiológica da infecção do trato respiratório incluiu a realização de diversos testes em secreção nasofaríngea e soro para a pesquisa do mesmo agente



etiológico; este procedimento foi feito para todos os casos incluídos no estudo. Foram encontrados resultados positivos para a presença dos seguintes agentes etiológicos: *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *C. trachomatis*, *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *Simkania negevensis*, rinovírus, vírus sincicial respiratório, vírus influenza A e B, vírus parainfluenza tipos 1, 2 e 3, enterovírus, adenovírus, metapneumovírus humano e bocavírus humano.

Os testes foram realizados no National Institute for Health and Welfare, Oulu, Finlândia; no Departamento de Virologia do Turku University Hospital, Turku, Finlândia e no Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz, FIOCRUZ, Salvador, Brasil.

## 10.2. Estudos Microbiológicos – Vírus

Uma amostra de secreção nasofaríngea foi aspirada pelas narinas pelos membros da equipe da pesquisa com uma sonda uretral e seringa descartável de 20ml e posteriormente congelada em freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$  até a realização dos testes virológicos. PCR reverso foi realizado para a detecção de rinovírus, enterovírus e metapneumovírus humano, conforme publicado anteriormente (Halonen et al., 1995; Hyypia et al., 1998).

A secreção do aspirado nasofaríngeo também foi utilizado para a investigação de antígenos virais (influenza A e B, VSR, parainfluenza tipo 1, 2 e 3 e adenovírus), os quais foram detectados por fluoroimunoensaio com anticorpos monoclonais (Makela et al., 1998). Os títulos de anticorpos séricos vírus-específicos foram determinados por enzimaensaio (ELISA) utilizando fase sólida coberta por antígeno e IgG anti-humana de coelho conjugada com peroxidase (Dako, Glostrup, Denmark) (Makela et al., 1998).

O bocavirus humano foi investigado através de PCR quantitativo na amostra de secreção nasofaríngea e na amostra de soro, aumento de IgG sérico nas amostras

pareadas e pesquisa de IgM e IgG pelo ELISA (Korppi et al., 2010).

## 10.2. Estudos Microbiológicos – Bactérias

A pesquisa de infecção pelas bactérias *S. pneumoniae*, *H. influenzae* não-tipável e *M. catarrhalis* foi realizada utilizando-se hemocultura e análise de anticorpos em amostra de soro pareada (Juvén et al., 2000). Foi utilizada pneumolisina-PCR para detecção do DNA do *S. pneumoniae* no creme leucocitário do sangue (Saukkoriipi et al., 2002).

Testes para detecção de anticorpos anti-bactérias foram realizados em soro da fase aguda e da convalescença da pneumonia. Anticorpos IgG para pneumolisina pneumocócica e para o polissacarídeo C do pneumococo foram medidos por ELISA, e um aumento de 2 vezes ou mais, ou 3 vezes ou mais, respectivamente, nos títulos de soros pareados foi considerado diagnóstico (Makela et al., 1998). Anticorpos para *H. influenzae* não tipáveis e *M. catarrhalis* foram detectados por ELISA usando antígeno celular de bactéria inteira, e um aumento de 3-vezes ou mais nos títulos de soros pareados foi considerado diagnóstico para infecção aguda.(Makela et al., 1998) Anticorpo IgM para *M. pneumoniae* foi medido por um kit comercial de ELISA (Platelia; Sanofi Diagnostics Pasteur S.A, Marnes la Coquette, France) (Waris et al., 1998). A pesquisa de IgM foi a escolhida porque quando comparada com a cultura, a sorologia e a PCR mostrou-se ser a opção mais valiosa para o diagnóstico de infecções por *M. pneumoniae* (Waris et al., 1998).

Anticorpos IgG e IgM para espécies de Clamídia foram estudados por microimunofluorescência com partes elementares de *C. pneumoniae* Kajaani 7 e *C. trachomatis* 1.2 como antígenos (Makela et al., 1998). A presença de IgM e/ou um aumento de 4 vezes ou mais nos níveis de IgG ou IgA entre soros pareados para

Clamídia e para *S. negevensis* foram considerado diagnóstico para infecção por estes microorganismos (Yamaguchi et al., 2005).

As técnicas utilizadas e as frequências de distribuição dos agentes etiológicos por faixa etária já foram descritas em trabalhos prévios (Nascimento-Carvalho et al., 2008; Nascimento-Carvalho et al., 2009; Nascimento-Carvalho et al., 2011; Nascimento-Carvalho et al., 2012).

## 10.2. Estudos das citocinas e quimiocinas

A dosagem das citocinas séricas foi realizada pela técnica *Cytometric Bead Array* (CBA) (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA). As citocinas IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e IL-12 foram dosadas com o Kit de Citocinas Inflamatórias Humanas. As citocinas IL-2, IL-4, IL-5 e IFN- $\gamma$  foram dosadas com o Kit de Citocinas Th1/Th2 Humanas e as quimiocinas CCL2, CCL5, CXCL9 e CXCL10 foram dosadas com o Kit de Quimiocinas Humanas. Citometria de fluxo (BD FACSAArray) e o *Software* FCAP Array (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA) foram utilizados para realizar a aquisição e a análise, respectivamente.

A curva padrão para cada citocina foi construída utilizando-se as concentrações de citocinas de referências fornecidas pelos kits. O nível máximo de detecção considerado foi o valor fornecido pelo fabricante: 10.000 pg/ml para todas as citocinas. Os níveis mínimos de detecção considerados foram os valores fornecidos pelo fabricante: 3,6 pg/ml para IL-8; 7,2 pg/ml para IL-1 $\beta$ ; 2,5 pg/ml para IL-6; 3,3 pg/ml para IL-10; 3,7 pg/ml para TNF- $\alpha$ ; 1,9 pg/ml para IL-12; 2,6 pg/ml para IL-2; 2,6 pg/ml para IL-4; 2,4 pg/ml para IL-5; 7,1 pg/ml para IFN- $\gamma$ ; 0,2 pg/ml para CCL5; 2,5 pg/ml para CXCL9; 2,7 pg/ml para CCL2; 2,8 pg/ml para CXCL10.

As dosagens das citocinas foram realizadas duas vezes na mesma amostra em

dois diferentes momentos, por um técnico cego para as informações clínicas e etiológicas.

## **11. Análise Estatística**

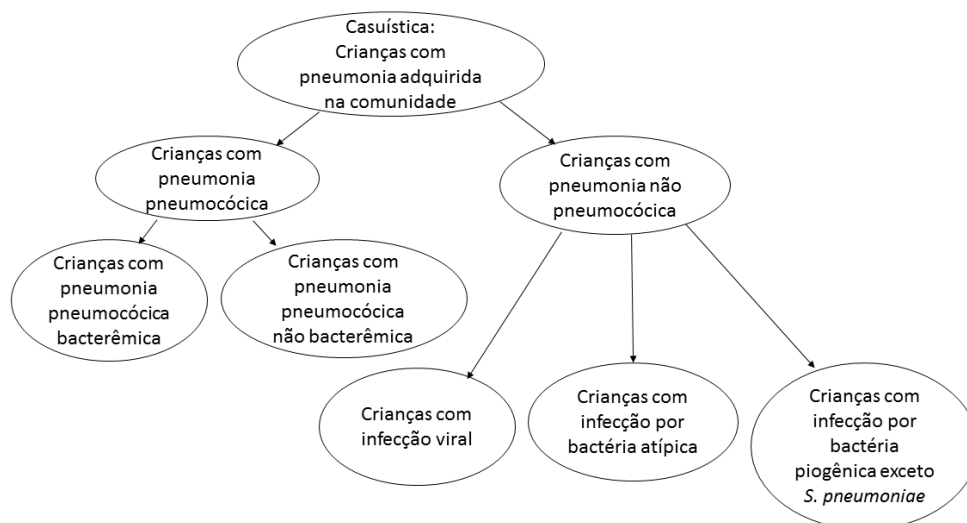
### **11.1. Análise exploratória dos dados**

O procedimento estatístico utilizado para descrição dos dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais da amostra foi a Estatística Descritiva, com as técnicas de cálculos de frequências, de medidas de tendência central e dispersão.

### **11.2. Estatística Inferencial**

A amostra foi dividida em dois grupos baseados na etiologia da infecção para comparar as concentrações de citocinas e sua associação com *S. pneumoniae*: pneumonia pneumocócica (presença de infecção por *S. pneumoniae*, com ou sem outros patógenos) *versus* pneumonia não pneumocócica (todos os testes para investigar infecção pneumocócica negativos e testes positivos para pelo menos um dos seguintes agente: *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *C. trachomatis*, *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *S. negevensis*, rinovírus, VSR, vírus influenza A e B, vírus parainfluenza tipos 1, 2 e 3, enterovírus, adenovírus, metapneumovírus humano e/ou bocavírus humano). Em seguida, o grupo de pneumonia pneumocócica foi dividido em bacterêmico (diagnosticado com hemocultura) e não bacterêmico (diagnosticado com PCR e sorologia para *S. pneumoniae*). Além disso, o grupo de pneumonia não pneumocócica foi dividido em três grupos diferentes, de acordo com a etiologia estabelecida: infecção viral, infecção por bactéria piogênica exceto *S. pneumoniae* e infecção por bactéria atípica (Figura 1).

**Figura 1. Divisão da amostra para comparação das medianas de concentração de citocinas/quimiocinas séricas em cada grupo**



Fonte: o autor (2015)

Hipótese para o objetivo específico: o perfil de citocinas difere entre crianças com pneumonia causada por diferentes agentes etiológicos.

Teste de hipóteses, sendo a hipótese nula e a hipótese alternativa bicaudadas:

- H<sub>0</sub>: Os níveis séricos de citocinas inflamatórias no grupo das crianças com pneumonia pneumocócica são iguais aos níveis séricos de citocinas em crianças com pneumonia não pneumocócica.
- H<sub>1</sub>: O nível sérico de uma das citocinas inflamatórias no grupo das crianças com pneumonia pneumocócica é maior do que o nível sérico da mesma citocina em crianças com pneumonia não pneumocócica.

Análise bivariada foi realizada com teste do Qui-Quadrado ou teste exato de

Fisher para comparar proporções e teste de Mann-Whitney U para comparar medianas. A análise do valor diagnóstico das citocinas foi realizada calculando-se a curva *Receiver Operating Characteristic* (ROC). Para determinar o valor preditivo das citocinas para a etiologia da pneumonia, foi construído um modelo de regressão logística multivariada e o IC de 95% da OR foi calculado.

Valores de  $P < 0,05$ , bicaudados, foram considerados estatisticamente significantes.

Os softwares STATA (versão 11) e SPSS (versão 9) foram utilizados para análise.

### **11.3. Controle para variáveis de confusão**

A aplicação dos critérios de exclusão.

## **12. Operacionalização das variáveis**

As variáveis contínuas foram transformadas em variáveis dicotômicas de acordo com os parâmetros que seguem:

- Febre, como temperatura axilar  $> 37,5^{\circ}\text{C}$  (El-Radhi & Barry, 2006).
- Taquipneia foi considerada como frequência respiratória  $\geq 60$  incursões/minuto em crianças com idade  $< 2$  meses,  $\geq 50$  incursões/minute em crianças com idade entre 2 e 11 meses e  $\geq 40$  incursões/minuto em crianças com idade  $\geq 12$  meses (WHO, 2013).
- Os níveis séricos detectados das citocinas foram dicotomizados de acordo com o ponto de corte definido pela curva ROC ou de acordo com os percentis 50 e 75.

### **13. QUESTÕES ÉTICAS**

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia.

## V. RESULTADOS

### 1. População de estudo

Foram avaliadas 322 crianças, dentre as quais 166 casos foram incluídos neste estudo. As razões para a exclusão dos casos foram: amostra de soro não disponível para dosagem de citocinas (n=61); etiologia não detectada (n=50); recusa em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (n=28); criança nascida de mãe com HIV (n=6); doença pulmonar crônica exceto asma (n=6); diagnóstico de varicela (n=3) e imunodeficiência (n=2). As características clinico-epidemiológicas da casuística estão apresentadas na Tabela 1.

### 2. Etiologia

Infecção pneumocócica foi detectada em 38 (22,9%) casos, dentre os quais 9 (23,7%) foram bacterêmicos (diagnosticado com hemocultura) e 29 (76,3%) casos foram diagnosticados com PCR ou sorologia para *S. pneumoniae*. Nesse grupo 12 (31,6%) casos apresentaram infecção pneumocócica isolada e 26 (68,4%) apresentaram infecção por pneumococo associado com vírus ou bactérias atípicas.

Outros agentes etiológicos foram detectados em 128 (77,1%) casos. No grupo de pneumonia não pneumocócica, ocorreram 84 (65,6%) casos de infecção viral, dentre os quais 67 (79,8%) apresentaram infecção por apenas 1 vírus e 17 (20,2%), infecção viral mista, com pelo menos 2 diferentes vírus. Os vírus mais frequentemente isolados, considerando infecção viral por um vírus único ou infecção mista, foram o rinovírus (n=27; 32,1%), vírus parainfluenza (n=22; 26,2%) e VSR (n=21; 25%). Os demais vírus



foram identificados nas seguintes frequências: 11 (13,1%) casos de bocavirus humano, 7 (8,3%) casos de influenza A ou B, 6 (7,1%) casos de metapneumovirus humano, 6 (7,1%) casos de adenovírus, 5 (6,0%) casos de enterovirus.

Infecção por bactéria atípica foi detectada em 26 (20,3%) casos, dentre os quais 12 (46,2%) casos apresentaram infecção única, 13 (50%) casos, infecção mista por bactéria atípica e vírus e 1 (3,8%) caso de infecção por 2 espécies diferentes de bactéria atípica. As bactérias atípicas foram identificadas nas seguintes frequências: *M. pneumoniae* 50% (n=13), *C. trachomatis* 42,3% (n=11) e *S. negevensis* 11,5% (n=3).

Infecção por bactéria piogênica foi identificada em 18 (14,1%) dos casos, dos quais 7 (38,9%) foram infecção única, 9 (50%) foram infecção mista por bactéria piogênica e vírus e 2 (11,1%) casos de infecção mista por bactéria piogênica, bactéria atípica e vírus. A bactéria piogênica mais frequentemente detectada foi *H. influenzae* em 15 (83,3%) casos, seguida da *M. catarrhalis* em 3 (16,7%) casos.

A Tabela 1 apresenta a comparação das características clínico-epidemiológicas e radiológicas entre os grupos de pneumonia pneumocócica e pneumonia não pneumocócica. Dentre todas estas comparações houve diferença estatisticamente significativa apenas para a frequência de infiltrado alveolar, que foi mais elevada no grupo da pneumonia não pneumocócica.

**Tabela 1. Características clínico-epidemiológicas e radiológicas das crianças hospitalizadas com pneumonia adquirida na comunidade com infecção pneumocócica ou não pneumocócica.**

<b>Características</b>	<b>Pneumonia Pneumocócica</b>	<b>Pneumonia Não Pneumocócica</b>	<b>Todas</b>
	(N=38)	(N=128)	(N=166)
Sexo masculino <sup>a</sup>	24 (63,2)	74 (57,8)	98 (59,0)

Idade (mês) <sup>b</sup>	19 (10-28)	16 (9-26)	17 (10-28)
Faixa Etária <sup>a</sup>			
< 2 meses	0	4 (3,1)	4 (2,4)
2-11 meses	11 (28,9)	40 (31,3)	51 (30,7)
12-23 meses	15 (39,5)	42 (32,8)	57 (34,3)
24-59 meses	12 (31,6)	42 (32,8)	54 (32,5)
Sintomas			
Duração da doença (dias) <sup>b</sup>	8 (5-14)	7 (4-14)	7 (4-14)
Tosse <sup>a</sup>	38 (100)	126 (98,4)	164 (98,8)
Duração da tosse (dias) <sup>b</sup>	10 (5-15)	7 (4-15)	7 (4-15)
Febre <sup>a</sup>	37 (97,4)	122 (95,3)	159 (95,8)
Duração da febre (dias) <sup>b</sup>	5 (4-8)	5 (3-7)	5 (3-8)
Dificuldade de respirar <sup>a</sup>	32 (84,2)	108 (84,4)	140 (84,3)
Duração da dificuldade de respirar (dias) <sup>b</sup>	4 (2-7)	4 (3-7)	4 (3-7)
Sinais <sup>a, c</sup>			
Taquipneia	35 (92,1)	106 (82,8)	141 (84,9)
Crépitos	22 (57,9)	92 (72,4)	114 (69,1)
Febre	24 (63,2)	77/126 (61,1)	101/164 (61,6)
Radiografia de tórax interpretada pelo radiologista pediátrico <sup>a, c</sup>			
Infiltrado alveolar	32/37 (86,5)	81/121 (66,9)	113/158 (71,5)
Derrame pleural	5/37 (13,5)	12/121 (9,9)	17/158 (10,8)

<sup>a</sup> Resultados em n (%); <sup>b</sup> Mediana (intervalo interquartil); <sup>c</sup> Denominadores diferentes devido às perdas; <sup>d</sup> valor de p = 0,02

Fonte: o autor (2015)

## 2. Citocinas e quimiocinas

As citocinas que apresentaram níveis detectáveis foram: IL-10 e IL-6. As citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-12 e IFN- $\gamma$  não apresentaram níveis detectáveis. As medianas (IIQ) observadas foram: 78,0 (30,7-244,3) pg/ml para IL-8; 10,6 (4,6-30,6) pg/ml para IL-6 e 3,6 (3,1-4,4) pg/ml para IL-10. As quimiocinas

detectadas foram CXCL10 e CCL2; as medianas calculadas foram: 74,2 (36,1-164,8) pg/ml e 19,1 (10,8-22,8) pg/ml, respectivamente. A quimiocina CXCL9 não apresentou níveis detectáveis e a quimiocina CCL5 apresentou níveis acima do limite confiável de detecção.

### 3. Análise bivariada

Comparando-se as medianas de concentrações das citocinas e quimiocinas séricas entre os dois grupos divididos de acordo com a etiologia (pneumonia pneumocócica *versus* pneumonia não pneumocócica), apenas IL-6 e CXCL10 mostraram diferença estatisticamente significativa (Tabela 2).

**Tabela 2. Comparação das medianas (intervalo interquartil) das concentrações séricas (pg/ml) das citocinas/quimiocinas em crianças com pneumonia adquirida na comunidade de acordo com os grupos etiológicos <sup>a</sup>.**

Citocina e Quimiocina	Pneumonia pneumocócica	Pneumonia não-pneumocócica	Valor p
	(N=38)	(N=128)	
IL-8	120,1 (27,9 – 408,8)	69,0 (29,7 – 206,7)	0,1
IL-6	31,2 (12,4 – 54,1)	9,0 (4,1 – 22,0)	<0,001
IL-10	3,5 (3,0 – 4,3)	3,7 (3,1 – 4,4)	0,5
CXCL10	99,8 (50,3 – 306,8)	65,5 (33,6 – 135,3)	0,02
CCL2	19,8 (11,4 – 22,7)	19,0 (10,3 – 22,8)	0,5

<sup>a</sup> IL1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , CXCL9 e CCL5 não apresentaram níveis detectáveis

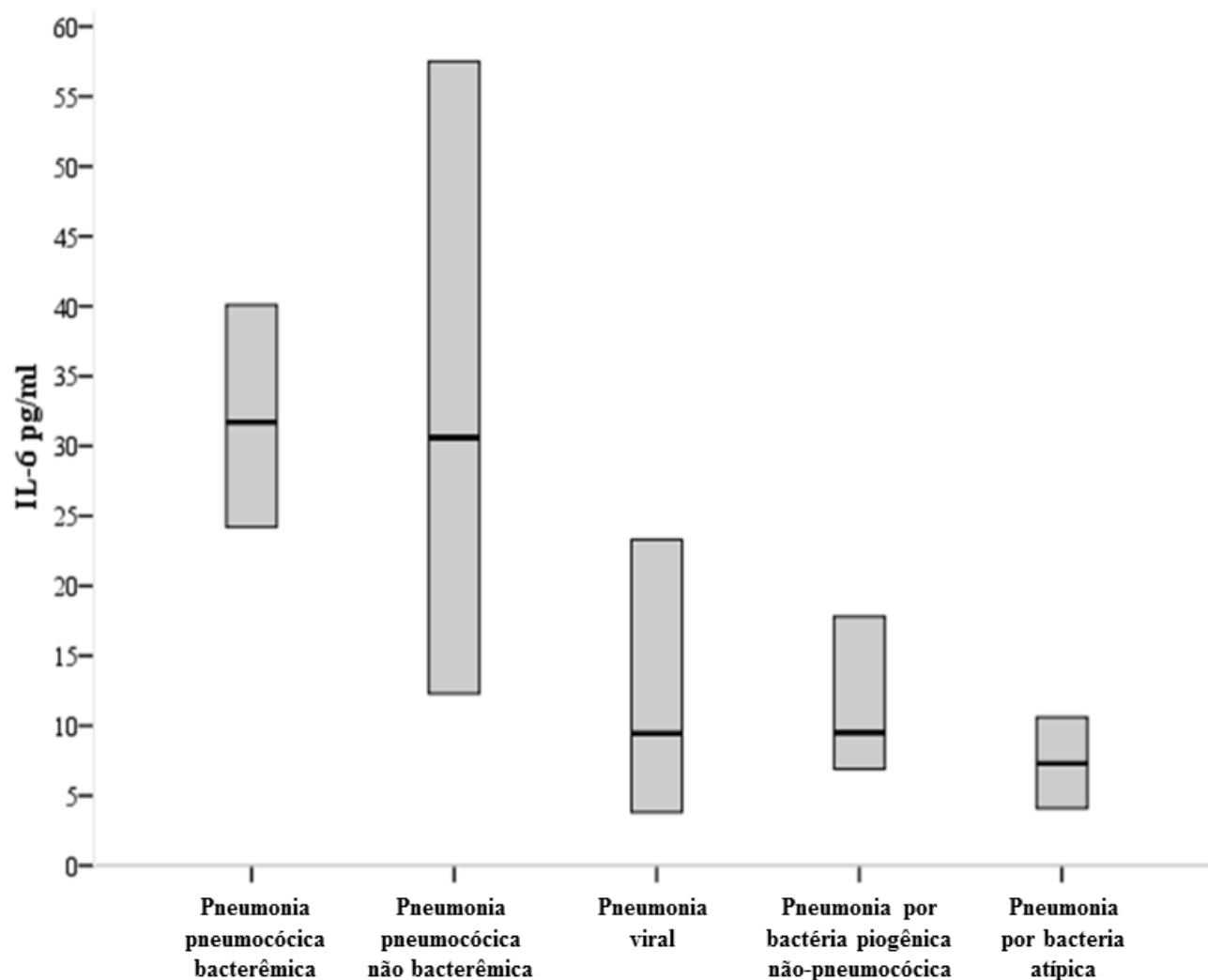
Fonte: o autor (2015)

As medianas (IIQ) das concentrações da IL-6 no soro de crianças com pneumonia nos subgrupos de infecção viral, infecção por bactéria atípica ou infecção por bactéria piogênica exceto *S. pneumoniae* foram 9,5 (3,7–23,4) pg/ml, 7,3 (4,1–10,8) pg/ml, and 9,5 (6,7–20) pg/ml, respectivamente. Comparando-se a distribuição de IL-6 em cada um desses subgrupos com o grupo da pneumonia pneumocócica, todas as diferenças foram estatisticamente significantes ( $p < 0,001$ ;  $p < 0,001$  e  $p = 0,008$ , respectivamente) (Gráfico 1).

As medianas (IIQ) das concentrações séricas de IL-6 das crianças com pneumonia pneumocócica diagnosticada por hemocultura, ou seja, os casos de pneumonia pneumocócica bacterêmica, e das crianças com pneumonia pneumocócica diagnosticada por PCR e sorologia para *S. pneumoniae*, ou seja, pneumonia pneumocócica não bacterêmica, foram: 31,7 (22,6 – 44) pg/ml and 30,6 (11,1 – 75,4) pg/ml, respectivamente; a diferença na comparação entre estes dois grupos não foi estatisticamente significativa ( $P=0,6$ ) (Gráfico 1).

Comparando-se a distribuição de IL-6 no subgrupo de pneumonia pneumocócica bacterêmica com o subgrupo de infecção viral, com o subgrupo de infecção por bactéria atípica e com o subgrupo de infecção por bactéria piogênica exceto *S. pneumoniae* todas as diferenças foram estatisticamente significantes ( $P=0,006$ ;  $P<0,001$ ;  $P=0,01$ ; respectivamente). Igualmente, comparando-se a distribuição de IL-6 no subgrupo da pneumonia pneumocócica não bacterêmica com cada um dos subgrupos etiológicos todas as diferenças foram significantes ( $P=0,002$ ;  $P<0,001$ ;  $P=0,027$ ; respectivamente) (Gráfico 1).

**Gráfico 1. Mediana da concentração de IL-6 sérica com o intervalo interquartil em crianças com pneumonia adquirida na comunidade de acordo com os grupos etiológicos.**



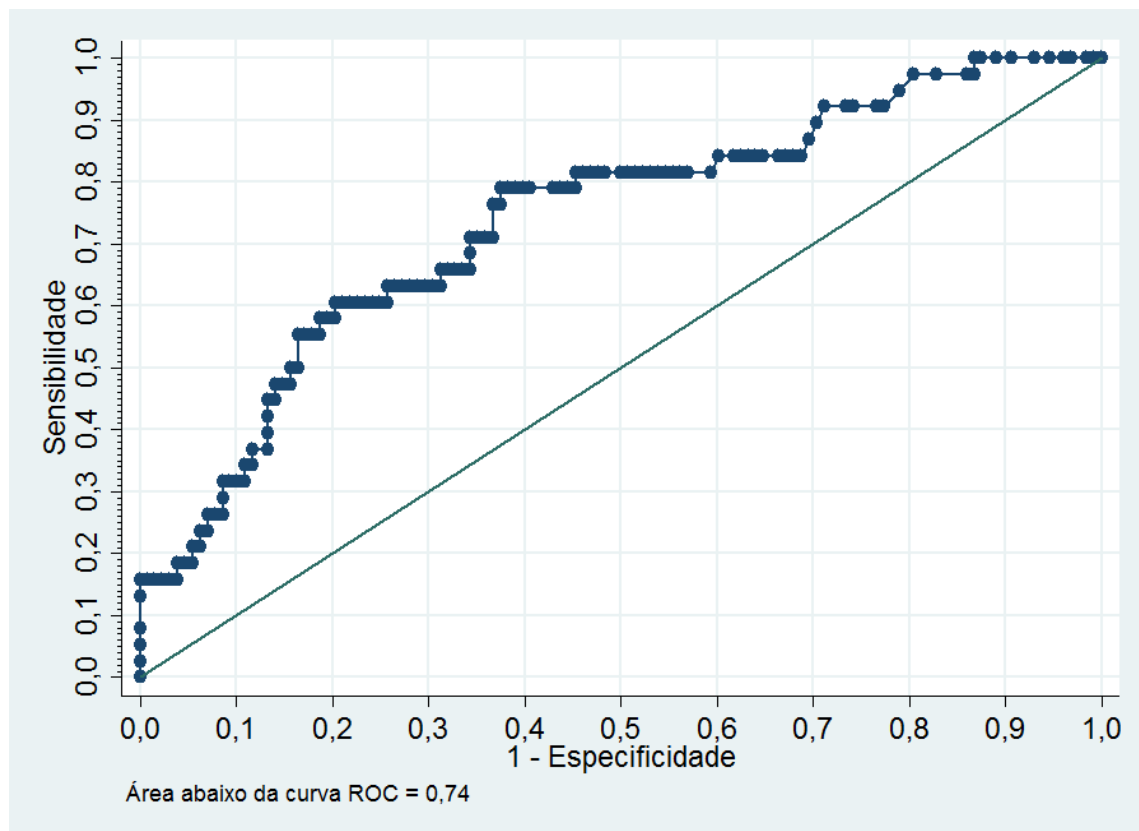
As dosagens das citocinas foram realizadas duas vezes na mesma amostra e todas as comparações citadas foram feitas com os níveis de citocinas e quimiocinas detectadas nas duas análises. Todos os resultados de significância estatística foram iguais.

## 4. Valor preditivo da IL-6

### 4.1. Curva ROC

Com o objetivo de avaliar o valor diagnóstico da IL-6 para pneumonia pneumocócica, a curva ROC foi calculada. A área abaixo da curva para IL-6 predizer pneumonia pneumocócica foi 0,74 (IC95% = 0,65-0,83;  $p < 0,001$ ) (Gráfico 2). O ponto de corte escolhido foi 12,5 pg/ml, de acordo com a melhor relação entre sensibilidade (76,3%) e especificidade (63,3%).

**Gráfico 2. Curva *Receiver Operating Characteristic* da interleucina-6 e pneumonia pneumocócica em crianças.**



#### 4.2. Análise multivariada

Foi realizada análise de regressão logística, utilizando-se pneumonia pneumocócica como variável dependente. IL-6 foi um fator preditor independente para infecção pneumocócica, com uma OR = 5,56 (IC95% = 2,42 – 12,75;  $p < 0,001$ ). O modelo foi ajustado para idade, como variável contínua (OR = 1,04; IC95% = 0,74 – 1,45;  $p = 0,8$ ). Foi utilizado o valor de 12,5 pg/ml como ponto de corte para dicotomizar a variável independente.

A quimiocina CXCL10 alcançou valores mais baixos na curva ROC (0,62; IC95% = 0,52 – 0,72) e a OR no modelo de regressão logística foi limítrofe (1,0018 [IC95% = 1,0003 – 1,0033]).

#### 4.3. Valor preditivo negativo

Utilizando-se 12,5 pg/ml como ponto de corte para dicotomizar a variável: concentração sérica de IL-6, o valor preditivo negativo de IL-6 abaixo de 12,5 pg/ml para infecção pneumocócica foi igual a 90% (IC95% = 82% – 95%) (Tabela 3).

**Tabela 3. Valor diagnóstico de IL-6 sérica igual ou maior que 12,5 pg/ml para infecção pneumocócica em crianças hospitalizadas com pneumonia adquirida na comunidade**

IL-6 $\geq$ 12,5 pg/ml	Infecção pneumocócica		Total
	Yes	No	
Yes	29	47	76
No	9	81	90
<b>Total</b>	38	128	166

Sensibilidade:  $29/38 = 76,3\%$  (IC95%: 60,0% - 88,0%)

Especificidade:  $81/128 = 63,3\%$  (IC95%: 54,0% - 71,0%)

Valor preditivo positivo:  $29/76 = 38,2\%$  (IC95%: 28,0% - 49,0%)

Valor preditivo negativo:  $81/90 = 90,0\%$  (IC95%: 82,0% - 95,0%)

## VI. DISCUSSÃO

As citocinas detectadas no soro das crianças hospitalizadas por PAC, no momento da admissão, foram IL-8, IL-6 e IL-10 e as quimiocinas detectadas foram CXCL10 e CCL2.

A resposta inflamatória, a função de cada citocina e os fatores que influenciam nos perfis de citocinas na PAC ainda não foram completamente elucidados. Em geral, as citocinas têm sido agrupadas de acordo com seu perfil pró-inflamatório, como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-17 e TNF- $\alpha$ , e anti-inflamatório, como IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$ . Porém, sabe-se que esta classificação não é estática, já que muitas citocinas são capazes de exercer diferentes efeitos. Durante as fases iniciais da pneumonia, os macrófagos alveolares liberam diversas citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, cujas funções são recrutar e ativar os leucócitos polimorfonucleares sistêmicos necessários para a defesa contra as bactérias no local da infecção. Por outro lado, as citocinas anti-inflamatórias regulam a resposta inflamatória contra patógenos invasores e previnem lesão tecidual durante esta resposta ao diminuir a sua intensidade (Bordon et al., 2013).

Assim, citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias tem sido detectadas no soro de adultos e crianças com PAC na resposta inflamatória, incluindo TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e IFN- $\gamma$  (Moussa et al., 1994; Kosmas et al., 1997; Lieberman et al., 1997; Glynn et al., 1999; Antunes et al., 2002; Igonin et al., 2003; Chien et al., 2006; Tumgor et al., 2006; Kellum et al., 2007; Michelow et al., 2007; Calbo et al., 2008; Calbo et al., 2010; Endeman et al., 2011; Martinez et al., 2011; Menendez et al., 2012).

As quimiocinas regulam muitas funções dos leucócitos polimorfonucleares e mononucleares, principalmente o recrutamento e a mobilização seletiva destes leucócitos para os sítios inflamatórios; além disso, facilitam o desenvolvimento, regulam as



interações, regulam a homeostasia destas células e do processo inflamatório (Sabroe et al., 2002; Cruvinel et al., 2010). As quimiocinas também são mediadores fundamentais na ligação entre a imunidade inata e a imunidade adaptativa, influenciam na produção de anticorpos e na memória imunológica (Sabroe et al., 2002).

A detecção e função da quimiocina CXCL10 ainda não foi bem esclarecida nas infecções pulmonares em humanos. Esta quimiocina atua na regulação do recrutamento de linfócitos B, linfócitos T e células NK, assim como de células dendríticas e macrófagos. Esta quimiocina tem sido relacionada com a proteção contra as infecções virais do trato respiratório; estudos em camundongos mostraram elevação nos níveis de CXCL10 na infecção por VSR e evidenciaram uma função protetora do CXCL10 no hospedeiro relacionada com a redução da carga viral e a regulação de patogênese da doença por este vírus (Lindell et al., 2008; Kalinowski et al., 2014).

A quimiocina CCL2 é quimiotática para os leucócitos mononucleares (os monócitos) e desempenham um papel fundamental no recrutamento destas células nas infecções pulmonares. No estado de equilíbrio do trato respiratório, os macrófagos alveolares são renovados por células precursoras locais, porém quando ocorre um processo inflamatório, a renovação dos macrófagos alveolares ocorre pela entrada nos tecidos de monócitos circulantes e este recrutamento é regulado pela quimiocina CCL2 (Holt et al., 2008). Estudos em camundongos demonstraram que a expressão excessiva de CCL2 em animais infectados pelo *S. pneumoniae* estava relacionada com uma resolução mais efetiva do processo inflamatório e que a inibição do receptor para esta quimiocina reduz drasticamente a mobilização de monócitos para os pulmões e reduz a quantidade de macrófagos nos alvéolos (Winter et al.; 2007). Outros dois trabalhos relataram a detecção de CCL2, um no soro e outro no lavado broncoalveolar, em pacientes com pneumonia causada pelo vírus influenza A/H1N1 (Lee

et al., 2011; Zuniga et al., 2011).

A citocina IL-8, induzida pelo TNF- $\alpha$  e IL-1 é um dos principais agentes quimiotáticos dos leucócitos polimorfonucleares para o sítio da inflamação em doenças do trato respiratório (Bordon et al., 2013). Estudos demonstraram aumento dos níveis de IL-8 no lavado broncoalveolar de pacientes com PAC e aumento na expressão genética nas células deste lavado; além de aumento dos níveis de IL-8 em lavado broncoalveolar de camundongos estimulados por LPS (Abul et al., 2001; Li et al., 2011). Um estudo prévio em crianças com infecções do trato respiratório encontrou relação na detecção de IL-8 em lavado nasal com sintomas de infecção por VSR, demonstrando algum tipo de relação entre a quimiocina e infecções virais (Gern et al., 2002). No presente estudo, encontramos níveis detectáveis de IL-8 em crianças com pneumonia, porém sem relação com micro-organismos específicos. Outros trabalhos em adultos e em crianças detectaram IL-8 no soro de pacientes com PAC, no momento da admissão, semelhante ao resultado da presente pesquisa (Fernandez-Serrano et al., 2003; Igonin et al., 2003; Chien et al., 2006; Tumgor et al., 2006; Michelow et al., 2007; Calbo et al., 2010; Endeman et al., 2011; Menendez et al., 2012).

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória produzida por células da imunidade inata, os macrófagos e as células dendríticas, e adaptativa, as células T, que contribui para redução da produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (Medzhitov et al., 2011). Um estudo demonstrou que camundongos com ausência de resposta IL-10 tem aumento de letalidade por choque séptico, possivelmente devido a uma reação pró-inflamatória não controlada (Latifi et al., 2002). Da mesma forma, alteração genética na produção e liberação de IL-10 está relacionada com maior gravidade e mortalidade em pacientes com PAC (Gallagher et al., 2003). Estes dados sugerem que IL-10 equilibra a resposta pró-inflamatória; por outro lado um aumento na expressão de IL-10 pode

aumentar mortalidade devido a uma infecção não resolvida (Calbo & Garau, 2010). Outros estudos, de forma similar ao presente trabalho, detectaram IL-10 no soro de pacientes adultos com PAC, no momento da admissão (Glynn et al., 1999; Antunes et al., 2002; Kellum et al., 2007; Calbo et al., 2008; Calbo et al., 2010; Endeman et al., 2011; Martinez et al., 2011; Menendez et al., 2012).

A IL-6 é uma citocina produzida por vários tipos celulares do sistema imune, como macrófagos, células endoteliais, fibroblastos, células T e células B, em resposta a micro-organismos invasores e age tanto na imunidade inata quanto na adaptativa (Barton, 1997). Foram descritas diversas funções para IL-6: estimular a produção de neutrófilos na medula óssea, retardar a apoptose e amplificar a função citotóxica dos neutrófilos, incluindo a produção de radicais livres de oxigênio; regular mecanismos da imunidade adaptativa, como a proliferação de células T, o desenvolvimento de linfócitos T citotóxicos antígeno-específicos e estimulação de células B; parece também regular a função de importantes citocinas da resposta pró-inflamatória, IL-1 e TNF- $\alpha$  (Barton, 1997; Kraghsbjerg & Fredlund, 2001; Calbo & Garau, 2010). Na fase de reação aguda, IL-6 estimula os hepatócitos a produzirem as proteínas de fase aguda, como a proteína C reativa, e tem sido relatada uma correlação positiva entre essas duas moléculas na PAC (Toikka et al., 2000; Delclaux & Azoulay, 2003; Michelow et al., 2007; Calbo & Garau, 2010). A proteína C reativa desempenha um importante papel na infecção pneumocócica, uma vez que liga-se a parede celular do *S. pneumoniae*, ativa a via clássica do complemento, além de opsonizar a bactéria para promover a fagocitose pelos neutrófilos; as proteínas de fase aguda aumentam a resistência a infecções e promovem o reparo do tecido lesionado (Delclaux & Azoulay, 2003). IL-6 está associada com a proteção do hospedeiro contra infecções pulmonares causadas por bactérias. Um tipo de genótipo humano relacionado ao aumento na indução de IL-6 está associado com a

proteção de pacientes contra a disseminação bacteriana na infecção por *S. pneumoniae* (Schaaf et al., 2005). Elevação dos níveis séricos de IL-6 também tem sido associada com evolução para gravidade ou resolução mais lenta em pacientes com PAC (Antunes et al., 2002; Igonin et al., 2003; Chien et al., 2006; Kellum et al., 2007; Martinez et al., 2011). De forma semelhante aos resultados apresentados na presente pesquisa, foi detectada IL-6 no soro de pacientes com PAC, no momento da admissão, em estudos prévios (Moussa et al., 1994; Lieberman et al., 1997; Glynn et al., 1999; Antunes et al., 2002; Igonin et al., 2003; Chien et al., 2006; Tumgor et al., 2006; Kellum et al., 2007; Kosmas et al., 1997; Michelow et al., 2007; Calbo et al., 2008; Calbo et al., 2010; Endeman et al., 2011; Martinez et al., 2011; Menendez et al., 2012).

As citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-2, IL-4, IL-5 e IFN- $\gamma$  não foram detectadas neste estudo, tendo sido inesperada a ausência de produção de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  desde que se trata de uma doença infecciosa aguda e estas citocinas são pró-inflamatórias e participam da imunidade inata precoce contra os patógenos invasores, principalmente bacterianos. As citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , liberadas no epitélio respiratório por macrófagos alveolares, são essenciais para o início da resposta imune inata na pneumonia bacteriana, nas fases mais precoces. Estas citocinas são necessárias para o recrutamento de neutrófilos na pneumonia pneumocócica. Existe uma redundância funcional entre estas duas citocinas, assim a presença de uma pode compensar a ausência da outra (Calbo & Garau, 2010). A IL-12 é produzida pelas células apresentadoras de antígenos (fagócitos, células dendríticas e células de Langerhans). Esta citocina tem um efeito regulatório na resposta imune inata e adaptativa, atua nas células NK e nas células T e induz a produção do IFN- $\gamma$ , que, por sua vez, estimula o desenvolvimento de linfócitos da classe Th1 CD4 $^{+}$  e tem associação com defesa imune das mucosas. IL-12 também atua sinergicamente com a citocina IL-18, na produção de IFN- $\gamma$  (Ruan et al.,

2008; Salvatore et al., 2008).

As possíveis causas para explicar a ausência de detecção destas citocinas no soro dos pacientes são: o rápido tempo de ação e posterior eliminação, associado a meia-vida curta de muitas citocinas e com o tempo de doença prévio a apresentação do paciente aos serviços de saúde; a produção compartimentalizada destas citocinas nos tecidos pulmonares sem a liberação para a corrente sanguínea; o nível de lesão pulmonar e as diferentes etiologias implicadas no processo (Calbo & Garau, 2010).

Em relação a questão do tempo, a resposta imunológica é um processo dinâmico que varia no decorrer da infecção. A cronologia dessa resposta imune nas infecções respiratórias bacterianas foi descrita em animais; a associação da infecção respiratória com a resposta inflamatória ainda não foi bem descrita em humanos. Em um modelo animal para infecção pneumocócica foi visto que ocorre uma mudança na detecção das citocinas em diferentes compartimentos do organismo; no início da infecção são detectados TNF- $\alpha$  e IL-6 no lavado broncoalveolar; TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 no tecido pulmonar e IL-6 no soro; em seguida, ocorre uma liberação elevada de citocinas apenas no tecido pulmonar, com posterior diminuição das citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-1) no lavado broncoalveolar e tecidos pulmonares e finalmente bacteremia é associada com detecção de IL-6 e TNF- $\alpha$  no soro (Bergeron et al., 1998). Em um outro modelo animal de infecção pneumocócica, os níveis de IL-6 aumentaram progressivamente ao longo do tempo no grupo de animais doentes e não houve detecção de outras citocinas na corrente sanguínea, sendo que nos tecidos pulmonares as concentrações de IL-6 e IL-1 permaneceram elevadas neste grupo (Dallaire et al., 2001).

Diversos estudos tem demonstrado mudança nos níveis de citocinas séricas de pacientes admitidos com PAC ao longo dos dias após admissão hospitalar. Tem sido relatado que as concentrações de citocinas atingem seu pico na admissão e diminuem

após os primeiros dias de hospitalização; por outro lado pacientes que desenvolvem sepse mantêm níveis detectáveis de citocinas na corrente sanguínea por mais tempo (Antunes et al., 2002; Fernandez-Serrano et al., 2003; Kellum et al., 2007; Endeman et al., 2011; Bordon et al., 2013). No entanto, estes pacientes foram submetidos ao tratamento para a doença, fato que provavelmente interfere na dinâmica das citocinas sistêmicas na resposta às infecções respiratórias e não responde à questão sobre os níveis de citocinas detectados na admissão em relação ao tempo de doença prévio, desde o início dos sintomas até a admissão no serviço de saúde (Calbo et al., 2008).

Apenas um estudo em adultos analisou os níveis de citocinas em dois grupos divididos de acordo com o início dos sintomas em relação a entrada no serviço de emergência. Não foi observada mudança nos níveis de citocinas na comparação dos que realizaram a dosagem com menos ou mais de dois dias de apresentação dos sintomas, exceto no TNF- $\alpha$ , e a dosagem de todas as citocinas foram elevadas (Calbo et al., 2010). Por outro lado a mediana de início de doença e de febre do presente estudo é de 5 dias.

Provavelmente as citocinas IL-2, IL-4, IL-5 e IFN- $\gamma$  não foram detectadas também pelo momento de coleta das amostras, estas são citocinas relacionadas com fases mais posteriores da resposta imunológica, relacionadas com a imunidade adaptativa.

Em relação a questão da localização da resposta imunológica, esta normalmente é compartimentalizada, resultando em diferentes concentrações de mediadores inflamatórios nos pulmões em relação a circulação sanguínea (Calbo & Garau, 2010; Bordon et al., 2013). Em geral, as citocinas inflamatórias apresentam níveis mais elevados em lavado broncoalveolar em comparação com a dosagem sérica, apesar de diversos estudos já terem demonstrado detecção de citocinas no soro de pacientes com PAC (Kolsuz et al., 2003; Lee et al., 2010). Em um estudo em que foram comparados os

níveis das citocinas dosadas em escarro e no soro de pacientes com pneumonia, foram detectados níveis mais elevados de IL-1 $\beta$  e IL-8 no escarro e níveis mais elevados de IL-10, IL-12 e CXCL10 no soro; IFN- $\gamma$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  foram encontrados em ambas amostras (Bordon et al., 2013).

De acordo com o resultado específico apresentado neste estudo, IL-6 está significativamente associada com PAC pneumocócica, pois crianças com níveis IL-6 séricos  $\geq$  12,5 pg/ml possuem chance 5,56 vezes mais elevada (com intervalo de confiança de 95% entre 2,42 e 12,75) em relação a crianças com níveis mais baixos de IL-6 de apresentarem PAC pneumocócica. Foi realizada a investigação de um painel estendido de etiologias das infecções, o que permitiu realizar repetidas comparações. Até o presente momento, esta é a primeira vez que tal associação é relatada na literatura com tamanha evidência em crianças.

Além disso, foram realizadas diversas comparações de PAC causada por *S. pneumoniae* com ou sem outros patógenos associados, assim como PAC pneumocócica bacterêmica ou não-bacterêmica *versus* PAC causada por diferentes subgrupos etiológicos, separadamente, e encontrou-se os mesmos resultados, evidenciando que esta é uma resposta patógeno-específica para o *S. pneumoniae*, considerando que, na amostra estudada no presente trabalho, nenhuma outra bactéria provocou tal elevação de IL-6. Estes resultados foram ainda confirmados, pois a mensuração das citocinas foi realizada duas vezes na mesma amostra e as análises estatísticas evidenciaram os mesmos resultados.

A IL-6 é referida em estudos prévios como uma citocina pró-inflamatória importante na defesa contra o pneumococo (van der Poll & Opal, 2009; Calbo & Garau, 2010), mas seu papel ainda não foi completamente compreendido neste tipo de infecção. No presente estudo, IL-6 demonstrou ser um potencial biomarcador para PAC

pneumocócica. Uma correlação positiva entre níveis de IL-6 e proteína C reativa (outro biomarcador para infecção bacteriana) foi relatada em crianças com PAC, mas não com um patógeno específico (Toikka et al., 2000; Michelow et al., 2007).

Na população pediátrica, existe apenas um estudo prévio que relaciona diversos agentes etiológicos, também investigados por um painel estendido de testes, com 15 citocinas diferentes, mas nenhuma associação foi encontrada entre IL-6 e alguma etiologia específica. No referido estudo, foi utilizado um método similar à presente pesquisa para a medição das citocinas. Este estudo difere do presente, pois o diagnóstico de infecção por *S. pneumoniae* foi baseado somente na hemocultura ou na análise de PCR para pneumolisina. No estudo citado, a mediana (IIQ) de IL-6 dentre 12 crianças com infecção pneumocócica foi 89 (43-203) pg/ml enquanto que nas 8 crianças com infecção viral foi 82 (50-381) pg/ml. Importante destacar que todas as crianças obtiveram hemocultura negativa e 12 crianças apresentaram PCR para pneumolisina positiva (Michelow et al., 2007). Comparando-se este resultado com o do estudo aqui apresentado, é possível inferir que infecção pneumocócica ocorreu no subgrupo considerado como infecção viral e o *S. pneumoniae* não foi identificado, pois pode haver crianças com PCR para pneumolisina negativa e ainda assim a infecção pneumocócica estar em curso.

Outro estudo comparou os níveis séricos de IL-8 e IL-6 entre crianças com PAC causada por *M. pneumoniae* (detectada por sorologia) e PAC causada por bactéria piogênica, incluindo o *S. pneumoniae* (detectada apenas por hemocultura). Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa nos níveis de IL-6 entre os dois grupos. No entanto, de acordo com a descrição das técnicas utilizadas para detectar os agentes etiológicos, não foi excluída infecção pneumocócica no grupo da infecção causada por *M. pneumoniae*; além disso não foi criado um grupo específico de infecção



pneumocócica para comparação com outros grupos etiológicos (Tumgor et al., 2006). A principal diferença entre este resultado prévio e o do presente trabalho é a definição etiológica da PAC na amostra estudada. Aqui, diversas técnicas microbiológicas foram aplicadas com o objetivo de otimizar a acurácia dos resultados. *S. pneumoniae* foi diagnosticado por hemocultura e PCR para detecção do DNA pneumocócico no creme leucocitário do sangue e determinação dos títulos de anticorpos séricos contra o *S. pneumoniae* em amostras pareadas.

Foi demonstrado, em um outro trabalho na população pediátrica, que IL-6 tem um valor limitado para distinguir infecção viral de bacteriana em crianças, incluindo a análise de infecção pneumocócica versus outras infecções (Toikka et al., 2000). No entanto, neste estudo, a maioria (86%) das amostras de sangue para dosagem e análise de citocinas séricas, foi coletada na primeira manhã após o início do uso de antibiótico. Está relatada na literatura diminuição de IL-6 após o início do tratamento com antibiótico em adultos hospitalizados com PAC (Antunes et al., 2002; Enderman et al., 2011).

A capacidade de IL-6 na predição de bacteremia na infância foi pesquisada em dois estudos prévios. Em um estudo de caso-controle, crianças com idade entre 60 dias e 36 meses com febre sem foco e com bacteremia (o grupo de casos, n=33) - determinada por hemocultura (58% positivas para *S. pneumoniae*) apresentou níveis séricos de IL-6 significativamente mais elevados do que crianças com febre sem foco e hemocultura negativa (o grupo controle, n=66). Não houve definição etiológica no grupo controle e foram excluídas todas as crianças com um potencial foco infeccioso bacteriano. Dessa forma não foi possível, nesta análise, comparar infecção pneumocócica bacterêmica com infecção pneumocócica não-bacterêmica neste estudo (Strait et al., 1999).

No outro estudo, IL-6 foi significativamente associada com bacteremia em crianças com infecção localizada no trato respiratório, infecção de pele e tecido mole,

infecção do trato urinário ou osteomielite. Os 30 pacientes incluídos no grupo de pacientes com infecção bacterêmica foram comparados com um outro grupo de pacientes com infecção não-bacterêmica; no entanto apenas 5 apresentaram hemocultura positiva, os outros 25 foram considerados como provável infecção bacterêmica, baseada na presença de sepse, sem confirmação microbiológica (Pavare et al., 2010).

Estudos em adultos mostram resultados similares aos deste estudo. Em um estudo prévio, os níveis de IL-6 sérica medida em pacientes com PAC pneumocócica bacterêmica foram significativamente mais elevados do que em pacientes com PAC causada por *M. pneumoniae* (Lieberman et al., 1997). Além disso, adultos com PAC pneumocócica apresentaram níveis séricos de IL-6 significativamente mais elevados que pacientes com PAC causada por *Legionella pneumophila*, *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *Coxiella burnetti*, ou vírus respiratórios (vírus influenza, vírus parainfluenza, adenovírus e VSR) (Enderman et al., 2011).

Dentre as limitações do presente estudo, pode-se citar que além das citocinas classicamente reconhecidas como essenciais para o processo inflamatório, outras citocinas como IL-17 e IL-18, que não foram dosadas, também tem demonstrado funções importantes na modulação da resposta inflamatória no trato respiratório (Sonnenberg et al., 2010; Marquez et al., 2012; Lundgren et al., 2012).

Uma outra limitação, em relação ao objetivo específico, é sobre a detecção dos agentes etiológicos. Os diagnósticos etiológicos obtidos neste trabalho foram presuntivos, pois não foram realizados através de pesquisa direta para a presença dos micro-organismos nos pulmões. Diversos testes diagnósticos foram utilizados: *S. pneumoniae* foi diagnosticado com DNA pneumocócico no creme leucocitário do sangue e aumento de anticorpos séricos contra o *S. pneumoniae* em amostras pareadas. Apesar da utilidade da sorologia e do PCR ainda ser controversa, estes procedimentos possuem

melhor aplicabilidade, pois são mais acessíveis do que cultura de tecidos ou de secreções do trato respiratório em crianças. Os testes sorológicos para diagnosticar pneumonia não-bacterêmica ainda não foram bem validados, pois não existe um padrão ouro para este tipo de infecção. Estes procedimentos são justificáveis, pois até o presente momento não existe uma forma melhor de diagnosticar o agente etiológico de PAC em crianças. E por último, até o presente momento, dosagem de IL-6 não é amplamente disponível na prática clínica. De qualquer modo, o dado de que IL-6 está associado a infecção pneumocócica abre perspectivas para novos estudos nesta área.

## **VII. PROPOSTAS DE ESTUDO**

1. Avaliar se existe associação entre níveis de citocinas séricas e alterações na radiografia de tórax, no quadro inicial de crianças com PAC.
2. Avaliar se existe associação entre concentrações de citocinas séricas e gravidade, no quadro inicial de crianças com PAC.
3. Avaliar se existe associação entre a citocina IL-6 e infecção pneumocócica em crianças não hospitalizadas com PAC, ou seja, com apresentação sem gravidade.

## VIII. CONCLUSÕES

1. Em crianças abaixo de 5 anos de idade e hospitalizadas com PAC, as citocinas e quimiocinas detectadas na admissão são principalmente associadas a resposta inflamatória aguda, são elas IL-6, IL-10, IL-8, CXCL10 e CCL2.
2. IL-6 é um preditor independente para infecção pneumocócica em crianças abaixo de 5 anos de idade hospitalizadas com PAC.

## IX. SUMMARY

CYTOKINES AND CHEMOKINE PROFILE IN HOSPITALIZED CHILDREN WITH COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA. Background: community-acquired pneumonia (CAP) is the main cause of death in children under-five years worldwide. However the etiologic and radiographic diagnosis remains a challenge in pediatrics and there is a lack of studies about the inflammatory response in this disease. Objective: To describe the profile of detected cytokines/chemokine at the moment of admission of children with CAP and evaluate if there is association between any cytokine, on admission, and pneumococcal CAP. Methods: this was a prospective study conducted at the Emergency Room of Federal University of Bahia Hospital, in Salvador, Brazil. Children aged less than five years admitted with CAP in a 21-month period were evaluated. On admission, clinical and radiological data were collected as well as biological samples to investigate 18 etiological agents and determine 14 serum cytokine/chemokines levels. Results: From 166 enrolled patients, 98 (59%) were boys and the median age was 17 (interquartile range [IQR]: 10-28) months. IL-8, CXCL10, CCL2, IL-6, and IL-10 showed detected levels and their median values were 78.0 pg/ml, 74.2 pg/ml, 19,1 pg/ml, 10.6 pg/ml, and 3.6 pg/ml, respectively. Pneumococcal infection was detected in 38 (22.9%) cases among which the median IL-6 concentration was 31.2 pg/ml (IQR: 12.4–54.1pg/ml). Other causative agents (*Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, atypical bacteria and viruses) were detected in 128 cases with the median IL-6 concentration 9.0 (IQR: 4.1–22.0g/ml). The area under the receiver-operating-characteristic curve for IL-6 to predict pneumococcal CAP was 0.74 (IC95%: 0.65 – 0.83;  $p < 0.001$ ). By multivariate analysis, with pneumococcal CAP as dependent variable, IL-6 was an independent predictor for pneumococcal infection (OR=5.56;

IC95% = 2.42–12.75; cut-off point 12.5 pg/ml). The negative predictive value of IL-6 under 12.5 pg/ml for pneumococcal infection was 90% (IC95%: 82% - 95%). Independently significant difference was not found for the other cytokines/chemokines.

Conclusions: Serum cytokines/chemokines are detectable at the moment of admission of children with CAP. Serum IL-6 concentration on admission is independently associated with pneumococcal infection among children under-5 years with CAP.

Key words: 1. Pneumonia, 2. Lung inflammation, 3. *Streptococcus pneumoniae*, 4. Cytokines, 5. Immunity.

## X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abul H, Abul A, Khan I, Mathew TC, Ayed A, Al-Athary E. Levels of IL-8 and myeloperoxidase in the lungs of pneumonia patients. *Mol Cell Biochem*, 217: 107-12, 2001.
2. Antunes G, Evans SA, Lordan JL, Frew AJ. Systemic cytokine levels in community-acquired pneumonia and their association with disease severity. *Eur Respir J*, 20: 990-5, 2002.
3. Bals R, Hiemstra PS. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur Respir J*, 23: 327-33, 2004.
4. Barton BE. IL-6: insights into novel biological activities. *Clin Immunol Immunopathol*, 85: 16-20, 1997.
5. Bergeron Y, Ouellet N, Deslauriers AM, Simard M, Olivier M, Bergeron MG. Cytokine kinetics and other host factors in response to pneumococcal pulmonary infection in mice. *Infect Immun*, 66: 912-22, 1998.
6. Black CP. Systematic review of the biology and medical management of respiratory syncytial virus infection. *Respir Care*, 48: 209-31, 2003.
7. Bordon J, Aliberti S, Fernandez-Botran R, Uriarte SM, Rane MJ, Duvvuri P, Peyrani P, Morlacchi LC, Blasi F, Ramirez JA. Understanding the roles of cytokines and neutrophil activity and neutrophil apoptosis in the protective versus deleterious inflammatory response in pneumonia. *Int J Infect Dis*, 17: e76–e83, 2013.
8. Braciale TJ1, Sun J, Kim TS. Regulating the adaptive immune response to respiratory virus infection. *Nat Rev Immunol*, 12: 295-305, 2012.



9. Bradley JS, Byington CL, Shah SS, Alverson B, Carter ER, Harrison C, Kaplan SL, Mace SE, McCracken GH Jr, Moore MR, St Peter SD, Stockwell JA, Swanson JT, Pediatric Infectious Diseases Society and the Infectious Diseases Society of America. The management of community-acquired pneumonia in infants and children older than 3 months of age: clinical practice guidelines by Pediatric Infectious Diseases Society and Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*, 53: 25-76, 2011.
10. Calbo E, Alsina M, Rodríguez-Carballeira M, Lite J, Garau J. Systemic expression of cytokine production in patients with severe pneumococcal pneumonia: effects of treatment with a beta-lactam versus a fluoroquinolone. *Antimicrob Agents Chemother*, 52: 2395-402, 2008.
11. Calbo E, Alsina M, Rodríguez-Carballeira M, Lite J, Garau J. The impact of time on the systemic inflammatory response in pneumococcal pneumonia. *Eur Respir J*, 35: 614-8, 2010.
12. Calbo E, Garau J. Of mice and men: innate immunity in pneumococcal pneumonia. *Int J Antimicrob Agents*, 35: 107-13, 2010.
13. Chen K, Kolls JK. T cell-mediated host immune defenses in the lung. *Annu Rev Immunol*, 31: 605-33, 2013.
14. Cherian T, Mulholland EK, Carlin JB, Ostensen H, Amin R, de Campo M, Greenberg D, Lagos R, Lucero M, Madhi SA, O'Brien KL, Obaro S, Steinhoff MC. Standardized interpretation of paediatric chest radiographs for the diagnosis of pneumonia in epidemiological studies. *Bull World Health Organ*, 83: 353-9, 2005.

15. Chien JY, Hsueh PR, Cheng WC, Yu CJ, Yang PC. Temporal changes in cytokine/chemokine profiles and pulmonary involvement in severe acute respiratory syndrome. *Respirology*, 11: 715-22, 2006.
16. Christ-Crain M, Opal SM. Clinical review: the role of biomarkers in the diagnosis and management of community-acquired pneumonia. *Crit Care*, 14: 2-11, 2010.
17. Cruvinel WM, Mesquita Júnior D, Araújo JAP, Catelan TTT, Souza AWS, Silva NP, Andrade LEC. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Rev Bras Reumatol*, 50: 434-61, 2010.
18. Dallaire F, Ouellet N, Bergeron Y, Turmel V, Gauthier MC, Simard M, Bergeron MG. Microbiological and inflammatory factors associated with the development of pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis*, 184: 292-300, 2001.
19. Delclaux C, Azoulay E. Inflammatory response to infectious pulmonary injury. *Eur Respir J*, Suppl. 42: 10s-14s, 2003.
20. El-Radhi AS, Barry W. Thermometry in paediatric practice. *Arch Dis Child*, 91: 351-6, 2006.
21. Endeman H, Meijvis SCA, Rijkers GT, van Velzen-Blad H, van Moorsel CHM, Grutters JC, Biesma DH.. Systemic cytokine response in patients with community-acquired pneumonia. *Eur Respir J*, 37: 1431-8, 2011.
22. Fernández-Serrano S, Dorca J, Coromines M, Carratalà J, Gudiol F, Manresa F. Molecular inflammatory responses measured in blood of patients with severe community-acquired pneumonia. *Clin Diagn Lab Immunol*, 10: 813-20, 2003.

23. Gallagher PM, Lowe G, Fitzgerald T, Bella A, Greene CM, McElvaney NG, O'Neill SJ. Association of IL-10 polymorphism with severity of illness in community acquired pneumonia. *Thorax*, 58: 154-6, 2003.
24. Gavin KP and Mitchell TJ. Innate immunity and the pneumococcus. *Microbiology*, 152: 285-93, 2006.
25. Gern JE, Martin MS, Anklam KA, Shen K, Roberg KA, Carlson-Dakes KT, Adler K, Gilbertson-White S, Hamilton R, Shult PA, Kirk CJ, Da Silva DF, Sund SA, Kosorok MR, Lemanske RF Jr. Relationships among specific viral pathogens, virus-induced interleukin-8, and respiratory symptoms in infancy. *Pediatr Allergy Immunol*, 13: 386-93, 2002.
26. Gillespie SH, Balakrishnan I. Pathogenesis of pneumococcal infection. *J Med Microbiol*. 49: 1057-67, 2000.
27. Glynn P, Coakley R, Kilgallen I, Murphy N, O'Neill S. Circulating interleukin 6 and interleukin 10 in community acquired pneumonia. *Thorax*, 54: 51-5, 1999.
28. Halonen P, Rocha E, Hierholzer J, Holloway B, Hyypiä T, Hurskainen P, Pallansch M. Detection of enteroviruses and rhinoviruses in clinical specimens by PCR and liquid-phase hybridization. *J Clin Microbiol*, 33: 648-53, 1995.
29. Harris M, Clark J, Coote N, Fletcher P, Harnden A, McKean M, Thomson A; British Thoracic Society Standards of Care Committee. British Thoracic Society guidelines for the management of community acquired pneumonia in children: update 2011. *Thorax*, 66: ii1-ii23, 2011.
30. Holt PG, Strickland DH, Wikström ME, Jahnsen FL. Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract. *Nat Rev Immunol*, 8: 142-52, 2008.
31. Hyypiä T, Puhakka T, Ruuskanen O, Mäkelä M, Arola A, Arstila P. Molecular

- diagnosis of human rhinovirus infection: comparison with virus isolation. *J Clin Microbiol*, 36: 2081–3, 1998.
32. Igonin AA, Armstrong VW, Shipkova M, Lazareva NB, Kukes VG, Oellerich M. Circulating cytokines as markers of systemic inflammatory response in severe community-acquired pneumonia. *Clin Biochem*, 37: 204-9, 2003.
33. Juvén T, Mertsola J, Waris M, Leinonen M, Meurman O, Roivainen M, Eskola J, Saikku P, Ruuskanen O. Etiology of community-acquired pneumonia in 254 hospitalized children. *Pediatr Infect Dis J*, 19: 293–8, 2000.
34. Kalinowski A, Ueki I, Min-Oo G, Ballon-Landa E, Knoff D, Galen B, Lanier LL, Nadel JA, Koff JL. EGFR activation suppresses respiratory virus-induced IRF1-dependent CXCL10 production. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 307: L186-96, 2014.
35. Kellum JA, Kong L, Fink MP, Weissfeld LA, Yealy DM, Pinsky MR, Fine J, Krichevsky A, Delude RL, Angus DC; GenIMS Investigators. Understanding the inflammatory cytokine response in pneumonia and sepsis: results of the Genetic and Inflammatory Markers of Sepsis (GenIMS) Study. *Arch Intern Med*, 167: 1655-63, 2007.
36. Kolsuz M, Erginel S, Alataş O, Alataş F, Metintaş M, Uçgun I, Harmanci E, Colak O. Acute phase reactants and cytokine levels in unilateral community-acquired pneumonia. *Respiration*, 70: 615-22, 2003.
37. Korppi M, Jartti T, Hedman K, Söderlund-Venermo M. Serologic diagnosis of human bocavirus infection in children. *Pediatr Infect Dis J*, 29:387, 2010.
38. Korppi M, Paldanius M, Hyvarinen A, Nevalainen A. Simkania negevensis and newly diagnosed asthma: a case – control study in 1- to 6-year-old children. *Respirology*, 11: 80–3, 2006.

39. Kosmas EN, Baxevanis CN, Papamichail M, Kordosis T. Daily variation in circulating cytokines and acute-phase proteins correlates with clinical and laboratory indices in community-acquired pneumonia. *Eur J Clin Invest*, 27: 308-15, 1997.
40. Kragstjerg P, Fredlund H. The effects of live *Streptococcus pneumoniae* and tumor necrosis factor-alpha on neutrophil oxidative burst and beta 2-integrin expression. *Clin Microbiol Infect*, 7: 125-9, 2001.
41. Latifi SQ, O'Riordan MA, Levine AD. Interleukin-10 controls the onset of irreversible septic shock. *Infect Immun*, 70: 4441-6, 2002.
42. Lee N, Chan PK, Wong CK, Wong KT, Choi KW, Joynt GM, Lam P, Chan MC, Wong BC, Lui GC, Sin WW, Wong RY, Lam WY, Yeung AC, Leung TF, So HY, Yu AW, Sung JJ, Hui DS. Viral clearance and inflammatory response patterns in adults hospitalized for pandemic 2009 influenza A (H1N1) virus pneumonia. *Antivir Ther*, 16: 237-47, 2011.
43. Lee YL, Chen W, Chen LY, Chen CH, Lin YC, Liang SJ, Shih CM. Systemic and bronchoalveolar cytokines as predictors of in-hospital mortality in severe community-acquired pneumonia. *J Crit Care*, 25: e7-13, 2010.
44. Li B, Dong C, Wang G, Zheng H, Wang X, Bai C. Pulmonary epithelial CCR3 promotes LPS-induced lung inflammation by mediating release of IL-8. *J Cell Physiol*, 226: 2398-405, 2011.
45. Lieberman D, Livnat S, Schlaeffer F, Porath A, Horowitz S, Levy R. IL-1 $\beta$  and IL-6 in community-acquired pneumonia: bacteremic pneumococcal pneumonia versus *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. *Infection*, 25: 90-4, 1997.
46. Lindell DM, Lane TE, Lukacs NW. CXCL10/CXCR3-mediated responses promote immunity to respiratory syncytial virus infection by augmenting

- dendritic cell and CD8(+) T cell efficacy. *Eur J Immunol*, 38: 2168-79, 2008.
47. Liu L, Oza S, Hogan D, Perin J, Rudan I, Lawn JE, Cousens S, Mathers C, Black RE. Global, regional, and national causes of child mortality in 2000-13, with projections to inform post-2015 priorities: an updated systematic analysis. *Lancet*, 385: 430-40, 2015.
48. Lundgren A, Bhuiyan TR, Novak D, Kaim J, Reske A, Lu YJ, Qadri F, Malley R. Characterization of Th17 responses to *Streptococcus pneumoniae* in humans: comparisons between adults and children in a developed and a developing country. *Vaccine*, 30: 3897-907, 2012.
49. Mäkelä MJ, Puhakka T, Ruuskanen O, Leinonen M, Saikku P, Kimpimäki M, Blomqvist S, Hyypiä T, Arstila P. Viruses and bacteria in the etiology of the common cold. *J Clin Microbiol*, 36: 539 – 42, 1998.
50. Marqués JM, Rial A, Muñoz N, Pelay FX, Van Maele L, Léger H, Camou T, Sirard JC, Benecke A, Chabalgoity JA. Protection against *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 acute infection shows a signature of Th17- and IFN- $\gamma$ -mediated immunity. *Immunobiology*, 217: 420-9, 2012.
51. Martínez R1, Menéndez R, Reyes S, Polverino E, Cillóniz C, Martínez A, Esquinas C, Filella X, Ramírez P, Torres A. Factors associated with inflammatory cytokine patterns in community-acquired pneumonia. *Eur Respir J*, 37: 393-9, 2011.
52. McIntosh K. Community-acquired pneumonia in children. *N Engl J Med*, 346: 429-37, 2002.
53. Medzhitov R, Shevach EM, Trinchieri G, Mellor AL, Munn DH, Gordon S, Libby P, Hansson GK, Shortman K, Dong C, Gabrilovich D, Gabryšová L,

- Howes A, O'Garra A. Highlights of 10 years of immunology in Nature Reviews Immunology. *Nat Rev Immunol*, 11: 693-702, 2011.
54. Menéndez R, Sahuquillo-Arce JM, Reyes S, Martínez R, Polverino E, Cillóniz C, Córdoba JG, Montull B, Torres A. Cytokine activation patterns and biomarkers are influenced by microorganisms in community-acquired pneumonia. *Chest*, 141: 1537-45, 2012.
55. Michelow IC, Katz K, McCracken GH, Hardy RD. Systemic cytokine profile in children with community-acquired pneumonia. *Pediatr Pulmonol*, 42: 640-5, 2007.
56. Moldoveanu B, Otmishi P, Jani P, Walker J, Sarmiento X, Guardiola J, Saad M, Yu J. Inflammatory mechanisms in the lung. *J Inflamm Res*, 2: 1–11, 2009.
57. Moussa K, Michie HJ, Cree IA, McCafferty AC, Winter JH, Dhillon DP, Stephens S, Brown RA. Phagocyte function and cytokine production in community acquired pneumonia. *Thorax*, 49: 107-11, 1994.
58. Nair H, Simões EAF, Rudan I, Gessner BD, Azziz-Baumgartner E, Zhang JS, Feikin DR, Mackenzie GA, Moïsi JC, Roca A, Baggett HC, Zaman SM, Singleton RJ, Lucero MG, Chandran A, Gentile A, Cohen C, Krishnan A, Bhutta ZA, Arguedas A, Clara AW, Andrade AL, Ope M, Ruvinsky RO, Hortal M, McCracken JP, Madhi SA, Bruce N, Qazi SA, Morris SS, El Arifeen S, Weber MW, Scott JA, Brooks WA, Breiman RF, Campbell H; Severe Acute Lower Respiratory Infections Working Group. Global and regional burden of hospital admissions for severe acute lower respiratory infections in young children in 2010: a systematic analysis. *Lancet*, 381: 1380-90, 2013.
59. Nascimento-Carvalho CM, Cardoso M-RA, Meriluoto M, Kempainen K, Kantola K, Ruuskanen O, Hedman K, Söderlund-Venermo M. Human bocavirus

- infection diagnosed serologically among children admitted to hospital with community-acquired pneumonia in a tropical region. *J Med Virol*, 84: 253–8, 2012.
60. Nascimento-Carvalho CM, Cardoso MRA, Paldanius M, Barral A, Araújo-Neto CA, Saukkoriipi A, Vainionpää R, Leinonen M, Ruuskanen O. *Simkania negevensis* infection among Brazilian children hospitalized with community-acquired pneumonia. *J Infect*, 58: 250-3, 2009.
61. Nascimento-Carvalho CM, Cardoso M-RA, Ruuskanen O, Lappalainen M Sole infection by human metapneumovirus among children with radiographically diagnosed community-acquired pneumonia in a tropical region. *Influenza Other Respir Viruses*, 5: 285-7, 2011.
62. Nascimento-Carvalho CM, Ribeiro CT, Cardoso MRA, Barral A, Araújo-Neto CA, Oliveira JR, Sobral LS, Viriato D, Souza AL, Saukkoriipi A, Paldanius M, Vainionpää R, Leinonen M, Ruuskanen O. The role of respiratory viral infections among children hospitalized for community-acquired pneumonia in a developing country. *Pediatr Infect Dis J*, 27: 939-41, 2008.
63. Ogra PL. Respiratory syncytial virus: The virus, the disease and the immune response. *Paediatr Respir Rev*, 5: S119–26, 2004.
64. Pavare J, Grope I, Kalnins I, Gardovska D. High-mobility group box-1 protein, lipopolysaccharide-binding protein, interleukin-6 and C-reactive protein in children with community acquired infections and bacteraemia: a prospective study. *BMC Infect Dis*, 10:28, 2010.
65. Picard C, Casanova JL, Puel A. Infectious diseases in patients with IRAK-4, MyD88, NEMO, or I $\kappa$ B $\alpha$  deficiency. *Clin Microbiol Rev*, 24:490-7, 2011.



66. Rosenzweig SD, Holland SM. Recent insights into the pathobiology of innate immune deficiencies. *Curr Allergy Asthma Rep*, 11: 369-77, 2011.
67. Ruan S, McKinley L, Zheng M, Rudner X, D'Souza A, Kolls JK, Shellito JE. Interleukin-12 and host defense against murine *Pneumocystis pneumonia*. *Infect Immun*, 76: 2130-7, 2008.
68. Sabroe I, Lloyd CM, Whyte MK, Dower SK, Williams TJ, Pease JE. Chemokines, innate and adaptive immunity, and respiratory disease. *Eur Respir J*, 19: 350-5, 2002.
69. Salvatore CM, Fonseca-Aten M, Katz-Gaynor K, Gomez AM, Hardy RD. Intranasal interleukin-12 therapy inhibits *Mycoplasma pneumoniae* clearance and sustains airway obstruction in murine pneumonia. *Infect Immun*, 76: 732-8, 2008.
70. Saukkoriipi A, Palmu A, Kilpi T, Leinonen M. Real-time quantitative PCR for the detection of *Streptococcus pneumoniae* in the middle ear fluid of children with acute otitis media. *Mol Cell Probes*. 2002; 16: 385-90.
71. Schaaf B, Rupp J, Müller-Steinhardt M, Kruse J, Boehmke F, Maass M, Zabel P, Dalhoff K. The interleukin-6 -174 promoter polymorphism is associated with extrapulmonary bacterial dissemination in *Streptococcus pneumoniae* infection. *Cytokine*, 31: 324-8, 2005.
72. Scott JAG, Wonodi C, Moisi JC, Deloria-Knoll M, DeLuca AN, Karron RA, Bhat N, Murdoch DR, Crawley J, Levine OS, O'Brien KL, Feikin DR, and the Pneumonia Methods Working Group. The definition of pneumonia, the assessment of severity, and clinical standardization in the pneumonia etiology research for child health study. *Clin Infect Dis*, 54: S109-16, 2012.
73. Scott JAG. The global epidemiology of childhood pneumonia 20 years on. *Bull World Health Organ*, 86: 494-6, 2008.

74. Sonnenberg GF, Nair MG, Kirn TJ, Zaph C, Fouser LA, Artis D. Pathological versus protective functions of IL-22 in airway inflammation are regulated by IL-17A. *J Exp Med*, 207: 1293-305, 2010.
75. Stein RT, Marostica PJC. Community-acquired pneumonia: a review and recent advances. *Pediatr Pulmonol*, 42: 1095–103, 2007.
76. Strait RT, Kelly KJ, Kurup VP. Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-6 levels in febrile, young children with and without occult bacteremia. *Pediatrics*, 104: 1321-6, 1999.
77. Toikka P, Irjala K, Juvén T, Virkki R, Mertsola J, Leinonen M, Ruuskanen O. Serum procalcitonin, C-reactive protein and interleukin-6 for distinguishing bacterial and viral pneumonia in children. *Pediatr Infect Dis J*, 19: 598-602, 2000.
78. Tumgor G, Celik U, Alabaz D, Cetiner S, Yaman A, Yildizdas D, Alhan E. Aetiological agents, interleukin-6, interleukin-8 and CRP concentrations in children with community- and hospital-acquired pneumonia. *Ann Trop Paediatr*, 26: 285-91, 2006.
79. van der Poll T, Opal SM. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet* 374: 1543-56, 2009.
80. Wardlaw T, Salama P, Johansson EW, Mason E. Pneumonia: the leading killer of children. *Lancet*, 368: 1048-50, 2006.
81. Waris M, Toikka P, Saarinen T et al. Diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children. *J Clin Microbiol*, 36: 3155-9, 1998.
82. Winter C, Taut K, Srivastava M, Länger F, Mack M, Briles DE, Paton JC, Maus R, Welte T, Gunn MD, Maus UA. Lung-specific overexpression of CC chemokine ligand (CCL) 2 enhances the host defense to *Streptococcus*

- pneumoniae infection in mice: role of the CCL2-CCR2 axis. *J Immunol*, 178: 5828-38, 2007.
83. World Health Organization (2013) Pocket Book of Hospital Care for Children. Guidelines for the management of common childhood illnesses. 2<sup>nd</sup> edition. Geneva: World Health Organization. 412 p. : Disponível em: [http://www.who.int/maternal\\_child\\_adolescent/documents/child\\_hospital\\_care/en/index.html](http://www.who.int/maternal_child_adolescent/documents/child_hospital_care/en/index.html). Acesso em: 4 de junho de 2013.
84. Yamaguchi T, Yamazaki T, Inoue M, et al. Prevalence of antibodies against *Simkania negevensis* in a healthy Japanese population determined by the microimmunofluorescence test. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2005; 43:21-7.
85. Yang H, Ko HJ, Yang JY, Kim JJ, Seo SU, Park SG, Choi SS, Seong JK, Kweon MN. Interleukin-1 promotes coagulation, which is necessary for protective immunity in the lung against *Streptococcus pneumoniae* infection. *J Infect Dis*, 207: 50-60, 2013.
86. Zhang P, Summer WR, Bagby GJ, Nelson S. Innate immunity and pulmonary host defense. *Immunol Rev*, 173: 39-51, 2000.

## **XI. ARTIGO**

“The predictive value of serum interleukin-6 for pneumococcal infection among children with community-acquired pneumonia”. **The Pediatric Infectious Disease Journal** [submetido, *vide* Normas de Publicação no ANEXO 5 e correio eletrônico do periódico confirmando submissão do artigo para análise no ANEXO 6].

## **XII. ANEXOS**

ANEXO 1. Termo de consentimento livre e esclarecido

ANEXO 2 Formulário de Avaliação Clínica

ANEXO 3 Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa e pelo Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

ANEXO 4. Normas de publicação do periódico *The Pediatric Infectious Disease Journal* para o artigo

ANEXO 5. Carta do Periódico confirmando submissão do artigo

ANEXO 6 Trabalhos prévios com a descrição das técnicas utilizadas no presente estudo

## ANEXO 1

## TERMO DE CONSENTIMENTO:

Título do projeto de pesquisa: Estudo da Etiologia de Pneumonia Adquirida na Comunidade por Métodos Específicos e Não Invasivos em Crianças Brasileiras Hospitalizadas

A recusa à presente autorização em nada repercutirá sobre a assistência à saúde a ser prestada ao paciente.

**A qualquer momento poderei interromper para perguntar sobre qualquer dúvida que surgir durante a apresentação das informações abaixo escritas.**

Eu, ....., fui procurado(a) pela Profa. Cristiana Nascimento de Carvalho da Faculdade de Medicina do Estado da Bahia, CRM 9371, sobre o projeto de pesquisa com o título acima citado. O menor ....., sob a minha inteira responsabilidade, foi convidado a participar deste projeto.

Pneumonia é uma das principais causas de hospitalização e óbito em crianças menores que 5 anos nos países em desenvolvimento. Não há estudos que tenham investigado de forma ampla os agentes causais destas pneumonias. Este estudo busca realizar esta investigação através da análise de duas amostras de 3,0ml de sangue venoso coletadas com intervalo de 2 semanas e da análise de secreção do nariz, a qual será coletada com uma sonda fina, durando menos de 1 minuto esta coleta, procedimento considerado com mínima chance de provocar machucado. Para as crianças que estiverem participando deste estudo, serão fornecidos quatro vales-transportes para o retorno duas semanas após a primeira avaliação.

Se eu concordar, minha criança poderá participar deste estudo, e as informações clínicas e laboratoriais registradas do caso serão utilizadas de forma anônima para esta investigação. No entanto, a criança receberá o tratamento completo e os procedimentos padronizados clinicamente para diagnóstico e acompanhamento serão realizados independente da participação no estudo.

## CONSENTIMENTO

Autorizo a inclusão do menor \_\_\_\_\_ sob a minha responsabilidade no estudo intitulado Estudo da Etiologia de Pneumonia Adquirida na Comunidade por Métodos Específicos e Não Invasivos em Crianças Brasileiras Hospitalizadas

---

Assinatura de um dos pais / guardiões

---

Assinatura do Médico

---

Assinatura da testemunha

---

Local e data

**DOCUMENTO EM DUAS VIAS, UMA PARA SER ENTREGUE A PESSOA  
OU RESPONSÁVEL QUE VAI PARTICIPAR DA PESQUISA**

## ANEXO 2

**FORMULÁRIO DE AVALIAÇÃO CLÍNICA**

ID: {ID} ____ ____ ____ ____
------------------------------

NÚMERO DO PRONTUÁRIO: \_\_\_\_\_

Iniciais da criança: {CINICIAL} \_\_\_\_\_

Horário de chegada no hospital (h/min.): {CLLEGADA} \_\_\_\_\_

Horário da Entrevista (h/min.): {CENTREV} \_\_\_\_\_

Data de admissão: {CFECHAC} \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

dia    mês    ano

Doutor: {CMEDICO} \_\_\_\_\_

Observações: {COBS1} \_\_\_\_\_

{COBS2} \_\_\_\_\_

{COBS3} \_\_\_\_\_

**HISTÓRIA DA MOLÉSTIA ATUAL**

<p>1. Doença: (Razão para procurar cuidados médicos, máximo de 3)</p> <p>{CPADEC1} _____</p> <p>{CPADEC2} _____</p> <p>{CPADEC3} _____</p>
<p>2. Duração de doença: {CDURA} ____ ____ (99) NS/NR</p>
<p>3. A criança está tomando algum medicamento? {CMEDICI}</p> <p>(0) Não    (1) Sim, Qual: {CCUALM} _____ (9) NS/NR</p>
<p><b>SE ALGUM ANTIBIÓTICO FOI NOTIFICADO NO ITEM 3</b></p> <p>4. O uso do antibiótico está na dose certa para a idade e o Peso {CANTIBIO}</p> <p>(0)Não (1)Sim (9)NS/NR</p>



- 4.1. O antibiótico foi usado nas últimas 72 hours? {C72HOURS} (0)Não (1)Sim (9)NS/NR
- 4.2. Total de dias para tratamento antibiótico {CDIATRAT} \_\_\_\_ \_\_\_\_ (99) NS/NR

ID: \_\_\_\_

## 5. A criança tem? Há quanto tempo?

- 5.1. Tosse {CTOS} Sim: \_\_\_\_ \_\_\_\_ (00)Não (99)NS/NR
- 5.2. Febre {CFIEBRE} Sim: \_\_\_\_ \_\_\_\_ (00)Não (99)NS/NR
- 5.3. Dificuldade para respirar {CDIFRESP} Sim: \_\_\_\_ \_\_\_\_ (00)Não (99)NS/NR
- 5.4. Sibilos {CSILBI} Sim: \_\_\_\_ \_\_\_\_ (00)Não (99)NS/NR
- 5.5. Ausência de ingesta {CTOMALIQ} Sim: \_\_\_\_ \_\_\_\_ (00)Não (99)NS/NR
- 5.6. Vômitos {CVOMIT} Sim: \_\_\_\_ \_\_\_\_ (00)Não (99)NS/NR
- 5.7. Convulsões {CCONVUL} Sim: \_\_\_\_ \_\_\_\_ (00)Não (99)NS/NR
- 5.8. Outros {COTROS} Sim: \_\_\_\_ \_\_\_\_ (00)Não (99)NS/NR

**HISTÓRIA PATOLÓGICA**

6. Quantas vezes a criança teve sibilos ou dificuldade respiratória nos últimos doze meses?  
{CSILB12} (00)Nenhuma \_\_\_\_ \_\_\_\_ (99) NS/NR

7. A criança tem tosse persistente (a maior parte do dia ou da noite)? {CTOSPERS}  
(0)Não (1)Sim, tosse sem secreção (2)Sim, tosse com secreção (9) NS/NR

8. A criança já foi internada anteriormente (pelo menos uma noite no hospital) durante os últimos  
12 meses? ; Quando (a última vez)? {CINTER12}  
(00) Não \_\_\_\_ \_\_\_\_ meses  
(99) NS/NR

9. ; A criança teve pneumonia durante os últimos 12 meses? ; Quando (a última vez)?  
{CNEUMO12} (00) Não \_\_\_\_ \_\_\_\_  
meses (99) NS/NR

10. ; A criança foi internada devido a pneumonia (pelo menos uma noite no hospital) durante os  
últimos 12 meses?  
Quando (a última vez)? {CINTEN12} (00)Não \_\_\_\_ \_\_\_\_ meses (99) NS/NR

11. A criança tomou algum antibiótico durante os últimos 3 meses? {CANTIBI3}

(0)Não (1)Sim, qual: {CCUALA} \_\_\_\_\_ (9)NS/NR

	Não	Sim
1. Derrame Pleural {CDERRAME}	1	2
2. Pneumonia grave definida como: aleteo nasal, estridor, cianose Ou inabilidade em beber {CNEUMOGR} _____	1	2
3. Abscesso Pulmonar {CEMPIEMA}	1	2
4. Estridor em repouso {CESTRID}	1	2
5. Asma definida como história prévia ou melhora rápida com o broncodilator {CASMA}	1	2
6. Coqueluche (coqueluche) {CTOSFER}	1	2
7. Desnutrição grave {CDESNUTR}	1	2
8. Meningite {CMENING}	1	2
9. Sepses {CSEPSIS}	1	2
10. Outra infecção requerendo antibiótico (artrite séptica, disenteria, Osteomielite aguda, etc.) {CINFEC}	1	2
11. Doença hereditária ou congênita debilitante {CCONGEN}	1	2
12. Doença Neurológica ou neuromuscular {CNEURO}	1	2
13. Hospitalização na últimas 2 semanas {CHOSP}	1	2
14. Participação prévia neste estudo {CPARTPRE}	1	2

ID: \_\_\_\_\_

### EXAME FÍSICO

12. Peso (g): {CPESO} ____ ____ ____ ____ ____ (99999)NS/NR
13. Altura (cm): {CALT} ____ ____ ____ (999)NS/NR
14. Temperatura axilar (°C): {CTEMP} ____ ____ . ____ (999)NS/NR
15. Frequência Respiratória(Quieto)/min (contar 60 seg.) {CFREQRE1} 1a vez ____ ____ (99)NS/NR {CFREQRE2} 2a vez ____ ____ (99)NS/NR
16. Frequência cardíaca / min (contar 60 seg): {CFREQCAR} ____ ____ ____ (999)NS/NR
17. Estado Geral: {CESTGEN} (0)Bom (1)Regular (2)Ruim (9)NS/NR
18. Estado Sensorial: {CESTSEN} (0)Normal (1) Irritado (2) Sonolento (9)NS/NR

## 19. Tórax:

19.1. Tiragem: {CTIRAJE} (0)Não (1)Subcostal (2)Intercostal (3) Subclavicular

19.2. Expiração prolongada: {CESPIRA} (0)Não (1)Sim (9)NS/NR

19.3. Hipersonoridade a percussão: {CHIPER} (0)Não (1)Sim (9)NS/NR

19.4. Estridor {CSTRIDOR} (0)Não (1)Sim (9)NS/NR

20. Ausulta:

20.1. Expansibilidade pulmonar diminuída: {CMURM}

(0) Não (1) Sim, Onde: {CLUGAR} (9) NS/NR

20.2. Roncos: {CRONCUS} (0)Não (1)Sim (9)NS/NR

20.3. Sibilos: {CSIBILA}

(0)Não (1)Sim, generalizados (2)Sim, localizados: {CLOCALS} (9)NS/NR

20.4. Crépitos: {CCREPITA}

(0)Não (1)Sim, quando: {CLOCALC} (9)NS/NR

20.5. Sopro tubário: {CSOPILOT}

(0)Não (1)Sim, onde: {CLOCALST} (9)NS/NR

20.6. Ritmo cardíaco: {CRITMO} (0)Regular (1)Irregular (9)NS/NR

20.7. Bulhas cardíacas: {CRUIDOS}

(0)Normais (1)Anormais, onde: {CLOCALR} (9)NS/NR

20.8. Sopro: {CSOPLO}

(0)Não (1)Sim, onde: {CLOCALSP} (9)NS/NR

21. Abdomen:

21.1. Hepatomegalia: {CHIGADO} (0)Não (1)Sim (9)NS/NR

21.2. Esplenomegalia: {CBAZO} (0)Não (1)Sim (9)NS/NR

21.3. Distensão Abdominal: {CDISTEN} (0)Não (1)Sim, descrição: {CDESCRI}

22. Extremidades: Cianose: {CCYANOSIS} (0)Não (1)Sim central (2)Sim periférica (9)NS/NR

## ANEXO 3

APROVAÇÃO PELA COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA E PELO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



MINISTÉRIO DA SAÚDE  
Conselho Nacional de Saúde  
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

**PARECER Nº 1447/2003**

**Registro CONEP: 7129** (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto )

**Registro CEP: 050/02**

**Processo nº 25000.159018/2002-18**

**Projeto de Pesquisa:** "Estudo da etiologia de pneumonia adquirida na comunidade por métodos específicos e não invasivos em crianças brasileiras hospitalizadas".

**Pesquisador Responsável:** DRª. Cristina Maria Costa Nascimento de Carvalho

**Instituição:** Hospital Universitário Prof. Edgard Santos / UFBA

**Área Temática Especial:** Cooperação estrangeira


Após se proceder à análise das respostas às considerações da CONEP no Parecer nº 257/2003, relativo ao projeto em questão, considerou-se que:

- a) foram atendidas as solicitações do referido parecer;
- b) o projeto preenche, de modo geral, os requisitos fundamentais das Resoluções CNS 196/96 e 292/99, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos;
- c) o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição supracitada.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação : Projeto aprovado

Brasília, 10 de setembro de 2003

  
WILLIAM SAAD HOSSNE  
Coordenador da CONEP/CNS/MS



MINISTÉRIO DA SAÚDE - Conselho Nacional de Saúde - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP  
**FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS**  
 (versão outubro/99) Para preencher o documento, use as indicações da página 2.

1. Projeto de Pesquisa: Estudo da Etiologia de Pneumonia Adquirida na Comunidade por Métodos Específicos e Não Invasivos em Crianças Brasileiras Hospitalizadas			
2. Área do Conhecimento (Ver relação no verso) Ciência da Saúde - Medicina		3. Código: 3.01	4. Nivel: (50 áreas do conhecimento: 4) D, E
5. Área(s) Temática(s) Especial (s) (Ver fluxograma no verso)		6. Código(s)	7. Fase: (56 áreas temáticas: 3) I ( ) II ( ) III ( ) IV ( )
8. Uniformes (3 opções) Pneumonia, Etiologia, Sintomas/ocorr. pneumoniae			
<b>SUJEITOS DA PESQUISA</b>			
9. Número de sujeitos: 200 No Centro: 300 Total: 500	10. Grupos Especiais: <18 anos (x) Portador de Deficiência Mental ( ) Embrião/Feto ( ) Relação de Dependência (Fundantes, Militares, Presidários, etc) ( ) Outros ( ) Não se aplica ( )		
<b>PESQUISADOR RESPONSÁVEL</b>			
11. Nome: Cristiano Maria Costa Nascimento de Carvalho			
12. Identidade: 1.771.521-09	13. CPF: 242.694.315-49	19. Endereço (Rua, n.º): Prof. Aristides Nova	Nº, 105 apto. 1201B São Lázaro
14. Nacionalidade: Brasileira	15. Profissão: Médico / Professor	20. CEP: 40.210-630	21. Cidade: Salvador
16. Mês e Titulação: Dez/02	17. Cargo: Professor Adjunto	23. Fone: 71.2357869	24. Fax: 71.2357869
18. Instituição a que pertence: Universidade Federal do Bahia		25. E-mail: cristiano@ufba.br	
<p><b>Termo de Compromisso:</b> Declaro que cuido e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pelo correção científica do projeto acima.</p> <p>Data: 18/02/2002</p> <p style="text-align: right;"><i>Cristiano Maria Costa Nascimento de Carvalho</i> Assinatura</p>			
<b>INSTITUIÇÃO ONDE SERÁ REALIZADO</b>			
26. Nome: Centro Pediátrico Professor Homenes de Oliveira		29. Endereço (Rua, n.º): Rua Padre Feijó, s/n - Carola	
27. Unidade/Órgão: Pediatría	30. CEP: 40.110-160	31. Cidade: Salvador	32. U.F.: Bahia
33. Participação Estrangeira: Sim (x) Não ( )	34. Fone: 71.33961026-1108	34. Fax: 71.33961103	
35. Projeto Multicêntrico: Sim ( ) Não (x) Nacional ( ) Internacional ( ) (Anexar a lista de todos os Centros Participantes no Brasil)			
<p><b>Termo de Compromisso (do responsável pela instituição):</b> Declaro que cuido e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução.</p> <p>Nome: <i>VANDA MA MOTA DE MIRANDA</i> Cargo: <i>Coordenadora do C.P.P.H.C.</i></p> <p>Data: 18/02/2002</p> <p style="text-align: right;"><i>Vanda Ma Mota de Miranda</i> Assinatura</p>			
<b>PATROCINADOR</b> Não se aplica ( )			
36. Nome: PRODOC		39. Endereço: Rua Basílio da Gama, 6 - Carola	
37. Responsável: Prof. Maria Lídia	40. CEP: 40.110-240	41. Cidade: Salvador	42. UF: Bahia
38. Cargo/Função: Coordenador de Pesquisas	43. Fone: 71.3365131	44. Fax: 71.3365183	
<b>COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP</b>			
45. Data de Entrada: 05/03/02	46. Registro no CEP: 050/02	47. Conclusão: Aprovado (x) Data: 05/06/02	48. Parecer: Aprovado ( ) Data: / /
49. Relatário(s) do Pesquisador responsável previsto(s) no(a) protocolo			
Encumbeiro a CONEP: 51. Os dados acima para registro ( ) 51.0 projeto para apreciação ( ) 52. Data: / /		53. Coordenador/Nome: <i>Maria Theresa de Figueiredo</i> Presidente do Conselho de Ética em Pesquisa - CONEP Data: / /	
<b>COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA - CONEP</b>			
54. Nº Expediente:	56. Data de Realização:	57. Registro na CONEP:	
55. Processo:			
58. Observações:			

APROVADO pelo CEP-  
HUPES/UFBA.  
05/06/02 *[Assinatura]*

ANEXO 4

NORMAS DE PUBLICAÇÃO DO PERIÓDICO *THE PEDIATRIC INFECTIOUS  
DISEASE JOURNAL* PARA O ARTIGO

**The Pediatric Infectious Disease Journal (PIDJ)  
Online Submission and Review System**

**SCOPE**

*The Pediatric Infectious Disease Journal* is a peer-reviewed, multidisciplinary journal directed to physicians and other health care professionals who manage infectious diseases of childhood.

**Ethical/Legal Considerations**

A submitted manuscript must be an original contribution not previously published (except as an abstract or preliminary report), must not be under consideration for publication elsewhere, and, if accepted, must not be published elsewhere in similar form, in any language, without the consent of Lippincott Williams & Wilkins. Each person listed as an author is expected to have participated in the study to a significant extent. Although the editors and referees make every effort to ensure the validity of published manuscripts, the final responsibility rests with the authors, not with the journal, its editors, or the publisher. All manuscripts must be submitted on-line through the journal's web site at <http://pidj.edmgr.com/>. See submission instructions under "Online manuscript submission."

***Patient anonymity and informed consent:*** It is the author's responsibility to ensure that a patient's anonymity be carefully protected and to verify that any experimental investigation with human subjects reported in the manuscript was performed with informed consent and following all the guidelines for experimental investigation with human subjects required by the institution(s) with which all the authors are affiliated. Authors should mask patients' eyes or, if the eye area is the focus of the illustration, the patient's nose and mouth, and they should remove patients' names from figures unless written consent obtained from the patients is submitted with the manuscript.

***Copyright:*** The corresponding author will complete the copyright questions within the submission steps, and provide each co-authors email address. The co-authors are emailed a hyperlink via which they will verify their co-authorship and complete the Copyright Transfer and Disclosure Form within EM. The co-authors are not required to register for an account in EM and no new accounts are created for them, rather, they are completing a form that is tied to the submission record.

***Conflicts of interest:*** Authors must state all possible conflicts of interest in the manuscript, including financial, consultant, institutional and other relationships that might lead to bias or a conflict of interest. If there is no conflict of interest, this should also be explicitly stated as none declared. All sources of funding should be acknowledged in the manuscript. All relevant conflicts of interest and sources of funding should be included on the title page of the manuscript with the heading "Conflicts of Interest and Source of Funding:". For example:

Conflicts of Interest and Source of Funding: A has received honoraria from Company Z. B is currently receiving a grant (#12345) from Organization Y, and is on the speaker's bureau for Organization X – the CME organizers for Company A. For the remaining authors none were declared.

In addition, each author must complete and submit the journal's copyright transfer



agreement, which includes a section on the disclosure of potential conflicts of interest based on the recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors, "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" ([www.icmje.org/update.html](http://www.icmje.org/update.html)).

A copy of the form is made available to the submitting author within the Editorial Manager submission process. Co-authors will automatically receive an Email with instructions on completing the form upon submission.

### ***Compliance with NIH and Other Research Funding Agency Accessibility Requirements***

A number of research funding agencies now require or request authors to submit the post-print (the article after peer review and acceptance but not the final published article) to a repository that is accessible online by all without charge. As a service to our authors, LWW will identify to the National Library of Medicine (NLM) articles that require deposit and will transmit the post-print of an article based on research funded in whole or in part by the National Institutes of Health, Wellcome Trust, Howard Hughes Medical Institute, or other funding agencies to PubMed Central. The revised Copyright Transfer Agreement provides the mechanism.

**Permissions:** Authors must submit written permission from the copyright owner (usually the publisher) to use direct quotations, tables, or illustrations that have appeared in copyrighted form elsewhere, along with complete details about the source. Any permissions fees that might be required by the copyright owner are the responsibility of the authors requesting use of the borrowed material, not the responsibility of Lippincott Williams & Wilkins.

### **Preparation of Manuscript**

Manuscripts that do not adhere to the following instructions are returned to the corresponding author for technical revision before undergoing peer review. Also, to streamline the review process, on reviewing newly submitted manuscripts, we will identify those that do not meet the mission of the journal, provide no new information or insights into management of infectious diseases or are of more local importance and better suited for a regional journal and return them immediately to the authors to allow them to submit their work elsewhere in a timely fashion.

### **New Article Types**

**Research Reports** This section comprises manuscripts on all aspects of the molecular pathogenesis and immunologic mechanisms of bacterial, viral, fungal and other infections in infants, children and adolescents. The emphasis will be on manuscripts that present data that are clinically applicable and provide a more thorough understanding of the pathophysiologic basis of infections in children and that could impact eventual treatment and prevention. The manuscripts can be formatted as original studies or brief reports and will be peer reviewed.

**HIV Reports** The section comprises of high-quality, high-impact original articles and brief reports of epidemiologic, clinical, translational and implementation science studies pertaining to the prevention, treatment and outcomes of HIV infection in infants, children, and adolescents.

**Vaccine Reports** Articles that present data from Vaccine Phase II-IV studies will appear

in this section. These manuscripts receive the same peer review as articles submitted as Original Studies. The universal open access fee for all accepted manuscripts in this category is: \$2000.00 US, plus an additional per-page fee with 2 options: 1) \$50 per page for print and online publication; or 2) \$25 per page for online only publication. All articles in this series will be available online by free access. For manuscripts in this category, authors should refer to the “Guidelines for collection, analysis and presentation of vaccine safety data in pre- and post-licensure clinical studies” published in *Vaccine* (2009, vol. 27; pp 2282-8) and use case definitions as developed by The Brighton Collaboration ([www.brightoncollaboration.org](http://www.brightoncollaboration.org)) whenever possible.

***ESPID Reviews and Reports (or purple pages)*** This section comprises invited concise reviews on all aspects of infections in infants, children and adolescents including bacterial, viral, fungal and parasitic infections. Reviews on prevention, diagnosis, therapeutic interventions and drugs as well as on teaching and conferences in pediatric infectious diseases are the focus of this section and will concentrate on novel findings, development and controversial issues.

### **Manuscript Submission**

***Online manuscript submission:*** All manuscripts must be submitted on-line through the new web site at <http://pidj.edmgr.com/>. First-time users: Please click the Register button from the menu above and enter the requested information. On successful registration, you will be sent an E-mail indicating your user name and password. Print a copy of this information for future reference. Note: If you have received an E-mail from us with an assigned user ID and password, or if you are a repeat user, do not register again. Just log in. Once you have an assigned ID and password, you do not have to re-register, even if your status changes (that is, author, reviewer, or editor). If you experience any problems, please contact Amy Newman, Journal Manager, at [PIDJournal@outlook.com](mailto:PIDJournal@outlook.com), Ph 830-865-1249, Fax 214-710-2175.

**Authors:** Please click the log-in- button from the menu at the top of the page and on the next screen log into the system as an Author. Submit your manuscript according to the author instructions. You will be able to track the progress of your manuscript through the system. If you experience any problems, please contact Amy Newman, Journal Manager, at [PIDJournal@outlook.com](mailto:PIDJournal@outlook.com), Ph 830-865-1249, Fax 214-710-2175. Requests for help and other questions will be addressed in the order received. To submit a completed manuscript, the following documents are required: Cover Letter, Title Page, Abstract, and Manuscript. Tables and figures are optional. Each portion of the manuscript must be submitted as separate documents (i.e. cover letter, title page, abstract, manuscript, tables and figures all saved as separate files). The text documents, cover letter, title page, abstract and manuscript are to be uploaded as Microsoft Word documents. Tables are to be created in Microsoft Word also. Excel tables will not load properly. All figures should be TIFF, EPS or PowerPoint files.

***General format:*** Submit manuscripts in English. Double space all copy, including legends, footnotes, tables, and references. Use a common font such as Arial or Times Roman in size 12. Enumerate all pages of the manuscript, beginning with the Title Page as page 1, and follow in sequence to the abstract, manuscript and all other attachments. If you are unfamiliar with numbering, you can search HELP while in Microsoft Word, and it will show in detail how to number all pages.

***Title page:*** Title page must be submitted as a separate file. Include on the title page:

(a) complete manuscript title; (b) authors' full names, highest academic degrees, and affiliations; (c) name and address for correspondence, including Fax number, telephone number, and E-mail address; (d) address for reprints if different from that of corresponding author (indicate whether reprints are available); and (e) all sources of support, including pharmaceutical and industry support, that require acknowledgment; (f) list three to five key words for indexing; (g) an abbreviated title of 55 characters or less used for the cover of the journal; (h) a running head title of 44 characters or less including spaces used for page headings on the pages in which your article is published.

The title page must also include disclosure of funding received for this work from any of the following organizations: National Institutes of Health (NIH); Wellcome Trust; Howard Hughes Medical Institute (HHMI); and other(s).

**Structured abstract for Original Studies and Supplement Articles:** Abstracts must be submitted as a separate file. Limit the abstract to 250 words. Do not cite references in the abstract. Limit the use of abbreviations and acronyms. Use the following subheads: Background, Methods, Results, and Conclusions (others may be added as needed).

**Unstructured abstract for Instructive Cases and Brief Reports:** Abstract must be submitted as a separate file. Limit the abstract to 60 words. It must be factual and comprehensive. Limit the use of abbreviations and acronyms, and avoid general statements (e.g. "the significance of the results is discussed").

**Brief Reports:** Papers for this section should be no longer than 5-6 double-spaced typed manuscript pages (fewer than 1500 words), 10 references and 1 figure or table. Word count does not include Title Page or Unstructured Abstract.

**Letters to the Editors:** Letters to the Editors should pertain to articles published within the *Pediatric Infectious Disease Journal* or highlight important new clinical or laboratory insights. Text should contain 500 words or fewer and less than 5 references.

**ESPID Reviews and Reports:** ERR reviews should contain a maximum of 2000 words (including references) and include up to 10 references and 1 table or figure. There is no abstract. A maximum of four authors is allowed.

**Original Studies:** Papers for this section do not have a word, reference, table or figure limit.

**Text:** Organize the manuscript into four main headings, Introduction, Materials and Methods, Results, and Discussion. If a brand name is cited, supply the manufacturer's name and address (city and state/country).

**Abbreviations:** For a list of standard abbreviations, consult the *American Medical Association Manual of Style*, 9th edition, or other standard sources. Write out the full term for each abbreviation at its first use unless it is a standard unit of measure. Abbreviations are allowed only if used three times or more in text.

**References:** The authors are responsible for the accuracy of the references. Key the references (double-spaced) at the end of the manuscript. Cite the references in text in the order of appearance, including those references cited in tables and figure legends at the chronological citation of the tables and figures in text. Cite unpublished data, such as papers submitted but not yet accepted for publication or personal communications, in parentheses in the text. If there are more than six authors, name only the first three

authors and then use et al. Refer to the List of Journals Indexed in Index Medicus for abbreviations of journal names, or access the list at <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>. Sample references are given below.

*Journal article*

1. Trujillo M, Correa N, Olsen K, et al. Cefprozil concentrations in middle ear fluid. *Pediatr Infect Dis J.* 2000;19:268 –270.

*Book chapter*

2. Grose C. Bacterial myositis and pyomyositis. In: Feigin RD, Cherry JD, eds. *Textbook of Pediatric Infectious Diseases*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1998:704 – 708.

*Entire book*

3. Nelson JD, Bradley JS. *Nelson's Pocket Book of Pediatric Antimicrobial Therapy*. 14th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000.

*Proceedings*

4. Harrigan PR, Dong W, Weber AE, et al. Highly mutated RT and protease [Abstract I-115]. In: 38th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Diego, CA, September 24 to 27, 1998. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1998.

*Online journals*

5. Friedman SA. Preeclampsia. *Obstet Gynecol.* [serial online]. January 1988;71:22–37. Available from: BRS Information Technologies, McLean, VA. Accessed December 15, 1990.

*World Wide Web*

6. Gostin LO. Drug use and HIV/AIDS [JAMA HIV/AIDS web site]. June 1, 1996. Available at: <http://www.ama-assn.org/special/hiv/ethics>. Accessed June 26, 1997.

**Figures:**

**A) Creating Digital Artwork**

1. Learn about the publication requirements for Digital Artwork: <http://links.lww.com/ES/A42>
2. Create, Scan and Save your artwork and compare your final figure to the Digital Artwork Guideline Checklist (below).
3. Upload each figure to Editorial Manager in conjunction with your manuscript text and tables.

**B) Digital Artwork Guideline Checklist**

Here are the basics to have in place before submitting your digital artwork:

- Artwork should be saved as TIFF, EPS, or MS Office (DOC, PPT, XLS) files. High resolution PDF files are also acceptable.
- Crop out any white or black space surrounding the image.

- Diagrams, drawings, graphs, and other line art must be vector or saved at a resolution of at least 1200 dpi. If created in an MS Office program, send the native (DOC, PPT, XLS) file.
- Photographs, radiographs and other halftone images must be saved at a resolution of at least 300 dpi.
- Photographs and radiographs with text must be saved as postscript or at a resolution of at least 600 dpi.
- Each figure must be saved and submitted as a separate file. Figures should not be embedded in the manuscript text file.

**Remember:**

- Cite figures consecutively in your manuscript.
- Number figures in the figure legend in the order in which they are discussed.
- Upload figures consecutively to the Editorial Manager web site and enter figure numbers consecutively in the Description field when uploading the files.

**Figure legends:** Include legends for all figures. They should be brief and specific, and they should appear on a separate manuscript page after the references. Legends should be part of the manuscript file on the disk. Use scale markers in the image for electron micrographs, and indicate the type of stain used.

**Color figures:** The journal accepts for publication color figures that enhance an article. Authors who submit color figures receive an estimate of the cost for color reproduction. If they decide not to pay for color reproduction, they can request that the figures be converted to black and white at no charge.

**Supplemental Digital Content**

**Supplemental Digital Content (SDC):** Authors may submit SDC via Editorial Manager to LWW journals that enhance their article's text to be considered for online posting. SDC may include standard media such as text documents, graphs, audio, video, etc. On the Attach Files page of the submission process, please select Supplemental Audio, Video, or Data for your uploaded file as the Submission Item. All SDC files should be uploaded as the author would like them presented in the final article. If an article with SDC is accepted, our production staff will create a URL with the SDC file. The URL will be placed in the call-out within the article. SDC files are not copyedited by LWW staff, they will be presented digitally as submitted. For SDC documents, any labels or legends should be included in the original SDC file when submitted. For a list of all available file types and detailed instructions, please visit <http://links.lww.com/A142>.

**SDC Call-outs**

Supplemental Digital Content must be cited consecutively in the text of the submitted manuscript. Citations should include the type of material submitted (Audio, Figure, Table, etc.), be clearly labeled as "Supplemental Digital Content," include the sequential list number, and provide a description of the supplemental content. All descriptive text should be included in the call-out as it will not appear elsewhere in the article.

Example:

We performed many tests on the degrees of flexibility in the elbow (see Video, Supplemental Digital Content 1, which demonstrates elbow flexibility) and found our results inconclusive.

### ***List of Supplemental Digital Content***

A listing of Supplemental Digital Content must be submitted at the end of the manuscript file. Include the SDC number and file type of the Supplemental Digital Content. This text will be removed by our production staff and not be published. Example: Supplemental Digital Content 1. wmv

### ***SDC File Requirements***

All acceptable file types are permissible up to 10 MBs. For audio or video files greater than 10 MBs, authors should first query the journal office for approval. For a list of all available file types and detailed instructions, please visit <http://links.lww.com/A142>.

**Tables:** Create tables using the table creating and editing feature of your word processing software (e.g., Word, WordPerfect). Do not use Excel or comparable spreadsheet programs. Provide a separate document for each table. Cite tables consecutively in the text, and number them in that order. Key each on a separate sheet, and include the table title, appropriate column heads, and explanatory legends (including definitions of any abbreviation not already defined in the text). Do not embed tables within the body of the manuscript. They should be self-explanatory and should supplement, rather than duplicate, the material in the text. In each table, the genus of each genus-species must be written out at its first appearance.

**Style:** *Stedman's Medical Dictionary* (27th edition) and *Merriam Webster's Collegiate Dictionary* (10th edition) should be used as standard references. Refer to drugs and therapeutic agents by their accepted generic or chemical names, and do not abbreviate them. Use code numbers only when a generic name is not yet available. Capitalize the trade names of drugs and place them in parentheses after the generic names. To comply with trademark law, include the name and location (city and state/country) of the manufacturer of any drug, supply, or equipment mentioned in the manuscript. Use the metric system to express units of measure and degrees Celsius or degrees Fahrenheit consistently throughout the manuscript to express temperatures, and use SI units rather than conventional units. Abbreviate "liter" in such forms as "3 units/L" and "5 mL"; write out when used alone (10 liters; 0.5-liter gavage). See also Day RA, ed. *How to Write and Publish a Scientific Paper*. 5th ed. Phoenix, AZ: The Oryx Press, 1998.

**Financial disclosure:** In the cover letter, indicate all affiliations with or financial involvement in any organization or entity with a direct financial interest in the subject matter or materials of the research discussed in the manuscript (e.g. employment, consultancies, stock ownership). All such information will be held in confidence during the review process. Should the manuscript be accepted, the Chief Editors will discuss with the author the extent of disclosure appropriate for publication.

### **After Acceptance**

**Open access** LWW's hybrid open access option is offered to authors whose articles have been accepted for publication. With this choice, articles are made freely available online immediately upon publication. Authors may take advantage of the open access option at

the point of acceptance to ensure that this choice has no influence on the peer review and acceptance process. These articles are subject to the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

Authors of accepted peer-reviewed articles have the choice to pay a fee to allow perpetual unrestricted online access to their published article to readers globally, immediately upon publication. The article processing charge for *The Pediatric Infectious Disease Journal* is \$3,100. The article processing charge for authors funded by the Research Councils UK (RCUK) is \$3,900. The publication fee is charged on acceptance of the article and should be paid within 30 days by credit card by the author, funding agency or institution. Payment must be received in full for the article to be published open access.

**Authors retain copyright:** Authors retain their copyright for all articles they opt to publish open access. Authors grant LWW a license to publish the article and identify itself as the original publisher.

**Creative Commons license:** Articles opting for open access will be freely available to read, download and share from the time of publication. Articles are published under the terms of the Creative Commons License Attribution-NonCommercial No Derivative 3.0 which allows readers to disseminate and reuse the article, as well as share and reuse of the scientific material. It does not permit commercial exploitation or the creation of derivative works without specific permission. To view a copy of this license visit: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0>.

**Compliance with NIH, RCUK and other research funding agency accessibility requirements:** A number of research funding agencies now require or request authors to submit the post-print (the article after peer review and acceptance but not the final published article) to a repository that is accessible online by all without charge. As a service to our authors, LWW identifies to the National Library of Medicine (NLM) articles that require deposit and transmits the post-print of an article based on research funded in whole or in part by the National Institutes of Health, Howard Hughes Medical Institute, or other funding agencies to PubMed Central. The revised Copyright Transfer Agreement provides the mechanism. LWW ensures that authors can fully comply with the public access requirements of major funding bodies worldwide. Additionally, all authors who choose the open access option will have their final published article deposited into PubMed Central.

RCUK funded authors can choose to publish their paper as open access with the payment of an article process charge, or opt for their accepted manuscript to be deposited (green route) into PMC with an embargo.

With both the gold and green open access options, the author will continue to sign the Copyright Transfer Agreement (CTA) as it provides the mechanism for LWW to ensure that the author is fully compliant with the requirements. After signature of the CTA, the author will then sign a License to Publish where they will then own the copyright.

It is the responsibility of the author to inform the Editorial Office and/or LWW that they have RCUK funding. LWW will not be held responsible for retroactive deposits to PMC if the author has not completed the proper forms.

**FAQ for open access:** <http://links.lww.com/LWW-ES/A48>

**Page proofs and corrections:** Corresponding authors receive page proofs to check the copyedited and typeset article before publication. Portable document format (PDF) files of the typeset pages and support documents (e.g., reprint order form) are sent to the corresponding author by E-mail. Complete instructions are provided with the E-mail for downloading and printing the files and for faxing the corrected page proofs to the publisher. Those authors without an E-mail address receive traditional page proofs. It is the author's responsibility to ensure that there are no errors in the proofs. Changes that have been made to conform to journal style stand if they do not alter the authors' meaning. Only the most critical changes to the accuracy of the content are made. Changes that are stylistic or are a reworking of previously accepted material are disallowed. The publisher reserves the right to deny any changes that do not affect the accuracy of the content. Authors may be charged for alterations to the proofs beyond those required to correct errors or to answer queries. Proofs must be checked carefully and returned within 24 to 48 hours of receipt, as requested in the cover letter accompanying the page proofs.

**Reprints:** Authors receive a reprint order form with the page proofs that includes reprint costs. Reprint order forms should be returned to Author Reprint Department, Lippincott Williams & Wilkins, 351 West Camden Street, Baltimore, MD 21201-2436. Reprints are normally shipped 6 to 8 weeks after publication of the issue in which the item appears. Contact the Author Reprint Department, Lippincott Williams & Wilkins, 351 W. Camden Street, Baltimore, MD 21201; Fax: 410-528-4434; E-mail: [reprintsgroup@lww.com](mailto:reprintsgroup@lww.com) with any questions.

**Permissions:** For permission and/or rights to use content for which the copyright holder is LWW or the society, please go to the journal's website and after clicking on the relevant article, click on the "Request Permissions" link under the "Article Tools" box that appears on the right side of the page. Alternatively, send an e-mail to [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com).

For Translation Rights & Licensing queries, contact Silvia Serra, Translations Rights, Licensing & Permissions Manager, Wolters Kluwer Health (Medical Research) Ltd, 250 Waterloo Road, London SE1 8RD, UK. Phone: +44 (0) 207 981 0600. E-mail: [silvia.serra@wolterskluwer.com](mailto:silvia.serra@wolterskluwer.com)

For Special Projects and Reprints (U.S./Canada), contact Alan Moore, Director of Sales, Lippincott Williams & Wilkins, Two Commerce Square, 2001 Market Street, Philadelphia, PA 19103. Phone: 215-521-8638. E-mail: [alan.moore@wolterskluwer.com](mailto:alan.moore@wolterskluwer.com)

For Special Projects and Reprints (non-U.S./Canada), contact Silvia Serra, Translations Rights, Licensing & Permissions Manager, Wolters Kluwer Health (Medical Research) Ltd, 250 Waterloo Road, London SE1 8RD, UK. Phone: +44 (0) 207 981 0600. E-mail: [silvia.serra@wolterskluwer.com](mailto:silvia.serra@wolterskluwer.com)

**Publisher's contact:** Send corrected page proofs, color letters, and any other related materials to Emily Weisenreder, [Emily.Weisenreder@wolterskluwer.com](mailto:Emily.Weisenreder@wolterskluwer.com), 410-528-4102 (phone), 443-451-8147 (fax), or mail to Emily Weisenreder, Wolters Kluwer Health, 351 W. Camden Street, Baltimore, MD 21201.

#### **Manuscript Checklist (before submission)**

- Cover letter



- Title page (including conflicts of interest statement)
- Abstract
- Each co-authors email address so they can verify their authorship
- Manuscript with figure legend if applicable
- References double-spaced in US National Library of Medicine style
- Corresponding author and E-mail address designated (in cover letter and on title page)
- Permission to reproduce copyrighted materials or signed patient consent forms
- Acknowledgments listed for grants and technical support
- High quality print of electronic art . Tables created using table software features
- Figures created/saved as TIFF, EPS, or PowerPoint files
- At least 3 suggested reviewers

ANEXO 5

CARTA DO PERIÓDICO CONFIRMANDO SUBMISSÃO DO ARTIGO

> From: em@editorialmanager.com  
> To: nascimentocarvalho@hotmail.com  
> Date: Wed, 11 Nov 2015 13:46:08 -0500  
> Subject: Submission Confirmation  
>  
> Dear Cristiana:  
>  
> Your manuscript has been received in our editorial office.  
>  
> Please log in to Editorial Manager as an Author for details on your submission titled: The  
Predictive Value of Serum Interleukin-6 for Pneumococcal Infection among Children with  
Community-acquired Pneumonia.  
>  
> Yours truly,  
>  
> The Chief Editors  
> The Pediatric Infectious Disease Journal  
>  
> JDN/GHM:casn

## ANEXO 6

TRABALHOS PRÉVIOS COM A DESCRIÇÃO DAS TÉCNICAS UTILIZADAS NO  
PRESENTE ESTUDO