

ANTONIO ZULIANI

ESTUDO DA ATIVIDADE BACTERICIDA DOS NEUTRÓFILOS
EM RECÉM-NASCIDOS

Dissertação ao Nível de Mestrado em Pediatria
apresentado à Universidade Federal do Paraná.
— DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA —

C U R I T I B A
Estado do Paraná — Brasil
— 1977 —

Aos meus pais pelo apoio recebido
na minha formação.

À Ana Maria, companheira de todos os momentos,

aos meus filhos:

Juliana

Giovana

e

Júnior

"Existe somente um único e genuíno tratamento científico para as doenças; este é o de estimular a fagocitose".

Bernard Shaw

The Doctor's Dilema

A G R A D E C I M E N T O

Expressamos nosso reconhecimento e agradecemos a todos aqueles que em maior ou menor grau, nos ajudaram a superar os momentos difíceis e colaboraram para a realização deste trabalho.

Prof. Dr. Eurípedes Ferreira

- ORIENTADOR -

Prof. Dr. Luiz José Bowe Kesikowski

Prof. Dr. Izrail Cat

Prof. Dr. Paulo Barbosa da Costa

Prof. Dr. João Xavier Viana

Profa. Dra. Azize Elias

Prof. Dr. Fernando José de Nóbrega

Aos Residentes

do Departamento de Pediatria do Hospital de Clínicas da U.F. do Paraná

do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de Clínicas da U.F. do Paraná

Aos Professores e Técnicos

dos Laboratórios de Hematologia, Microbiologia, Imunologia e Bioquímica do Hospital de Clínicas da U.F. do Paraná

do Laboratório de Microbiologia do Setor de Ciências Biológicas da U.F. do Paraná

Às Bibliotecárias,

Suzana Guimarães Castilho

Liliane Sperandio

e demais funcionários da Biblioteca do Setor de Ciências da Saúde da U.F. do Paraná

À Datilógrafa,

Edna Buganza, pelo magnífico trabalho datilográfico

Aos Colegas de Pós-Graduação em Pediatria ao Nível de Mestrado

Aos Professores e Amigos do Departamento de Pediatria da U.F. do Paraná - Setor de Ciências da Saúde

Aos Colegas do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP - São Paulo

I N D I C E

INTRODUÇÃO	01
OBJETIVO	09
CASUÍSTICA E MÉTODOS	10
1. CASUÍSTICA	10
2. MÉTODOS	14
2.1. Colheita do material	14
2.2. Preparação dos neutrófilos	15
2.3. Preparação das bactérias	16
2.4. Preparação das opsoninas	17
2.5. Teste bactericida	17
2.6. Reagentes	18
2.6.1. Solução de Hanks com 1% de <u>gela</u> tina	18
2.6.2. EDTA - K ₂	19
2.6.3. Siliconização	20
2.7. Métodos estatísticos	20

RESULTADOS	22
DISCUSSÃO	30
CONCLUSÕES	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
ANEXOS	51

I N T R O D U Ç Ã O

A resistência à infecção pelos microorganismos que nos cercam é devida a fatores específicos (imunidade adquirida) e a fatores não específicos que agem independentemente e concomitantemente com os primeiros.

A imunidade adquirida é representada pela defesa celular (imunidade mediada por células), mais relacionada às infecções virais, e pela produção de anticorpos (imunidade humoral), mais intimamente ligada à infecção bacteriana.

Os fatores inespecíficos envolvidos na defesa contra a infecção são representados por proteínas séricas como a Proteína C reativa, pela ativação do sistema complemento através da properdina facilitando a imunoaderência e a fagocitose; pela produção de interferon que impede a replicação viral; pela barreira constituída pela pele, epitélio ciliado e pelo; e, finalmente pela habilidade dos neutrófilos e macrófagos de exercerem a fagocitose e lise do microorganismo invasor.

No homem a fagocitose é exercida pelos neutrófilos e monócitos do sangue periférico e pelos macrófagos dos tecidos e microglia do sistema nervoso central.

Os neutrófilos são produzidos na medula óssea, onde estão envolvidos três compartimentos (Fig. 1): a) o compartimento da célula tronco; b) o compartimento da mitose e c) o compartimento de maturação e reserva. A partir do compartimento de maturação, os neutrófilos passam para o sangue periférico e distribuem-se em dois sítios: os granulócitos circulantes e os marginalizados, WINTROBE & col.⁽⁸³⁾.

Existem vários métodos para avaliar a produção de neutrófilos nos diferentes compartimentos, entretanto um dos mais adequados é a análise dos neutrófilos do sangue periférico através de isótopos radioativos, BRUBAKER & EVANS⁽¹²⁾.

A produção dos granulócitos desde o compartimento mitótico até o seu aparecimento no sangue periférico necessita de horas e dias dependendo das condições do indivíduo testado, CARTWRIGHT & col.⁽¹⁴⁾, FLIEDNER & col.⁽²⁶⁾, PERRY⁽⁵⁷⁾, WARNER & ATHENS⁽⁸²⁾. Entretanto, a sobrevivência dos neutrófilos no sangue periférico varia de

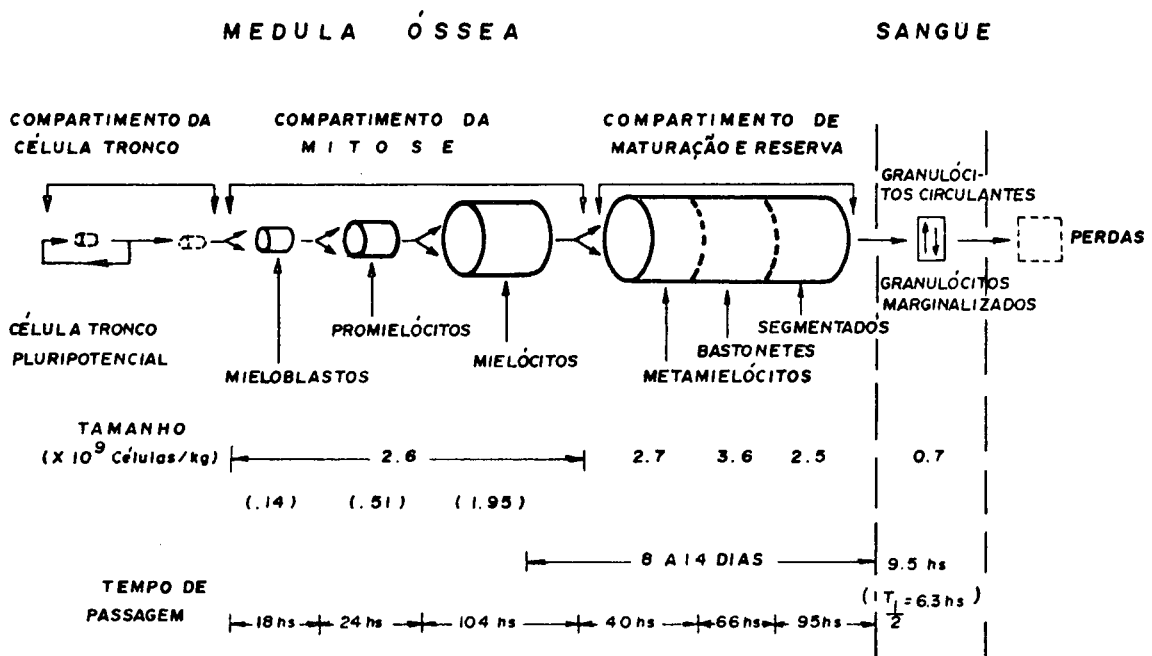


Fig. 1 - Modelo de produção e cinética dos neutrófilos no homem segundo Wintrobe e col. (1974)

seis a sete horas, STOSSEL⁽⁷⁸⁾.

O poder fagocitário e bactericida dos neutrófilos está relacionado com a sua capacidade de exercer a endocitose e com o conteúdo dos grânulos existentes em seu citoplasma, STOSSEL⁽⁷⁸⁾, WINTROBE & col.⁽⁸³⁾.

Os neutrófilos ingerem matérias estranhas, batérias e outras partículas, mas raramente fagocitam células autólogas, VAUGHN⁽⁸¹⁾. Embora, fatores quimiotáticos facilitem a sua migração para o sítio da infecção, BAUM & col.⁽¹⁰⁾, BOYDEN⁽¹¹⁾, a maneira como os neutrófilos reconhecem partículas estranhas constitui-se em mistério, a pesar de ser essa capacidade a essência da função fagocitária, WINTROBE & col.⁽⁸³⁾.

Os grânulos constituintes do citoplasma dos neutrófilos são divididos em primários e secundários.

Os grânulos primários ocorrem nas células mielóides precursoras e possuem enzimas hidrolíticos associados aos lisossomas e grandes quantidades de mieloperoxidase uma hemoproteína com atividade peroxidásica, BAINTON & col.⁽⁸⁾, STOSSEL⁽⁷⁸⁾. Possuem ainda lisozimas e proteínas catiônicas de baixo peso molecular com atividade bac-

tericida, BAGGIOLINI & col.⁽⁶⁾, BAINTON & col.⁽⁸⁾, OLSSON & VENGE⁽⁵³⁾, STOSSEL⁽⁷⁸⁾, ZEYA & SPITZNAGEL⁽⁹⁰⁾.

Nas fases tardias do desenvolvimento dos neutrófilos, a produção dos grânulos primários desaparece e ocorre a formação de grânulos menores, eletronicamente menos densos e que se coram pobremente com a solução de Wright-Giemsa, STOSSEL⁽⁷⁸⁾. São os grânulos secundários ou específicos, sendo em maior quantidade que os primários, BAGGIOLINI & col.⁽⁷⁾, BAINTON & col.⁽⁸⁾, OLSSON & VENGE⁽⁵³⁾, ZEYA & SPITZNAGEL⁽⁹⁰⁾.

Os precursores dos neutrófilos contém grande quantidade de mitocôndrias, sugerindo que a respiração é sua fonte de energia metabólica, STOSSEL⁽⁷⁸⁾. Entretanto, com a maturação dessas células, o número de mitocôndrias diminui consideravelmente e se formam grandes depósitos de glicogênio, SCOTT & HORN⁽⁶⁵⁾, STOSSEL⁽⁷⁸⁾.

SBARRA & KARNOVSKY⁽⁶⁴⁾, demonstraram que durante a fagocitose o consumo de oxigênio aumenta de duas a três vezes, entretanto este processo não envolve a oxidação do citocromo mitocondrial o que foi verificado por meio de inibidores da respiração celular como o cianeto.

O consumo do átomo de carbono número "um" da glicose marcada com ^{14}C e a sua conversão em CO_2 , através da via hexose monofosfato, aumenta de seis a sete vezes, BAEHNER & NATHAN⁽⁵⁾.

A oxidação do NADPH é aumentada em cinco vezes e a do NADH em três vezes, BAEHNER & NATHAN⁽⁵⁾. O Nitroblue tetrazolium é reduzido para formazona azul violeta aparentemente pela oxidase, BAEHNER & NATHAN⁽⁵⁾.

Esses achados indicam que os neutrófilos, normalmente operando em condições de hipóxia, utilizam a glicólise como fonte de energia, STOSSEL⁽⁷⁸⁾.

Outras alterações metabólicas e estruturais devem ocorrer durante a maturação dos neutrófilos, embora não conhecidas. Assim é que os precursores dos neutrófilos em relação a sua forma madura, são rígidos, imóveis e incapazes de ingerir partículas, LICHTMAN & WEED⁽³⁶⁾. Mesmo os bastonetes e neutrófilos que constituem a reserva medular, são menos eficientes que os do sangue periférico, ALTMAN & STOSSEL⁽¹⁾.

A ocorrência de um defeito bactericida dos neutrófilos circulantes em alguns pacientes com infecção

severa e extrema reação leucemóide, indicam que os neutrófilos da reserva medular sejam funcionalmente imaturos, McCALL & col.⁽³⁷⁾, MESSNER & col.⁽⁴¹⁾.

A aquisição, por meios desconhecidos de suficiente motilidade e plasticidade, habilitam os neutrófilos maduros a escaparem dos sinusóides medulares e entrarem na circulação, GIORDANO & LICHTMAN⁽³⁰⁾, LICHTMAN & WEED⁽³⁶⁾.

Correlações das mudanças morfológicas com a função bactericida têm sido tentadas, entretanto os resultados são inconclusivos, QUIE⁽⁶⁰⁾.

Entretanto, infecções generalizadas continuam sendo uma importante causa de morbidade e mortalidade nos recém-nascidos, apesar do grande avanço na terapêutica anti-microbiana.

Em revisões recentes de autópsias de recém-nascidos, a infecção bacteriana ocupa lugar de destaque, OLDING⁽⁵²⁾. Essa causa é mais evidente quando os recém-nascidos são de pré-termo e baixo peso para a idade gestacional, BUETOW & col.⁽¹³⁾, McCracken Jr & Shinefield⁽³⁹⁾, Moorman Jr & Sell⁽⁴⁸⁾, Nyhan & Fousek⁽⁵¹⁾, Silverman &

HOMAN⁽⁶⁹⁾, SMITH & col.⁽⁷⁰⁾.

Vários estudos sobre os mecanismos de defesa dos recém-nascidos têm sido realizados, FIREMAN & col.⁽²⁵⁾, MILLER⁽⁴⁴⁾, PROPP & ALPER⁽⁵⁹⁾, YEUNG & HOBBS⁽⁸⁵⁾, entre eles o do poder fagocitário e bactericida dos neutrófilos, DOSSET & col.⁽²³⁾, FORMAN & STIEHN⁽²⁷⁾, MILLER⁽⁴⁶⁾, XANTHOU & col.⁽⁸⁹⁾. Entretanto, os resultados têm sido conflitantes, ORLOWSKY & col.⁽⁵⁴⁾, PEARSON⁽⁵⁶⁾, possivelmente devido às dificuldades da metodologia empregada, CASTRO & col.⁽¹⁵⁾, LI & col.⁽³⁵⁾, SHAYEGANI & col.⁽⁶⁸⁾, SOLBERG^(74,75), TAN & col.⁽⁷⁹⁾ e da interpretação dos resultados experimentais, CHANDRA⁽¹⁶⁾, KAPRAL⁽³³⁾.

O B J E T I V O S

Considerando-se que os recém-nascidos não possuem todo o seu sistema bioquímico completamente desenvolvido, particularmente aqueles classificados como pré-termo, e oferecendo-se nas condições experimentais atividade opsônica normal, é objetivo do presente trabalho:

- 1) Estudar a atividade bactericida dos neutrófilos obtidos do sangue do cordão umbilical;
- 2) correlacionar essa atividade com o estado nutricional e maturidade dos recém-nascidos;
- 3) correlacionar essa atividade com a de indivíduos sadios, não recém-nascidos.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

1. CASUÍSTICA

Foram estudados 84 recém-nascidos, de ambos os sexos, nascidos no Hospital de Clínicas da U.F. do Paraná, classificados em quatro diferentes grupos em função da idade gestacional e do peso ao nascimento (Gráfico 1).

Os recém-nascidos foram divididos em diferentes grupos seguindo-se estes critérios:

Definiu-se recém-nascidos de termo a todo produto de uma gestação compreendido entre 38 a 41 semanas e 6 dias contados a partir do primeiro dia do último período menstrual, segundo a AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS - COMMITTEE ON FETUS AND NUWBORN⁽²⁾ e COMITÊ BRASILEIRO DE PERINATOLOGIA⁽¹⁹⁾.

Este grupo por sua vez, foi subdividido em função do peso ao nascimento, em peso adequado e baixo pe

CASUÍSTICA

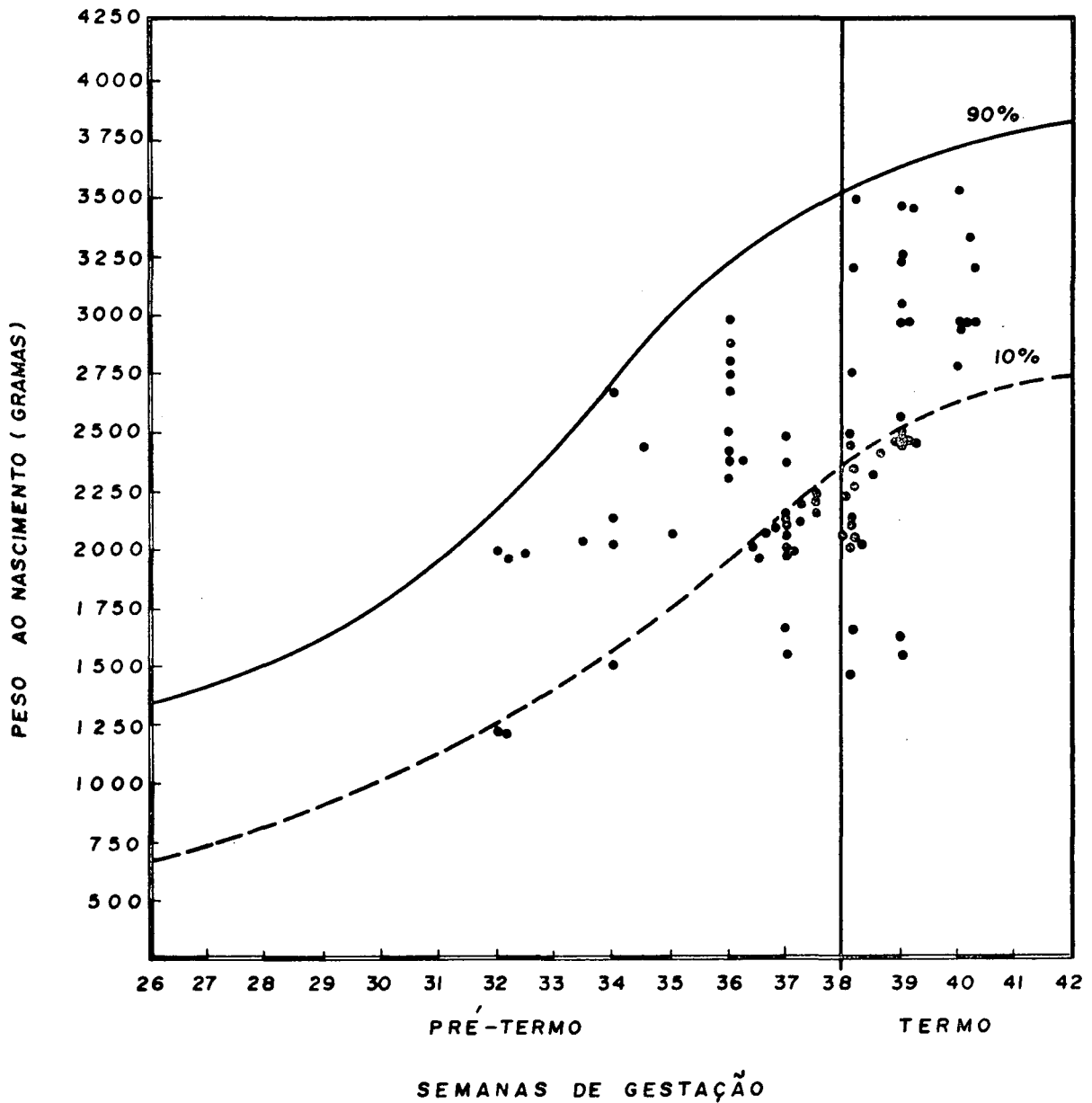


Gráfico.1 - Recém-nascidos de ambos os sexos, distribuídos segundo o peso ao nascimento e idade gestacional.

so para a idade gestacional. Foi considerado peso adequado aquele compreendido entre o 10º e 90º percentil e baixo peso para a idade gestacional, aquele abaixo de 10º percentil, segundo os critérios de BATAGLIA & LUBCHENCO⁽⁹⁾.

Considerou-se recém-nascido de pré-termo a todo produto de uma gestação menor ou igual a 37 semanas e 6 dias, contados a partir do 1º dia do último período menstrual, segundo a AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS - COMMITTEE ON FETUS AND NEWBORN⁽²⁾ e COMITÊ BRASILEIRO DE PERINATOLOGIA⁽¹⁹⁾. Igualmente, este grupo foi subdividido de acordo com o peso ao nascimento em peso adequado e baixo peso para a idade gestacional, segundo os critérios de BATAGLIA & LUBCHENCO⁽⁹⁾.

Nos casos em que houve dificuldade em se obter informações precisas a respeito do primeiro dia do último período menstrual, para melhor avaliar a idade gestacional foram utilizados os critérios de DUBOWITZ & col.⁽²⁴⁾, após 24 horas de vida.

Como controle foram usados 21 indivíduos de ambos os sexos, de faixa etária variando de 16 a 36 anos, gozando de saúde na ocasião do estudo.

Estão incluídos no presente estudo os recém-nascidos cujas mães não apresentavam nenhuma patologia associada a gestação pertinente, independentemente da idade e paridade, bem como aquelas cuja ruptura de bolsa amniótica ocorreu em tempo menor do que 24 horas.

Foram excluídos do presente estudo mães que, durante a gestação ou trabalho de parto, fizeram uso de drogas como corticosteróides, fenilbutazona, metamizole, antibióticos, derivados da pirazolona e anti-arrítmicos, FORSGREN & col.⁽²⁸⁾, FUENFER & col.⁽²⁹⁾, KERNBAUM & BASTIN⁽³⁴⁾, RUUTU⁽⁶³⁾, ou que apresentavam diabete mellitus, reumatismo, alcoolismo, fatores esses que interferem na fagocitose, CROSBY & ALLINSON Jr⁽²²⁾.

Somente foram estudados recém-nascidos cuja vitalidade, avaliada segundo a escala de APGAR⁽³⁾, no primeiro e quinto minuto de vida foi superior a 7.

2. MÉTODOS

A atividade bactericida dos neutrófilos foi determinada pelo método quantitativo de QUIE & col. (62).

2.1. Colheita do material

Após 3 segundos do clampeamento do cordão em recém-nascidos de termo e 75 segundos em recém-nascidos de pré-termo, antes da dequitação da placenta, a área do cordão umbilical a ser puncionada foi cuidadosamente limpa com solução a 1% de álcool iodado e algodão estéril embebido em álcool a 70%, COWETT & col. (20).

Utilizando-se de seringa de 10 ml descartável e heparinizada, foram colhidos 10 ml de sangue. Cerca de 7 ml de sangue foi adicionado em tubo de centrifuga 15 x 75 mm, contendo 3 ml de Dextran a 6%. Os restantes 3 ml de sangue foram transferidos para um frasco contendo EDTA potássico a 1% para a realização do hemograma. Ao mesmo tempo foram feitos esfregaços para a análise qualitativa dos leucócitos. Da mesma maneira procedeu-se com relação aos indivíduos controle, sendo o sangue

retirado de uma veia do braço.

2.2. Preparação dos neutrófilos

A mistura de sangue e Dextran a 6% uma vez selada com parafilme foi deixada a sedimentar a temperatura ambiente por 90 minutos.

O plasma rico em leucócitos, plaquetas e poucos eritrócitos obtido pela sedimentação, foi transferido para um tubo de centrífuga 15 x 75 mm, através de pipeta Pasteur. A seguir esses tubos foram centrifugados a 2.000 rpm por 15 minutos, através de uma centrífuga ASCA modelo UJ1 nº 11.047. O sobrenadante foi descartado e o botão celular lavado 2 vezes com 2 ml de solução de Hanks com 1% de gelatina.

A seguir foi efetuada a contagem dos neutrófilos, ajustando-os à concentração desejada de 5×10^6 polimorfonucleares/ml. A viabilidade dos neutrófilos foi testada por exclusão através do azul de Tripán a 1%.

2.3. Preparação das bactérias

Colônias de *Staphylococcus aureus*, com características biológicas previamente estabelecidas, fornecidas pelo Laboratório de Patologia Clínica da Santa Casa de Misericórdia de Curitiba, foram utilizadas em todo o estudo.

Essas colônias foram mantidas em gelose, sendo repicadas semanalmente e semeadas em tubos de ensaio 16 x 150 mm com gelose inclinada. Três a quatro tubos dessas colônias-estoques foram lavados em sua superfície, sucessivamente, com 2 ml de soro fisiológico. Um ml dessa lavagem foi transferido para um tubo de fotocolorímetro Coleman Junior II, modelo 6/20, nº 8.329, sendo adicionado soro fisiológico no montante necessário para obter uma densidade ótica de 0,6 a 620 mu.

Parte dessa suspensão oticamente ajustada, foi diluída a 1:50 com solução de Hanks com 1% de gelatina, resultando uma concentração de 3 a 6 x 10⁷ bactérias/ml.

2.4. Preparação das opsoninas

Soro proveniente de 6 indivíduos adultos sadios foi misturado e distribuído em alíquotas de 0,5 ml e mantidos a menos 25°C. Para cada experimento, essas alíquotas foram diluídas a 1:20 em solução de Hanks com 1% de gelatina.

2.5. Teste bactericida

Em tubos de hemólise 12 x 75 mm foram adicionados 0,5 ml da suspensão de polimorfonucleares, 0,1 ml da suspensão de bactérias e 0,4 ml de soro humano a 20% (opsoninas) e incubados a 37°C, com agitação constante.

Para cada indivíduo testado foram preparados 5 tubos cujas reações foram interrompidas a 0, 30, 60, 90 e 120 minutos.

No tempo hábil os tubos foram centrifugados a 800 rpm por 5 minutos em uma centrífuga CHRIST, modelo UJ1, nº 12.728. O sobrenadante foi descartado e do botão de bactéria e neutrófilo, foi transferido o con-

teúdo de uma alça de platina, previamente calibrada a 0,002 ml, para um tubo de ensaio 16 x 150 mm contendo 1 ml de água destilada e estéril. Após obtida a lise dos leucócitos usando-se a mesma alça de platina, o seu conteúdo foi transferido para um tubo de ensaio de 16 x 150 mm, estéril contendo 1 ml de caldo simples. Após agitação, essa mistura foi vertida em uma placa de Petri de 10 cm de diâmetro e coberta com 9 ml de Tripsan - Soy-Agar.

As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e o número de colônias foi determinado pelo Quebec Bacteria Colony Counter, modelo 3298 - B10, segundo ARTHUR H. THOMAS COMPANY⁽⁴⁾.

2.6. Reagentes

2.6.1. Solução de Hanks com 1% de gelatina

Foi preparada a partir de solução estoque de acordo com a fórmula abaixo, esterilizada por filtração e o pH ajustado para 7.2.

Solução A	g/500 ml
NaCl	80,0 g
KCl	4,0 g
MgSO ₄ ·7.H ₂ O	1,0 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1,0 g

Dissolver em 400 ml de H₂O esterilizada.

Em 50 ml

CaCl₂ anidro 1,39 g

Ajustar o volume para 500 ml.

Solução B	g/500 ml
Na ₂ HPO ₄ ·12.H ₂ O	1,5 g
KH ₂ ·PO ₄	0,6 g
Glicose	10,0 g
Fenol vermelho	0,2 g
Azida sódica	1,0 g

Acrescentar 1% de gelatina.

2.6.2. EDTA - K₂

Foi feita uma solução a 1% em água destilada.

2.6.3. Siliconização

Todo o material empregado no experimento foi siliconizado e esterilizado previamente. Em uma solução a 10% volume a volume de DRI-FILM-SG-87, da Pierce Chemical Company e éter de petróleo, o material foi imerso por 5 minutos, à temperatura ambiente. Após foram transferidos para uma solução de álcool a 95% por 5 minutos e secados em estufa.

2.7. Métodos estatísticos

Dada a natureza das variáveis, utilizaram-se testes estatísticos paramétricos.

Usou-se a análise de variância, SNEDECOR⁽⁷¹⁾ para mesmos indivíduos, para se estudar o efeito significativo ou não entre os tempos de incubação, repetições e interação peso x tempos. Quando a análise de variância foi significativa, complementou-se o estudo com a comparação entre as médias, utilizando-se o método de Tuckey, SNEDECOR⁽⁷²⁾.

A comparação entre o número de colô-

nias de *Staphylococcus aureus*/ml encontradas no soro de recém-nascidos de peso adequado ou baixo peso para a idade gestacional, nascidos a termo ou pré-termo foram feitos pela aplicação do teste "t" de Studente, SNEDECOR⁽⁷³⁾.

Em todos os casos o nível de significância para rejeição da hipótese de igualdade foi sempre igual ou menor do que 0,01 (1%).

Quando o valor calculado foi estatisticamente significativo usou-se, para caracterizá-lo, dois asteriscos e a sigla NS para não significativo.

R E S U L T A D O S

O número de colônias/ml de *Staphylococcus aureus* obtidos nos diferentes experimentos em função do tempo e nas diferentes populações estudadas acham-se nas Tabelas I, II e III, apresentadas nos anexos.

Os resultados serão apresentados de modo sucinto e na seguinte sequência:

1. Análise de variância dos dados obtidos (número de colônias/ml de *Staphylococcus aureus*) em recém-nascidos de termo em função do peso e tempo de incubação (Quadro 1).

2. Comparação entre as médias de colônias de *Staphylococcus aureus* em recém-nascidos de termo, nos diferentes tempos de incubação (Quadro 2).

3. Análise de variância dos dados obtidos (número de colônias/ml de *Staphylococcus aureus*) em recém-nascidos de pré-termo em função do peso ao nascimento e

tempo de incubação (Quadro 3).

4. Comparação entre as médias de colônias de *Staphylococcus aureus* em função do peso ao nascimento em recém-nascidos de pré-termo, nos diferentes tempos de incubação (Quadro 4).

5. Análise de variância dos dados obtidos (número de colônias/ml de *Staphylococcus aureus*) em indivíduos-controle (Quadro 5).

6. Comparação entre as médias de colônias de *Staphylococcus aureus* em indivíduos-controle, nos diferentes tempos de incubação (Quadro 6).

7. Comparação entre o número de colônias de *Staphylococcus aureus* encontradas em recém-nascidos de peso adequado e baixo peso para a idade gestacional, nascidos a termo ou pré-termo (Quadro 7).

8. Análise de variância da comparação entre o número de colônias de bactérias encontradas entre indivíduos-controle, recém-nascidos de termo e recém-nascidos de pré-termo, independentemente do peso ao nascimento (Quadro 8).

9. Comparação entre as médias de colônias de *Staphylococcus aureus* encontradas em indivíduos-controle, recém-nascidos de termo e recém-nascidos de pré-termo (Quadro 9).

QUADRO 1 - Análise de variância dos dados obtidos (número de colônias/ml de *Staphylococcus aureus*) em recém-nascidos de termo em função do peso e tempo de incubação

Causas de Variação	G.L.	S.Quadrados	Q.Médios	F
Pesos	1	54.080,48	54.080,48	0,4784 NS
Tempos	4	77.211.272,58	19.302.818,15	170,75 **
Pesos x Tempos	4	118.055,23	29.513,81	0,2611 NS
Tratamentos (9)		77.383.408,29		
Repetições	20	6.845.865,50	342.293,28	3,03 **
Resíduo	180	20.348.852,31	113.049,18	
Total	209	104.578.126,10		

QUADRO 2 - Comparação entre as médias de colônias de *Staphylococcus aureus* em recém-nascidos de termo, nos diferentes tempos de incubação

Tempos	M é d i a s	
	Peso adequado	Baixo peso
0'	1943	1917 colônias/ml
30'	1124	1124 " "
60'	686	763 " "
90'	389	488 " "
120'	199	209 " "

Diferença crítica = 338

QUADRO 3 - Análise de variância dos dados obtidos (número de colônias/ml de *Staphylococcus aureus*) em recém-nascidos de pré-termo em função do peso ao nascimento e tempo de incubação

Causas de Variação	G.L.	S. Quadrados	Q. Médios	F
Pesos	1	409.999,24	409.999,24	3,31 NS
Tempos	4	55.688.447,33	13.922.111,83	112,25 **
Pesos x Tempos	4	38.631,64	9.657,91	0,0779 NS
Tratamentos (9)		56.137.078,21		
Repetições	20	9.818.680,52	490.934,03	3,96 **
Resíduo	180	22.325.589,29	124.031,05	
Total	209	88.281.348,02		

QUADRO 4 - Comparação entre as médias de colônias de Staphylococcus aureus em função do peso ao nascimento em recém-nascidos de pré-termo, nos diferentes tempos de incubação

Tempos	M é d i a s	
	Peso adequado	Baixo peso
0'	2507	2648 colônias/ml
30'	2170	2244 " "
60'	1720	1799 " "
90'	1443	1508 " "
120'	1085	1169 " "

Diferença crítica = 354

QUADRO 5 - Análise de variância dos dados obtidos (número de colônias/ml de Staphylococcus aureus) em indivíduos-controle

Causas de Variação	G.L.	S.Quadrados	Q.Médios	F
Tempos	4	28.874.077,48	7.218.519,37	311,80 **
Repetições	20	2.918.888,76	145.944,44	6,30 **
Resíduo	80	1.852.083,72	23.151,05	
Total	104	33.645.049,96		

QUADRO 6 - Comparação entre as médias de colônias de *Staphylococcus aureus* em indivíduos-controle, nos diferentes tempos de incubação

Tempos	M é d i a s
0'	1656 colônias/ml
30'	867 " "
60'	552 " "
90'	349 " "
120'	162 " "

Diferença crítica = 159

QUADRO 7 - Comparações entre o número de colônias de Staphylococcus aureus encontradas em recém-nascidos de peso adequado e baixo peso para a idade gestacional, nascidos a termo ou pré-termo

Peso adequado - RN Termo x RN Pré-termo

$$t = \frac{868 - 1785}{98,28} = -9,33 \text{ **}$$

Baixo peso - RN Termo x RN Pré-termo

$$t = \frac{900 - 1874}{89,21} = -10,92 \text{ **}$$

Peso adequado termo x Baixo peso pré-termo

$$t = \frac{868 - 1874}{95,20} = -10,57 \text{ **}$$

Peso adequado pré-termo x Baixo peso termo

$$t = \frac{1785 - 900}{92,50} = 9,57 \text{ **}$$

$$t_{(00)} 1\% = 2,58$$

QUADRO 8 - Análise de variância da comparação entre o número de colônias de bactérias encontradas entre indivíduos-controle, recém-nascidos de termo e recém-nascidos de pré-termo, independentemente do peso ao nascimento

Causas de Variação	G.L.	S.Quadrados	Q.Médios	F
Comparações	2	3.598.506,53	1.799.253,27	151,56 **
Tempos	4	4.444.294,00	1.111.073,50	93,59 **
Resíduo	8	94.970,80	11.871,35	
Total	14	8.137.771,33		

QUADRO 9 - Comparação entre as médias de colônias de Staphylococcus aureus encontradas em indivíduos-controle, recém-nascidos de termo e recém-nascidos de pré-termo

	M é d i a s
Indivíduos-controle	717 colônias/ml
Recém-nascido de termo	884 " "
Recém-nascido de pré-termo	1830 " "

Diferença crítica = 275

D I S C U S S Ã O

As funções fagocitárias e bactericidas dos neutrófilos têm sido objeto de vários estudos, numa tentativa de explicar um dos possíveis mecanismos de defesa dos recém-nascidos, às infecções.

TUNNCLIFF⁽⁸⁰⁾, utilizando *Streptococcus pyogenes*, *Pneumococcus* e *Staphylococcus aureus* como teste orgânico, concluiu que o poder fagocitário dos leucócitos era menor ao nascimento, decaindo nos primeiros meses de vida e atingindo os níveis de adulto aos dois anos de idade.

MATOTH⁽⁴⁰⁾, concluiu que a fagocitose de grãos de amido era menor pelos leucócitos de recém-nascidos do que os de adultos. Entretanto, quando os leucócitos obtidos do sangue do cordão de recém-nascidos de termo eram lavados e colocados em presença de soro de adultos a uma diluição 1:3, possuíam a mesma capacidade de fagocitar grãos de amido que aquela dos adultos.

GLUCK & SILVERMAN⁽³¹⁾, num estudo da atividade fagocitária em 54 recém-nascidos de pré-termo e 15 recém-nascidos de termo, e utilizando partículas de carvão, demonstraram não haver diferença desta atividade entre adultos e recém-nascidos com peso superior a 2.000 g.

MYAMOTO^(49,50), concluiu que o poder fagocitário de recém-nascidos de termo ou de pré-termo frente a *Streptococcus* era menor que aquele desenvolvido por lactentes com 1 mês de vida. Seus achados concordaram com os de GLUCK & SILVERMAN⁽³¹⁾, referentes a existência de uma relação entre peso ao nascimento e função leucocitária. Entretanto, COCCHI & MARIANELLI⁽¹⁷⁾, utilizando *Pseudomonas aeruginosa*, relataram que o poder fagocitário dos neutrófilos era maior nos recém-nascidos de pré-termo que aquele de adultos. Todavia a atividade bactericida era menor nestes recém-nascidos.

Também COEN & col.⁽¹⁸⁾, usando *Staphylococcus aureus*, confirmaram as observações supra citadas quanto a habilidade fagocitária dos recém-nascidos de termo bem como a sua ineficaz atividade bactericida.

Em estudo comparativo entre recém-nascidos de

termo e baixo peso, FORMAN & STIEHN⁽²⁷⁾, não encontraram diferença estatisticamente significativa quanto a atividade bactericida dos neutrófilos.

PARK & col.⁽⁵⁵⁾, embora não informem sobre o estado nutricional dos recém-nascidos por eles estudados, encontraram atividade bactericida normal dos neutrófilos para o *Staphylococcus aureus*. Na presença de soro de adulto a 10% ou mais, McCracken Jr & EICHENWARD⁽³⁸⁾ encontraram atividade bactericida normal de neutrófilos de recém-nascidos de termo e baixo peso para o *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

No presente estudo, recém-nascidos de termo, independentemente do peso ao nascimento tem um comportamento igual ao de adultos quanto a atividade bactericida frente ao *Staphylococcus aureus*. Por outro lado, os recém-nascidos de pré-termo, independentemente do peso ao nascimento, possuem esta atividade bactericida sensivelmente reduzida, quando comparada àquelas de recém-nascidos de termo e de adultos.

Os nossos resultados estão em acordo com aqueles observados por WRIGHT Jr & col.⁽⁸⁴⁾, embora os crité-

rios para a definição dos diferentes sub-grupos de recém-nascidos não tenham obedecido aos postulados no presente estudo.

Ainda no presente estudo, não encontramos diferença do poder bactericida dos neutrófilos, em função do peso do recém-nascido ao nascimento dentro de um mesmo grupo de idade gestacional.

Por outro lado, a idade gestacional parece ser o fator preponderante sobre a atividade bactericida dos neutrófilos dos recém-nascidos, ou seja, os de recém-nascidos de pré-termo são menos capazes de destruir o *Staphylococcus aureus*.

Uma possível explicação para essa deficiência pode ser atribuída à imaturidade dos neutrófilos dos recém-nascidos de pré-termo, quanto a sua motilidade, a fatores metabólicos dentro das primeiras horas de vida, a imaturidade enzimica, seja ela relacionada às proteínas microbicidas ou referentes à respiração celular.

Considerando-se que a desnutrição proteico-calórica na vida pré e pós-natal produz profundas e varia-

das alterações no metabolismo energético intracelular em todos os níveis do organismo, o mesmo poderíamos esperar com relação aos neutrófilos e sua atividade bactericida.

Assim, demonstrou-se em mães cujos recém-nascidos pesavam pouco, quer por serem desnutridos intra-uterino ou recém-nascidos de pré-termo que os valores de ATP, adenilato e piruvato quinase estavam diminuídos, METCOFF & col.⁽⁴³⁾.

Assim, METCOFF & col.⁽⁴²⁾, observaram em mães de recém-nascidos de termo que o metabolismo energético dos neutrófilos representado pelos níveis de ATP, ADP e pela atividade da adenilato e piruvato quinase aumentavam durante o último trimestre de gestação. Entretanto, MITCHELL & col.⁽⁴⁷⁾ observaram que a atividade da via hexose monofosfato e da enzima mieloperoxidase estavam aumentadas durante a gravidez e que apesar de importantes para a fagocitose dos neutrófilos a capacidade fagocítica dos mesmos não estava aumentada.

Em recém-nascidos de termo, PARK & col.⁽⁵⁵⁾ demonstraram que a atividade metabólica dos neutrófilos estava aumentada no sangue do cordão, porém a capacidade fagocítica e bactericida dos mesmos era normal.

De modo correspondente, YOSHIDA & col.⁽⁸⁸⁾ encontraram no sangue do cordão de recém-nascidos com desnutrição intra uterina, baixo conteúdo de ATP, piruvato e adenilato quinase. Este quadro bioquímico é semelhante ao encontrado em crianças com desnutrição proteico-calórica pós-natal, YOSHIDA & col.^(86,87).

No que diz respeito à desnutrição proteico-calórica pós-natal, SELVARAJ & BHAT⁽⁶⁶⁾, também encontraram atividade glicolítica dos neutrófilos reduzida e atividade fagocitária diminuída.

Pela analogia com a desnutrição proteico-calórica pós-natal e sabendo-se que a produção de energia nos leucócitos na desnutrição fetal está diminuída, seríamos levados a supor que a atividade fagocitária e bactericida dos neutrófilos do recém-nascido desnutrido poderia estar diminuída. Entretanto, encontramos nos recém-nascidos de termo com baixo peso para a idade gestacional, valores da atividade bactericida comparáveis aos dos recém-nascidos de termo de peso adequado para a idade gestacional.

Esses resultados foram também encontrados por outros autores, FORMAN & STIEHN⁽²⁷⁾, WRIGHT Jr & col.⁽⁸⁴⁾.

Considerando que os recém-nascidos com baixo peso para a idade gestacional, por nós estudados, se enquadram perfeitamente dentro dos critérios aceitos para definir a desnutrição intra uterina é possível que se houvesse redução na produção de energia dos neutrófilos esta não teria sido suficiente para interferir na atividade bactericida dos mesmos.

Evidentemente, para confirmarmos essa hipótese necessitaríamos do estudo conjunto do metabolismo intracelular dos neutrófilos de recém-nascidos com baixo peso para a idade gestacional associado a atividade fagocitária e bactericida dos mesmos.

C O N C L U S Õ E S

Considerando-se que os aspectos humorais da fagocitose, medida indiretamente pela atividade bactericida estão excluídos do presente trabalho pela utilização de opsonização homogênea, a análise da participação celular permite-nos concluir:

1º) Os recém-nascidos de termo, independentemente do peso ao nascimento possuem mesma atividade bactericida que aquela dos seus controles.

2º) Os recém-nascidos de pré-termo, independentemente do peso ao nascimento possuem menor atividade bactericida quando comparados com recém-nascidos de termo e seus controles.

3º) A idade gestacional é fator preponderante na atividade bactericida dos neutrófilos de recém-nascidos.

4º) O estado nutricional do recém-nascido ao nascimento, não interfere na sua capacidade microbicida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. ALTMAN, A. & STOSSEL, T.P. Functional immaturity of bone marrow bands and polymorphonuclear leucocytes. Br J Haematol, 27:241-5, 1974.
02. AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. COMMITTEE ON FETUS AND NEWBORN. Nomenclature for duration of gestation, birth weight and intra-uterine growth. Pediatrics, 39:935-9, 1967.
03. APGAR, V. A proposal for new method of evaluation of newborn infant. Anesth Analg (Paris), 32:260-7, 1953.
04. ARTHUR H. THOMAS COMPANY. Quebec bacterie colony counter. In: Thomas scientific apparatus and reagents. Philadelphia, 1971. p 396.
05. BAEHNER, R.L. & NATHAN, D.G. Leukocytes oxidase: defective activity in chronic granulomatous disease. Science, 155:835-6, 1967.
06. BAGGIOLINI, M.; DE DUVE, C.; MASSON, P.L.; HEREMANS, J.F. Association of lactoferrin with specific granules in rabbit heterophil leukocytes. J Exp Med, 131:559-70, 1971.

07. BAGGIOLINI, M.; HIRSCH, J.G.; DE DUVE, C. Further biochemical and morphological studies of granule fraction from rabbit eterophil leukocytes. J Cell Biol, 45:586-92, 1970.
08. BAINTON, D.F.; ULLYOT, J.L.; FARQUHAR, M.G. The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. Origin and content of azurophil and specific granules. J Exp Med, 134: 907-34, 1971.
09. BATTAGLIA, F.C. & LUBCHENCO, L.O. A practical classification of newborn infants by birth weight and gestacional age. J Pediatr, 71:159-63, 1967.
10. BAUM, J.; MOWAT, A.G.; KIRK, J.A. A simplified method for the measurement of chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes from human blood. J Lab Clin Med, 77:501-9, 1971.
11. BOYDEN, S.V. The chemostatic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. J Exp Med, 115:453-66, 1962.
12. BRUBAKER, L.H. & EVANS, W.H. Separation of granulocytes, monocytes, lymphocytes, erythrocytes and platelets from human blood and relative tagging with diisopropylfluorophosphate (DFP). J Lab Clin Med, 73:1036-45, 1969.

13. BUETOW, K.C.; KLEIN, S.W.; LANE, R.B. Septicemia in premature infants. The characteristics, treatment and prevention of septicemia in premature infants. Amer J Dis Child, 110:29-41, 1965.
14. CARTWRIGHT, G.E.; ATHENS, J.W.; WINTROBE, M.M. The kinetics of granulopoiesis in normal man. Blood, 24:780-803, 1964.
15. CASTRO, O.; ANDRIOLE, V.T.; FINCH, S.C. Whole blood phagocytic and bactericidal activity for staphylococcus aureus. J Lab Clin Med, 80:857-70, 1972.
16. CHANDRA, R.K. Fetal malnutrition and postnatal immunocompetence. Am J Dis Child, 129:450-4. 1975.
17. COCCHI, P. & MARIANELLI, L. Phagocytosis and intracellular killing of *Pseudomonas aeruginosa* in premature infants. Helv Paediat Acta, 22:110-9, 1967.
18. COEN, R.; GRUSH, O.; KAUDER, E. Studies of bacterial activity and metabolism of the leukocyte in full term neonates. J Pediatr, 75:400-6, 1969.
19. COMITÊ BRASILEIRO DE PERINATOLOGIA. Normas de assistência hospitalar aos recém-nascidos. J Pediatr, 5(Supl. esp.):6, 1977.
20. COWTT, R.M.; PETER, G.; HAKANSON, D.O.; OH, W. Reliability of bacterial culture of bacterial culture of blood obtained from an umbilical artery catheter. J Pediatr, 88:1035-6, 1976.

21. CRAIG, C.P. & SUTER, E. Extracellular factors influencing staphylocidal capacity of human polymorphonuclear leukocytes. J Immunol, 97:287-96, 1966.
22. CROSBY, B. & ALLISON Jr., F. Phagocytic and bactericidal capacity of polymorphonuclear leukocytes recovered from venous blood of human beings. Proc Soc Exp Biol Med, 123:660-6, 1966.
23. DOSSET, J.H.; WILLIAMS Jr., R.C.; QUIE, P.G. Studies on interation of bacteria, serum factors and polymorphonuclear leukocytes in mothers and newborns. Pediatrics, 44:49-57, 1969.
24. DUBOWITZ, L.M.; DUBOWITZ, V.; GOLDEBERG, C. Unical assessment of gestacional age in the newborn infant. J Pediatr, 77:1-10, 1970.
25. FIREMAN, P.; ZUCHOWSKI, D.A.; TAYLOR, P.M. Development of human complement system. J Immunol, 103:25-31, 1969.
26. FLIEDNER, T.M.; CRONKITE, E.P.; KILMAN, S.A.; BOND, V.P. Granulocytopoiesis II. Emergence and pattern of labeling of neutrophilic granulocytes in humans. Blood, 24:683-700, 1964.
27. FORMAN, M.L. & STIEHN, E.R. Impaired opsonic activity but normal phagocytosis in low-birth-weight infants. N Eng J Med, 281:926-31, 1969.

28. FORSGREN, A.; SCHMELING, D.; QUIE, P.G. Effect of tetracycline on the phagocytic function of human leukocytes. J Infect Dis, 130:412-5, 1974.
29. FUENFER, M.M.; OLSON, G.E.; POLK Jr., H.C. Effect of various corticosteroids upon the phagocytic bactericidal activity of neutrophils. Surgery, 78:27-33, 1975.
30. GIORDANO, G.F. & LICHTMAN, M.A. Marrow cell egress. The central interaction of barrier pore size and cell maturation. J Clin Invest, 52:1154-64, 1973.
31. GLUCK, L. & SILVERMAN, W.A. Phagocytosis in premature infants. Pediatrics, 20:951-7, 1958.
32. IWASZKO-KRAWCZUK, W. & PROKOPOWICZ, J. Phagocytosis in the small-for-dates newborn. Acta Paediatr Acad Sci Hung, 14:47-9, 1973.
33. KAPRAL, F.A. The phagocytosis and intracellular fate of staphylococci. Ann NY Acad Sci, 128:285-300, 1965.
34. KERNBAUM, S. & BASTIN, R. Corticoides et fonctions phagocytaires des polynucléaires neutrophiles humains. Nouv Presse Med, 3:2386-90, 1974.
35. LI, I.W.; MUDD, S.; KAPRAL, F.A. Dissociation of phagocytosis and intracellular killing of Staphylococcus aureus by human blood leukocytes. J Immunol, 90:804-9, 1963.

36. LICHTMAN, M.A. & WEED, R.I. Alteration of the cell periphery during granulocyte maturation: Relationship to cell function. Blood, 39:301-16, 1972.
37. McCALL, C.E.; CAVES, J.; COOPER, R.; DeCHATELET, L. Functional characteristics of human toxic neutrophils. J Infect Dis, 124:68-75, 1971.
38. McCracken Jr., G.H. & EICHENWARD, H.F. Leukocyte function and the development of opsonic and complement activity in the neonate. Amer J Dis Child, 121:120-6, 1971.
39. McCracken Jr., G.H. & SHINEFIELD, H.R. Changes in the pattern of neonatal septicemia and meningitis. Amer J Dis Child, 112:33-9, 1966.
40. MATOTH, Y. Phagocytic and ameboid activities of the leukocytes in the newborn infant. Pediatrics, 9:748-54, 1952.
41. MESSNER, R.P.; REED, W.P.; PLAMER, D.L. A transient defect in leukocytic bactericidal capacity. Clin Immunol Immunopathol, 1:523-32, 1973.
42. METCOFF, J.; WIKMAN-COFFELT, J.; YOSHIDA, T.; BERNAL, A.; ROSADO, A.; YOSHIDA, P.; URRUSTI, J.; FRENK, S.; MADRAZO, R.; VELASCO, L.; MORALES, M. Energy metabolism and protein synthesis in human leukocytes during pregnancy and in placenta related to fetal growth. Pediatrics, 51:866-77, 1973.

43. METCOFF, J.; YOSHIDA, T.; MORALES, M.; ROSADO, A.;
URRUSTI, J.; SOSA, A.; YOSHIDA, P.; FRENK, S.;
VELASCO, L.; WARD, A.; AI-UBAIDI, Y. Biomolecular
studies of fetal malnutrition in maternal leuko-
cytes. Pediatrics, 47:180-91, 1971.
44. MILLER, J.F.A.P. Immunity in the foetus and the new-
born. Br Med Bull, 22:21-6, 1966.
45. MILLER, M.E. Chemotactic function in the human neo-
nate: Humoral and cellular aspects. Pediatr Res,
5:487-92, 1971.
46. MILLER, M.E. Phagocytosis in the newborn infant:
Humoral and cellular factors. Pediatrics, 44:49-51,
1969.
47. MITCHELL Jr., G.W.; JACOBS, A.A.; HADDAD, V.; PAUL,
B.B.; STRAUSS, A.J. The role of the phagocyte in
host-parasite interactions. Am J Obstet Gynecol,
108:805-13, 1970.
48. MOORMAN Jr., R.S. & SELL, S.H. Neonatal septicemia.
South Med J, 54:137-41, 1961.
49. MYAMOTO, K. Phagocytic activity of leucocytes in
premature infants. Part I. Comparison of the phago-
cytic activity of leucocytes between premature in-
fants and full-term infants. Hiroshima J Med Sci,
14:9-17, 1965.

50. MYAMOTO, K. Phagocytic activity of leucocytes in pre mature infants. Part II. Correlation of leukocytes in premature and full-term infants. Hiroshima J Med Sci, 14:19-30, 1965.
51. NYHAN, W.L. & FOUSEK, M.D. Septicemia of the newborn. Pediatrics, 22:268-78, 1958.
52. OLDING, L. Bacterial infection in cases of perinatal death. A morphological and bacteriological study based on 264 autopsies. Acta Paediatr Scand(Suppl.) 55:1-104, 1966.
53. OLSSON, I. & VENGE, P. Cationic proteins of human granulocytes. I. Isolation of the cationic proteins from the granuls of leuckaemic mieloyd cells. Scand J Haematol, 9:201-11, 1972.
54. ORLOWSKI, J.P.; SIEGER, L.; ANTONY, B.F. Bactericidal capacity of monocytes of newborn infants. J Pediatr, 89:797-801, 1976.
55. PARK, R.H.; HOLMES, B.; GOOD, R.A. Metabolic activities in leukocytes of newborn infants. J Pediatr, 76:237-41, 1970.
56. PEARSON, H.A. Phagocytosis by leukocytes of newborn infants. J Pediatr, 74:329-30, 1969.
57. PERRY, S. Rates of appearance and disappearance of white blood cells in normal and in various disease states. J Lab Clin Med, 51:501-15, 1958.

58. PETERSON, P.K.; VERHOEF, J.; SABATH, L.D.; QUIE, P.G. Extracellular and bacterial factors influencing staphylococcal phagocytosis and killing by human polymorphonuclear leukocytes. Infect Immun, 14: 496-501, 1976.
59. PROPP, R.P. & ALPER, C.A. C₃ synthesis in the human fetus and lack of transplacental passage. Science, 162:672-3, 1968.
60. QUIE, P.G. Bactericidal function of human polymorphonuclear leukocytes. Pediatrics, 50:264-70, 1972.
61. QUIE, P.G. Intracellular killing of bacteria. N Engl J Med, 280:502-3, 1969.
62. QUIE, P.G.; WHITE, J.G.; HOLMES, B.; GOOD, R.A. In vitro bactericidal capacity of human polymorphonuclear leukocytes: Diminished activity in chronic granulomatous disease of childhood. J Clin Invest, 46:668-79, 1967.
63. RUUTU, T. Effect of antiarrhythmic and diuretic agents on phagocytosis and bacterial killing by human neutrophilic leukocytes. Ann Med Exp Biol Fenn, 50:49-55, 1972.
64. SBARRA, A.J. & KARNOVSKY, M.L. The biochemical basis of phagocytosis. J Biol Chem, 234:1335-62, 1959.

65. SCOTT, R.E. & HORN, R.G. Ultrastructural aspects of neutrophil granulocytes development in humans. Lab Invest, 23:202-15, 1970.
66. SELVARAJ, R.J. & BHAT, K.S. Metabolic and bactericidal activities of leukocytes in protein-calorie malnutrition. Am J Clin Nutr, 25:166-74, 1972.
67. SETH, V. & CHANDRA, R.K. Opsonic activity, phagocytosis and bactericidal capacity of polymorphs in undernutrition. Arch Dis Child, 47:282-4, 1972.
68. SHAYEGANI, M.G.; KAPRAL, F.A.; MUDD, S. Phagocytosis and intracellular killing of staphylococcus aureus by human and rabbit blood leukocytes. J Immunol, 93:88-93, 1964.
69. SILVERMAN, W.A. & HOMAN, W.E. Sepsis of obscure origin in the newborn. Pediatrics, 3:157-76, 1949.
70. SMITH, R.T.; PLATOU, E.S.; GOOD, R.A. Septicemia of the newborn: current status of problem. Pediatrics, 17:549-75, 1956.
71. SNEDECOR, G.W. Sampling from a normally distributed population. In: ----. Statistical methods. Zowa, Zowa State University, 1962. Cap. 2, p. 35-65.
72. SNEDECOR, G.W. Two or more random samples of measurement data. Analysis of variave. In: ----. Statistical methods. Zowa, Zowa State University, 1962. Cap. 10, 237-90.

73. SNEDECOR, G.W. Two-way experiments. Analysis of variave. In: ----. Statistical methods. Zowa, Zowa State University, 1962. Cap. 11, p. 291-328.
74. SOLBERG, C.O. Enhanced susceptibility to infection. Acta Pathol Microbiol Scand, 80B:10-8, 1972.
75. SOLBERG, C.O. Protection of phagocytized bacteria against antibiotics. Acta Med Scand, 191:383-7, 1972.
76. SOLBERG, C.O. & HELLUM, K.B. Influence of serum on the bactericidal activity of neutrophil granulocytes. Acta Pathol Microbiol Scand, 81B:621-6, 1973.
77. SOLBERG, C.O. & HELLUM, K.B. Neutrophil granuloocyte function in bacterial infections. Lancet, 2:727-29, 1972.
78. STOSSEL, T.P. Phagocytosis (first of three parts). N Engl J Med, 290:717-23, 1974.
79. TAN, J.S.; WATANAKUNAKORN, C.; PHAIR, J.P. A modified assay of neutrophil function: Use of lysostaphin to differentiate defective phagocytosis from impaired intracellular killing. J Lab Clin Med, 78:316-22, 1971.
80. TUNNCLIFF, R. Observations on the anti-infections power of the blood of infants. J Infect Dis, 7:698-707, 1910.

81. VAUGHN, R.B. The comparative in vitro phagocytic activity of rabbit polymorphonuclear leucocytes and macrophages. Br J Exp Pathol, 46:82-5, 1965.
82. WARNER, H.R. & ATHENS, J.W. An analyses of granulocyte kinetics in blood and bone marrow. Ann NY Acad Sci, 113:523-36, 1964.
83. WINTROBE, M.M.; LEE, G.R.; BOGSS, D.R.; BITHELL, T.C.; ATHENS, J. Granulocytes and monocytes. In: Clinical hematology. 7.ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1974. Cap.6, p.221-85.
84. WRIGHT Jr., W.C.; ANK, B.J.; HERBERT, J.; STIEHM, E. R. Decreased bactericidal activity for leukocytes of stressed newborn infants. Pediatrics, 56:579-84, 1975.
85. YEUNG, C.Y. & HOBBS, J.R. Serum-gama-G-globulin levels in normal, premature, and "small-for-dates" newborn babies. Lancet, 1:1167-70, 1968.
86. YOSHIDA, T.; METCOFF, J.; FRENK, S. Reduced pyruvic kinase activity, altered growth patterns of ATP in leukocytes, and protein-calorie malnutrition. Am J Clin Nutr, 21:162-6, 1968.
87. YOSHIDA, T.; METCOFF, J.; FRENK, S.; DE LA PENA, C. Intermediary metabolites and adenine nucleotides in leukocytes of children with protein-calorie malnutrition. Nature, 214:525-6, 1967.

88. YOSHIDA, T.; METCOFF, J.; MORALES, M.; ROSADO, A.; SOSA, A.; YOSHIDA, P.; URRUSTI, J.; FRENK, S.; VELASCO, L. Human fetal growth retardation. II. Energy metabolism in leukocytes. Pediatrics, 50: 559-67, 1972.
89. XANTHOU, M.; VALASSI-ADAM, E.; KINTZONIDOU, E.; MATSANIOTIS, N. Phagocytosis and killing ability of *Candida albicans* by blood leucocytes of healthy term and preterm babies. Arch Dis Child, 50:72-5, 1975.
90. ZEYA, H.I. & SPITZNAGEL, J.K. Cationic protein bearing granules of polymorphonuclear leukocytes: separation from enzyme rich granules. Science, 163: 1069-71, 1969.

TABELA I - Número de colônias de *Staphylococcus aureus*, em função dos diferentes tempos de incubação no soro de recém-nascidos de termo de peso adequado e baixo peso para a idade gestacional

REPE- TIÇÕES	PESO ADEQUADO					BAIXO PESO					TOTAL
	0'	30'	60'	90'	120'	0'	30'	60'	90'	120'	
01	3.453	1.820	1.625	828	390	1.105	812	747	471	121	11.372
02	1.503	897	292	226	158	1.625	1.235	325	292	162	6.715
03	1.657	975	818	422	195	1.625	1.218	1.121	650	178	8.859
04	2.600	1.657	1.259	536	253	1.950	1.300	780	585	195	11.115
05	2.437	1.657	747	520	243	1.625	1.137	650	357	178	9.551
06	2.437	1.300	682	414	243	1.950	1.137	1.072	568	243	10.046
07	1.300	503	421	414	134	1.462	975	812	406	178	6.605
08	3.331	1.681	668	532	328	2.185	946	650	333	243	10.897
09	1.454	975	747	717	136	1.202	893	455	243	139	6.961
10	1.982	1.137	731	422	195	1.811	1.137	796	593	223	9.027
11	2.925	1.555	877	292	260	2.185	946	755	357	227	10.379
12	2.925	1.998	1.300	438	292	2.088	1.023	812	682	223	11.781
13	1.584	1.015	650	213	162	1.706	1.137	731	568	195	7.961
14	1.462	975	341	292	139	2.762	1.503	812	487	292	9.065
15	1.137	682	268	130	108	2.876	1.503	950	487	292	8.433
16	1.555	1.044	660	162	146	3.250	1.820	1.300	828	390	11.155
17	1.300	552	373	343	148	2.275	975	650	520	223	7.359
18	1.430	845	585	406	158	2.112	1.332	1.068	893	230	9.059
19	1.495	812	568	373	178	1.300	650	325	260	130	6.091
20	1.625	958	341	211	178	1.625	1.124	650	333	162	7.207
21	1.205	568	455	280	134	1.543	812	568	325	162	6.052
TOTAL	40.797	23.606	14.408	8.171	4.178	40.262	23.615	16.029	10.238	4.386	185.690
TOTAL P. ADEQUADO: 91.160						TOTAL B. PESO: 94.530					185.690
TOTAL PA + BP	0' = 81.059		30' = 47.221		60' = 30.437		90' = 18.409		120' = 8.564		185.690

TABELA II - Número de colônias de *Staphylococcus aureus*, em função dos diferentes tempos de incubação no soro de recém-nascidos de pré-termo de peso adequado e baixo peso para a idade gestacional

REPE- TIÇÕES	PESO ADEQUADO					BAIXO PESO					TOTAL
	0'	30'	60'	90'	120'	0'	30'	60'	90'	120'	
01	2.437	1.950	1.543	1.218	1.056	2.925	2.275	1.470	1.462	1.300	17.636
02	2.437	2.193	1.462	1.641	1.007	2.437	1.950	1.482	1.300	1.137	17.046
03	2.437	1.950	1.482	1.300	1.137	2.437	1.960	1.371	1.147	1.019	16.240
04	1.405	1.001	897	715	650	2.713	2.275	1.950	1.828	1.137	14.571
05	1.625	1.243	1.046	759	715	3.250	2.762	2.275	1.787	1.381	16.843
06	3.250	2.762	1.950	1.592	1.381	2.437	2.112	1.950	1.056	1.137	19.627
07	3.250	2.925	2.437	1.950	1.462	2.437	1.950	1.706	1.462	1.007	20.586
08	2.762	2.600	1.950	1.787	1.153	2.275	2.112	1.625	1.462	975	18.701
09	2.941	2.567	1.803	1.625	1.218	2.307	2.193	1.950	1.641	1.007	19.252
10	2.535	2.112	1.787	1.625	1.137	2.843	2.421	2.080	1.657	1.300	19.497
11	3.201	2.908	2.437	2.031	1.381	2.892	2.583	2.242	1.787	1.235	22.697
12	2.275	1.950	1.543	1.218	975	2.275	1.868	1.438	1.235	1.056	15.833
13	3.250	2.762	2.437	1.950	1.300	2.925	2.275	1.430	1.397	1.300	21.026
14	2.437	2.145	1.803	1.462	1.056	2.795	2.502	2.242	1.625	1.300	19.367
15	2.925	2.681	2.275	1.787	1.218	1.681	1.356	1.031	660	812	16.426
16	2.681	2.502	1.950	1.625	1.137	3.250	2.892	2.405	1.161	1.462	22.065
17	1.868	1.438	1.046	975	812	2.400	2.080	1.706	1.600	1.046	14.971
18	2.437	2.283	1.746	1.371	1.056	2.925	2.275	1.625	1.462	1.300	18.480
19	1.625	1.218	1.121	893	731	3.250	2.925	2.437	1.950	1.462	17.612
20	2.437	2.112	1.787	1.300	1.137	2.400	1.920	1.360	1.200	1.028	16.681
21	2.437	2.275	1.625	1.482	1.072	2.762	2.437	1.998	1.787	1.153	19.028
TOTAL	52.652	45.577	36.127	30.306	22.791	55.616	47.123	37.773	31.666	24.554	384.185
RNPT	TOTAL ADEQUADO: 187.453					TOTAL BAIXO PESO: 196.732					384.185
TOTAL PA + BP	0' = 108.268	30' = 92.700	60' = 73.900	90' = 61.972	120' = 47.345						384.185

TABELA III - Número de colônias de *Staphylococcus aureus*, em função dos diferentes tempos de incubação nos indivíduos-contrôle

REPE- TIÇÕES	0'	30'	60'	90'	120'	TOTAL
01	1.300	455	325	260	130	2.470
02	1.178	723	304	218	127	2.550
03	2.275	975	650	520	199	4.619
04	1.950	975	589	373	184	4.071
05	1.657	861	390	260	146	3.314
06	1.657	845	341	260	146	3.249
07	1.251	682	406	325	127	2.791
08	1.807	975	477	264	180	3.703
09	1.178	589	295	243	123	2.428
10	1.300	731	406	206	139	2.782
11	1.462	650	503	357	148	3.120
12	1.950	1.121	812	487	195	4.565
13	1.137	650	438	341	119	2.685
14	1.543	812	568	325	162	3.410
15	2.242	1.137	812	487	195	4.873
16	1.803	1.056	780	373	178	4.190
17	1.759	975	477	255	180	3.646
18	1.170	666	520	357	119	2.832
19	2.015	1.186	861	601	201	4.864
20	2.185	1.007	828	325	199	4.544
21	1.950	1.137	812	487	195	4.581
TOTAL	34.769	18.208	11.594	7.324	3.392	75.287

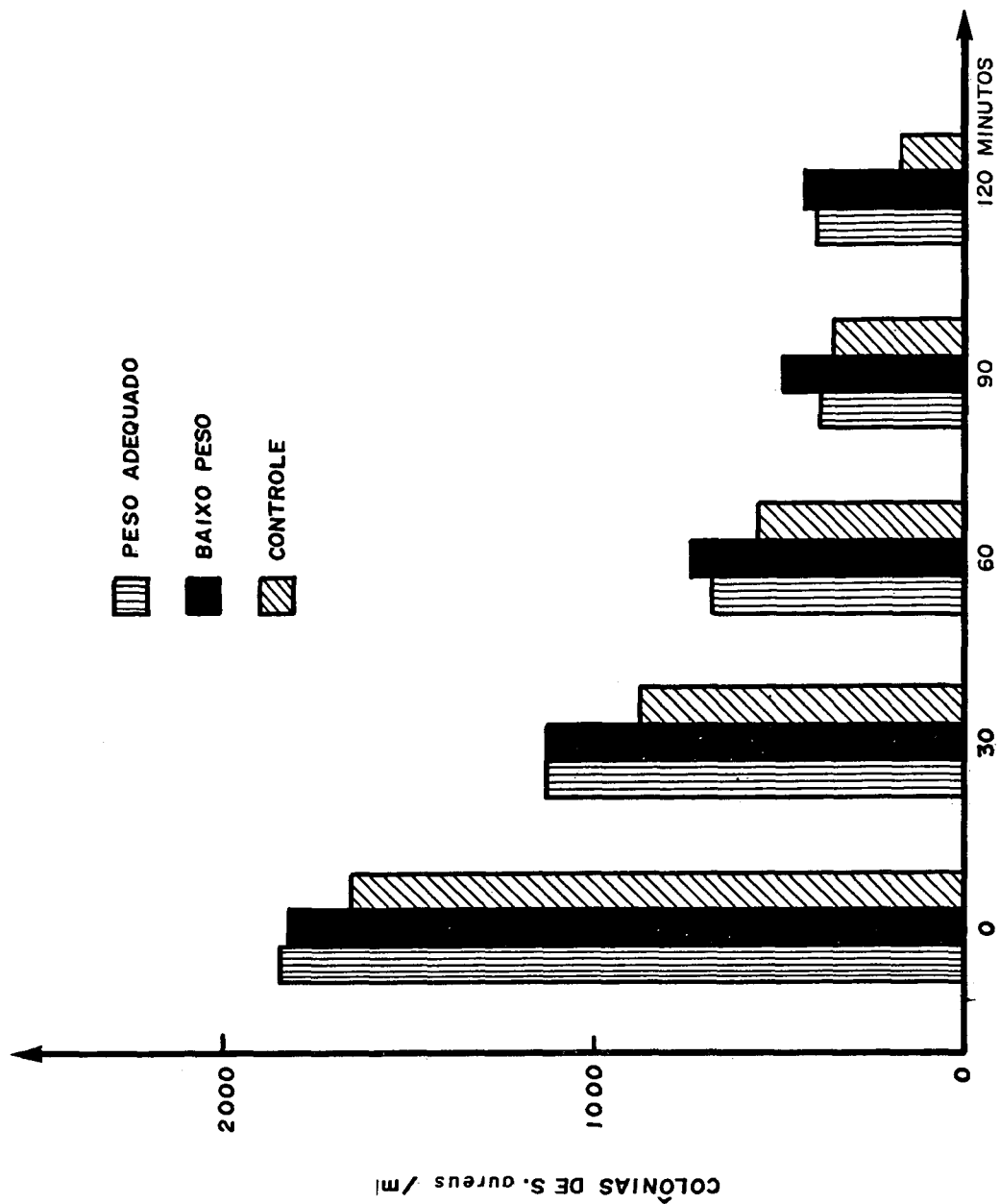


GRÁFICO 2 - MÉDIAS DE COLÔNIAS DE *S.aureus* /ml EM SORO DE RECÉM-NASCIDOS DE TERMO EM FUNÇÃO DO PESO. COMPARAÇÃO COM SEUS CONTROLES.

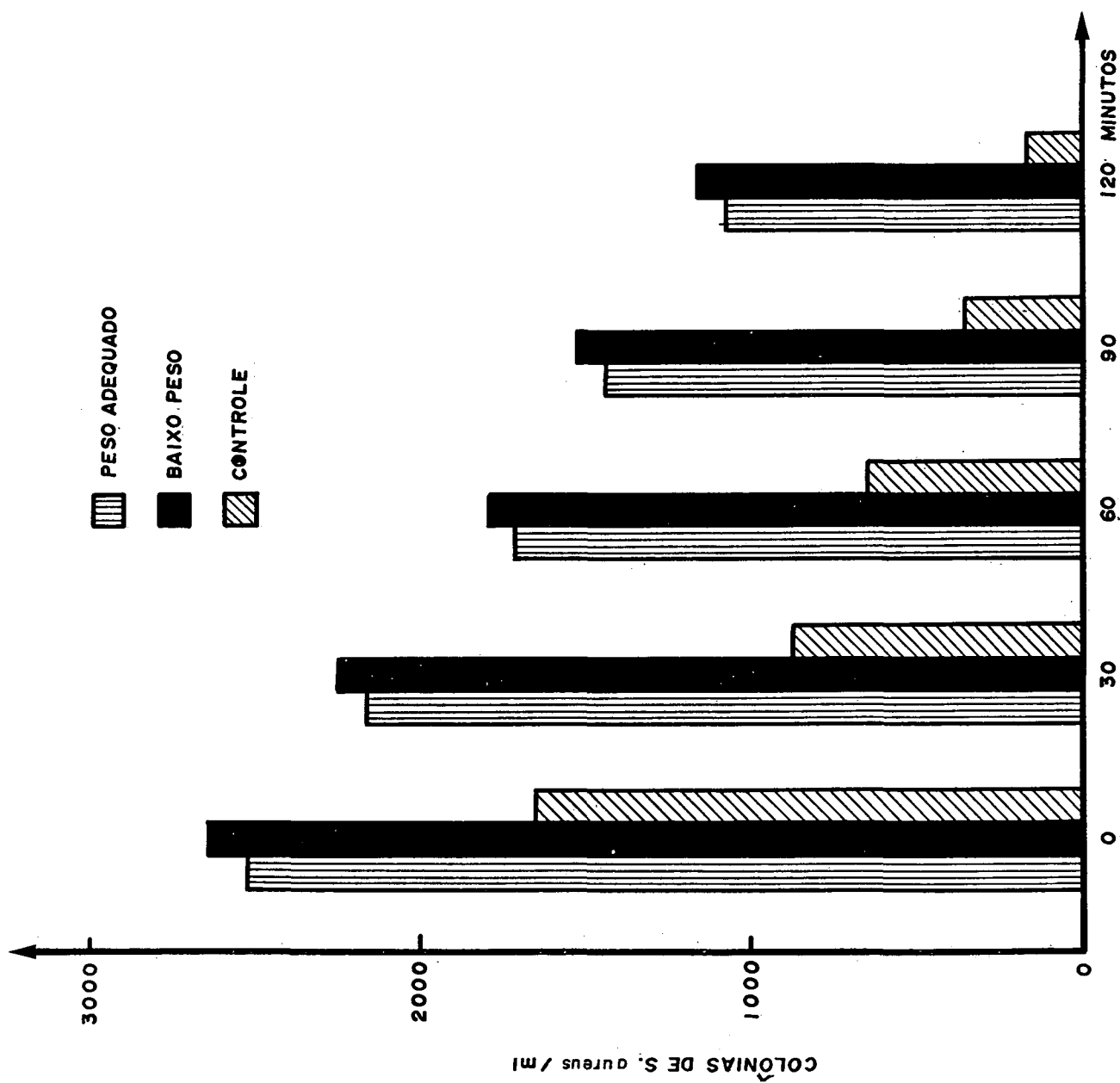


GRÁFICO 3 - MÉDIAS DE COLÔNIAS DE *S. aureus* /ml EM SORO DE RECÉM-NASCIDOS DE PRÉ-TERMO EM FUNÇÃO DO PESO. COMPARAÇÃO COM SEUS CONTROLES

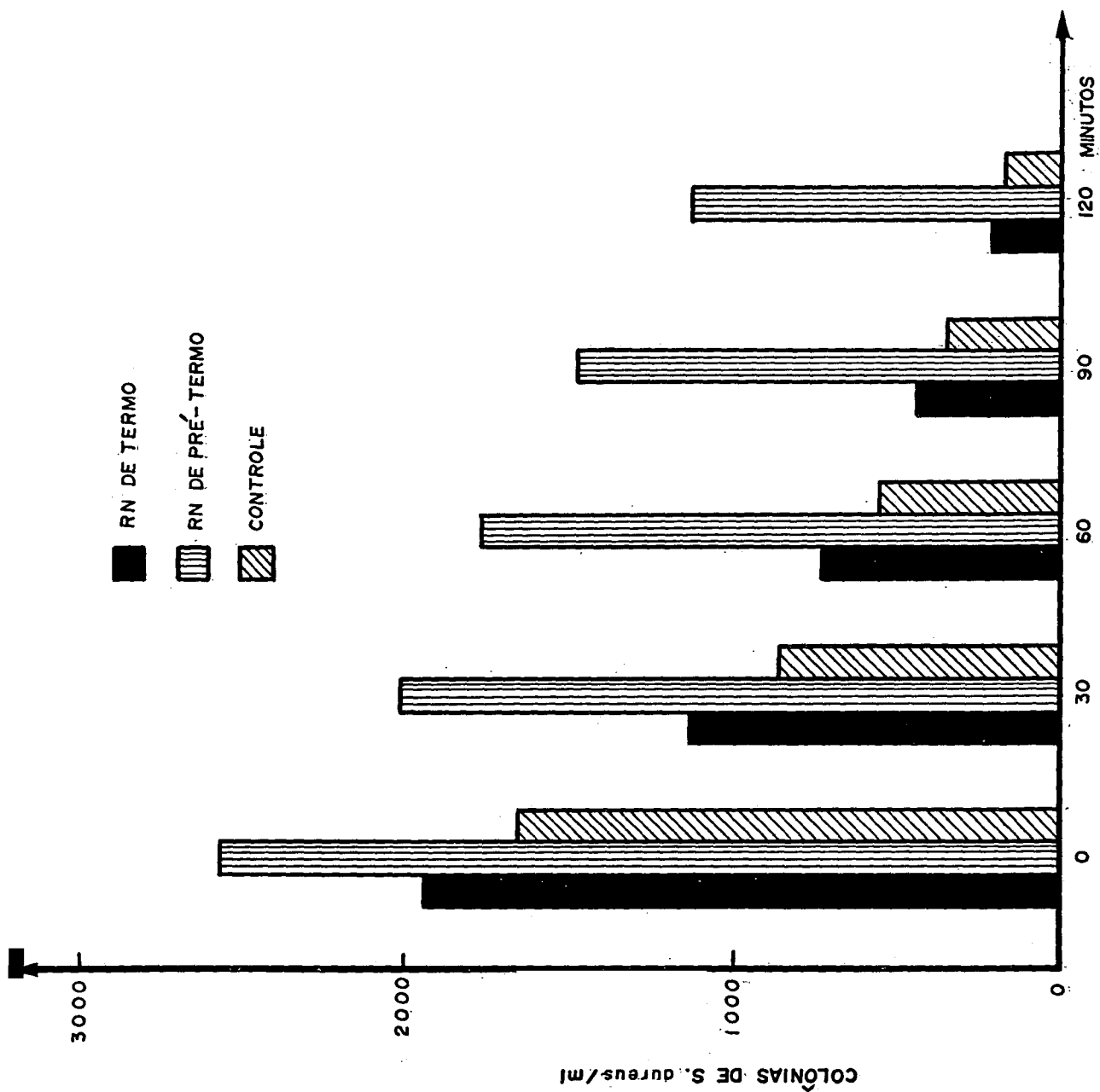


GRÁFICO 4 - MÉDIAS DE COLÔNIAS DE *S. aureus* /ml EM SORO DE RECÉM - NASCIDOS DE TERMO, PRÉ-TERMO E CONTROLES.