

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet
Opća bolnica "Dr. Josip Benčević" Slavonski Brod



SEKUNDARNA PREVENCIJA U PEDIJATRIJI

8. POSLIJEDIPLOMSKI TEČAJ STALNOG MEDICINSKOG
USAVRŠAVANJA I. KATEGORIJE

ZBORNIK RADOVA

Sveučilišni udžbenik

Slavonski Brod, 2011.

UDŽBENICI SVEUČILIŠTA JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MANUALIA UNIVERSITATIS STUDIORUM IOSEPHI GEORGII STROSSMAYER
OESSEKIENSIS

Nakladnici

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet
Opća bolnica "Dr. Josip Benčević" Slavonski Brod

Recenzenti

prof. dr. sc. Milivoj Boranić
prof. dr. sc. Ivan Malčić

Urednici

prof. dr. sc. Neda Aberle
dr. Milan Bitunjac

Za nakladnike

prof. dr. sc. Aleksandar Včev
dr. Milan Bitunjac

Lektor i korektor

prof. Gabrijela Blekić

ISBN 978-953-7736-05-7

ISBN

Odlukom Senata Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku,
klasa: 612-10/12-01/8 i zr. broj: 2158-60-01-12-4 od 5. ožujka 2012. godine
daje se suglasnost za izdavanje ovog zbornika radova (pod br. 02/12)

CIP- katalogizacija u publikaciji

UDK

SEKUNDARNA prevencija u pedijatriji : zbornik radova / ur. Neda Aberle i Milan
Bitunjac.- Slavonski Brod ; Osijek : Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku : Opća
bolnica "Dr. Josip Benčević", 2011.- 165 str. ; 17x24 cm

⁹⁹Sva prava pridržana. Niti jedan dio ovog udžbenika ne smije se preslikavati niti umnožavati
na bilo koji način, bez pismenog dopuštenja nakladnika, te svih autora.

Biomarkeri infekcije novorođenčeta

Biomarkers in neonatal infection

Silvija Pušeljčić, Vesna Milas

Klinika za pedijatriju, Kliničkog bolničkog centra i Medicinskog fakulteta u Osijeku,
J. Huttlara 4, 31000 Osijek

Sažetak

Infekcija u organizmu novorođenčeta rezultira promjenama u pojedinim hematološkim i biokemijskim pokazateljima. Još uvijek su klinički, hematološki i biokemijski parametri u toj ranoj životnoj dobi neujednačeni te ostaje otvoreno pitanje kada i kome uvesti pravilnu antimikrobnu terapiju. Idealan test za ranu dijagnozu infekcije kod novorođenčeta bio bi onaj koji ima 100%-tnu osjetljivost (svi pacijenti s infekcijom se uvijek otkrivaju pomoću testa) i 100%-znu specifičnost (svi pacijenti bez infekcije imaju uvijek negativan rezultat testa). Međutim, takav idealan test još uvijek ne postoji i malo je vjerojatno da će u budućnosti biti otkriven, ponajprije radi niza čimbenika u majke i novorođenčeta. Jedan pristup odnosi se na definiranje graničnih ("cut-off") vrijednosti pojedinih parametara infekcije, odnosno definiranje točke na kojoj većina stanja koja su označena kao infekcija to doista i jesu, a ona koja su označena kao neinfektivna doista i nemaju infekciju. Biomarker je mjerljiv dio gena, proteina, metabolita ili nekog drugog pokazatelja koji korelira s određenim ishodom ili kliničkim stanjem, a do danas je pri dijagnosticiranju infekcije u novorođenčeta testiran već veliki broj biomarkera. Najčešće upotrebljeni marker u tu svrhu je izrada kompletne krvne slike i C-reaktivni protein. U području istraživanja infekcija i sepse testirano je ukupno 178 različitih biomarkera, od toga ukupno 58 markera u kliničkim studijama što nije karakteristično ni za jedno drugo patološko stanje. Ovako velik potencijalni broj biomarkera za infekciju vjerojatno je u vezi s vrlo složenom patofiziologijom svake infekcije, koja uključuje brojne medijatore upale, ali i druge patofiziološke mehanizme i činitelje. Sustav koagulacije, komplementa, aktivacije upale i apoptoze uključeni su u proces razvoja stanja od kolonizacije do sepse, pri čemu je zahvaćen velik broj tipova stanica, tkiva i organa. Stoga je i velik broj potencijalnih biomarkera za identifikaciju infekcije u novorođenčadi.

Ključne riječi: novorođenče, infekcija, biomarker

Summary

The response to infection in newborns leads to changes in certain hematological and biochemical parameters. There are clinical, hematological and biochemical parameters at this early age, but they are not uniform and the question remains as to when and to whom to administer antimicrobial therapy correctly. An ideal test for early diagnosis of infection in newborns would be one that has 100% sensitivity (all patients with infection would be detected by the test) and 100% specificity (all patients without infection would always have a negative

result). However, such an ideal test does not exist yet and is unlikely to be discovered in the near future, primarily because of many factors in mothers and newborns, and the act of childbirth itself affecting the values of measured parameters. One approach is to define the "cut-off" values of certain parameters of infection, and define the point at which a majority of newborns identified as having infections really do have it, and those declared free of infection, do not have it. The biomarker is a measurable part of genes, proteins, metabolites or other indicators that correlates with specific outcomes or clinical conditions, and to date a large number of biomarkers for the recognition of infection in newborns have been tested. The most commonly used marker for this purpose is the complete blood count and C-reactive protein. As in any other pathological condition, a total of 178 different biomarkers were tested in the study of infections and sepsis, of which a total of 58 were markers tested in clinical studies. The large number of potential biomarkers of infection is probably related to the highly complex pathophysiology of infection, which involves numerous mediators of inflammation and other complex pathophysiological mechanisms. The systems of coagulation, complement, activation of inflammation and apoptosis, are all involved in the development of the infection - from colonization to sepsis, so that a large number of cell types, tissues and organs are affected. Consequently a large number of potential markers may be used for its identification.

Key words: newborn, infection, biomarkers

Uvod

Prema većini studija incidencija rane novorođenačke sepse zapravo nije visoka i iznosi od 1 do 8 na 1000 živorođene djece, ali je znatno viša u rizičnim skupinama. Općenito se može reći da se povećava proporcionalno sa smanjenjem gestacije, pa je u nezrelije nedonoščadi i nekoliko desetaka puta viša (1, 2, 3). Prosječna incidencija u razvijenim zemljama kreće se od 3,5 do 4,3 na 1000 živorođene djece, dok je u zemljama u razvoju i tri puta veća (4).

Ponekad vrlo brz razvoj kliničke slike sepse s progresivnim pogoršanjem općeg stanja i razvojem septičkog šoka pobuđuje u svakog kliničara stanje neizvjesnosti, bez obzira na dužinu kliničkog iskustva. Prema većini istraživanja, unatoč pravovremenoj dijagnozi, optimalnom liječenju i primjeni novih generacija antibiotika stopa mortaliteta od sepse u novorođenačkoj dobi još je uvijek visoka i kreće se od 20 do 40% (2, 3), dok neki navode i veću stopu smrtnosti, od 30 do čak 69% (5).

Nekoliko činitelja povećava rizik od ozbiljne infekcije u novorođenačadi rođene u terminu. To što su infekcije poročajnog kanala majke, prijevremeno prsnuće plodovih ovoja, uroinfekcije roditelja, febrilitet majke u porodu. Neki pedijatri u ovim okolnostima, ako je prisutan neki od opstetričkih rizičnih čimbenika, pa čak i ako je dijete klinički dobro, odlučit će se na rutinsku primjenu antibiotika kod novorođenčeta (6). Visoka smrtnost od novorođenačke sepse, opstetrički čimbenici rizika, nedefiniranost laboratorijskih parametara i suptilnost kliničke slike ostavljaju prostor svakom kliničaru da temeljem iskustva ocijeni ima li dijete infekciju ili ne te se odluči za primjenu antimikrobne terapije. Ona će nerijetko biti uvedena radi straha od previđanja sepse s brzim kliničkim tijekom kod novorođenčeta (7). Ovdje se sada otvara novo veliko poglavlje u neonatalnoj medicini, a to je pojam novorođenačke infekcije i što je ona uistinu. U užem smislu riječi osim sepse, ovdje pripadaju i infekcije urotrakta, kožne infekcije, infekcije pupčane rane te ono što ostaje kao "nespecificirana infekcija novorođenačke dobi", a prema MKB klasifikaciji označena je šifrom P 39.9.

Pretraživanjem medicinskih publikacija gotovo nigdje ne možemo naći kolika je incidencija infekcija kod novorođenčeta jer taj podatak postoji samo za sepsu. Postoje podaci

koji navode da od 30 novorođenčadi koja su liječena empirijskom antimikrobnom terapijom tek jedno uistinu i ima infekciju, dok su ostala najvjerojatnije liječena nepotrebno (8). Istraživanje Lina i suradnika navodi da je učestalost urinarne infekcije među febrilnom djecom u dobi do 8 tjedana 13,6% (9). Međutim, velika studija na 1200 novorođenčadi provedena na Klinici za pedijatriju KBC-a Osijek obuhvatila je isključivo novorođenčad u prvih 7 dana života te je nađena incidencija od 4,5% infekcija mokraćnog sustava u ranoj novorodenačkoj dobi (10). Ako incidenciji sepse od 1% dodamo 4,5% novorođenčadi s uroinfekcijom, te oko 3% novorođenčadi s kožnim infekcijama i infekcijama pupčane rane (11), odnosno nespecificiranim infekcijama, incidencija infekcija u novorodenačkoj dobi mogla bi se kretati približno od 8 do 9%. Prema podacima Yoon i suradnika incidencija neonatalne infekcije kod novorođenčadi u dobi od 4 do 28 dana bila je 10,5% (2). Organizam novorođenčeta odgovara na infekciju promjenama u pojedinim hematološkim i biokemijskim pokazateljima, koji su još uvijek za tu ranu životnu dob neujednačeni te ostaje otvoreno pitanje kada i kome uvesti pravilnu antimikrobnu terapiju (13).

Klinička prezentacija neonatalne infekcije je suptilna i nespecifična, a uključuje znakove kao što su pojava žutice, nestabilna tjelesna temperatura, promjene disanja i srčane frekvencije, te poteškoće uzimanja i probave hrane. Dijagnostički problem je heterogenost kliničke slike i nedostatak pouzdanih i brzih dijagnostičkih testova (14, 15). Idealan test za ranu dijagnozu infekcije novorođenčeta bio bi onaj koji je 100% osjetljiv (svi pacijenti s infekcijom se uvijek otkrivaju s pomoću testa) i 100% specifičan (svi pacijenti bez infekcije imaju uvijek negativan rezultat testa). Međutim, takav idealan test još ne postoji i malo je vjerojatno da će u budućnosti biti otkriven, ponajprije radi niza čimbenika u majke i novorođenčeta, te samog poroda koji utječe na vrijednosti mjerenih parametara. Jedan pristup odnosi se na definiranje graničnih ("cut-off") vrijednosti pojedinih parametara infekcije, odnosno definiranje točke na kojoj većina stanja koja su označena kao infekcija to doista i jest, a ona koja su označena kao neinfektivna doista nemaju infekciju (16).

U području istraživanja infekcija i sepse testirano je ukupno 178 različitih biomarkera, od toga ukupno 58 markera u kliničkim studijama što nije karakteristično ni za jedno drugo patološko stanje. Ovako veliki potencijalni broj biomarkera za infekciju vjerojatno je u vezi s vrlo složenom patofiziologijom svake infekcije, koja uključuje brojne medijatore upale, ali i druge složene patofiziološke mehanizme. Sustav koagulacije, komplementa, aktivacije upale i apoptoze uključeni su u proces razvoja stanja infekcije - od kolonizacije do sepse, pri čemu je zahvaćen veliki broj tipova stanica, tkiva i organa. Stoga je i velik broj potencijalnih biomarkera za identifikaciju infekcije (17).

Većina autora se slaže da je u novorodenačkoj dobi potrebna kombinacija više biomarkera za dijagnozu infekcije jer se time postiže bolja dijagnostička specifičnost i osjetljivost u odnosu na uporabu samo jednog pokazatelja (1, 13, 15, 18). Biomarker je mjerljiv dio gena, proteina, metabolita ili nekog drugog pokazatelja koji korelira s određenim ishodom ili kliničkim stanjem. Najčešće upotrebljeni marker u tu svrhu je izrada kompletne krvne slike s posebnim osvrtnom na broj neutrofila, te omjer njihovih zrelih i nezrelih formi (19).

Reaktanti akutne faze upale, kao što su C-reaktivni protein, prokalcitonin i fibrinogen, dostupni su za svakodnevnu kliničku praksu, a α -1 antitripsin i protein koji veže lipopolisahridne upotrebljavaju se rutinski (20). Brojni citokini kao što su interleukin 6 (IL-6), interleukin 8 (IL-8), interleukin 18 (IL-18) (21, 7), čimbenik tumorske nekroze α (tumor necrosis factor, TNF α) (21, 16), površinski markeri CD11b, CD64, CD40, E-selektin (22, 23), topljive intercelularne adhezijske molekule-1 (ICAM-1) te L-selektin i P-selektin (18, 24) pokazali su povezanost s infekcijom u novorođenčadi.

Dio markera infekcije novorođenčeta testiranih u kliničkim uvjetima prikazan je u

tablici 1.

<i>Skupina: Groups</i>	<i>Naziv markera, Marker name</i>
<i>Reaktanti akutne faze</i> <i>Acute phase reactants</i>	Serumski amiloid A (SAA); Serum amyloid A C-reaktivni protein (CRP); C-reactive protein Prokalcitonin (PCT); Procalcitonin Feritin; Ferritin Pentraksin 3; Pentraxin 3 Lipopolisaharid vežući protein (LBP); Lipopolysaccharide binding protein
<i>Citokini</i> <i>Cytokines</i>	IL-1; IL-1 antagonist IL-1 receptora; IL-1 receptor antagonist IL-6; IL-6 IL-8; IL-8 IL-10; IL-10 IL-18; IL-18 TNF- α ; TNF- α
<i>Površinski stanični biljezi</i> <i>Cell surface markers</i>	Monocitni CD11b; Monocyte CD11b Monocitni CD40; Monocyte CD40 Monocitni CD63; Monocyte CD63 Monocitni CD64; Monocyte CD64 sCD25 (IL-2R); sCD25 (IL-2R)
<i>Topljivi (solubilni) receptori</i> <i>Soluble receptors</i>	sE-selektin; sE-selectine sELAM-1; sELAM-1 sCD14; sCD14 sICAM-1; sICAM-1 Antitrombin III; Antithrombin III
<i>Čimbenici koagulacije</i> <i>Coagulation factors</i>	von Willebrand faktor ; von Willebrandt factor Protein C; Protein C Fibrinopeptid A ; Fibrinopeptide A D-dimeri; D-dimers Trombomodulin; Thrombomodulin

ELAM -*endothelial leukocyte adhesion molecule* (endotelne leukocitne adhezijske molekule);
IL: *interleukin*; s: *soluble* (topljivi); TNF *tumor necrosis factor* (čimbenik tumorske nekroze);
ICAM - *intercellular adhesion molecule* (topljive međustanične adhezijske molekule)

Tablica 1. Potencijalni biomarkeri za dijagnozu infekcije u novorođenčeta
Table 1. Potential biomarkers for diagnosis of infection in the newborn

Hematološki bodovni sustav za procjenu infekcije novorođenčeta

Ukupan broj leukocita i diferencijalna krvna slika i danas su lako dostupni u svim ustanovama i pored skupih dijagnostičkih testova prilično su ekonomični. Kontradiktorni su izvještaji o njihovoj prediktivnoj vrijednosti u dijagnozi rane neonatalne infekcije. Diferencijalna krvna slika daje mogućnost diferenciranja pojedinih vrsta leukocita, a odgovor

neutrofila na infekciju i promjene koje posljedično nastaju u perifernoj krvi mogle bi značajno pomoći u dijagnozi RNI [25].

Prije više od 20 godina Rodwell i suradnici pokušali su bodovati parametre iz kompletne krvne slike te predvidjeti rizik razvoja infekcije novorođenčeta, pri tome bodujući svaki od ukupno sedam parametara s jednim bodom: ukupni broj leukocita, ukupni broj neutrofila, omjer nezrelih neutrofila prema ukupnom broju neutrofila (I/T), omjer nezrelih neutrofila prema zrelim neutrofilima (I/M), broj nezrelih neutrofila, ukupan broj trombocita te pojavu degenerativnih promjena u polimorfonuklearima (vidi tablicu 2). Kao graničnu vrijednost za

Parametri; Parameters	Vrijednosti; Value	Bodovi; Points
Ukupan broj leukocita Total white blood cell (WBC) count	$\leq 5 \times 10^9/L$ $\geq 25 \times 10^9/L$ kod poroda; at birth $\geq 30 \times 10^9/L$ 12-24h: 12-24 hours $\geq 21 \times 10^9/L$ od drugog dana života; from the second day of life	1
Ukupan broj neutrofila (seg+neseg+eo+bazo) Total neutrophil counts	$\leq 7,800 \times 10^9/L$ $\geq 14,500 \times 10^9/L$	1
Broj nezrelih neutrofila (neseg) Polymorphonuclears cell count	Porast; Increase	1
Omjer nezrelih neutrofila prema ukupnom broju neutrofila (I/T) Immature to total neutrophil ratio (I/T)	$\geq 0,25$	1
Omjer nezrelih neutrofila prema zrelim neutrofilima (I/M) Immature to mature neutrophil ratio (I/M)	$\geq 0,25$	1
Ukupan broj trombocita Platelet count	$\leq 150 \times 10^9/L$	1
Degenerativne promjene u polimorfonuklearima Degenerative changes in polymorphonuclears cell (PMN)	Toksične granule; Toxic granules Vakuole; Vacuoles Döhleova tjelešca; Döhle bodies	1

Tablica 2. Modificirani hematološki bodovni sustav prema Rodwellu
Table 2. Modified Rodwell hematological scoring system

infekciju uzeli su 3 ili više bodova (26).

Ukupan broj neutrofila dostiže maksimum od 12. do 24. sata nakon rođenja, i prema istraživanju Manroe i suradnika granice 95% pouzdanosti su za to razdoblje između $7,8 \times 10^9/L$ i $14,5 \times 10^9/L$ (27). Escobar i suradnici su kod inficirane novorođenčadi našli prosječnu vrijednost ukupnog broja neutrofila $6,3 \times 10^9/L$, dok je kod neinficirane novorođenčadi prosječna vrijednost neutrofila iznosila $9,6 \times 10^9/L$. Ističu da povišene vrijednosti ukupnog broja neutrofila nisu udružene s infekcijom u novorođenčadi (28) jer različita klinička stanja majke mogu utjecati na ukupan broj neutrofila u novorođenčeta (29). Uz promjene ukupnog broja neutrofila za infekciju je karakterističan «pomak ulijevo», jer povećan broj nesegmentiranih neutrofila i mladih formi neutrofila izlazi iz koštane srži u cirkulaciju, te posljedično raste odnos između nezrelih i zrelih formi neutrofila. Prema nekim autorima vrijednost ukupnog broja leukocita ima dijagnostičku točnost od 88% za prisutnost rane neonatalne infekcije, dok

vrijednost ukupnog broja nezrelih neutrofila veća od $1,1 \times 10^9/L$ predviđa ranu neonatalnu infekciju uz točnost od 65%. Visoku prediktivnu vrijednost (82%) u dijagnozi rane neonatalne infekcije ima i vrijednost ukupnog broja neutrofila veća od 17,6 dok granične vrijednosti odnosa nezrelih neutrofila i ukupnog broja neutrofila (immature:total polymorphonuclear) I:T (66%) i odnosa nezrelih neutrofila i zrelih neutrofila (immature:mature polymorphonuclear) I:M (67 %) u sličnom postotku potvrđuju ranu neonatalnu infekciju (25).

U novijim studijama analiza hematološkog profila pokazala je da najveću vrijednost ima omjer nezrelih neutrofila prema ukupnom broju neutrofila (I/T), potom slijedi omjer nezrelih neutrofila prema zrelih neutrofilima (I/M), a ta dva kriterija uz trombocitopeniju imaju visoku negativnu prediktivnu vrijednost od 94% (30).

C-reaktivni protein (CRP)

C-reaktivni protein (CRP) izvorno su Tillett i Francis otkrili još 1930. godine kao tvar u serumu bolesnika s akutnom upalom koja reagira s C polisaharidom pneumokoka (31). Do danas je poznat u laboratorijskoj dijagnostici kao najviše ispitivan protein plazme koji služi kao upalni marker, zbog čega je važan indikator kod upale, nekroze tkiva ili traume. CRP pripada pentraksinskoj proteinskoj skupini, a proizvode ga jetra i masne stanice (adipociti). Po sastavu je glikoprotein molekularne mase 110 kD, prema obliku prstenasti pentamer, a prema svojstvima je član skupine proteina poznatih kao reaktanti akutne faze upale (32). Gen za CRP nalazi se na prvom kromosomu 1q21-q23 (33). Njegove vrijednosti ubrzano rastu u slučaju akutne upale, pa tako mogu porasti i stotinu puta u roku od samo 24 sata. Povećanje njegove koncentracije u krvi nastaje već šest do devet sati nakon početka infekcije, a maksimum doseže za jedan do tri dana, nakon prethodnog porasta koncentracije interleukina 6 (IL-6) kojeg izlučuju različite stanice imunostava, ponajprije makrofagi (34). Njegovi imunološki učinci su brojni: aktivacija komplementa, supresija ili aktivacija određenih tipova T-limfocita i proizvodnje nekih citokina, mogućnost vezanja bakterijskih polisaharida i fosfolipida iz tkiva oštećenih upalom, traumom ili infekcijom (32).

Koncentracija CRP-a određuje se u uzorku tekućeg dijela krvi (serumu ili plazmi), posljednjih godina najčešće metodom imunoturbidimetrije (35). Određivanje koncentracije CRP-a ima značajno mjesto u dijagnostici i praćenju terapije infekcija u nedonoščadi i novorođenčadi. Višestrukim studijama pokušalo se odrediti vrijednost CRP-a koja upućuje na infekciju kao i optimalno vrijeme uzimanja uzoraka. Mjerenjem koncentracije CRP-a u krvi pupkovine, s graničnom vrijednošću 5 mg/L, utvrđena je niska osjetljivost od 35%, ali značajna specifičnost od 86% i dijagnostička točnost od 72%. Ovako značajna specifičnost testa CRP-a potvrđuje da negativan nalaz CRP-a sa značajnom sigurnošću znači i odsutnost infekcije (36).

Ukoliko se kao granična vrijednost za infekciju uzme vrijednost 6 mg/l tada osjetljivost raste na 95%, a negativna prediktivna vrijednost na 97% (15). Autori koji kao graničnu vrijednost CRP-a za infekciju uzimaju 10 mg/L nalaze osjetljivost od 97%, negativnu prediktivnu vrijednost od 98%, ali bolju specifičnost od 61% (37). U različitim studijama navodi se različit stupanj osjetljivosti, od 43% do 90% i specifičnosti od 60 do 78%, dok za kasnu sepsu specifičnost i pozitivna prediktivna vrijednost dosežu visokih 93 do 99% (16).

CRP kao brza, cijenom prihvatljiva i danas lako dostupna pretraga može poslužiti za prepoznavanje zdrave novorođenčadi i odabir novorođenčadi koja zahtijeva praćenje i tretman prije rezultata mikrobioloških nalaza (38).

Prokalcitonin (PCT)

Prokalcitonin (PCT) je protein sastavljen od 116 aminokiselina većim dijelom nalik na hormon kalcitonin, a stvara se i izlučuje u C-stanicama štitne žlijezde nakon specifične stanične proteolitičke aktivnosti u pro-hormon prokalcitonin (PCT). Kad su posrijedi teže bakterijske infekcije i sepsa, makrofagi i monociti jetre, ali i drugih organa, uključuju se ubrzanom sintezom i otpuštanjem PCT-a kao odgovora na upalu (39, 40).

Koncentracija PCT-a počinje rasti već tri sata nakon kontakta organizma s bakterijskim endotoksinom, a vrhunac uslijedi nakon šest do osam sati od početka kontakta te koncentracija ostaje kontinuirano povišena slijedeća 24 sata (41). Nekoliko studija pokazuje da upotrebom kvantitativne metode mjerenja, porast koncentracije PCT-a može biti pokazatelj za ranu dijagnozu sepse novorođenčeta (40, 42, 43, 44, 45) dok novorođenčad sa virusnom infekcijom, bakterijskom kolonizacijom ili distresom druge etiologije imaju urednu ili tek diskretno povišenu vrijednost PCT-a (13, 46).

Većina studija slaže se da je granična vrijednost PCT-a kod sumnje na infekciju novorođenčeta 2 ng/ml nakon 24 sata života (39, 42), dok neki autori tu graničnu vrijednost spuštaju niže, odnosno patološkim vrijednostima smatraju one iznad 1,5 ng/ml (45). Pri toj vrijednosti osjetljivost se kreće od 65% do 92%, specifičnost od 60% do 87%, pozitivna prediktivna vrijednost od 30% do 80%, a negativna prediktivna vrijednost od 76% do 98% za PCT (47, 48, 49).

Povećana koncentracija serumskog PCT-a u novorođenčadi može biti povezana s drugim činiteljima osim neonatalne infekcije, posebno u prvih 12 - 24 sata života. Posrijedi je vjerojatno fiziološki porast serumске vrijednosti PCT-a (45, 46, 50). Iako PCT može prijeći placentalnu barijeru, porast koncentracije između 24. i 48. sata života ne može se objasniti prijenosom od majke nego vjerojatno endogenom sintezom PCT-a (51). Ta se pojava može vjerojatno pripisati stresu novorođenčeta tijekom poroda ili prilagodbe na izvanmaternične uvjete života, što može stimulirati porast reaktanata akutne faze. Porast serumске koncentracije PCT-a nalazi se i kod djece bez infekcije koja imaju respiratorne smetnje, ponajprije hijalinomembransku bolest, odnosno u novorođenčadi koja je razvila neki oblik sindroma respiratornog distresa (52, 53). Monneret i suradnici pretpostavili su da je hipoksemija stanje koje prethodi razvoju sindroma respiratornog distresa, te smatraju da je moguća i plućna sinteza PCT-a (53).

Citokini kao biomarkeri infekcije novorođenčeta

Riječ citokini izvedena je iz dvije riječi grčkog podrijetla – "cytos", što znači stanica, i "kine", odnosno "kinein", što znači micati se. Ovaj naziv uveden je kako bi se mogla razlikovati skupina imunomodulacijskih molekula od hematopoetskih činitelja staničnog rasta. Citokini se ponašaju kao biološki djelotvorne molekule koje se oslobađaju iz stanica, transportiraju u druge dijelove organizma i djeluju na funkcije drugih stanica dovodeći do brojnih bioloških učinaka. Citokini su polipeptidi ili glikopeptidi molekularne mase od 6 do 70 kDa, a djeluju preko specifičnih receptora u samoj stanici i na staničnoj membrani. Mogu biti pozitivni i negativni regulatori imunosnog odgovora. Oni su glasnici koji pripadaju u vrlo važne činitelje u komunikaciji između ljudskih stanica. Citokini predaju informaciju ciljnoj stanici koja sadrži odgovarajući receptor, pri čemu dolazi do aktivacije gena s posljedičnim promjenama ciljne stanice. Sintezu i otpuštanje citokina mogu zaustaviti inhibitori koji moduliraju biološku aktivnost citokina ili inhibiraju sposobnost odgovora ciljne stanice. Svaka živa stanica s jezgrom u ljudskom organizmu stvara citokine čija vrsta i količina sekrecije ovisi o tipu i stadiju stanične diferencijacije i aktivacije (54).

Stvaranje mnogih citokina pobuđuje se antigenski specifičnom aktivacijom limfocita T4. U skupinu citokina pripada grupa interleukina, tumorskih činitelja rasta i interferona. Izraz interleukin prihvaćen je za grupu medijatora odgovornih za međusobno komuniciranje leukocita, a do danas je poznato 29 vrsta interleukina, koji se označavaju slovima IL i brojevima od 1 do 29. Povećano izlučivanje citokina nije udruženo samo s infekcijama nego i s autoimunim i neurodegenerativnim bolestima (55). Razlikujemo proinflamacijske i antiinflamacijske citokine. Upalni citokini, uključujući činitelja tumorske nekroze (tumor necrosis factor- α , TNF- α), IL-1 β i IL-6, aktiviraju koagulaciju i inhibiraju fibrinolizu što može rezultirati difuznim oštećenjem endotela kapilara, s posljedičnom disfunkcijom brojnih organa i smrtnim ishodom (56).

Interleukin 1 (IL-1) je naziv za dva različita proteina, IL-1 α i IL-1 β , koji prepoznaju isti stanični receptor. Ne izlučuju se iz stanica zdravih individua. IL-1 inducira sintezu TNF- α i IL-6 i aktivira limfocite T što rezultira stvaranjem IL-2. Izlučuju ga makrofazi, fibroblasti, endotelne stanice, keratinociti, astrociti, limfociti B i aktivirani limfociti T, stanice glatkih mišića i stanice mikroglije. Ima važnu imunoregulacijsku funkciju, potiče sintezu IL-2 u limfocitima T i pomaže izražavanje receptora za IL-2 na aktiviranim limfocitima T. Uz druge interleukine aktivira limfocite B da proliferiraju, sazrijevaju i pojačavaju sintezu imunoglobulina (54).

Interleukin 6 (IL-6) je multifunkcionalan citokin koji se sintetizira u mnogim stanicama: makrofazima, T-stanicama, fibroblastima i endotelnim stanicama (57). Mogu ga proizvoditi bakterije i virusi. Najvažnije djelovanje interleukina 6 očituje se na završnoj diferencijaciji B-limfocita i poticanju biosinteze sekrecijskog tipa imunoglobulina (Ig) na razini mRNA (58). Također, interleukin 6 potiče sintezu slijedećih proteina: fibrinogena, alfa-1-antikimotripsina, alfa-1 kiselog glikoproteina, serumskog amiloida A i C-reaktivnog proteina (CRP) (59). IL-6 potiskuje izlučivanje TNF- α i IL-1 aktivirajući stvaranje reaktanata akutne faze iz jetre i stimulira osovinu hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda. Tako pomaže kontroli upalne reakcije. Osnovna uloga interleukina 6 jest regulacija imunosne reakcije u svojstvu proupalnog, ali i protuupalnog citokina (54). Gen za IL-6 smješten je na kromosomu 7 (7p21), gdje zauzima 1125 pb genomske DNA, a sastoji se od pet eksona i četiri introna (60). Komponente bakterija, uključujući endotoksine, jaki su aktivatori mreže citokina. Zadnjih se desetak godina u kliničkim studijama pokušala ocijeniti dijagnostička vrijednost proupalnih citokina kao što su interleukin-1 (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) i činitelj tumorske nekroze (TNF- α), no ona se nije pokazala bitno boljom od puno jednostavnijih i jeftinijih pretraga koje su lakše dostupne (5, 15, 61). Za IL-6 se granične ("cut-off") vrijednosti kreću od 14 pg/ml do 18,2 pg/ml. Pritom je sensitivnost tog testa od 76% do 87%, specifičnost od 50% do 70%, pozitivna prediktivna vrijednost od 70% te negativna prediktivna vrijednost od 63% (49, 62).

Za interleukin-10 (IL-10) pri vrijednosti >17 pg/ml nalazi se osjetljivost 92% i specifičnost 84% (47). Interleukin-8 (IL-8) je kemokin odgovoran za migraciju neutrofila i makrofaga na mjesto upale i obično nije prisutan u visokoj koncentraciji kod zdrave novorođenčadi. Izrazito mu raste koncentracija u stanju sepse kod febrilne djece s neutropenijom (20). Izmjerene su i do 1000 puta više vrijednosti IL-6 i IL-8 u skupini novorođenčadi s B streptokoknom bakterijemijom nego pri drugim neonatalnim infekcijama (15). IL-18 je proinflamacijski citokin koji nije specifičan za neonatalnu sepsu. Nedavne studije su povezale genski polimorfizam za IL-18 s nekrotizirajućim enterokolitisom (63) i infekcijom respiracijskim sincicijskim virusom (64).

Činitelj tumorske nekroze (tumor necrosis factor- α , TNF- α , kahektin) moćan je citokin koji stvaraju makrofazi, monociti, neutrofili, T limfociti, astrociti, glatke mišićne stanice i fibroblasti nakon stimulacije mikroorganizmima ili stranim česticama (65). Član je skupine citokina koji stimuliraju reaktante akutne faze i ključni je medijator u razvoju septičkog šoka

(66). Gen za TNF nalazi se na kromosomu 6p21.3, gdje zauzima 1660 pb genomske DNA (67). Sadrži oko 3 kb i ima 4 eksona, a zadnji ekson kodira više od 80% izlučenog proteina (68). Najbolje je proučena njegova sposobnost izazivanja upalne reakcije, jer osim što stimulira stvaranje ostalih citokina (IL-1, IL-6, IL-8) posreduje u kaskadi citokina koja uzrokuje upalu putem receptora lokaliziranih na makrofazima. Aktivnost mu je proinflamatorna i antitumorska, a uz mnoge učinke opisana je i njegova sposobnost da potakne smrt stanice. Indirektno regulira upalnu reakciju tako što potiče otpuštanje kortikotropina iz hipofize, stimulirajući na taj način koru nadbubrežne žlijezde da otpušta kortizol koji inhibira upalu (54).

Koncentracija TNF- α u armijskoj tekućini od 41 pg/ml navise ima osjetljivost 82% i specifičnost 79% u predviđanju ranog početka neonatalne sepsa kod prijevremenog poroda, čak i pri intaktnim plodovima ovojima (69). Prema nekim autorima TNF- α bi bio najbolji prediktor razvoja teške neonatalne infekcije (70), dok je prema drugima on važan posrednik u patofiziologiji septičkog šoka i sustavnog upalnog odgovora, no njegova korisnost nije bolja od praćenja vrijednosti IL-6 ili IL-8 (71, 72).

Površinski biljezi kao pokazatelji infekcije novorođenčeta

Usavršavanje tehnologije protočne citometrije omogućilo je nove načine otkrivanja površinskih antigena na krvnim stanicama. Ova tehnologija bolja je u odnosu na konvencionalne imunološke metode otkrivanja aktivacijskih markera na staničnoj membrani (73). Površinski biljezi neutrofila CD11b i CD64 identificirani su prije desetak godina kao obećavajući biljezi za dijagnozu rane i kasne infekcije novorođenčeta (74).

CD11b je podjedinica adhezijske molekule integrina b2 koja je u vrlo niskim koncentracijama prisutna na površini neaktiviranih neutrofila. Uočeno je povećanje CD11b dva do četiri puta u novorođenčadi s mikrobiološki potvrđenom sepsom (75). Za dijagnosticiranje rane neonatalne infekcije CD11b pokazuje osjetljivost od 86 do 100% i specifičnost 100% (16). Analizom dvaju površinskih biljega neutrofila (CD11b, CD64) i dvaju površinskih biljega limfocita (CD25, CD45RO) pokazalo se da CD64 ima najveću osjetljivost (97%), specifičnost (90%) i negativnu prediktivnu vrijednost (99%) kao dijagnostički marker za pojavu rane neonatalne infekcije (76). Najnovije studije za CD64 navode graničnu ("cut-off") vrijednost od 2,6% pri kojoj je maksimalna osjetljivost 92% i specifičnost 71%. Smatra se da je za dijagnozu rane neonatalne infekcije nužna kombinacija biomarkera (47).

Imunološke pretrage površinskih antigena izvode se protočnom citometrijom za što je potreban dobro opremljen laboratorij, educirano osoblje te značajna financijska sredstva. Stoga za sada nemaju rutinsku primjenu u svakodnevnoj kliničkoj praksi u svrhu dijagnosticiranja RNI.

Topljive međustanične molekule i ostali potencijalni biomarkeri infekcije novorođenčeta

Topljive međustanične adhezijske molekule-1 (soluble intercellular adhesion molecule -sICAM-1) poznate i kao površinski biljeg CD54 nalaze se na endotelnim stanicama i na membrani leukocita u niskim koncentracijama. Nakon poticanja proizvodnje citokina bakterijskim endotoksinom, koncentracija ICAM-1 počinje se značajno povećavati. ICAM-1 je ligand za integrin LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen 1) receptor koji se nalazi na površini leukocita, te nakon aktivacije putem ICAM-1/LFA-1 leukociti migriraju u tkiva (77). Studije pokazuju kako je sICAM najbolje kombinirati sa CRP-om, te da pri vrijednosti CRP > 6 mg/L i sICAM-1 >300 ng/ml (15), odnosno sICAM > 274 ng/ml, mogu biti dobri

prediktori infekcije. Daju visoku osjetljivost od 95% i negativnu prediktivnu vrijednost od 97% (78).

Selektini su skupina staničnih adhezijskih molekula (cell adhesion molecules, CAMs). Svi selektini su jednolančani transmembranski glikoproteini koji imaju slična svojstva (79). Adhezija leukocita na endotel te migracija u upalno tkivo posredovana je interakcijom između molekula na leukocitima i na vaskularnom endotelu, ponajprije selektina i integrina. Postoje tri podskupine selektina ovisno o mjestu ekspresije: E-selektin u endotelnim stanicama, L-selektin u leukocitima i P-selektin u trombocitima i endotelnim stanicama (80).

E-selektin, poznat kao stanični antigen CD62, član je skupine endotelnih leukocitnih adhezijskih molekula 1 (endothelial-leukocyte adhesion molecule 1, ELAM-1). Prisutan je samo u endotelnim stanicama. Koncentracija mu raste nakon citokinske aktivacije, te igra važnu ulogu u procesu upale. Tijekom upale E-selektin privlači leukocite na mjesto upale, a oslobađanje citokina IL-1 i TNF- α iz oštećenih stanica uzrokuje otpuštanje E-selektina iz endotelnih stanica u blizini krvnih žila. Leukocit se s pomoću liganda veže slabom vezom za E-selektin, što omogućava migraciju leukocita u područje upale (81).

P-selektin ima sličnu funkciju, no najvažnija mu je uloga u pokretanju neutrofila nakon početne stimulacije endotelne stanice ili trombocita. U roku od nekoliko minuta nakon aktivacije agonistima kao što su histamin, trombin ili oksidansi, P-selektin se putem liganda veže s leukocitom te omogućava njegovu adheziju (82).

Mjerenjem plazmatskih vrijednosti selektina kod novorođenčadi s infekcijom nađena je značajno povišena vrijednost kod gram-negativne sepse, ali vrijednosti selektina imaju nisku dijagnostičku vrijednost kada se koriste sami ili u kombinaciji s drugim testovima. Međutim, selektin se može koristiti kao prognostički pokazatelj za ishod novorodenačke sepse (23).

Većina istraživača slaže se da za sada u svakodnevnoj kliničkoj praksi treba kombinirati barem dva markera, od kojih je kompletna krvna slika zbog cijene, dostupnosti i privatljive dijagnostičke točnosti gotovo uvijek zastupljena. C-reaktivni protein je u svakodnevnoj rutinskoj kliničkoj praksi dobro prihvaćen, ali ipak ima značenje kao kasniji pokazatelj infekcije. Prokalcitonin je prihvaćen kao rani marker infekcije u prvih 24 sata života iako još uvijek nije jasno postovljena granična ("cut-off") vrijednost za prva 24 sata. Ostali biomarkeri imaju znatno veću cijenu, složeniju laboratorijsku tehnologiju, a nemaju bitno bolju dijagnostičku točnost u odnosu na kombinaciju krvne slike i C-reaktivnog proteina i/ili prokalcitonina. Osjetljivost i specifičnost 95 - 100% pokazuju za sada samo površinski biljezi CD11b i CD64, no za njihovo je razjerenje potrebna protočna citometrija, što zahtijeva dobro opremljen laboratorij, educirano osoblje i značajnija financijska sredstva pa iz tog razloga još uvijek nemaju rutinsku primjenu u svakodnevnoj kliničkoj praksi u svrhu dijagnosticiranja rane neonatalne infekcije.

Literatura:

1. Molloy EJ, et al. Maternal and neonatal lipopolysaccharide and Fas responses are altered by antenatal risk factors for sepsis. *Clin Exp Immunol* 2008; 151: 244-50.
2. Haque KN, et al. Pattern of culture-proven neonatal sepsis in a district general hospital in the United Kingdom. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004; 25:759-64.
3. Bell R, et al. Changing patterns of perinatal death 1982-2000: a retrospective cohort study. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2004; 89:531-6.
4. Schuchat A, et al. Risk factors and opportunities for prevention of early-onset neonatal sepsis: a multicenter case-control study. *Pediatrics* 2000; 105:21-6.

5. Zuppa AA, et al. Evaluation of C reactive protein and others immunologic markers in the diagnosis of neonatal sepsis. *Minerva Pediatr* 2007; 59:267-74.
6. Ungerer RL, et al. Prophylactic versus selective antibiotics for term newborn infants of mothers with risk factors for neonatal infection. *Cochrane Database Syst Rev* 2004(4): CD003957.
7. Franz AR, et al. Measurement of interleukin 8 in combination with C-reactive protein reduced unnecessary antibiotic therapy in newborn infants: a multicenter, randomized, controlled trial. *Pediatrics* 2004; 114:1-8.
8. Benitz WE, et al. Serial serum C-reactive protein levels in the diagnosis of neonatal infection. *Pediatrics* 1998;102: 41.
9. Lin DS, et al. Urinary tract infection in febrile infants younger than eight weeks of Age. *Pediatrics* 2000; 105:20.
10. Milas V. Rano otkrivanje bakteriurije i infekcije mokraćnog sustava radi sprječavanja trajnog oštećenja bubrega. *Doktorska disertacija* 2004; Osijek: 86.
11. Javed M. Neonatal dermatology at tertiary care teaching hospital. *Eastern J of Med* 2010;15:90-92.
12. Yoon HS, Shin YJ, Ki M. Risk factors for neonatal infections in full-term babies in South Korea. *Yonsei Med J* 2008; 49:530-6.
13. Joram N, et al. Umbilical cord blood procalcitonin and C reactive protein concentrations as markers for early diagnosis of very early onset neonatal infection. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2006; 91:65-6.
14. Malik A, et al. Beyond the complete blood cell count and C-reactive protein: a systematic review of modern diagnostic tests for neonatal sepsis. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2003;157:511-6.
15. Kingsmore SF, et al. Identification of diagnostic biomarkers for infection in premature neonates. *Mol Cell Proteomics* 2008; 7:1863-75.
16. Mishra UK, et al. Newer approaches to the diagnosis of early onset neonatal sepsis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2006; 91:208-12.
17. Pierrakos C, Vincent JL. Sepsis biomarkers: a review. *Crit Care* 2010;14:15.
18. Edgar JD, et al. A prospective study of the sensitivity, specificity and diagnostic performance of soluble intercellular adhesion molecule 1, highly sensitive C-reactive protein, soluble E-selectin and serum amyloid A in the diagnosis of neonatal infection. *BMC Pediatr* 2010; 10:22.
19. Selimovic A, et al. The predictive values of total white blood count and differential count in the diagnosis of early-onset neonatal sepsis. *Med Arh* 2008; 62:205-10.
20. Carcillo J, Planquois JS, Goldstein B. Early markers of infection and sepsis in newborn and children. *Advances in Sepsis* 2006;5:118-125.
21. Stoll BJ, et al. Changes in pathogens causing early-onset sepsis in very-low-birth-weight infants. *N Engl J Med* 2002; 347:240-7.
22. Bhandari V, et al. Hematologic profile of sepsis in neonates: neutrophil CD64 as a diagnostic marker. *Pediatrics* 2008; 121:129-34.
23. Zaki Mel S, el-Sayed H. Evaluation of microbiologic and hematologic parameters and E-selectin as early predictors for outcome of neonatal sepsis. *Arch Pathol Lab Med* 2009;133:1291-6.
24. Figueras-Aloy J, et al. Serum soluble ICAM-1, VCAM-1, L-selectin, and P-selectin levels as markers of infection and their relation to clinical severity in neonatal sepsis. *Am J Perinatol* 2007;24:331-8.
25. Selimović A, Skokić F, Selimović Z. Opstetrički rizični faktori majke i rana neonatalna sepsa. *Gynaecol Perinatol* 2008;17:138-141.
26. Rodwell RL, Leslie AL, Tudehope DI. Early diagnosis of neonatal sepsis using a hematologic scoring system. *J Pediatr* 1988;112:761-7.
27. Manroe BL, et al. The neonatal blood count in health and disease. I. Reference values for neutrophilic cells. *J Pediatr* 1979;95:89-98.
28. Escobar GJ, et al. Neonatal sepsis workups in infants >= 2000 grams at birth: A population-based study. *Pediatrics* 2000;106:256-63.
29. Schelonka RL, et al. Peripheral leukocyte count and leukocyte indexes in healthy newborn term infants. *J Pediatr* 1994;125:603-6.
30. Ghosh S, Mittal M, Jaganathan G. Early diagnosis of neonatal sepsis using a hematological scoring system. *Indian J Med Sci* 2001;55:495-500

31. Tillett W, Francis JT. Serological reactions in pneumonia with a nonprotein somatic fraction of pneumococcus. *J Exp Med* 1930;52:561-585.
32. Pepys M, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest* 2003; 111:1805-12.
33. NCBI, E. Protein, CAA39671.
34. Lau D, Dhillon B, Yan H, Szmitko PE, Verma S. Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288:2031-41.
35. Brian C, Olshaker JS. The C-reactive protein. *Journal of Emergency Medicine* 1999; 17:1019-1025.
36. Čosičkić A, Skokić F. Predictive value of interleukin 6 from the umbilical cord blood in early neonatal infection. *Med Arh* 2009;63:4-8.
37. Garland SM, Bowman ED. Reappraisal of C-reactive protein as a screening tool for neonatal sepsis. *Pathology* 2003;35:240-3.
38. Čosičkić A, Skokić F. Evaluacija dijagnostičke vrijednosti C-reaktivnog proteina u neonatalnim infekcijama 2007; 3:201-208.
39. Boo NY, Nor Azlina AA, Rohana J. Usefulness of a semi-quantitative procalcitonin test kit for early diagnosis of neonatal sepsis. *Singapore Med J* 2008; 49:204-8.
40. Gendrel D, et al. Procalcitonin as a marker for the early diagnosis of neonatal infection. *J Pediatr* 1996;128:570-3.
41. Gendrel D, Bohuon C. Procalcitonin as a marker of bacterial infection. *Pediatr Infect Dis J* 2000;19:679-87.
42. Sekha K, Husseini MB, Seyyedsadri N. The role of the procalcitonin in diagnosis of neonatal sepsis and correlation between procalcitonin and C-reactive protein in these patients. *Pak J Biol Sci* 2008;11:1785-90.
43. Vazzalwar R, et al. Procalcitonin as a screening test for late-onset sepsis in preterm very low birth weight infants. *J Perinatol* 2005; 25:397-402.
44. Lopez VS, Perez JB, Solis D, Roques-Serradilla V, et al. Procalcitonin is not sufficiently reliable to be the sole marker of neonatal sepsis of nosocomial origin. *BMC Pediatr* 2006;6:16.
45. Lopez VS, Solis JB, Serradilla DP, Colomer VR, Corallo GD. Evaluation of procalcitonin for diagnosis of neonatal sepsis of vertical transmission. *BMC Pediatr* 2007;26:9.
46. Chiesa C, et al. Reliability of procalcitonin concentrations for the diagnosis of sepsis in critically ill neonates. *Clin Infect Dis* 1998;26:664-72.
47. Zeitoun AA, et al. Evaluation of neutrophilic CD64, interleukin 10 and procalcitonin as diagnostic markers of early- and late-onset neonatal sepsis. *Scand J Infect Dis* 2010; 42: 299-305.
48. Khoshdel A, et al. Sensitivity and specificity of procalcitonin in diagnosis of neonatal sepsis. *Iran J of Pathol* 2008;3:203-207.
49. Ali AM, et al. Reliability of serum procalcitonin concentrations for the diagnosis of sepsis in neonates. *Egypt J Immunol* 2008;15:75-84.
50. Sachse C, Dressler F, Henkel E. Increased serum procalcitonin in newborn infants without infection. *Clin Chem* 1998; 44:1343-4.
51. Assumma M, et al. Serum procalcitonin concentrations in term delivering mothers and their healthy offspring: a longitudinal study. *Clin Chem* 2006; 46:1583-7.
52. Lapillonne A, et al. Lack of specificity of procalcitonin for sepsis diagnosis in premature infants. *Lancet* 1998;351:1211-2.
53. Monneret G, et al. Increased serum procalcitonin levels are not specific to sepsis in neonates. *Clin Infect Dis* 1998;27:1559-61.
54. Čulić S. Citokini i autoimunosne bolesti. *Pediatr Croat* 2005;49:148-161.
55. Mosmann TR, et al. Two types of murine helper T cell clone. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136:2348-57.
56. Bernard GR, et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 2001;344:699-709.
57. Thomson A. The cytokine handbook. 1994, London: Academic Press. 141.
58. Raynal MC, et al. Interleukin 6 induces secretion of IgG1 by coordinated transcriptional activation and differential mRNA accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86:8024-8.

59. Castell JV, et al. Recombinant human interleukin-6 (IL-6/BSF-2/HSF) regulates the synthesis of acute phase proteins in human hepatocytes. *FEBS Lett* 1988;232:347-50.
60. Sehgal PB. Regulation of IL6 gene expression. *Res Immunol* 1992;143:724-34.
61. Kocabas E, et al. Role of procalcitonin, C-reactive protein, interleukin-6, interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in the diagnosis of neonatal sepsis. *Turk J Pediatr* 2007;49:7-20.
62. Khassawneh M, et al. Diagnostic markers for neonatal sepsis: comparing C-reactive protein, interleukin-6 and immunoglobulin M. *Scand J Immunol* 2007;65:171-5.
63. Treszl A, Tulassay T, Vasarhelyi B. Genetic basis for necrotizing enterocolitis--risk factors and their relations to genetic polymorphisms. *Front Biosci* 2006;11:570-80.
64. Puthothu B, et al. Interleukin (IL)-18 polymorphism 133C/G is associated with severe respiratory syncytial virus infection. *Pediatr Infect Dis J* 2007;26:1094-8.
65. Fitzgerald A, O'neil LAJ, Gearing AJH, Callard RE. *The cytokine fact book* 2001; London: Academic Press. 150.
66. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001;104: 487-501.
67. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=191160>.
68. Nedwin GE, et al. Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. *Nucleic Acids Res* 1985;13:6361-73.
69. Park KH, et al. Amniotic fluid tumor necrosis factor-alpha is a marker for the prediction of early-onset neonatal sepsis in preterm labor. *Gynecol Obstet Invest* 2004; 58:84-90.
70. Baud O, et al. Amniotic fluid concentrations of interleukin-1beta, interleukin-6 and TNF-alpha in chorioamnionitis before 32 weeks of gestation: histological associations and neonatal outcome. *Br J Obstet Gynaecol* 1999;106:72-7.
71. Berner R, et al. Elevated gene expression of interleukin-8 in cord blood is a sensitive marker for neonatal infection. *Eur J Pediatr* 2000;159:205-10.
72. Dollner H, Vatten L, Austgulen R. Early diagnostic markers for neonatal sepsis: comparing C-reactive protein, interleukin-6, soluble tumour necrosis factor receptors and soluble adhesion molecules. *J Clin Epidemiol* 2001;54:1251-7.
73. Simms HH, D'Amico R. Lipopolysaccharide induces intracytoplasmic migration of the polymorphonuclear leukocyte CD11b/CD18 receptor. *Shock* 1995;3:196-203.
74. Fjaertoft G, et al. Neutrophils from term and preterm newborn infants express the high affinity Fc gamma-receptor I (CD64) during bacterial infections. *Pediatr Res* 1999; 45: 871-6.
75. Nupponen I, et al. Neutrophil CD11b expression and circulating interleukin-8 as diagnostic markers for early-onset neonatal sepsis. *Pediatrics* 2001;108:12.
76. Ng PC, et al. Neutrophil CD64 is a sensitive diagnostic marker for early-onset neonatal infection. *Pediatr Res* 2004;56:796-803.
77. Yang L, et al. ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow. *Blood* 2005;106:584-92.
78. Figueras-Aloy J, et al. Serum Soluble ICAM-1, VCAM-1, L-Selectin, and P-Selectin Levels as Markers of Infection and their Relation to Clinical Severity in Neonatal Sepsis. *Am J of Perinatol* 2007;24:331-338.
79. Somers WS, et al. Insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structures of P- and E-selectin bound to SLe(X) and PSGL-1. *Cell* 2000; 103:467-79.
80. Mariscalco MM, Smith W. Integrins and cell adhesion molecules. In *Fetal and Neonatal Physiology*. R. Polin, Fox, WW, Editor. 1999, WB Saunders Company: Philadelphia. 1980-2002.
81. Collins T, et al. Structure and chromosomal location of the gene for endothelial-leukocyte adhesion molecule 1. *J Biol Chem* 1991;266:2466-73.
82. Lorant DE, et al. P-selectin expression by endothelial cells is decreased in neonatal rats and human premature infants. *Blood* 1999;94:600-9.