

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

LÉKAŘSKÁ FAKULTA



**Vybrané laboratorní biomarkery
a jejich využití v diagnostice
novorozenecké sepse**

MUDr. Anna Baštan

Školitel: prof. MUDr. Vladimír Mihál, CSc.

Studijní program: Pediatrie

Školící pracoviště: Dětská klinika Lékařské fakulty Univerzity

Palackého v Olomouci a Fakultní nemocnice Olomouc

Prohlašuji, že jsem dizertační práci na téma „Vybrané laboratorní biomarkery a jejich využití v diagnostice novorozenecké sepse“ vypracovala samostatně pod vedením školitele za použití v práci uvedených pramenů a literatury. Dále prohlašuji, že tato dizertační práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Datum

Podpis

Ráda bych tuto práci věnovala svému dědečkovi, který mě vždy v mé práci podporoval, zajímal se a byl mi velkou oporou.

Poděkování

Chtěla bych poděkovat především svému manželovi a své mamince, bez nichž bych tuto práci nikdy nedokončila.

Dále bych ráda poděkovala svému školiteli prof. MUDr. Vladimíru Mihálovi, CSc. za odborné vedení a cenné připomínky ke klinické i teoretické části dizertace. Děkuji také MUDr. Janu Hálkovi, Ph.D. za spolupráci při zavádění studie na Novorozeneckém oddělení FN Olomouc a za cenné odborné i lidské rady. A v neposlední řadě MUDr. Vojtěchu Bodnárovi za to, že byl vždy ochoten zodpovědět všechny mé dotazy.

OBSAH

1	Souhrn dizertační práce a její cíle	6
2	Teoretická východiska	9
2.1	Novorozenecká sepe	9
2.2	Laboratorní znaky novorozenecké sepe	10
2.2.1	Klasické biomarkery novorozenecké sepe	11
2.2.2	Moderní laboratorní znaky novorozenecké sepe	13
2.3	Sepe a její definice v kontextu pediatrických a neonatologických odlišností	22
2.4	Imunologická podstata novorozenecké sepe	24
2.5	Shrnutí teoretické části	27
3	Experimentální část	28
3.1	Projekt 1. Stanovení sérového kalprotektinu u předčasně narozených novorozenců a jeho význam v diagnostice časně novorozenecké sepe	28
3.1.1	Cíle studie	28
3.1.2	Pacienti a metody	29
3.1.3	Etika	30
3.1.4	Výsledky	30
3.1.5	Diskuze	32
3.2	Projekt 2. Porovnání hladin interleukinu-6 z pupečníkové a periferní krve novorozence a definování jeho dynamiky ve vztahu k jednotlivým proměnným	35
3.2.1	Cíle studie	35
3.2.2	Pacienti a metody	36
3.2.3	Výsledky	39
3.2.4	Diskuze a závěr	44
3.3	Projekt 3. Stanovení exprese povrchového receptoru CD64 na povrchu neutrofilů u septických novorozenců metodou průtokové cytometrie	47
3.3.1	Cíle studie	47
3.3.2	Pacienti a metody	48
3.3.3	Výsledky	50
3.3.4	Diskuze a závěr	54
4	Shrnutí experimentální části	56
5	Použitá literatura	57
6	Seznam použitých zkratk	70

7	Seznam tabulek	72
8	Seznam grafů a obrázků	73
9	Seznam publikační a přednáškové činnosti autora.....	75
9.1	Seznam publikací a přednášek souvisejících s dizertační prací.....	75
9.1.1	Publikace v časopisech s impakt faktorem	75
9.1.2	Publikace v recenzovaných časopisech	75
9.1.3	Publikace v nerecenzovaných časopisech	75
9.1.4	Přednášková činnost	75
9.2	Ostatní publikační a přednášková činnost	76
10	Grantová činnost	77
11	Přílohy	78

1 Souhrn dizertační práce a její cíle

Neonatologie zaznamenala v posledních 20 letech obrovský pokrok v péči o předčasně narozené novorozence. Velkým problémem zůstává včasná diagnostika a léčba novorozenecké sepse. Zranitelnost těchto pacientů je dána především jejich nezralým imunitním systémem. Nejčastější příznaky rozvíjejícího se septického stavu u novorozence jsou nespecifické a objevují se i u řady neinfekčních stavů. Vedle klinického vyšetření je nutno provést základní laboratorní hodnocení. Zlatým standardem v diagnostice sepse je hemokultura a následný průkaz původce z mikrobiologického kultivačního vyšetření krve. U poměrně významné části novorozenců se sepsí se na výsledek hemokultury nelze spolehnout. V určitých případech provádíme také kultivační průkaz z jiných biologických zdrojů (mozkomíšni mok, kůže a jiné). Dalším laboratorním znakem využívaným běžně v diagnostice infekce, resp. sepse je C-reaktivní protein (CRP). I tento protein akutní fáze má své limity. Pro včasnou diagnostiku novorozenecké sepse je nutné počítat s jeho delším biologickým poločasem a nelze ho doporučit, pokud ano, pak v kombinaci s dalšími biomarkery. Je třeba hledat laboratorní parametry vhodnější. Hojně využívanými laboratorními znaky jsou proteiny akutní fáze a prozánětlivé cytokiny. Nadějnými biomarkery nejen novorozenecké sepse jsou interleukin-6 (IL-6), prokalcitonin (PCT), exprese povrchového receptoru CD64 na neutrofilech a kalprotektin. Cílem této práce byla analýza vybraných biomarkerů novorozenecké sepse na podkladě dosud známých poznatků o jejich biologickém chování. Dalším cílem bylo zhodnocení možností jejich praktického využití v diagnostice novorozenecké sepse s ohledem na dynamiku a způsob odběru.

Specifikace cílů:

- Stanovení sérového kalprotektinu u předčasně narozených novorozenců a jeho využití v diagnostice časně novorozenecké sepse.
- Porovnání hladin interleukinu-6 v pupečnickové a periferní krvi předčasně narozených novorozenců.
- Definování dynamiky interleukinu-6 ve vztahu k jednotlivým perinatologickým proměnným a ev. zavedení měření pupečnickového interleukinu-6 v rámci diagnostiky časně novorozenecké sepse.
- Stanovení exprese povrchového receptoru CD64 na neutrofilech u předčasně narozených septických novorozenců metodou průtokové cytometrie.

Summary

Neonatology has made a big step forward in the last 20 years regarding the care of premature newborns. However the biggest issue continues to remain early diagnosis and treatment of infectious or septic newborns. The vulnerability of these patients is mainly due to their immature immune system. The most common symptoms of developing the septic condition in the newborn are non-specific. They appear in a number of non-infectious conditions. Along with the clinical examination, it is also necessary to run some basic laboratory assessment. Standard in the diagnosis of sepsis is the proof of pathogen from the blood culture. For a relatively significant part of septic newborns you cannot rely on the results from the blood culture. Another laboratory characteristic frequently used in the diagnosis of infection, sepsis, is C-reactive protein. But also this marker has its imperfections and cannot be recommended for early diagnosis of neonatal sepsis. It is necessary to search for more ideal laboratory markers. A hypothetical ideal marker of sepsis should have a well-defined optimal "cut-off" value, sensitivity and negative predictive value. The laboratory markers that are frequently used are acute phase proteins and pro inflammatory cytokines. The most promising markers, not only of neonatal sepsis, are interleukin-6, procalcitonin, CD64 and calprotectin. Goal of this work was to analyze selected biomarkers of neonatal sepsis based on the previously known knowledge about their biological behavior. Another goal was to evaluate the possibilities of their practical use in the diagnosis of neonatal sepsis with regard to the dynamics and sampling method.

Target specifications:

- Comparison of serum calprotectin level between healthy and septic preterm newborns.
- Comparison of interleukin-6 levels in umbilical and peripheral blood of preterm neonates.
- Defining interleukin-6 dynamics in relation with individual perinatalogical variables and depending on the results, there is a possibility of introduction of umbilical cord interleukin-6 measurement as part of early diagnosis of neonatal sepsis.
- Comparison of CD64 levels in healthy and septic preterm neonates.

Přehled klíčových slov

Biomarker, C-reaktivní protein, cytokin, časná novorozenecká sepe, diagnostika, exprese CD64 na neutrofilech, interleukin-6, kalprotektin, krevní obraz, marker, novorozenec, parametr, pozdní novorozenecká sepe, prokalcitonin, protein akutní fáze, sepe.

Key words

Acute phase reactant, biomarker, blood count, C-reactive protein, calprotectin, cytokine, diagnostics, nCD64 expression, early onset sepsis, interleukin-6, late onset sepsis, marker, newborn, parameter, procalcitonin, sepsis.

2 Teoretická východiska

2.1 Novorozenecká seps

Během posledních 20 let zaznamenáváme v neonatologii obrovský pokrok v péči o nezralé novorozence. Velkým problémem nadále zůstává novorozenecká infekce, resp. její generalizace (seps) a komplikace s ní spojené.

Novorozenecká seps má zásadní vliv na morbiditu a mortalitu novorozenců. Dle statistiky publikované vědci z pediatrické kliniky v Yale-New Haven Hospital může za 11 % všech úmrtí v novorozeneckém věku¹. Novější studie z roku 2018 toto číslo navyšuje na 16 % a řadí novorozeneckou sepsi mezi hlavní příčiny úmrtí novorozenců². V případě pozitivního mikrobiologického kultivačního vyšetření krve pak úmrtnost na novorozeneckou sepsi stoupá na 18 %³. Seps celosvětově postihuje 2202 novorozenců na 100 000 živě narozených, resp. 3 miliony novorozenců ročně².

Novorozeneckou sepsi dělíme na časnou novorozeneckou sepsi - „early-onset seps“ (EOS) a pozdní novorozeneckou sepsi - „late-onset seps“ (LOS). Časná novorozenecká seps je definována jako seps, která vznikla přestupem bakterií vertikálně z matky na dítě před nebo během porodu a objeví se do 72 hodin po narození⁴. O pozdní novorozenecké sepsi mluvíme v případě, že vznikla za více než 72 hodin od porodu. Je spojena především s pobytem novorozence na jednotce intenzivní péče, resp. s intenzivní péčí – umělá plicní ventilace (UPV), intravenózní vstupy, ruce personálu apod.⁵. Novorozenecká seps ohrožuje převážně novorozence předčasně narozené, avšak nevyhýbá se ani novorozencům narozeným v termínu. Její výskyt a četnost komplikací je vyšší v populaci novorozenců nízké porodní hmotnosti⁶.

Základním úskalím je diagnostická přesnost a rychlost. Ta spolu s včasnou léčbou rozhoduje o dalším osudu dítěte. Klasickými pilíři diagnostiky je zhodnocení klinických příznaků systémové zánětlivé reakce organismu (SIRS) a průkaz patogenního agens v biologickém vzorku (krev, mozkomíšni mok a jiné). Klinická kritéria systémové zánětlivé odpovědi organismu jsou tělesná teplota $> 38,5$ °C či < 36 °C, rychlost srdeční akce $> 2SD$ pro věk a/nebo u dětí pod 1 rok bradykardie pod 10. percentil pro věk, dechová frekvence $> 2SD$ či UPV, leukocytóza/leukopenie dle hodnot pro daný věk a/nebo > 10 % nezralých forem granulocytů⁷. Výše zmíněná kritéria SIRS mají v novorozeneckém věku malou diagnostickou hodnotu. Symptomy zánětlivé reakce organismu jsou v novorozeneckém období nespecifické.

Dle multicentrické studie⁸ publikované roku 2009, která shromáždila data z 26 britských neonatologických center, jsou nejčastějšími klinickými známkami novorozenecké sepse náhle vzniklá potřeba kyslíku či ventilační podpory, apnoické pauzy, bradykardie, hypotenze, intolerance glukózy, kapilární návrat > 3 vteřiny, rozdíl teploty mezi periferií a tělesným jádrem > 2 °C, letargie/dráždivost, tepelná nestabilita, intolerance stravy, zvýšení sérového bilirubinu, oligurie, metabolická acidóza.

Zlatým standardem v diagnostice sepse je mikrobiologické kultivační vyšetření krve. Toto vyšetření patří mezi základní vyšetření, které se v diagnostice sepse nesmí před nasazením ATB terapie opomenout. V novorozeneckém věku má řadu úskalí a negativní výsledek diagnózu sepse nevylučuje^{9,10}. Proto je zapotřebí mít k dispozici další laboratorní markery.

Hlavním důvodem velkého zájmu o problematiku novorozenecké sepse a její včasnou diagnostiku je její velká morbidita a mortalita¹. U extrémně nedonošených novorozenců má prodělaná novorozenecká sepse zásadní vliv na jejich další neurologický vývoj. Tito novorozenci jsou ve srovnání s novorozenci, kteří sepsi neprodělali, ve větším riziku neurologického postižení, ať už se jedná o dětskou mozkovou obrnu či senzomotorický deficit¹¹.

2.2 Laboratorní znaky novorozenecké sepse

Hypotetický ideální laboratorní znak sepse by měl mít dobře definovanou optimální cut off hodnotu a co největší senzitivitu a negativní prediktivní hodnotu. Měl by předpovědět závažnost infekce v počátku klinických příznaků a umět rozlišit jednotlivé skupiny etiologických agens. Podle jeho dynamiky bychom měli poznat vývoj nemoci a reakce na antibiotickou (ATB) terapii, popřípadě vznik komplikací. Měl by umět předpovědět prognózu a mortalitu a pro jeho detekci by mělo stačit malé množství odebrané krve¹². V neposlední řadě by měl být cenově dostupný pro většinu novorozeneckých oddělení. Nic v životě není ideální, ale naše snaha je se ideálu přiblížit. Proto je vedle klasických, řadu let používaných markerů potřeba najít laboratorní znak, který by tyto podmínky alespoň z části splňoval.

2.2.1 Klasické biomarkery novorozenecké sepse

Mezi klasické laboratorní biomarkery novorozenecké sepse v naší práci řadíme mikrobiologické kultivační vyšetření krve, krevní obraz a C-reaktivní protein. Tyto historicky používané laboratorní znaky mají jistě své místo v diagnostickém procesu. Avšak mají také své limity, které nás nutí hledat laboratorní ukazatele přesnější.

2.2.1.1 Mikrobiologické kultivační vyšetření krve, resp. průkaz původce v biologickém materiálu

Základním vyšetřením v diagnostice nejen novorozenecké sepse je průkaz původce v biologickém materiálu. U novorozenecké sepse je zlatým standardem mikrobiologické kultivační vyšetření krve (hemokultura), tedy přímá detekce patologického agens v krevním řečišti. Její užití a interpretace má v neonatologii řadu úskalí. Výtěžnost vyšetření klesá díky častému antenatálnímu podání ATB matce, technickým potížím či malému množství odebraného vzorku. Pokud jsou mikroorganismy přítomny ve velmi malých koncentracích (< 4 CFU/ml), je pro detekci těchto patogenů potřeba minimálně 1 ml krve. Pro zjištění přítomné bakteriémie je ale ve většině případů dostačující 0,5 ml krve. Při použití moderního kontinuálního monitorovacího systému je medián TTP (time to positivity) u novorozenecké sepse 9-18 hodin. U *Streptococcus agalactiae* (GBS) a *Escherichia coli* je přibližně 96-100 % pozitivních do 36 hodin, zatímco detekce koaguláza negativních stafylokoků může trvat až 48 hodin¹³. U poměrně významné části novorozenců se sepsí se z výše uvedených důvodů průkaz původce nezdaří. Negativní mikrobiologické kultivační vyšetření krve ale novorozeneckou sepsi nevylučuje^{9,10}. Klingenberg uvádí, že počet septických novorozenců s negativním mikrobiologickým kultivačním vyšetřením krve až 16x převyšuje počet septických novorozenců s pozitivní hemokulturou. Negativní mikrobiologické kultivační vyšetření krve vidíme převážně u novorozenců vyšetřovaných při podezření na časnou novorozeneckou sepsi¹³.

Postup odběru hemokultury má svá jasná pravidla. Vždy je důležitý odběr pro aerobní i anaerobní kultivaci. Jestliže krve není dostatek, inokulujeme pouze aerobní lahvičku. U novorozenců anaerobní patogeny nečekáme. Pokud se však nejedná primárně o střevní problém, např. o nekrotizující enterokolitidu či peritonitidu z jiné příčiny, v tom případě je odběr pro anaerobní kultivaci vyžadován. Vzhledem k malému objemu cirkulující krve novorozence se většinou provádí odběr pouze jednoho vzorku¹⁴.

2.2.1.2 Krevní obraz

Krevní obraz patří mezi základní laboratorní vyšetření napříč lékařskými obory. U novorozenecké sepse je jeho výpovědní hodnota spíše malá, přesto toto vyšetření v diagnostickém procesu nemůžeme opomenout.

Pro potvrzení diagnózy novorozenecké sepse má krevní obraz sám o sobě nízkou prediktivní hodnotu. Normální hodnoty naměřené vícekrát po sobě zvyšují pravděpodobnost nepřítomnosti sepse^{15,16}. Nízký počet leukocytů ($5000 - 7500/\text{mm}^3$), nízké ANC (absolute neutrophil count) a hodnota I/T indexu (immature to total neutrophil ratio) $> 0,2$ jsou spojeny s vyšším rizikem infekce¹⁷. I/T index je parametr nespecifický. Perinatální hypoxie, hypertenze matky, porodní stres či dlouhá indukce oxytocinem mohou hodnotu I/T indexu ovlivnit. Při hodnocení ANC ve smyslu neutropenie je potřeba pracovat s hodnotami pro dané gestační stáří. Dolní hodnota fyziologického rozmezí ANC u dětí narozených po 36. týdnu gestace je $3500/\text{mm}^3$, u dětí narozených mezi 28. a 36. týdnem gestace mluvíme o neutropenii při $\text{ANC} < 1000/\text{mm}^3$ a pro děti narozené před 28. týdnem gestace je limit ANC $500/\text{mm}^3$ ¹⁸.

Další dobře použitelný, ale málo prozkoumaný parametr krevního obrazu je neutrofil/lymfocyt (NLR) index. Během sepse se zvyšuje počet neutrofilů a snižuje se počet lymfocytů. Septičtí pacienti mají zvýšený NLR index. Recentní studie Li a spol. potvrdila pozitivní korelaci mezi zvýšením NLR indexu a sepsí. Septičtí novorozenci měli zvýšený NLR index na hladině významnosti $P < 0.001$ ¹⁹. Toto potvrdila také novější studie z roku 2021. NLR je nezávislý prediktivní faktor rizika časně novorozenecké sepse na hladině významnosti $p=0.003$. Hodnota $\geq 3,169$ má senzitivitu 77 % a specificitu 78 %²⁰.

2.2.1.3 C-reaktivní protein

C-reaktivní protein, bílkovina, která precipituje s tzv. C-polysacharidem pneumokoků, se řadí mezi proteiny akutní fáze (APPs)²¹. Reakce akutní fáze je nespecifický komplexní fyziologický děj, kdy v důsledku rozvoje patologického děje (zánět, nádorové onemocnění, trauma, chirurgický výkon) dojde k uvolnění velkého množství mediátorů zánětu^{21,22}. Je to reakce systémová, objevuje se horečka, dochází ke zvýšenému uvolňování hormonů, k leukocytóze, ke změně v syntéze plazmatických proteinů, ať už ve smyslu plus či minus. Tato reakce je pro organismus extrémně důležitá, protože brání mikrobiálnímu přerůstání a navrácí zpět

homeostázu. Proteiny akutní fáze jsou bílkoviny, jejichž koncentrace se v důsledku této reakce mění. Dle směru změny dělíme APPs na pozitivní a negativní.

CRP je typickým příkladem pozitivního proteinu akutní fáze²³. Písmeno C v názvu odkazuje na schopnost rozpoznat polysacharidy *Streptococcus pneumoniae* typ C^{24,25}. Má převážně antiinflamatorní efekt, pomáhá rozeznat a likvidovat patogeny a zlepšuje proces odklizení nekrotických a apoptotických buněk^{26–34} a to skrze komponentu komplementu C1q a receptoru protilátkového fragmentu (Fc) Fc- γ RI and Fc- γ RII, čímž aktivuje klasickou cestu komplementu a zahajuje fagocytózu. Je syntetizován játry a stimulem pro jeho vyplavení jsou centrální cytokiny (IL-6, interleukin-1 β a tumor necrosis factor- α [TNF- α])^{35–37}. Jeho sérová koncentrace se zvyšuje o 5 mg/l za 6 hodin po infekčním stimulu s maximem do 48 hodin a poločas v séru je okolo 19 hodin^{37–39}.

V klinické praxi je důležité myslet na jeho postnatální dynamiku. Nejčastěji udávaný cut-off první den života je 4–5 mg/l, dále 10–12 mg/l⁴⁰. Bender a kol. ve své studii z roku 2008 uvádí, že po infekčním stimulu vystoupá na maximální hodnoty za 16-24 hodin. Jakmile CRP začne stoupat, sérové hladiny cytokinů (IL-6 a -8) již klesají⁴¹. Jak dokazuje taiwanská studie z roku 2015, výsledek negativního CRP (≤ 10 mg/l) by se neměl brát jako závazný k vyloučení novorozenecké sepse, v rozhodnutí, zda zahájit ATB léčbu, ani ve volbě vhodného ATB⁴². Zvýšené hladiny CRP byly naměřeny i u neinfekčních stavů jako je pneumonitida způsobená aspirací mekonia, šok, horečka matky, předčasný odtok plodové vody (PROM), intraventrikulární hemoragie, anoxická encefalopatie, syndrom dechové tísně novorozence (RDS), chorioamnionitida a tranzitorní tachypnoe novorozence³⁹. Z uvedeného vyplývá, že CRP není vhodným laboratorním znakem pro včasnou diagnostiku novorozenecké sepse. Pro sledování efektivity antimikrobiální terapie a její ukončení je CRP biomarker použitelný^{39,43,44}.

2.2.2 Moderní laboratorní znaky novorozenecké sepse

Jako „moderní“ markery označuji v této práci laboratorní znaky, které se do klinické praxe již dostaly, ale jejich použití je zatím limitováno jak pracovištěm, tak jejich správnou interpretací. Jak bylo zmíněno výše, klasické biomarkery sepse nespĺňují požadavky na tzv. marker ideální. Mezi nově používané markery v diagnostice sepse, resp. novorozenecké sepse řadíme kalprotektin, prokalcitonin, povrchový znak na neutrofilech CD64, interleukin-6 a další.

2.2.2.1 Kalprotektin

Kalprotektin je členem rodiny S100 proteinů. Jedná se o heterodimer S100A8/A9. S100 proteiny se nachází pouze u obratlovců. Jejich důležitou vlastností je vazba s Ca^{2+} a Zn^{2+} , díky kterým získávají řadu intra- a extracelulárních vlastností⁴⁵. Svůj název získaly pro schopnost rozpustit se ve 100% síranu amonném⁴⁶. Po aktivaci neutrofilů či mononukleárů se přesunou z intracelulárního do extracelulárního prostředí a začnou se chovat jako alarminy, resp. DAMPs (damage-associated molecular pattern molecules)⁴⁷. Alarminy jsou molekuly schopné aktivovat imunitní systém skrze specifické receptory⁴⁸. Antimikrobiální aktivita kalprotektinu se zvyšuje poté, co se inkorporuje do neutrofilních extracelulárních pastí, neutrophil extracellular traps (NETs)⁴⁹. V literatuře můžeme kalprotektin najít pod různými synonymy, jak uvádí tabulka 1⁴⁵.

Tabulka 1. Synonyma S100 proteinu S100A8/A9

Synonyma	Autoři, rok
L1 antigen	Fagerhol et al. (1980)
27E10 antigen	Zwadlo et al. (1986)
Cystic fbrosis antigen	Dorin et al. (1987)
MRP8/14 ^a	Odink et al. (1987)
L1 light and heavy chain	Andersson et al. (1988)
Calgranulin A (CAGA)/calgranulin B (CAGB)	Wilkinson et al. (1988)
p8,14	Hogg et al. (1989)
60B8-A and B antigen	Tobe et al. (1989)
Calprotectin	Steinbakk et al. (1990)
S100A8/S100A9	Schafer et al. (1995)

^aMethylated related protein

Kalprotektin se nachází v cytosolu buněk vrozeného imunitního systému. V neutrofilech zaujímá až polovinu všech bílkovin a v monocytech téměř 5 %⁵⁰. Je přítomen také v cytoplasmě slizničního epitelu. Zdá se, že cytosolický kalprotektin přímo chrání intracelulární část dlaždicového epitelu proti invazivním mikrobům svou antimikrobiální aktivitou a nepřímo aktivací NADPH oxidáz vedoucí k produkci reaktivních forem kyslíku. V extracelulárním

prostředí kalprotektin sekvstruje esenciální stopové kovy z mikrobů a tím inhibuje jejich růst⁴⁹. Uvolňuje se bezprostředně po interakci hostitel-patogen. Pro tuto svou vlastnost se používá jako laboratorní znak aktivace granulocytů a mononukleárů⁵¹.

Kalprotektin se dá měřit ve všech tělních tekutinách (sérum, sliny, stolice, moč, sperma, stolice likvor, abscesová tekutina)⁴⁵. Měření hladiny tohoto S100 proteinu ve stolici je již rutinně zavedeno v gastroenterologii. Využívá se v diferenciální diagnostice funkčních gastroenterologických potíží a nespecifických střevních zánětů (IBD), a také je základním laboratorním znakem při sledování aktivity nemoci u pacientů s IBD⁵²⁻⁵⁴. Nadějně výsledky ukázala meta-analýza z roku 2021 zabývající se sérovým kalprotektinem jakožto biomarkerem u pacientů s juvenilní idiopatickou artritidou. Užití sérového kalprotektinu může představovat užitečný nástroj pro přesnější stratifikaci aktivity onemocnění a mohlo by napomoci individuálnějšímu přístupu k volbě léků⁵⁵. V dospělé medicíně se kalprotektin využívá v rámci širší diagnostiky zánětlivých procesů⁵⁶. Role alarminu S100A8/A9 v problematice novorozenecké sepse není dokonale objasněna stejně jako jeho využití v klinické praxi.

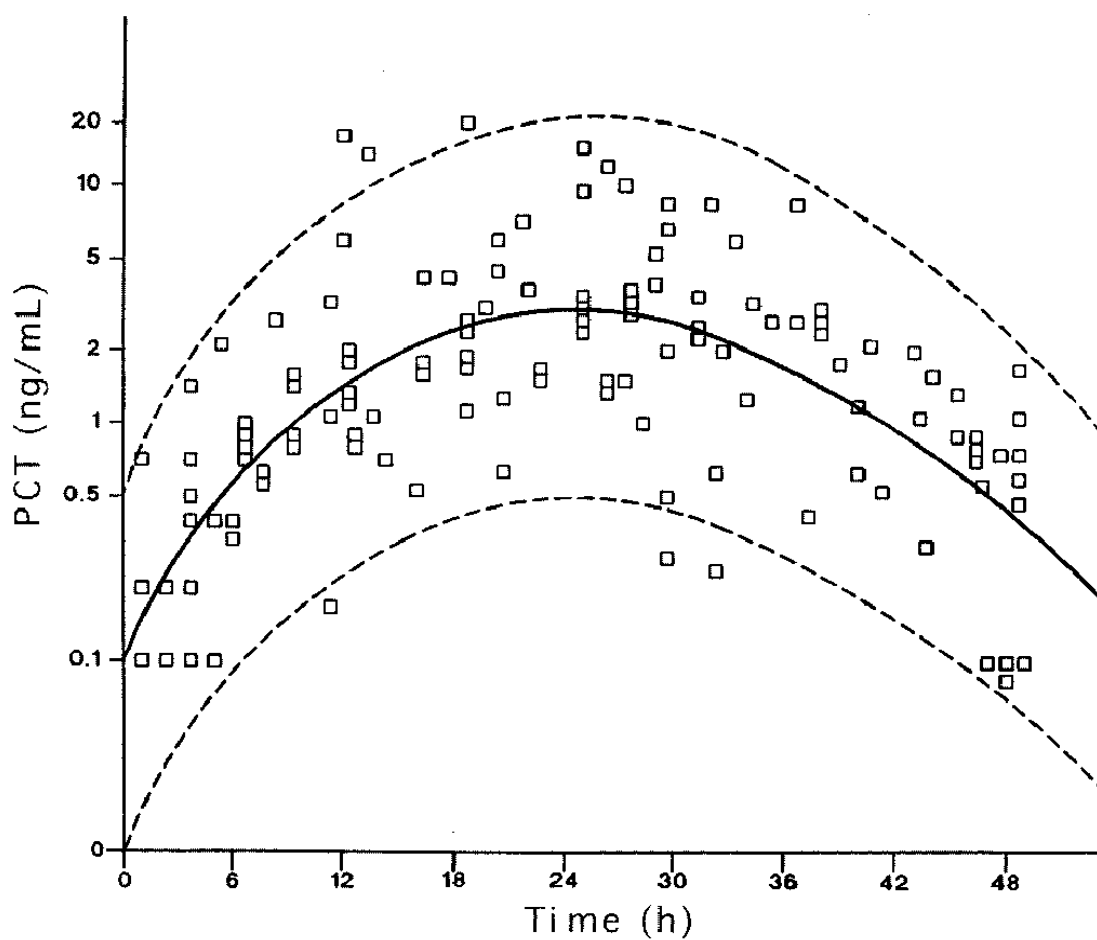
2.2.2.2 Prokalcitonin

Dalším z řady moderních laboratorních znaků sepse je prokalcitonin. Jedná se o prohormon kalcitoninu bez hormonální aktivity³⁷. PCT je bílkovina sestávající ze 116 aminokyselin a je kódován CALC-1 genem⁵⁷. Při nepřítomnosti infekčního stimulu je transkripce CALC-1 genu pro PCT v non-neuroendokrinních tkáních potlačena⁵⁸. Mikrobiální infekce je zodpovědná za zvýšení exprese genu CALC-1 a následné uvolnění prekurzorů kalcitoninu z buněk a tkání celého těla⁵⁹. Nejvyšší množství PCT začnou játra produkovat při sepsi. Jeho sérová koncentrace se pak zvyšuje až 1000násobně. Stejně jako CRP je PCT stimulován centrálními cytokiny IL-6, IL-1 β a TNF- α . Jeho stimulace ale může proběhnout i přímo mikrobiálními lipopolysacharidy³⁷.

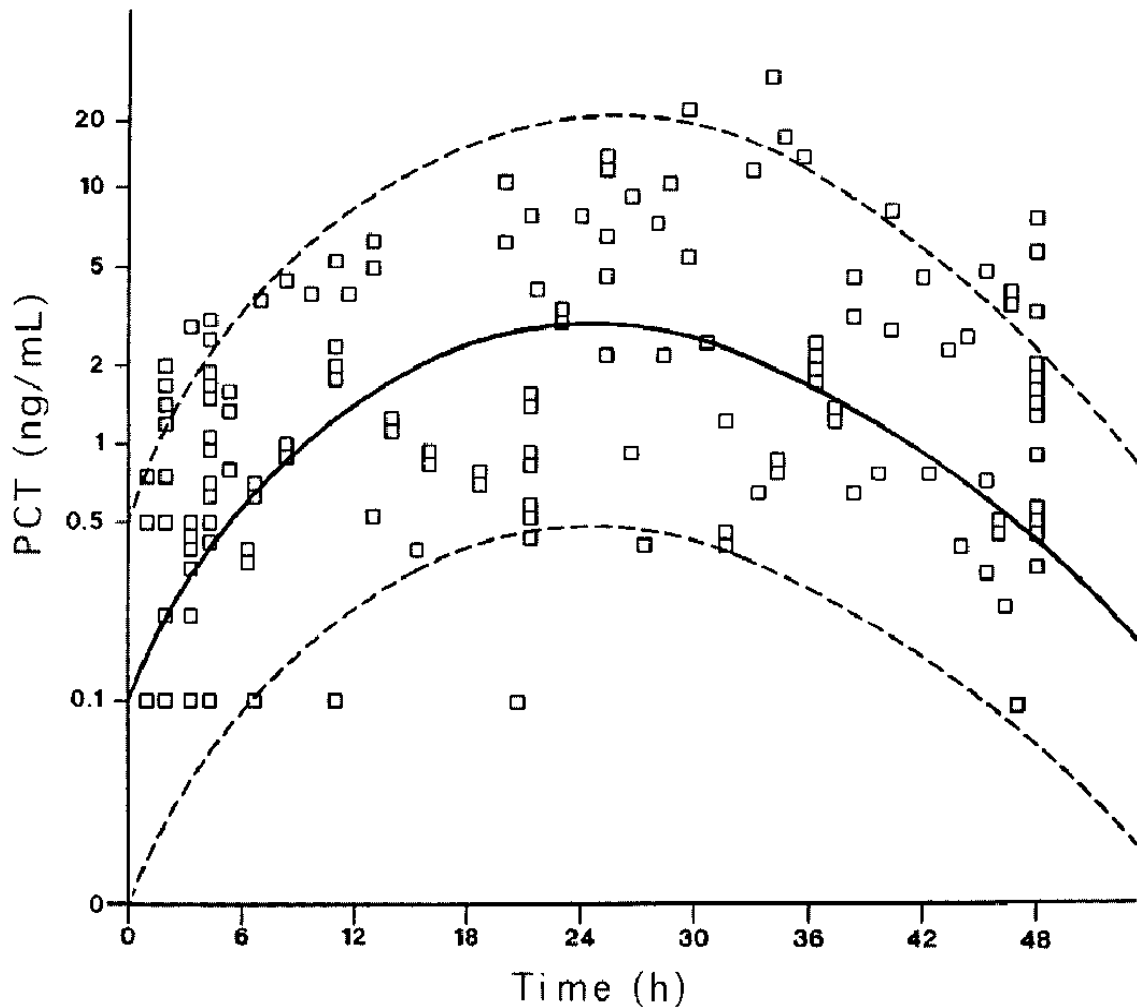
Pro diagnostiku časně novorozenecké sepse je největším úskalím jeho fyziologické zvýšení v prvních hodinách a dnech života^{60,61}. Detailní přehled o postnatálních hodnotách PCT podala letitá, ale ceněná studie německých vědců z roku 1998⁶¹. Tito měřili PCT u novorozenců bez prokázané sepse. Do studie byli zahrnuti předčasně narození i novorozenci narození v termínu. PCT měřili ve dvou obdobích: 0-48 hodin po porodu (diagnostika EOS) a 3-30 dní po porodu (diagnostika LOS). Jak ukazují výsledky této studie, a můžeme je vidět na grafech 1

a 2, v prvních dnech života dítěte jsou sérové hladiny PCT, bez ohledu na infekci, fyziologicky zvýšené a velmi dynamické. Diagnostika časně EOS pomocí PCT se tímto komplikuje.

Graf 1. Věkově specifické referenční rozmezí prokalcitoninu u zdravých novorozenců. Časové rozmezí od narození do 48. hodiny života. Čtverce představují jednotlivé hodnoty, tečkované čáry představují spodní a horní hranici, tučná čára představuje geometrický průměr. (Převzato z Chiesa et al., 1998 ⁶¹)

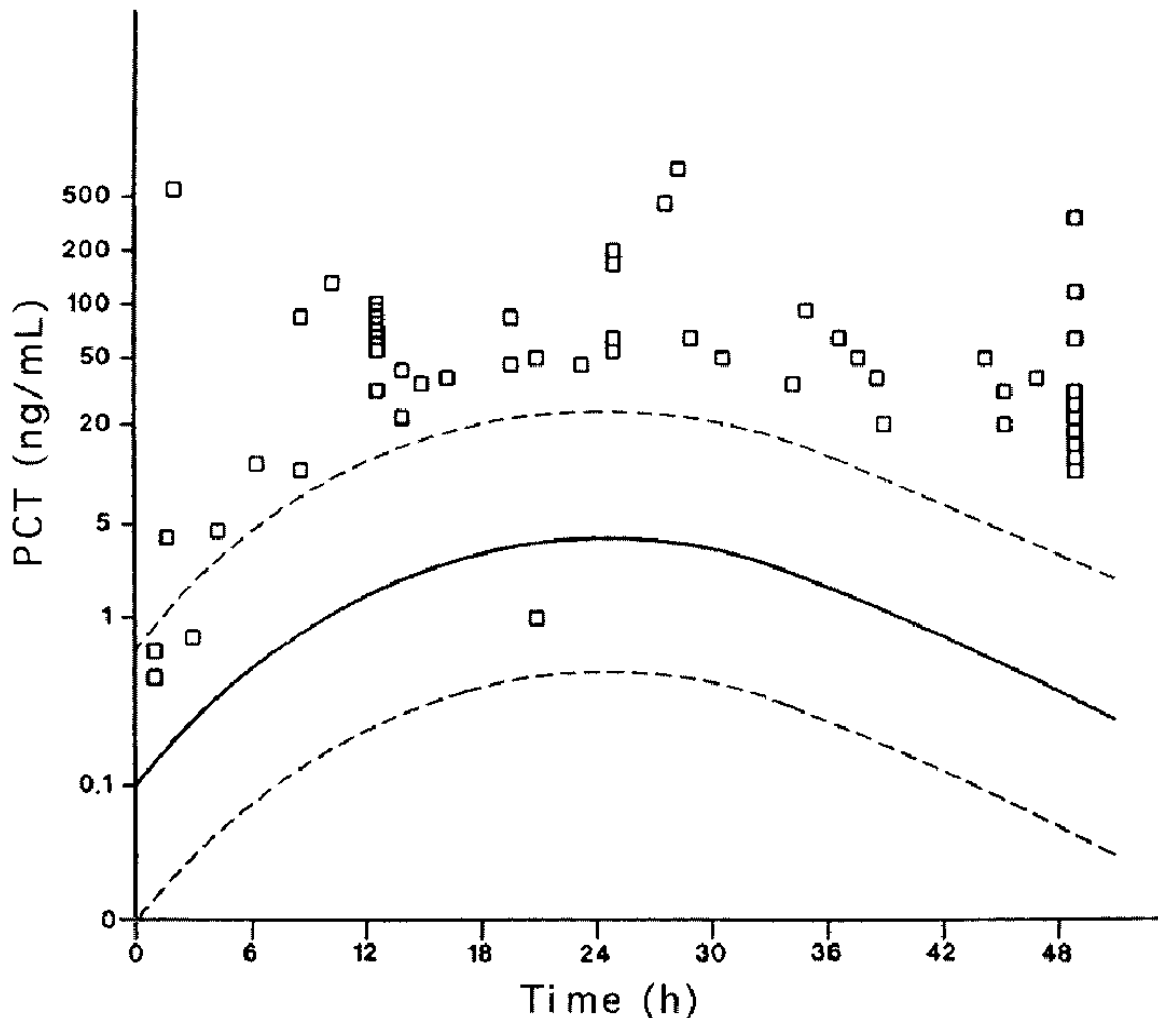


Graf 2. Distribuce hodnot prokalcitoninu získaných od novorozenců přijatých na JIP pro jiný než infekční důvod. Časové rozmezí od narození do 48. hodiny života. Čtverce představují jednotlivé hodnoty. Tečkované čáry představují spodní a horní hranici, tučná čára představuje geometrický průměr. (Převzato z Chiesa et al., 1998)⁶¹



Určitá výhoda PCT v diagnostice novorozenecké sepse je jeho nezávislost na většině perinatologických faktorů. Jedním z faktorů, které jeho hladinu v prvních hodinách života ovlivňují, je gestační diabetes matky. Děti těchto matek mají hladiny PCT zvýšené nad limit⁶¹. V pozdější studii stejných autorů vidíme jako signifikantní faktor poporodního zvýšení PCT pouze předčasný odtok plodové vody, a to na hladině významnosti PCT $p = 0,05$ ⁶². Pokud počítáme s jeho fyziologicky zvýšenou hladinou v prvních dvou dnech života, pak se PCT může stát dobrým laboratorním ukazatelem časně novorozenecké sepse, jak můžeme vidět na grafu 3.

Graf 3. Distribuce hodnot prokalcitoninu u pacientů s časnou novorozeneckou sepsí. Časové rozmezí od narozením do 48. hodiny života. Čtverce představují jednotlivé hodnoty, tečkované čáry představují spodní a horní hranici referenčního rozsahu, tučná čára představuje geometrický průměr. (Převzato z Chiesa et al., 1998)⁶¹



V diagnostice pozdní novorozenecké sepse se prokalcitonin běžně užívá. Hladiny PCT se při infekci, resp. sepsi rychle zvyšují. Lze je detekovat 6 hodin po infekci, přičemž vrcholí za 18 až 24 hodin a zůstávají zvýšené až 48 hodin. Kromě diagnostiky lze PCT využít také v hodnocení závažnosti nemoci a úspěšnosti antibiotické terapie – jeho hladiny po podání antimikrobiální terapie rychle klesají⁶³. Dle přehledu a systematického přehledu z roku 2021 je PCT označován jako slibný marker v rychlé diagnostice novorozenecké sepse, jeho plazmatické hladiny jsou významně vyšší u pacientů s potvrzenou pozdní novorozeneckou

sepsi^{64,65}. Ve studii, která vyšla o rok později, potvrdili tuto skutečnost pouze u novorozenců s EOS, u LOS byly hladiny PCT neprůkazné⁶⁶.

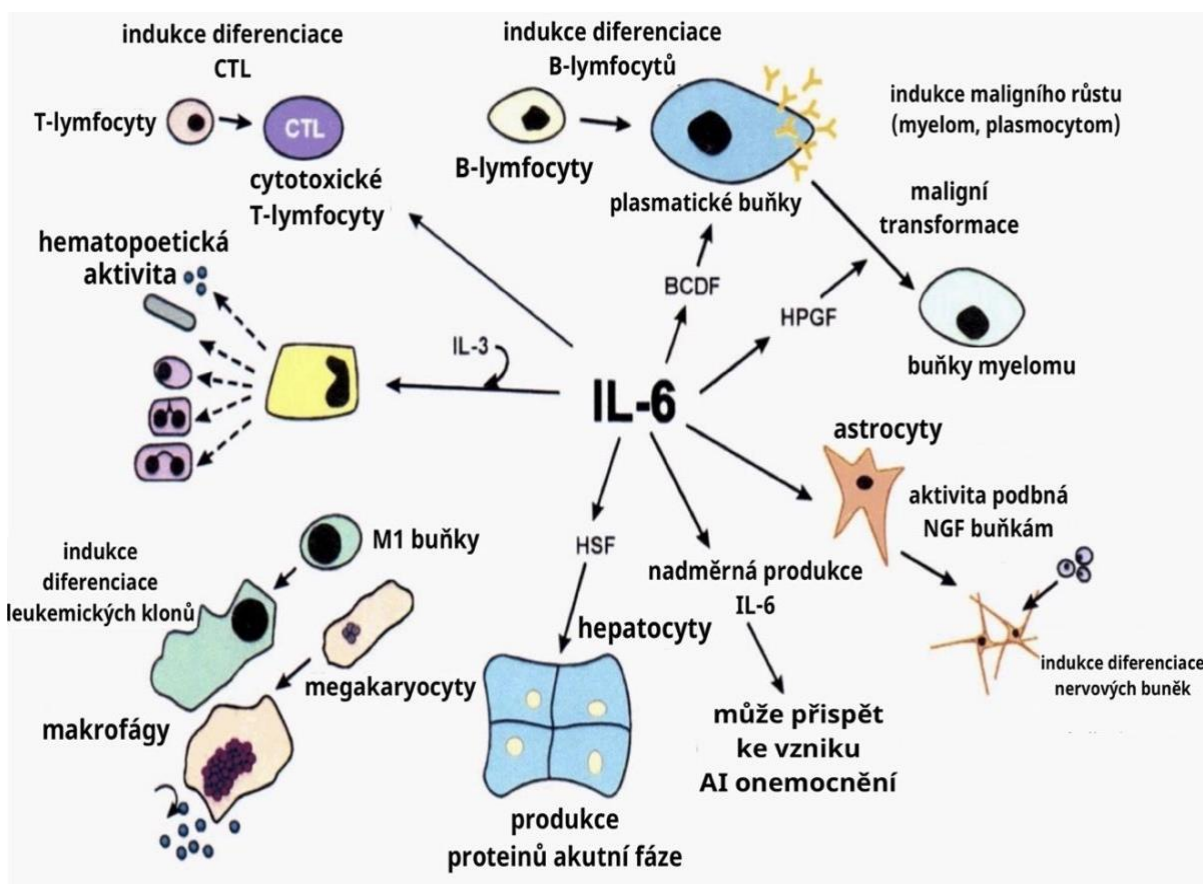
2.2.2.3 Interleukin – 6

Interleukin-6 je cytokin, který hraje jednu z hlavních rolí (centrální) v obraně organismu. Je produkován T - a B - lymfocyty, monocyty, fibroblasty, keratinocyty, endoteliálními buňkami, mesangiálními buňkami, adipocyty a některými nádorovými buňkami. Jeho produkce je odpovědí organismu na infekci či poškození tkáně. IL-6 je jedním z nejvíce exprimovaných mediátorů zánětu⁶⁷. Syntéza IL-6 buňkami imunitního systému je zahájena bezprostředně jako odpověď na PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), resp. DAMPs na postiženou zánětlivě změněnou tkáň⁶⁸. Tento protein byl objeven v 80. letech 20. století. V průběhu let se ukázalo, že je nositelem řady biologických funkcí. Postupem času získával různá pojmenování, která reflektovala právě tyto funkce. Stručný seznam uvádí tabulka 2. Název interleukin-6 se poprvé objevil ve studii *The Biology of Interleukin-6* z roku 1989 od japonského autora Kishimota⁶⁹.

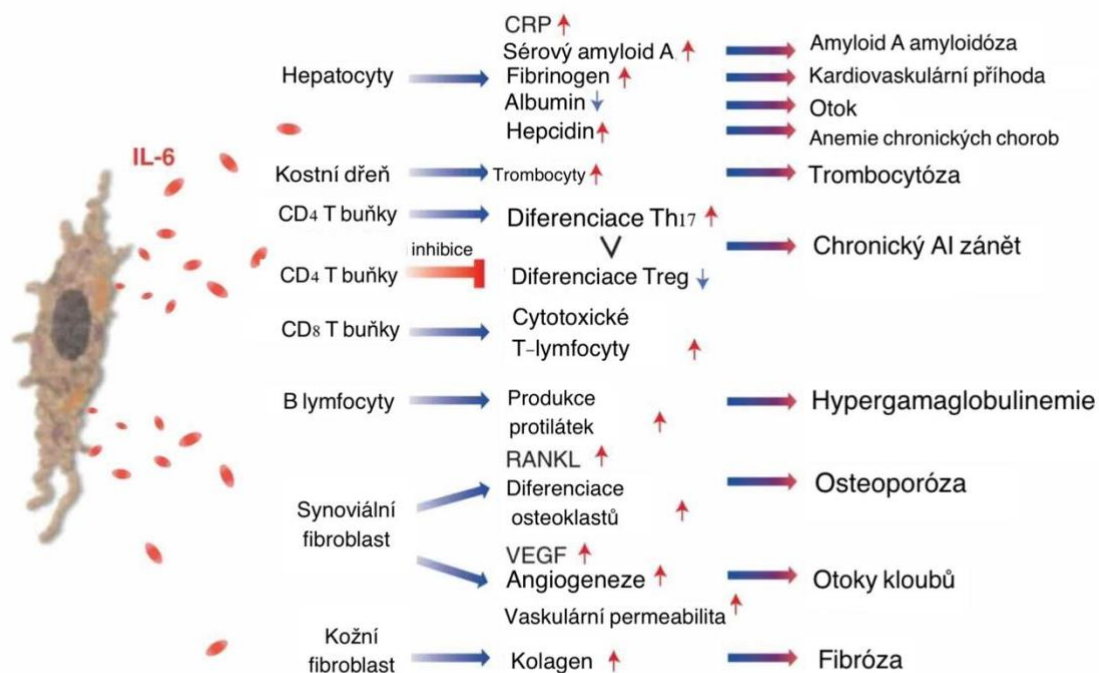
Tabulka 2. Synonyma interleukinu-6. (Upraveno dle Simpsona et al., 1997)⁷⁰

Synonyma	Autoři, rok
interferon- β_2	Weissenbach et al., 1980; Zilberstein et al., 1986
26K factor	Content et al., 1982; Haegeman et al., 1986
B-cell stimulatory factor 2	Hirano et al., 1985
hybridoma growth factor	van Snick et al., 1986; Brakenhoff et al., 1987
plasmacytoma growth factor	Nordan et al., 1987
hepatocyte- stimulatory factor	Gauldie et al., 1987
hematopoietic factor	Ikebuchi et al., 1987
cytotoxic T-cell differentiation factor	Takai et al., 1988

Jakmile se krevním řečištěm dostane do jater, dojde k rychlé syntéze a uvolnění proteinů akutní fáze. Těmito proteiny jsou CRP, sérový amyloid A, fibrinogen a haptoglobin. Reaktanty akutní fáze, u kterých vyplavením IL-6 dochází k jejich snížení, jsou albumin a transferin. Hematopoetická funkce IL-6 spočívá v maturaci megakaryocytů v kostní dřeni a tím k vyplavení krevních destiček. Zvýšením hladiny hepcidinu je IL-6 zodpovědný za nízkou hladinu sérového železa u anemie chronických chorob. Hepcidin ve střevě blokuje železový transportér ferroportin 1 a tím snižuje hladinu sérového železa. Důležitou imunologickou funkcí IL-6 je pomoc v diferenciaci naivních CD4+ a CD8+ T – lymfocytů a díky IL-6 jsou aktivované B – lymfocyty schopné diferenciaci do plasmatických buněk produkujících protilátky. Nadměrná syntéza IL-6 může tedy vést k hypergammaglobulinemii, produkci autoprotilátek a rozvoji autoimunitních onemocnění⁷¹. Obrázky 1 a 2 podávají přehledný schematický popis těchto funkcí.



Obrázek 1. Přehled biologického působení interleukinu-6 (upraveno dle Simpsona et al., 1997)⁷⁰



Obrázek 2. Interleukin-6 při imunitní odpovědi, při zánětu a onemocnění. IL-6 je cytokin vykazující pleiotropní aktivitu; indukuje syntézu proteinů akutní fáze jako jsou CRP, sérový amyloid A, fibrinogen a hepcidin v hepatocytech, zatímco inhibuje produkci albuminu. IL-6 hraje důležitou roli v získané imunitní odpovědi stimulací produkce protilátek a vývoje efektorových T-buněk. Kromě toho může IL-6 podporovat diferenciaci nebo proliferaci několika neimunitních buněk. Díky pleiotropní aktivitě vede dysregulovaná kontinuální produkce IL-6 ke vzniku nebo rozvoji různých onemocnění.

Treg = regulační T lymfocyt. RANKL = receptorový aktivátor ligandu jaderného faktoru kB (NF-kB). VEGF = vaskulární endoteliální růstový faktor.

(upraveno dle Tanaky et al., 2014)⁷¹

IL-6 je velmi rychlý a dynamický biomarker a silný induktor produkce proteinů akutní fáze v játrech⁷². Poté, co dojde k uvolnění částí bakteriální buněčné stěny, jeho hladina vzroste během 2 hodin, maximálních hodnot dosáhne do 6 hodin. Krátký poločas IL-6 je dán především jeho vazbou na plasmatické bílkoviny, časným uskladněním v játrech a inhibicí ostatními cytokiny⁷³. Hodnoty IL-6 jsou signifikantně zvýšeny již 48 hodin před objevením klinických příznaků sepse⁷⁴. Vzhledem k jeho krátkému poločasu je již 24 hodin po infekčním stimulu

v plazmě téměř neměřitelný a není využitelný pro monitorování léčby⁴⁴. Pro krátký biologický poločas nemusíme zachytit peak a měl by být kombinován s „pozdějším markerem“, např. CRP¹³. Díky vysoké senzitivitě a rychlosti vzestupu je IL-6 vhodný laboratorní znak pro včasnou diagnostiku novorozenecké sepse. Nevýhodou je jeho nižší specificita⁷³.

2.2.2.4 nCD64

Kvantifikace výskytu povrchových buněčných znaků metodou průtokové cytoflowmetrie je další možností v diagnostice novorozenecké sepse. Jako nejvhodnější se jeví stanovení povrchových znaků na neutrofilech. Nejvíce zkoumán je povrchový receptor nCD64. Tento znak je u klidových neutrofilů téměř neměřitelný. Jeho exprese se rychle zvyšuje při zánětlivé reakci a aktivaci neutrofilů. Tento vzestup je násobný – velmi významný – a je možno jej zaznamenat běžnými metodikami používanými při průtokové cytometrii⁷⁵. Výhodou tohoto povrchového znaku jsou jeho stabilní hladiny⁷⁶. Ukázalo se také, že exprese nCD64 není ovlivněna tranzitorní tachypnoí novorozence, syndromem respirační tísně, ani dalšími perinatologickými proměnnými⁷⁷. Dle meta-analýzy čínských autorů z roku 2016 nemá nCD64 dostatečně vysokou specificitu a senzitivitu k diagnostice novorozenecké sepse. Jedním z důvodů těchto závěrů může být fakt, že novorozenci méně exprimují neutrofilů při infekci gramnegativními bakteriemi. Výsledky ukazují, že je třeba tento povrchový znak kombinovat s dalšími laboratorními parametry⁷⁸. Ke stejným závěrům došla i meta-analýza z roku 2019. Autoři doporučují kombinaci nCD64 a CRP pro větší diagnostickou přesnost ve srovnání se samotným nCD64, IL-6, PCT, CRP a PCT +CRP⁷⁹.

2.3 Sepse a její definice v kontextu pediatrických a neonatologických odlišností

Sepse má v celosvětovém měřítku za následek 19 % všech úmrtí. Nejvyšší úmrtnost nacházíme u dětí mladších 5 let. V této věkové kategorii představují novorozenci 47 % všech úmrtí⁸⁰. Výraz seps pochází z řeckého výrazu sepsin a znamená hnít, zhnisat⁸¹. Dle „The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)“ z roku 2016 je nejnovější definice sepse zaměřena na orgánovou dysfunkci a metabolické děje vedoucí k orgánovým selháním. Sepse je život ohrožující orgánová dysfunkce způsobená dysregulovanou odpovědí hostitele na infekci. Tento stav postupně vede k septickému šoku. Septický šok je klinická podskupina sepse. Základní cirkulační a buněčně/metabolické abnormality jsou u šoku tak závažné, že podstatně zvyšují úmrtnost¹⁰. Jak každý pediatr ví, dítě

není malý dospělý. Proto je potřeba brát výše zmíněnou definici s rezervou. Jedním z kritérií septického šoku je hypotenze. U dětí krevní tlak klesá až v preterminální fázi, ve fázi dekompenzace, tedy až po vyčerpání všech kompenzačních mechanismů. V žádném případě není hypotenze časným symptomem závažnosti stavu. Pozornost je od počátku třeba věnovat těmto symptomům: tachykardie, chladná akra s oslabenými pulzacemi a prodlouženým kapilárním návratem, snížená diuréza. V dětské intenzivní péči je příhodnější sepsi označovat jako orgánovou dysfunkci spojenou se sepsí a septický šok jako sepsi s kardiovaskulární dysfunkcí (včetně hypotenze, potřeby léčby vazoaktivními látkami nebo zhoršené perfuze)⁸².

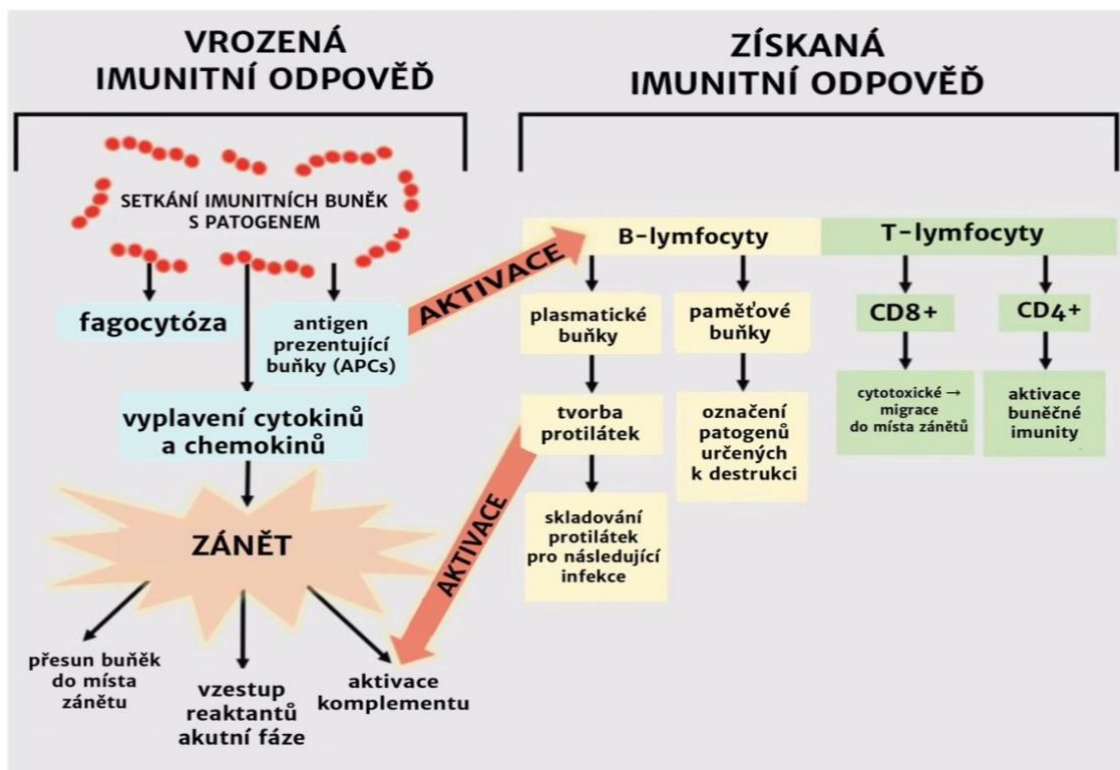
Pro novorozence výše zmíněné neplatí. Nejčastější definice popisuje novorozeneckou sepsi jako systémovou bakteriální, virovou či mykotickou infekci, která představuje potenciálně smrtelnou hrozbu pro donošené i předčasně narozené děti⁸³. V přesné definici novorozenecké sepse existuje značná heterogenita. Dle systematického přehledu, který se touto problematikou zabýval, 85 % studií se pro definitivní diagnózu sepse spoléhalo na mikrobiologickou kultivaci. Většina těchto definic se ve skutečnosti zaměřuje spíše na popis „bakteriémie“ než „sepse“⁸⁴. Což je v rozporu s výše zmíněnou definicí dle Sepsis-3, která popisuje „zánětlivé reakce hostitele s poškozením koncových orgánů“ nezávisle na mikrobiální detekci. Kromě toho jsou klinické příznaky novorozenecké sepse a infekce velmi nespecifické a nespolehlivé. Určité symptomy však mohou převládat. Jsou to systémové příznaky jako letargie, intolerance krmení a teplotní nestabilita, a kardiorespirační příznaky včetně hypotenze a respirační tísně. Dva z nejčastěji uváděných příznaků – hypotenze a respirační tíseň – stejně jako počet krevních destiček jsou parametry orgánového selhání měřené ve skóre SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) v doporučeních Sepsis-3¹⁰. Termín těžká sepse je považován za zastaralý a v dospělých, ani dětské intenzivní péči se již tento pojem nepoužívá. Ve studiích zabývajících se novorozeneckou sepsí je těžká sepse charakterizována jako přítomnost orgánové dysfunkce, což je klíčový rys definice sepse u dospělých, resp. dětí dle Sepsis-3¹⁰.

Novorozenci jsou ve většině případů vystaveni jiným patogenům než starší děti, ať už to jsou mikroorganismy způsobující intrauterinní infekce či patogeny získané vertikálním přenosem během porodu. Vzhledem k nezralosti imunitního systému je reakce novorozenců na patogeny rozdílná, často bouřlivější s progresí lokálního nálezu. Patogeny, které jsou u starších dětí nebo dospělých často považovány za kontaminanty, způsobují u novorozenecké populace významnou nemocnost a úmrtnost. Vzhledem k rychlému vývoji mozku v novorozeneckém období musíme mít na paměti i dlouhodobý vývoj dítěte v důsledku prodělané novorozenecké

sepsi. Výsledky systematického přehledu a meta-analýzy z roku 2019 ukazují, že sepsi u předčasně narozených dětí (pod 32. gestačním týdnem) může mít hluboký dopad na dlouhodobý neurologický vývoj těchto dětí ve srovnání s předčasně narozenými dětmi, které sepsi neprodělaly¹¹.

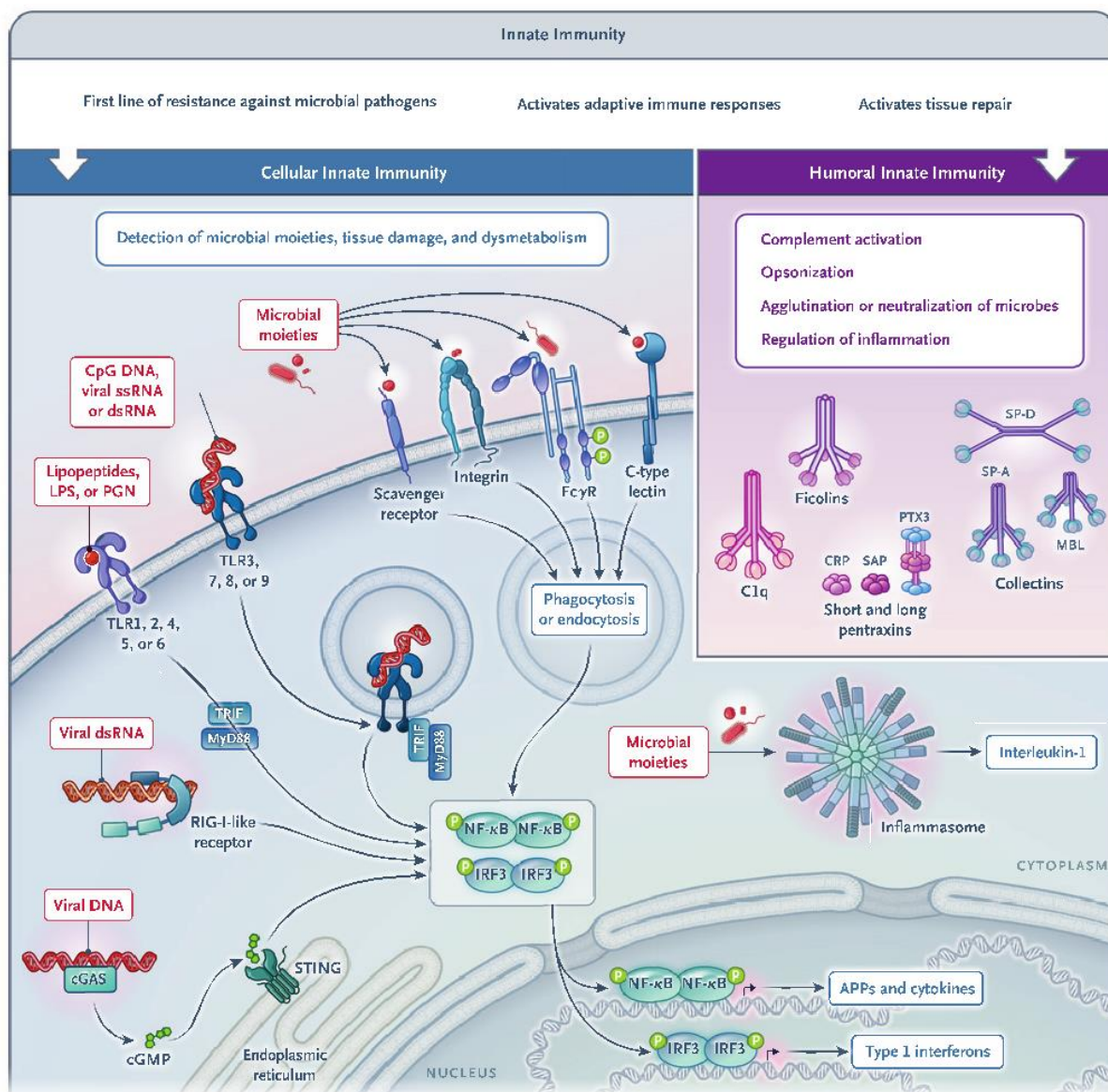
2.4 Imunologická podstata novorozenecké sepsi

Vzhledem k omezené expozici mikrobům z vnějšího prostředí jsou novorozenci nuceni spoléhat se převážně na vrozený imunitní systém. Tento systém nabízí rychlou, avšak krátkodobou a nespecifickou odpověď na mikroorganismy⁸⁵. Vrozená imunita je první linií obrany vůči mikrobiálním patogenům a podílí se jak na aktivaci adaptivní imunitní odpovědi, tak na tkáňové reparaci. Vrozenou imunitu tvoří buněčné a humorální rameno. Vrozený systém reguluje toleranci k sobě samému a interaguje s T- a B- lymfocyty ze získaného imunitního systému. Získaná imunita je pomalejší, ale více cílená imunitní odpověď. Je řízená lymfocyty a mateřskými protilátkami⁸³. Základní schéma vidíme na obrázku 3.



Obrázek 3. Kaskáda imunitní odpovědi a interakce vrozeného a získaného imunitního systému (upraveno dle Glaserové et al.,2021)⁸³.

Jakmile patogen obejde epiteliální bariéry, jsou jeho molekulární vzorce spojené s patogeny (PAMPs) detekovány receptory rozpoznávající patogeny (PRR). Jedny z nejdůležitějších jsou Toll-like receptory (TLRs)⁸⁵. TLRs jsou součástí vrozené imunity. Jejich vzájemné působení s mikroorganismy je zásadní pro produkci a uvolnění cytokinů, chemokinů, proteinů komplementu a koagulačních faktorů^{85,86}. Známe 10 typů TLRs s rozdílnými funkcemi⁸⁷. Například TLR4 rozeznávají lipopolysacharidy buněčné stěny gramnegativních bakterií. Aktivují polymorfonukleáry, monocyty a makrofágy a ty pak spouští imunitní odpověď⁴⁵. Podrobné schéma vidíme na obrázku 4. Exprese TLRs je u novorozenců, dětí i dospělých podobná. Avšak u předčasně narozených novorozenců byla popsána nižší exprese TLR2 a TLR4 na povrchu makrofágů. Následné reakce na vazbu PAMP-TLR se liší. V novorozeneckém období jsou funkce TLR insuficientní. Po stimulaci jednotlivých TLRs in vitro produkují novorozenecké antigen prezentující buňky méně prozánětlivých (IL-1b, TNF-a) a Th1 podporujících cytokinů (IL-12p70, typ 1 interferon), ale stejné nebo větší množství cytokinů podporujících Th17 (IL-23, IL-6) ve srovnání s dospělými buňkami⁸⁸. Tato funkční nedostatečnost je jeden z predisponujících faktorů vedoucí k rozvoji septického stavu^{85,89}. Velkou roli v reakci novorozeneckého organismu na infekci hrají genetické faktory. Do budoucna bude potřeba tyto genetické faktory rozpoznat a pracovat s nimi převážně v terapeutické rovině. Polymorfismus TLR4, které jsou důležité pro zahájení vrozené imunitní odpovědi aktivováním intracelulárních signálních cest a rozpoznáním lipopolysacharidů gramnegativních bakterií, je spojován s možnou příčinou zvýšené náchylnosti k septickým stavům⁸⁷.



Obrázek 4. Vrozená imunita – buněčné a humorální rameno (převzato od Mantovani et al.,2023)⁷²

cGAS – cyclic GMP-AMP synthase, cGMP – cyclic guanosine mono-phosphate, dsRNA – double-stranded RNA, IRF – interferon regulatory factor, LPS – lipopolysaccharide, MBL – mannose-binding lectin, MyD88 – myeloid differentiation primary response 88, NF- κ B nuclear factor kappa B, PGN - peptidoglycan, RIG-I - retinoid acid-inducible gene I, SAP - serum amyloid P, SP-A - surfactant protein A, SP-D - surfactant protein D, ssRNA - single-stranded RNA, STING - stimulator of interferon genes, TRIF - toll/interleukin-1 receptor–domain–containing adapter- inducing interferon- β .

U novorozenců jsou neutrofilů hlavními aktéry imunitní odpovědi v boji proti infekci. Na zvířecích modelech můžeme vidět, že novorozenci mají ve srovnání s dospělými jedinci desetkrát nižší rezervy neutrofilů⁹⁰. Novorozenecké neutrofilů vykazují sníženou deformabilitu. Ve spojení s hypotenzí může být příčinou mikrovaskulární okluze a následné orgánové dysfunkce. Neutrofilů u novorozenců mají narušenou schopnost tvorby NET (Neutrophil Extracellular Trap), snížené fagocytární funkce a nízké hladiny baktericidních proteinů. Kromě toho jsou méně účinné v reakci na apoptotické podněty. Kombinace těchto změn ve funkcích neutrofilů je jednou z příčin větší náchylnosti novorozenců k infekci, resp. sepsi. A tyto změny v buněčné imunitě se netýkají pouze neutrofilů. Novorozenci mají nízké hladiny antigen prezentujících buněk (APC), monocytů a dendritických buněk. Žírné buňky novorozenců uvolňují po stimulaci více histaminu, než buňky dospělých. Uvolněný histamin může potenciálně přispívat k vazodilataci a septickému šoku⁸⁵.

2.5 Shrnutí teoretické části

Novorozenecká sepsis je jedním z největších problémů v neonatologii. I přes veškerý pokrok, který obor prodělal, zůstává sepsis příčinou 13 % všech novorozeneckých úmrtí a má za následek 42 % všech úmrtí v prvním týdnu života⁸⁵. Abychom mohli danou nemoc správně léčit, musí se v první řadě správně a rychle diagnostikovat. Vzhledem k akutnosti stavu je diagnostická rychlost a přesnost v případě sepsis klíčová. Klinické projevy sepsis jsou v novorozeneckém období velmi nespecifické, což diagnostiku stěžuje. Proto je potřeba umět správně porozumět laboratorním znakům, které se při podezření na sepsis již používají, či najít znaky nové, lepší a přesnější ve své výpovědní hodnotě.

3 Experimentální část

3.1 Projekt 1. Stanovení sérového kalprotektinu u předčasně narozených novorozenců a jeho význam v diagnostice časně novorozenecké sepse

Výskyt infekčních komplikací, zejména bakteriální sepse, je v novorozeneckém věku vysoký. Je to dáno mimo jiné specifickými vlastnostmi imunitního systému novorozence. Časná diagnostika infekcí je v tomto období zásadní, rozhoduje o dalším osudu dítěte. Laboratorní biomarkery sepse známé z klinické praxe mají své limity. Dynamika laboratorních známek zánětu užívaných běžně v jiných věkových skupinách je v novorozeneckém věku odlišná, často závisí na postnatálním i chronologickém věku dítěte, což diagnostiku dále komplikuje. Jedním z nadějných laboratorních znaků je kalprotektin. Tento marker má svou nezastupitelnou úlohu převážně v gastroenterologii. Ale postupně si nachází své místo u mnohých nemocí napříč lékařskými obory.

Kalprotektin je leukocytární cytosolový protein, který se uvolňuje z leukocytů po jejich aktivaci nebo lýze. Pro tuto svou vlastnost se používá jako laboratorní znak aktivace granulocytů⁵¹. Nejznámější a nejčastější je jeho užití v gastroenterologii. Využívá se stanovení obsahu kalprotektinu ve stolici, je ukazatelem zánětlivé aktivity ve střevě. Měření kalprotektinu v séru je v praxi využíváno málo. V několika studiích bylo popsáno jeho použití v diagnostice novorozenecké infekce⁹¹⁻⁹³. Jak bylo zmíněno, elevace kalprotektinu je známkou aktivace granulocytů a ukazatelem probíhající zánětlivé aktivity. Je možné se domnívat, že jeho sérová hladina bude zvýšená také u septických stavů. V rámci hledání nových laboratorních znaků sepse jsme vzhledem k výše uvedeným vlastnostem kalprotektinu zahájili tuto studii.

3.1.1 Cíle studie

Cílem projektu bylo ověření významu sérového kalprotektinu v diagnostice časně novorozenecké sepse.

3.1.2 Pacienti a metody

3.1.2.1 Pacienti

Studie probíhala v roce 2016 na Jednotce intenzivní a resuscitační péče Novorozeneckého oddělení Fakultní nemocnice Olomouc. Do studie byli zařazeni předčasně narození novorozenci (< 35. týden gestace), kteří naplnili některá z níže uvedených kritérií pro diagnózu sepse. Novorozenci, kteří tato kritéria nenaplnili, byli zařazeni do kontrolní skupiny. Studie se zúčastnilo celkem 65 novorozenců.

3.1.2.2 Metody

U všech novorozenců narozených před ukončeným 35. týdnem gestace se na našem pracovišti provádí do 2 hodin od porodu odběr žilní krve v rámci skříninku časně novorozenecké sepse - 0,5 ml periferní krve na stanovení krevního obrazu a diferenciálního rozpočtu leukocytů a 0,5 - 1 ml krve k biochemické analýze (CRP, IL-6). Vzorek krve k biochemické analýze jsme použili k vyšetření kalprotektinu, nebylo tedy třeba zvláštního odběru. Doplnění vyšetření bylo v souladu s informovaným souhlasem stvrzeným zákonnými zástupci dítěte. Krevní obraz a diferenciální rozpočet leukocytů, CRP a IL-6 byly měřeny klasickými, již zavedenými metodami. Kalprotektin byl analyzován pomocí testovacího kitu Quantum Blue MRP8/14 (imunochromatografický test) s detekcí pomocí přístroje Quantum Blue reader firmy BÜHLMANN. Test je navržen pro selektivní kvantitativní měření antigenu kalprotektinu (MRP8/14) pomocí sendvičové imunoanalýzy. Touto soupravou se stanovuje kalprotektin v rozmezí 0,5 – 10 µg/ml, po naředění vzorku extrakčním pufrům až do 100 µg/ml. V soupravě jsou použity monoklonální protilátky vysoce specifické pro MRP8/14, analýza je kalibrována pomocí testu BÜHLMANN MRP8/14 ELISA. U každého testu probíhá zároveň kontrolní měření pro ověření funkčnosti a správného provedení analýzy, pro platný výsledek je požadována viditelná kontrolní linie. Test pomáhá rychle stanovit první odhad akutního zánětlivého stavu pacienta. Tuto metodu jsme zvolili, jelikož je možnost získat výsledek do pár hodin i ve službě.

Diagnostická kritéria pro sepsi a zahájení ATB terapie:

- klinický obraz sepse, celkové zhodnocení stavu (může se objevit - náhle vzniklá potřeba kyslíku, ventilační podpora, apnoické pauzy, bradykardie, hypotenze, intolerance glukózy, kapilární návrat > 3 s, rozdíl teploty mezi periferií a tělesným jádrem > 2 °C, letargie/dráždivost, tepelná nestabilita, intolerance stravy, zvýšení sérového bilirubinu, oligurie, metabolická acidóza)
- laboratorní parametry: CRP > 10 mg/l a IL-6 > 250 ng/l
- pozitivní mikrobiologické kultivační vyšetření krve (ev. mozkomíšní mok, kůže a jiné) – není podmínkou

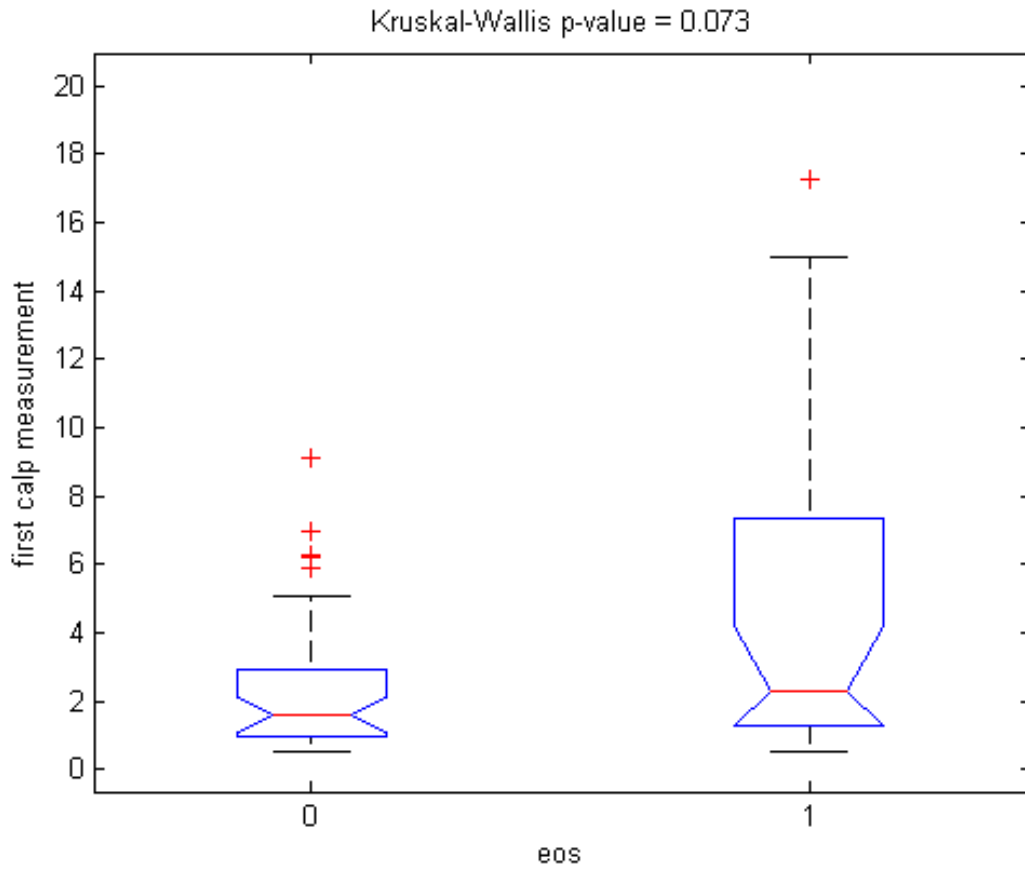
3.1.3 Etika

K analýze vzorku nebylo třeba zvláštního odběru. Vyšetření byla provedena z materiálu získaného pro odběry prováděné standardním způsobem dle zvyklostí pracoviště. Doplnění vyšetření bylo v souladu s informovaným souhlasem stvrzeným zákonnými zástupci dítěte.

3.1.4 Výsledky

Byly srovnány laboratorní hodnoty kalprotektinu dětí s adnatní infekcí s hodnotami kalprotektinu dětí bez potvrzené infekční komplikace. Celkový počet vyšetřených vzorků (novorozenců) byl 65. Z tohoto počtu jich 25 prodělalo časnou novorozeneckou sepsi (klinicky a laboratorně potvrzenou). Medián hodnot sérového kalprotektinu u novorozenců, kteří neměli infekční komplikaci, byl 1,7 µg/ml, medián hodnot u septických novorozenců byl 3,3 µg/ml. Rozdíl mezi sérovou hladinou u zdravých novorozenců a novorozenců s časnou novorozeneckou sepsí nebyl statisticky signifikantní ($p=0.0725$). Tyto výsledky vidíme na grafu 4.

Graf 4. Srovnání hodnot sérového kalprotektinu u novorozenců s časnou novorozeneckou sepsí (1) a zdravých kontrol (0). Tyto výsledky se pohybují na hranici významnosti ($p=0.0725$).



3.1.5 Diskuze

Kalprotektin se nachází v cytosolu buněk vrozeného imunitního systému. Uvolňuje se bezprostředně po interakci hostitel – patogen. Pro tuto vlastnost se používá jako laboratorní znak aktivace granulocytů a mononukleárů⁵¹. Dynamika tohoto markeru zatím není dostatečně prozkoumána. Normální hodnoty sérového kalprotektinu jsou v intervalu 0,1 a 1,6 µg/ml⁹⁴. Studie, které se případným využitím sérového kalprotektinu v diagnostice novorozenecké sepse zabývaly, jsou rozporuplné a s rozdílnými závěry.

V roce 2011 zkoumal Terrin a spol.⁹¹ diagnostickou přesnost sérového kalprotektinu v rámci diagnostiky pozdní novorozenecké sepse a porovnával jej s běžně užívanými laboratorními parametry jako jsou počet leukocytů, I/T index, počet krevních destiček a CRP. Tyto hodnoty měřil u 231 novorozenců, vstupní kritéria byla: porodní hmotnost < 1500 g, gestační stáří > 24 týdnů, postnatální stáří > 72 hodin, žádná antibiotická terapie během posledních 14 dnů. U novorozenců se suspekci na pozdní novorozeneckou sepsi byly vzorky odebrány během 60 minut od prvních příznaků, takto bylo vyšetřeno 93 dětí. Sérový kalprotektin byl měřen standardní ELISA metodou – commercial ELISA assay (Calprest, Eurospital, Trieste, Italy). U 62 novorozenců s potvrzenou LOS byla sérová koncentrace kalprotektinu signifikantně vyšší (3,1 +/- 1,0 µg/l) (p < 0.001) než u novorozenců, u kterých se sepse nepotvrdila (1,1 +/- 0,3 µg/l). U 110 zdravých kontrol byla hodnota 0,91 +/- 0,58 µg/l. O rok později egyptští neonatologové měřili sérový kalprotektin spolu s dalšími klasickými laboratorními biomarkery zánětu. Soubor čítal 48 donošených novorozenců a jednalo se také o diagnostiku pozdní novorozenecké sepse, kontrolní skupina měla 40 novorozenců. Časový údaj o odběru vzorku není k dispozici. Kalprotektin byl měřen standardní ELISA metodou – commercial ELISA assay (Calprest, Eurospital, Trieste, Italy). U novorozenců s potvrzenou LOS byla sérová hladina kalprotektinu vyšší (3,77±1,85 µg/mL) než u zdravých kontrol (0,70±0,33 µg/mL) (p=0,001). Novorozenci s pozitivním mikrobiologickým kultivačním vyšetřením krve a novorozenci, kteří na následky sepse zemřeli, měli nejvyšší hladiny kalprotektinu⁹². Sporné výsledky ukazuje studie z roku 2015 vedená doktorkou Decembrino. Porovnávala diagnostické možnosti a přesnost kalprotektinu a již zavedených laboratorních ukazatelů novorozenecké sepse. Nerozlišovali sepsi časnou a pozdní. Soubor čítal 41 novorozenců. Kalprotektin byl měřen standardní ELISA metodou - commercial ELISA assay (Calprest, Eurospital, Trieste, Italy). Data z této studie ukazují, že sérová koncentrace kalprotektinu je zvýšená u novorozenců s prokázanou sepsí. Medián hodnot kalprotektinu u osmi septických novorozenců s pozitivním

mikrobiologickým kultivačním vyšetřením krve byl 2,7 $\mu\text{g/ml}$. Suspektní sepsi mělo 33 novorozenců a medián hodnot kalprotektinu byl 1,9 $\mu\text{g/ml}$. Optimální cut-off hodnota, která dle této studie odliší septické a neseptické novorozence, je 2,2 $\mu\text{g/ml}$. Senzitivita této hodnoty je 62,5 % a specificita 69,7 %. V závěru studie je uvedeno, že jeho sérová hladina není ovlivněna gestačním stářím, pohlavím, ani způsobem porodu⁹³. Nadějně výsledky ukázala iránská studie případů a kontrol z roku 2017, kdy během prvních 72 hodin života odebrali vzorky krve novorozenců, kteří vykazovali známky sepse. Kontrolní skupinu tvořili novorozenci s ikterem, u kterých bylo nutné odebrat krev pro hodnocení sérové hladiny bilirubinu a dalších laboratorních markerů ke zjištění příčiny žloutenky. Z krve analyzovali standardní biochemické ukazatele a krevní obraz. Ve studii se pak zaměřili na kalprotektin a I/T index. Sérový kalprotektin byl měřen standardní ELISA metodou – Biovendor ELISA kit. Medián hodnot kalprotektinu ve skupině, která prodělala EOS a čítala 40 novorozenců, byl 23 760 ng/mL a ve skupině kontrolní, kde bylo také 40 dětí, byla hodnota 13 140 ng/mL, tyto výsledky byly na hladině významnosti 0.002⁹⁵. Recentní studie z loňského roku vedená doktorkou Pirr z německého Hannoveru testovala kalprotektin jakožto laboratorní parametr pozdní novorozenecké sepse u novorozenců narozených před 32. týdnem gestace. Sérový kalprotektin byl odebrán v době prvních klinických projevů sepse. Ve srovnání s CRP a IL-6 kalprotektin neukázal výhodu, nedokázal rozlišit mezi septickým a zdravým novorozencem⁹⁶.

Ve všech těchto pracích autoři využívali k měření sérového kalprotektinu standardní ELISA metody. Dalším důvodem nepřesvědčivých výsledků by bezesporu mohla být malá a nesourodá kohorta. Novorozenců s EOS bylo pouze 25, kdežto zdravých kontrol téměř dvojnásobně (40). Lze spekulovat, že při větší kohortě s EOS by výsledek mohl prokázat statisticky významné rozdíly (výsledek $p < 0.07$ naznačuje určitou statistickou tendenci). Rovněž při větší homogenitě pacientů s EOS (gestační stáří, hmotnost, perinatogické faktory) by se hodnoty mohly změnit. Kalprotektin je laboratorní známkou aktivace neutrofilů, je možné, že u předčasně narozených novorozenců, kdy jsou rezervy neutrofilů snadno vyčerpány kvůli snížené krvetvorbě v kostní dřeni, je během sepse jeho hodnota falešně negativní. Pro lepší pochopení a ev. využití kalprotektinu v rámci diagnostiky novorozenecké sepse by bylo potřeba detailně prozkoumat dynamiku tohoto markeru.

Tabulka 3. Výsledky odběrů z publikovaných studií zaměřených na kalprotektin a novovorzoneckou sepsi

studie	sepsse ano	sepsse ne	kontrolní skupina	počet	kalprotektin	CRP	leukocyty	IL-6	hemokultura
Terrin, 2011 ⁹¹	✓ LOS			62	3,1 µg/ml	13,1 mg/dl	16,645 × 10 ³ /mm ³	X	52+
		✓		29	1,1 µg/ml	6,2 mg/dl	14,837 × 10 ³ /mm ³	X	X
			✓	110	0,91 µg/ml	2,1 mg/dl	12,382 × 10 ³ /mm ³	X	X
Abdel-Maaboud, 2012 ⁹²	✓ LOS			48	1,5 - 6,5 µg/ml	8 - 29 mg/l	8 - 31 × 10 ³ /dl	10 - 250 pg/mL	8+, 40-
			✓	40	0,5 - 1,4 µg/ml	0,5 - 9 mg/l	3,8 - 16 × 10 ³ /dl	10 - 15 pg/mL	
Decembrino, 2015 ⁹³	✓				2,7 µg/ml	6 mg/dl	13,3 x 10 ³ /mm ³	X	8+
	✓				1,9 µg/ml	1,5 mg/dl	13 x 10 ³ /mm ³	X	33-
Shams, 2017 ⁹⁵	✓ EOS			40	23 760 ng/ml	X	10,42 x 10 ³ /dl	X	2+, 38-
			✓	40	13 140 ng/ml	X	3.85 x	X	

3.2 Projekt 2. Porovnání hladin interleukinu-6 z pupečnickové a periferní krve novorozence a definování jeho dynamiky ve vztahu k jednotlivým proměnným

Doporučeným postupem je útočná antibiotická léčba dětí s novorozeneckou sepsí a naopak vynechání antimikrobiální léčby u novorozenců bez onemocnění. Nadbytečná ATB terapie zasahuje do organismu nezralého dítěte, prokazatelně zvyšuje riziko vzniku nozokomiálních infekcí a dalších komplikací, např. nekrotizující enterokolitidy⁹⁷. Časná a spolehlivá diagnostika novorozenecké sepse je jednou ze zásadních otázek současné neonatologie. Hojně využívanými laboratorními biomarkery jsou proteiny akutní fáze a prozánětlivé cytokiny. Důležitý laboratorní znak je i IL-6. IL-6 je cytokin, který hraje důležitou roli v obraně organismu, a to díky svému imunitnímu a hematopoetickému působení a schopnosti vyvolat odpověď akutní fáze⁸. Překážkou pro dostupnost IL-6 na některých pracovištích zůstává jeho vysoká cena.

Novorozenci, především předčasně narození, patří mezi nejzranitelnější populaci dětských pacientů. Neinvazivní vyšetřovací metody by měly vždy, pokud to situace a stav dítěte dovolí, předcházet těm invazivním. Proto je snaha držet se toho všem známého hesla „*Primum non nocere*“, především neškodit.

Vždy když studujeme a v klinické praxi používáme konkrétní laboratorní parametr, je třeba znát jeho cut-off hodnoty. Chiesa et al.⁹⁸ nám ve své studii podal přehledný popis referenčních hodnot a postnatální dynamiky IL-6. Průměrná hodnota IL-6 u zdravých donošených novorozenců ihned po narození byla 1,69 pg/ml, ve 24. hodině života 4,09 pg/ml a 3,45 pg/ml ve 48. hodině života. Dynamika IL-6 u zdravých novorozenců narozených těsně před termínem s těmito výsledky korespondovala; 10,9 pg/ml (0 h), 9,3 pg/ml (24 h), a 8,4 pg/ml (48 h).

3.2.1 Cíle studie

Klinickým cílem naší studie bylo zjistit, zda lze vyšetřením krve z pupečnicku nahradit brzký postnatální odběr periferní krve. Jde o snahu omezit odběr periferní krve a nahradit ho nebolestivým odběrem z pupečnicku. Bylo nutné popsat hladiny IL-6 v pupečnickové krvi předčasně narozeného novorozence. Odběr IL-6 z periferní krve je již standardně zaveden v rámci diagnostiky novorozenecké sepse. Známe jeho cut-off hodnoty. Dále byla snaha porovnat pupečnickové a periferní hodnoty IL-6 a najít mezi nimi vztah v závislosti

na perinatálních faktorech jako je gestační stáří, způsob porodu, ATB podaná matce prenatálně, předčasný odtok plodové vody, sepse a asfyxie. Popřípadě zjistit, zda lze z pupečnickové hodnoty predikovat hodnotu periferní. Naše studie se týkala procesu diagnostiky časné novorozenecké sepse.

3.2.2 Pacienti a metody

3.2.2.1 Pacienti

Do studie byli zahrnuti novorozenci narození před ukončeným 35. týdnem gestace (<34+6), u kterých se zdařil odběr dostatečného množství pupečnickové krve. U všech dětí narozených před ukončeným 35. týdnem gestace se dle standardů pracoviště provádí do 2 hodin od porodu odběr žilní krve v rámci skríninku časné novorozenecké sepse – 0,5 ml periferní krve na stanovení krevního obrazu a diferenciálního rozpočtu leukocytů a 0,5 – 1 ml krve k biochemické analýze (CRP, IL-6).

3.2.2.2 Metody

Studie probíhala na Jednotce intenzivní a resuscitační péče Novorozeneckého oddělení Fakultní nemocnice Olomouc, které je jedním z 12 českých perinatologických center. Prospektivní studie probíhala od dubna 2016 do srpna 2018. Odběr pupečnickové krve byl proveden standardně z pupečnickové tepny těsně po vybavení placenty, viz obrázek 5. Odběr krve z periferní žíly novorozence byl proveden do 2 hodin od porodu, viz obrázek 6. Hodnoty IL-6 byly stanoveny na analytickém systému Cobas 8000 (výrobce Roche/Hitachi). Použita byla kvantitativní metoda „ECLIA“ (elektrochemiluminiscenční imunostanovení).

Definice asfyxie dle The American College of Obstetricians and Gynecologists z roku 2014⁹⁹:

- Apgar skóre < 5 v 5. a 10. minutě života
- pH z pupečnickové tepny <7,0 nebo nedostatek bazí (BD) ≥ 12 mmol/l, nebo obojí
- poškození mozku dle MRI (magnetická rezonance)
- přítomnost multisystémového orgánového selhání spolu s hypoxicko-ischemickou encefalopatií

Kritéria pro hodnocení septických novorozenců a zahájení ATB terapie:

- klinický obraz sepse, celkové zhodnocení stavu (může se objevit - náhle vzniklá potřeba kyslíku, ventilační podpora, apnoické pauzy, bradykardie, hypotenze, intolerance glukózy, kapilární návrat > 3 s, rozdíl teploty mezi periferií a tělesným jádrem > 2 °C, letargie/dráždivost, tepelná nestabilita, intolerance stravy, zvýšení sérového bilirubinu, oligurie, metabolická acidóza)
- laboratorní parametry: CRP > 10 mg/l a IL-6 > 250 ng/l
- pozitivní mikrobiologické kultivační vyšetření krve (ev. mozkomíšní mok, kůže a jiné) – není podmínkou



Obrázek 5. Odběr krve z pupečnickové tepny těsně po vybavení placenty (foto z archivu autora)



Obrázek 6. Odběr krve z kubitální žíly u novorozence (foto z archivu autora)

3.2.2.3 Statistické metody

Pro srovnání spojitého znaku (hladina IL-6 či jeho logaritmus) mezi dvěma skupinami pacientů jsme použili neparametrický Kruskal-Wallisův test. Tento test je pro dvě skupiny ekvivalentní Wilcoxonovu testu. Neparametrický test jsme volili díky výrazné nenormalitě hladin IL-6 a také proto, že jeho výsledek závisí na pořadí hodnot v obou skupinách, lze tedy lépe přecházet mezi původními hodnotami a jejich logaritmy. Pro predikci (na úrovni logaritmů obou hladin) jsme použili standardní lineární regresi. Všechny testy proběhly na hladině 0.05.

3.2.2.4 Etika

K analýze vzorku nebylo třeba zvláštního odběru, vyšetření byla provedena z materiálu získaného pro odběry prováděné standardním způsobem dle zvyklostí pracoviště. Doplnění vyšetření bylo v souladu s informovaným souhlasem stvrzeným zákonnými zástupci dítěte.

3.2.3 Výsledky

Párový odběr se podařilo zrealizovat u 73 novorozenců. Průměrné stáří bylo 32+0 týdnů gestace (24+0 – 34+6), průměrná porodní hmotnost byla 1740 g (600 g – 3300 g). Z celkového počtu 73 novorozenců bylo 36 rozeno císařským řezem. Tři novorozenci byli po porodu asfyktičtí s potřebou kardiopulmonální resuscitace. 16 novorozenců bylo léčeno antibiotiky pro časnou novorozeneckou sepsi. 42 rodiček dostalo prenatálně či perinatálně antibiotika z důvodu positivity GBS (*Streptococcus agalactiae*, Gram-pozitivní β -hemolytický kok skupiny B) či jiné infekční komplikace matky a 35 rodiček mělo předčasně odteklou plodovou vodu, tedy odteklou plodovou vodu před nástupem pravidelné děložní činnosti¹⁰⁰. Zmíněná demografická data uvádí přehledně tabulka 4.

Tabulka 4. Demografická data sledované kohorty

Ø počet týdnů gestace	Porodní hmotnost Ø	Císařský řez	Asfyxie	Sepse	ATB podaná matce	PROM
32 (24+0 – 34+6)	1740g (600 g – 3300 g)	36	3	16	42	35

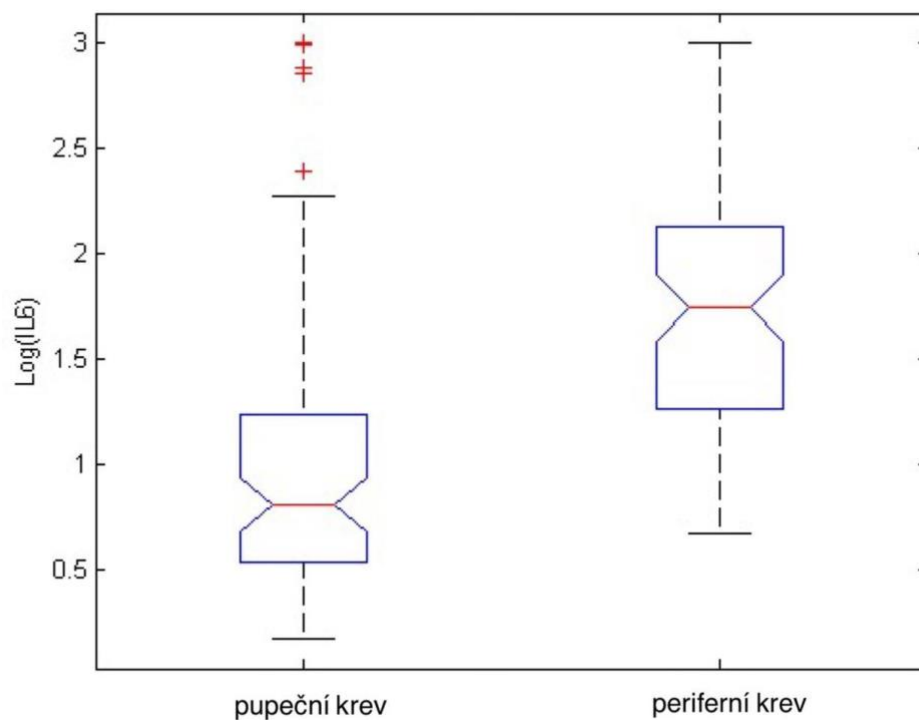
Tabulka 5 uvádí naměřené hodnoty IL-6 v pupečnickové a periferní krvi. Jak vidíme, hodnoty v periferní krvi jsou mnohonásobně vyšší než hodnoty v krvi pupečnickové. Průměrná hodnota IL-6 v pupečnickové krvi byla 16,88 ng/l, v krvi periferní 288,93 ng/l. Medián v krvi pupečnickové byl 6,5 ng/l, v krvi periferní 56 ng/l. Minimální naměřená hodnota IL - 6 v pupečnickové krvi byla 1,7 ng/l, maximální hodnota 984,7 ng/l. Nejnížší

hodnota IL-6 zaznamenaná v periférii bylo 4,7 ng/l, oproti maximu, které dosáhlo v jednom případě až 11 932 ng/l. Mezi prvním (pupečník) a druhým (periferie) měřením IL-6 byl zjištěn signifikantní rozdíl ($p < 0.001$). Medián prvního měření je 6,5 ng/l, medián druhého měření je 56 ng/l, nárůst je téměř desetinásobný. Grafické znázornění vidíme na grafu 5.

Tabulka 5. Naměřené hodnoty IL-6 v pupečnickové a periferní krvi (ng/l)

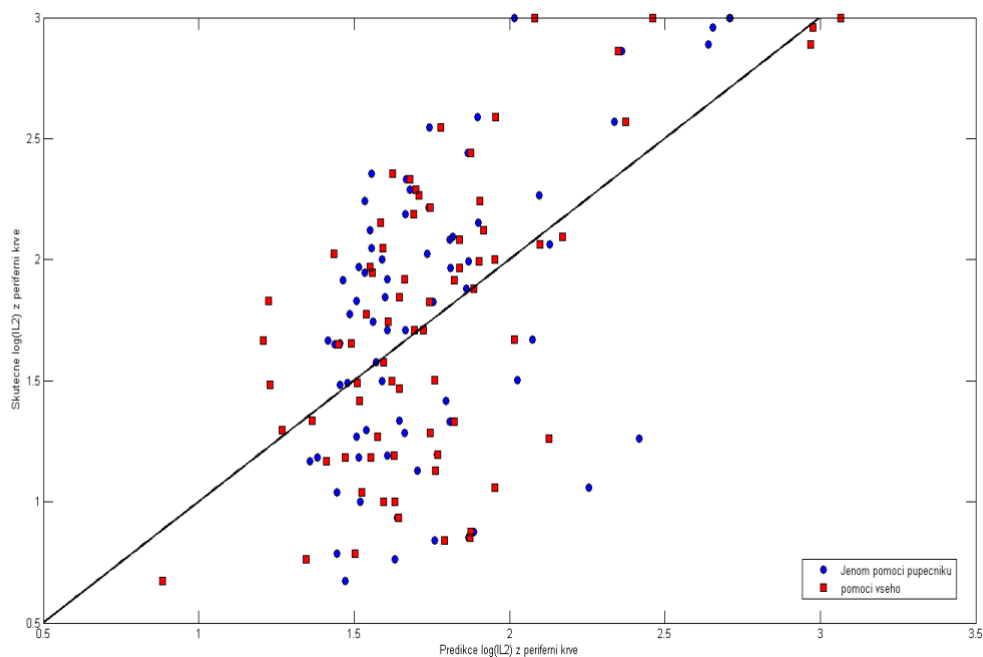
	průměr	medián	minimum	maximum
pupečnicková krev	16,88	6,5	1,7	984,7
periferní krev	288,93	56,0	4,7	11 932,0

Graf 5. Srovnání hodnot interleukinu-6 v pupečnickové (první) a periferní (druhé) krvi. Osa y znázorňuje logaritmickou škálu. Rozdíl v hladinách, testováno non-parametrickým Kruskalovým–Wallisovým testem, statisticky signifikantní ($p < 0.001$).



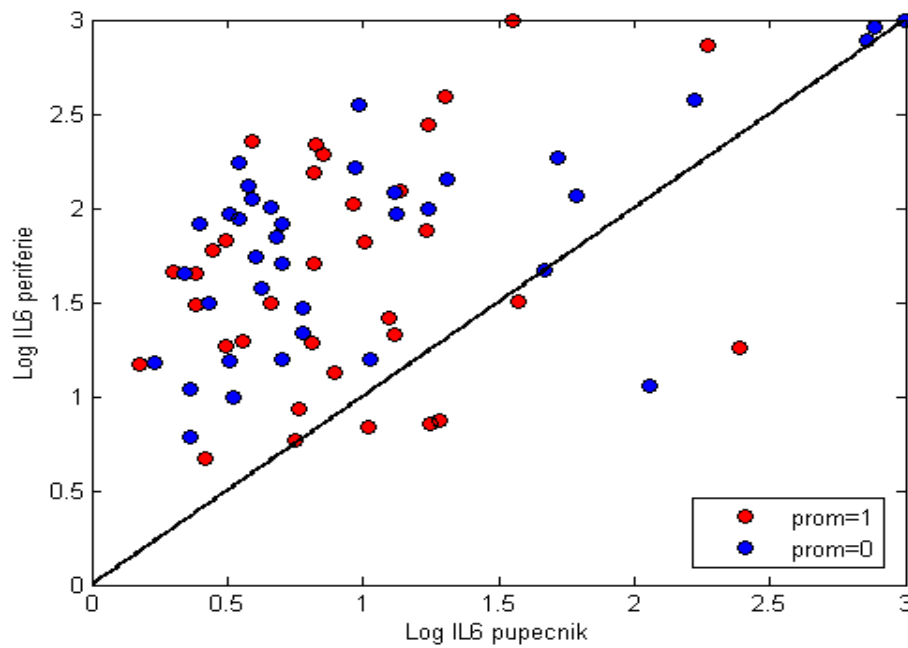
Hodnoty IL-6, které by byly zjištěny z periferní krve, lze predikovat z krve pupečnickové (graf 6). Jako vhodný se jeví lineární model na úrovni (dekadického) logaritmu obou hladin – logaritmus hladiny IL-6 v periferní krvi (IL6_perif) lze modelovat jako lineární funkci logaritmu hladiny IL-6 v krvi pupečnickové (IL6_pup). Na našich datech vychází predikční model takto: $\log(\text{IL6_perif}) = 1.27 + 0.48 * \log(\text{IL6_pup})$. Pokud odstraníme logaritmy z obou stran vztahu, dostaneme rovnici $\text{IL6_perif} = 18.7 * (\text{IL6_pup})^{0.48}$.

Graf 6. Predikce hodnot interleukinu-6 v periferní krvi na základě hodnot v krvi pupečnickové. Osa y je skutečný (naměřený) logaritmus hladin IL-6 v periferní krvi; osa x ukazuje předpokládané hladiny.

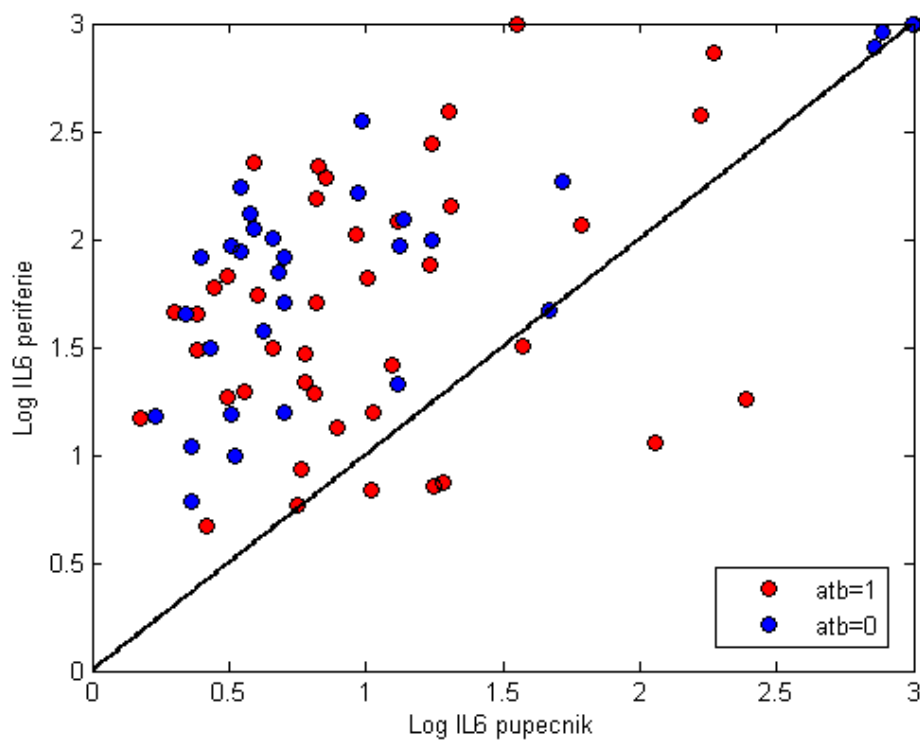


V další analýze jsme se soustředili na závislost vzrůstu IL-6 v periferní krvi oproti jeho hodnotě v krvi pupečnickové na dalších proměnných (předčasně odteklá plodová voda, ATB podaná matce před porodem, císařský řez, poporodní asfyxie, sepse). Vzrůst hladiny IL-6 jsme definovali jako $\log(\text{IL6_perif}) - \log(\text{IL6_pup})$. Vzrůst hladiny IL-6 není na zmíněných faktorech statisticky závislý (graf 7-11). Není závislý na tom, zda předčasně odteklá plodová voda ($p = 0.5$), na ATB podaných matce prenatálně ($p = 0.14$), na způsobu porodu ($p = 0.75$), na asfyxii ($p = 0.10$), ani na sepsi ($p = 0.16$).

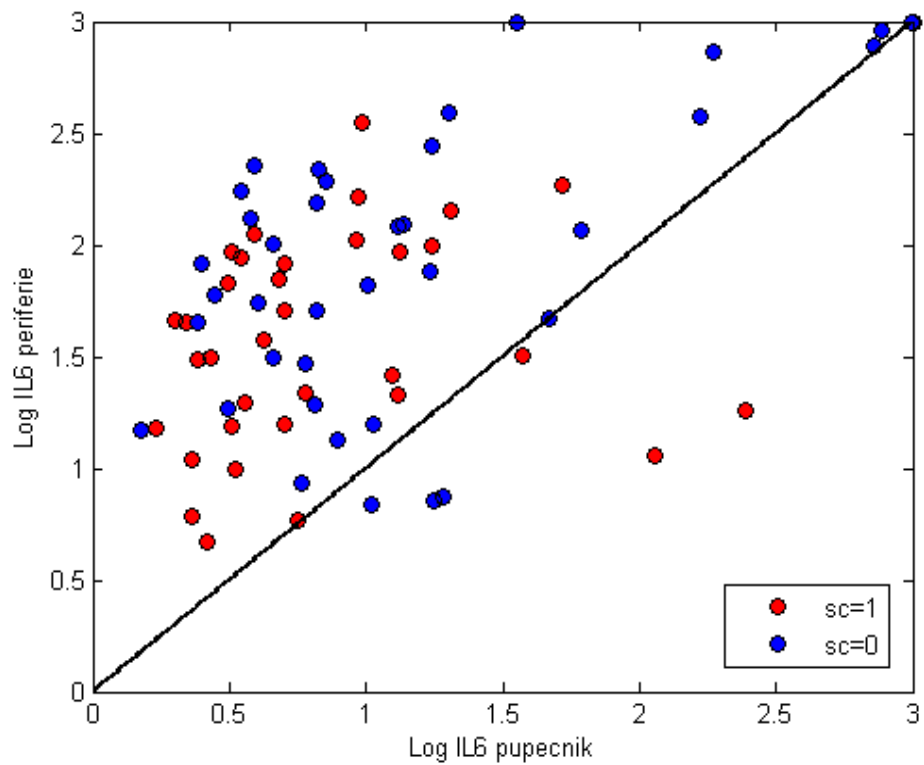
Graf 7. Závislost vzrůstu interleukinu-6 v periferní krvi oproti jeho hodnotě v krvi pupečnickové na předčasně odteklé plodové vodě (PROM=1)



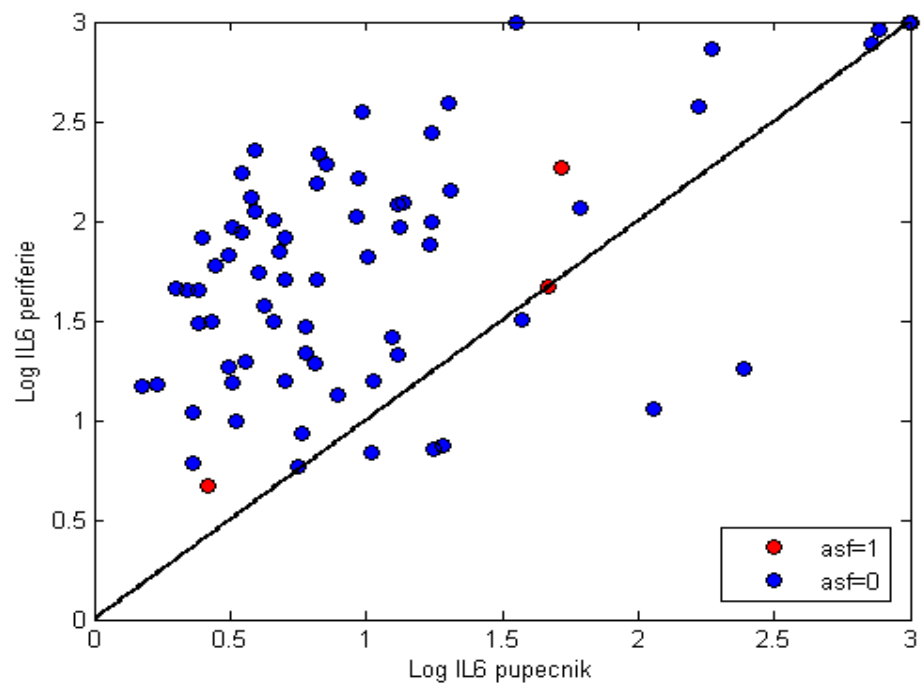
Graf 8. Závislost vzrůstu interleukinu-6 v periferní krvi oproti jeho hodnotě v krvi pupečnickové na antibiotické terapii podané matce před porodem (ATB=1)



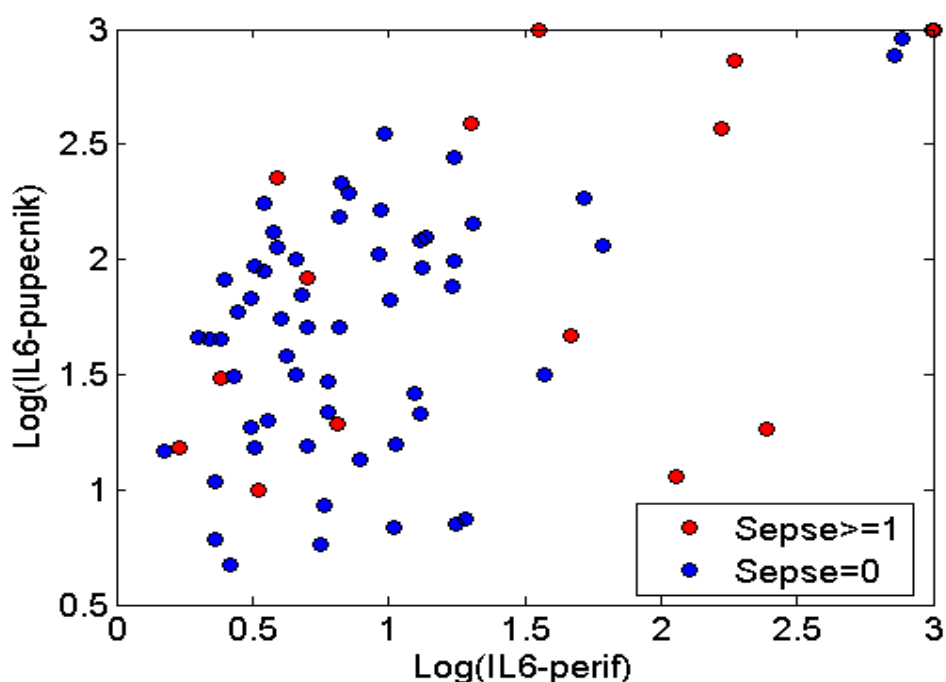
Graf 9. Závislost vzrůstu interleukinu-6 v periferní krvi oproti jeho hodnotě v krvi pupečnickové na způsobu porodu



Graf 10. Závislost vzrůstu interleukinu-6 v periferní krvi oproti jeho hodnotě v krvi pupečnickové na asfyxii (ASF=1)



Graf 11. Závislost vzrůstu interleukinu-6 v periferní krvi oproti jeho hodnotě v krvi pupečnickové na sepsi



3.2.4 Diskuze a závěr

Důvodem problematického přístupu k septickým novorozencům, resp. předčasně narozeným novorozencům, je nespecifický klinický obraz a nezralý imunitní systém. Je snaha najít ideální laboratorní znak, který by včas septického novorozence rozpoznal. V neonatologii se již na začátku diagnostického procesu potýkáme se specifickým problémem, a to s omezeným množstvím biologického materiálu (krve). Objem krve nezralého novorozence činí asi 80 ml/kg tělesné hmotnosti. Tito pacienti jsou velmi zranitelní, je proto snaha všech ošetřujících lékařů volit přístupy co nejméně invazivní. V diagnostice časně novorozenecké sepse by odběr pupečnickové krve mohl nahradit odběr z periferní krve, který se standardně provádí v prvních hodinách života.

Proběhla řada studií, ve kterých se autoři zaměřili na pupečnickový IL-6 jakožto diagnostický nástroj časně novorozenecké sepse, a to jak u donošených, tak předčasně narozených novorozenců. Ve všech těchto studiích měl pupečnickový IL-6 u septických novorozenců zvýšené hodnoty. Nebrali ale v úvahu dynamiku tohoto cytokinu. Používali stejné cut-off hodnoty jako v periferní krvi^{101–109}. Jak vidíme na výsledcích naší studie, dynamiku IL-6 nelze

při jeho hodnocení opomenout. V italské studii z roku 2001 se autoři zaměřili na referenční rozmezí postnatálních hodnot IL-6. Do studie zahrnuli 148 novorozenců narozených po ukončeném 35. týdnu gestace. Tito novorozenci byli po dobu sledování (4 týdny) bez infekčních komplikací. Naměřené hodnoty ve všech třech časových bodech (0, 24, 48 hodin) negativně korelují s gestačním věkem. U donošených novorozenců byla průměrná hodnota IL-6 signifikantně nižší v pupečnickové krvi (1,69 ng/l) než ve 24. (4,09 ng/l) a 48. hodině (3,45 ng/l). U novorozenců předčasně narozených byla již pupečnicková hodnota vyšší než u dětí termínových a to 10,9 ng/l. Zde však nevidíme tak výrazný rozdíl ve 24. hodině (9,3 ng/l) a 48. hodině (8,4 ng/l). Autoři se domnívají, že u předčasně narozených dětí začíná stresová reakce organismu již před narozením, a to by mohl být důvod vyšších hodnot v pupečnickové krvi⁹⁸. V naší studii byla průměrná hodnota IL-6 v pupečnickové krvi 16,88 ng/l. Možným důvodem by mohla být skutečnost, že naše kohorta sestávala z novorozenců narozených před ukončeným 35. týdnem gestace, průměrně 32. týden. Jednalo se o novorozence předčasně narozené, u nichž pravděpodobně začíná stresová reakce organismu již intrauterinně. Hodnota ve 24. hodině života se zásadně liší od námi naměřených hodnot v prvních dvou hodinách života.

Není pochyb o tom, že IL-6 je velmi dynamický marker. Důvody pro rychlý vzestup v tomto krátkém poporodním období (do 2 hodin od narození) je nejasný. Je možné uvažovat o stresové reakci organismu způsobenou porodem, oxidačním stresem, reakcí na změnu vnějšího prostředí a kontaktem s mikrobiálními antigeny, prematurita aj. K objasnění je nutné provést doplňující studie zaměřené tímto směrem. K diagnostice časně novorozenecké sepse je pravděpodobně možné použít hodnoty hladin IL-6 z pupečnickové krve. Vždy je nutno použít příslušné (a odlišné) cut-off hodnoty. Naše studie je jedinečná zhodnocením dynamiky tohoto centrálního cytokinu v časném postnatálním období. Poukázala na nutnost používání jiných cut-off hodnot při užití pupečnickového IL-6 jakožto laboratorního znaku časně novorozenecké sepse. Limitací studie by mohl být výběr kohorty a fakt, že téměř jedna čtvrtina novorozenců byla zatížena patologií (sepse, asfyxie). Avšak při statistickém zpracování jednotlivých proměnných vidíme nezávislost vzestupu IL-6 na těchto proměnných. Tato „nezávislost“ je zajímavá a potvrzuje jeho prediktivní univerzálnost. Dle meta-analýzy z roku 2022, která se zaměřila na periferní a pupečnickový IL-6 v diagnostice časně novorozenecké sepse, je senzitivita a specificita IL-6 v pupečnickové krvi vyšší než v krvi periferní – 83 vs. 71 % a 85 vs. 77 %¹¹⁰.

Na našem pracovišti pupečnickový IL-6 nahradil časný odběr z periferní krve. IL-6 z pupečnicku bereme u všech dětí pod < 34 + 6 (včetně) týdnů gestace. Dle výsledků naší studie, klinické praxe a literárních zdrojů pracujeme s následujícími pravidly:

- pupečnickové hodnoty, při klinických známkách: 20-25 ng/l velmi suspektní
- sérové hladiny, při klinických známkách: 250-300 ng/l velmi suspektní
- při těchto hodnotách a klinických známkách indikujeme ATB a ev. dle dalšího monitoringu časně vysadíme
- pokud jsou tyto hodnoty bez klinických známek sepse, čili odběr se bral z jiného důvodu, pak ATB neindikujeme
- hodnoty (pupečnickové i periferní) 1000 ng/l a více – ATB indikujeme i bez klinických známek sepse

3.3 Projekt 3. Stanovení exprese povrchového receptoru CD64 na povrchu neutrofilů u septických novorozenců metodou průtokové cytometrie

Hledání nových, spolehlivých diagnostických laboratorních znaků, které by dokázaly s vysokou jistotou potvrdit či vyloučit přítomnost systémové bakteriální infekce u předčasně narozených dětí je prioritním úkolem současné neonatologie. Častý výskyt novorozenecké sepse, zranitelnost organismu v novorozeneckém období a obavy z následků vede v klinické praxi běžně k zahajování ATB terapie i při vzniku nespecifických klinických příznaků, a tedy teoreticky k jejich nesprávné indikaci. Přitom nadužívání této terapie přináší významná negativa (asociace s výskytem nekrotizující enterokolitidy, vznik rezistentních bakteriálních kmenů, ovlivnění mikrobiomu novorozence)^{111,112}. Klinické projevy infekce jsou v novorozeneckém věku nespecifické, a to zejména v populaci předčasně narozených novorozenců. Překrývají se s jinými komplikacemi nezralosti (RDS, oběhová nestabilita, otevřený duktus arteriosus, poruchy termoregulace atd.)^{113,114}. Ve výzkumných pracích bylo a je testováno užití mnoha potencionálních biomarkerů – proteinů, cytokinů, metabolomik, genomik. Jednou z možností, jak časně odhalit reakci organismu na invazi patogenních kmenů, je detekce povrchových znaků buněk podílejících se na imunitní reakci. Takovýto povrchový znak je např. receptor CD64. CD64, známý také jako Fc-gamma receptor 1, je vysokoafinitním receptorem pro IgG protilátky, a podílí se tak na procesu fagocytózy opsonizovaných bakterií. Ke zvýšení exprese receptoru na povrchu neutrofilů dochází asi za hodinu po invazi patogenních kmenů. Mohlo by jít o poměrně časný ukazatel infekční komplikace. Zprávy o využití stanovení exprese CD64 na neutrofilech (nCD64) v diagnostice novorozenecké sepse jsou poněkud rozporuplné a nepřinášejí jasné výsledky¹¹⁵. Vzhledem k nejednoznačnosti publikovaných dat jsme v rámci hledání nových laboratorních markerů novorozenecké sepse zahájili vlastní měření tohoto povrchového znaku.

3.3.1 Cíle studie

Cílem naší pilotní studie bylo ověření možnosti využití jedné z metodik stanovení nCD64 v diagnostice novorozenecké sepse u předčasně narozených novorozenců.

3.3.2 Pacienti a metody

3.3.2.1 Pacienti

Byly vyšetřeny krevní vzorky předčasně narozených novorozenců (narozených před 35. týdnem těhotenství) hospitalizovaných na Jednotce intenzivní a resuscitační péče Novorozeneckého oddělení Fakultní nemocnice Olomouc od března 2016 do června 2017. Tito pacienti byli rozděleni do dvou skupin:

- I. Časná novorozenecká seps. U každého novorozence narozeného před 35. týdnem gestace se na našem pracovišti odebírá pupečnicková krve CRP, IL-6 a krevní obraz v rámci diagnostiky časně novorozenecké sepse. Z tohoto důvodu již neprovádíme časný (do 2 hodin od porodu) odběr z periferie. Postnatální (a tedy kontrolní) odběr ke stanovení počtů krevních elementů a biochemického vyšetření provádíme mezi 12. a 24. hodinou života dítěte. Novorozencům zařazeným do I. skupiny byly vyšetřeny krevní vzorky dle tohoto standardu.
- II. Pozdní novorozenecká seps. Ve druhé skupině pacientů bylo vyšetření provedeno v rámci kontrolního laboratorního vyšetření nebo při podezření na pozdní novorozeneckou sepsi, tedy kdykoliv, ale ne dříve než po 72. hodině života. Novorozenci zařazení do této skupiny naplnili některá z těchto kritérií:
 - klinický obraz sepse, celkové zhodnocení stavu (může se objevit - náhle vzniklá potřeba kyslíku, ventilační podpora, apnoické pauzy, bradykardie, hypotenze, intolerance glukózy, kapilární návrat > 3 s, rozdíl teploty mezi periferií a tělesným jádrem > 2 °C, letargie/dráždívnost, tepelná nestabilita, intolerance stravy, zvýšení sérového bilirubinu, oligurie, metabolická acidóza)
 - laboratorní parametry: CRP > 10 mg/l a IL-6 > 250 ng/l
 - pozitivní mikrobiologické kultivační vyšetření krve (ev. mozkomíšni mok, kůže a jiné) – není podmínkou

3.3.2.2 Metody

K analýze byly použity vzorky odebrané pro stanovení krevního obrazu a diferenciálního rozpočtu. U všech vzorků bylo provedeno stanovení a kvantifikace určených povrchových buněčných znaků metodou průtokové cytometrie. Analýza získaných vzorků byla realizována metodou vícebarevné průtokové cytometrie s panelem protilátek proti CD3, CD4, CD8, CD16+CD56+, CD14, CD15, CD163, CD19, CD138, CD45RO, CD64 a patričních

izotypových kontrol na cytometru FACS Canto II (Becton Dickinson) s použitím analytického software FACS Diva ver. 8.0 1 (BD Biosciences). U cílových subpopulací bylo stanoveno jejich procentuální zastoupení. V případě CD64 se jedná o populaci exprimovanou na CD15 pozitivních granulocytech, přičemž k analýze dat bylo akvírováno minimálně 50 000 událostí v gate granulocytů. Ověření positivity CD64 bylo provedeno pomocí mediánu fluorescenční intenzity.

Ostatní diagnostika a terapie byla prováděna dle zavedených diagnostických a terapeutických standardů pracoviště, včetně stanovení běžných biochemických markerů. Před zahájením terapie byl proveden odběr krve k mikrobiologickému hodnocení. Následně byl vyhodnocen stav a průběh onemocnění u dětí, které byly zařazeny do kategorií dle klinického průběhu a výsledků laboratorního vyšetření:

- a. Jistá sepse (pozitivní klinické i laboratorní příznaky, pozitivní mikrobiologické kultivační vyšetření krve)
- b. Pravděpodobná sepse (pozitivní klinické i laboratorní příznaky, negativní mikrobiologické kultivační vyšetření krve)
- c. Sepse klinická (pozitivní klinické, negativní laboratorní příznaky a negativní mikrobiologické kultivační vyšetření krve)
- d. Sepse nepřítomna (negativní klinické, laboratorní příznaky i mikrobiologické kultivační vyšetření krve).

3.3.2.3 Statistické metody

Rozdíly ve spojitých proměnných mezi skupinami (například rozdíl v expresi nCD64 mezi pacienty se sepsí a bez sepse) byl srovnáván pomocí boxplotů a testován Kruskalovým-Wallisovým testem. Standardní ROC křivky vznikly tak, že pro všechny možné cut-off hodnoty zkoumaného prediktoru jsme vynesli na osu x doplněk specificity do jedničky a na osu y senzitivitu. Vzhledem k malému počtu pacientů jsme obecně dávali přednost vizualizaci dat před testováním hypotéz. Případné testy hypotéz byly prováděny na hladině 0.05. Všechny analýzy byly provedeny v softwaru MATLAB 2013b and Statistics Toolbox, The MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts, United States.

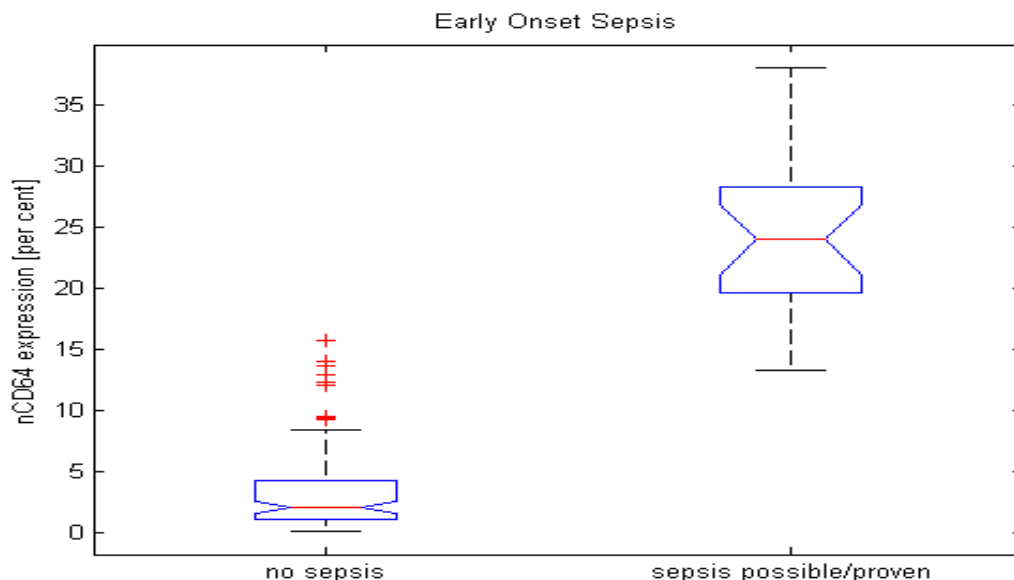
3.3.2.4 Etika

K analýze vzorku nebylo třeba zvláštního odběru, vyšetření byla provedena z materiálu získaného pro odběry prováděné standardním způsobem dle zvyklostí pracoviště. Doplnění vyšetření bylo v souladu s informovaným souhlasem stvrzeným zákonnými zástupci dítěte.

3.3.3 Výsledky

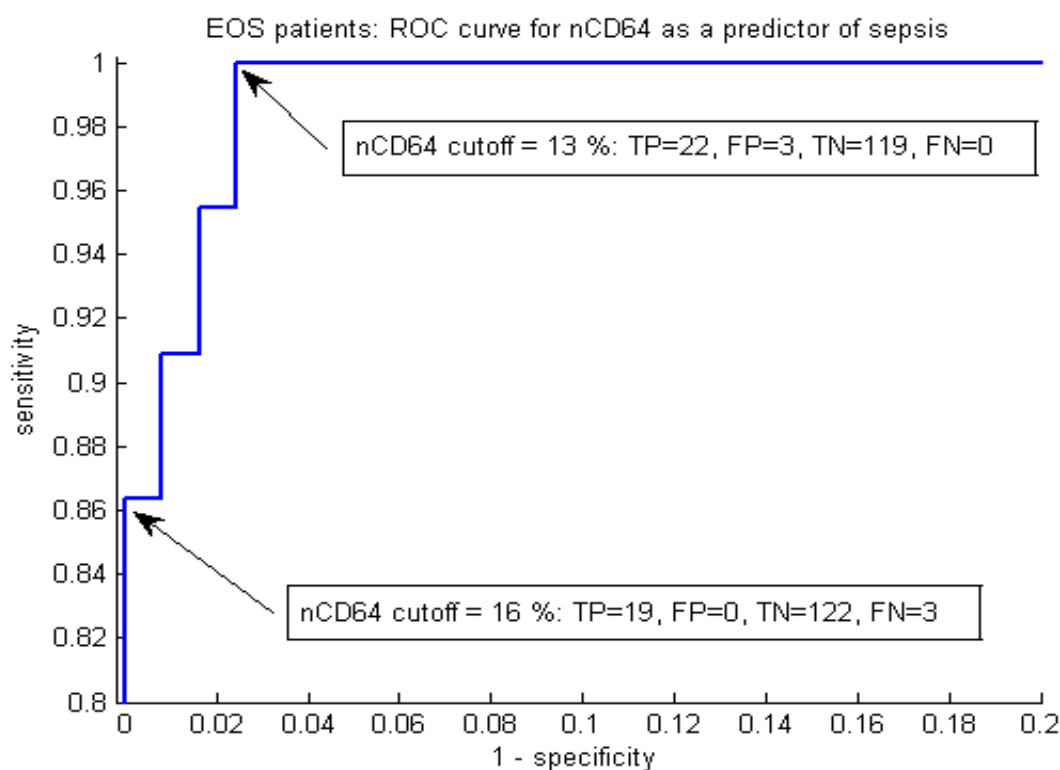
V první skupině pacientů (zaměřené na diagnózu časně novorozenecké sepse) bylo vyšetřeno 174 novorozenců. Průměrná porodní hmotnost byla 1613 g (410 g – 2450 g), gestační věk při narození 31 týdnů (24-33). Z tohoto počtu mělo jistou (a) nebo pravděpodobnou sepsi (b) celkem 23 pacientů, u ostatních se o infekční komplikaci nejednalo. U všech 23 pacientů s jistou nebo pravděpodobnou sepsí byla zahájena ATB terapie dle doporučení. Po statistickém zpracování výsledků vidíme na grafu 12 významnou asociaci signifikantně zvýšených hodnot nCD64 a výskytem sepse (jisté nebo pravděpodobné).

Graf 12. Hodnoty nCD64: srovnání skupin pacientů s a bez EOS. Rozdíl v expresi nCD64 je statisticky významný na hladině 10^{-13} .



Na grafu 13, který znázorňuje výsek ROC křivky, vidíme opět vysokou prediktivní hodnotu nCD64 pro novorozeneckou sepsi (jistá, pravděpodobná). Jako ideální cut-off hodnota se jeví 13 %.

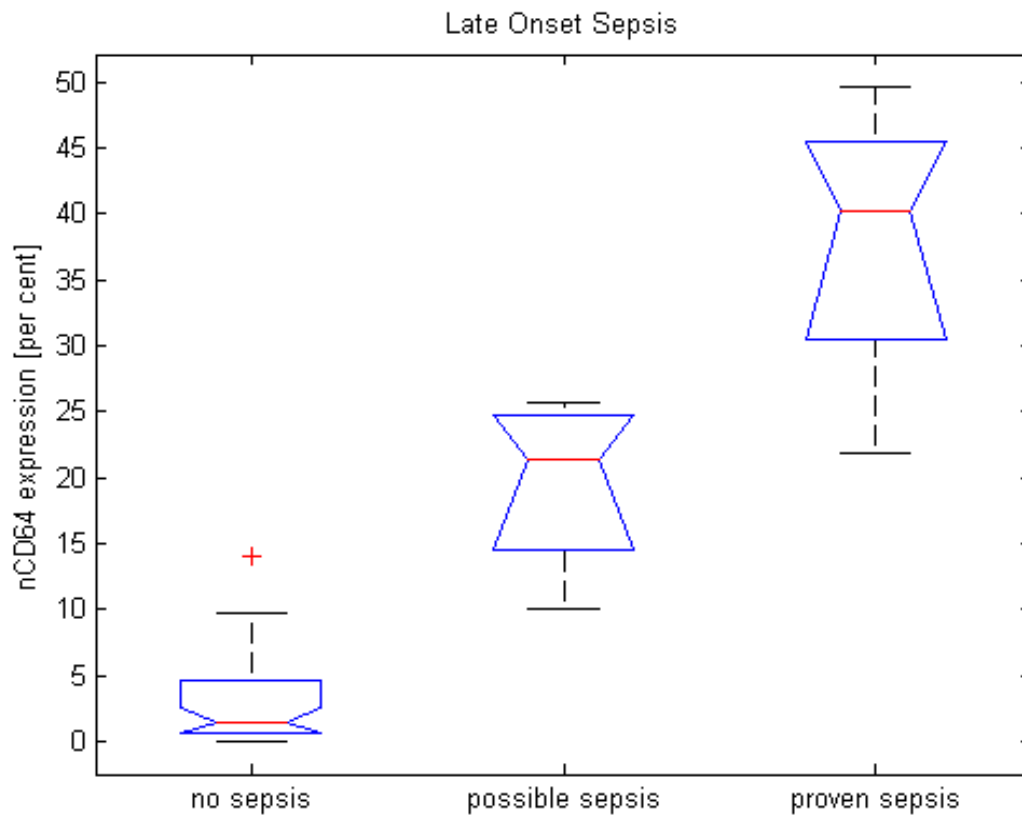
Graf 13. Výsek ROC křivky, srovnání senzitivity a specifity pro jednotlivé cut-off hodnoty nCD64. True positive (TP), false positive (FP), true negative (TN), and false negative (FN) cases.



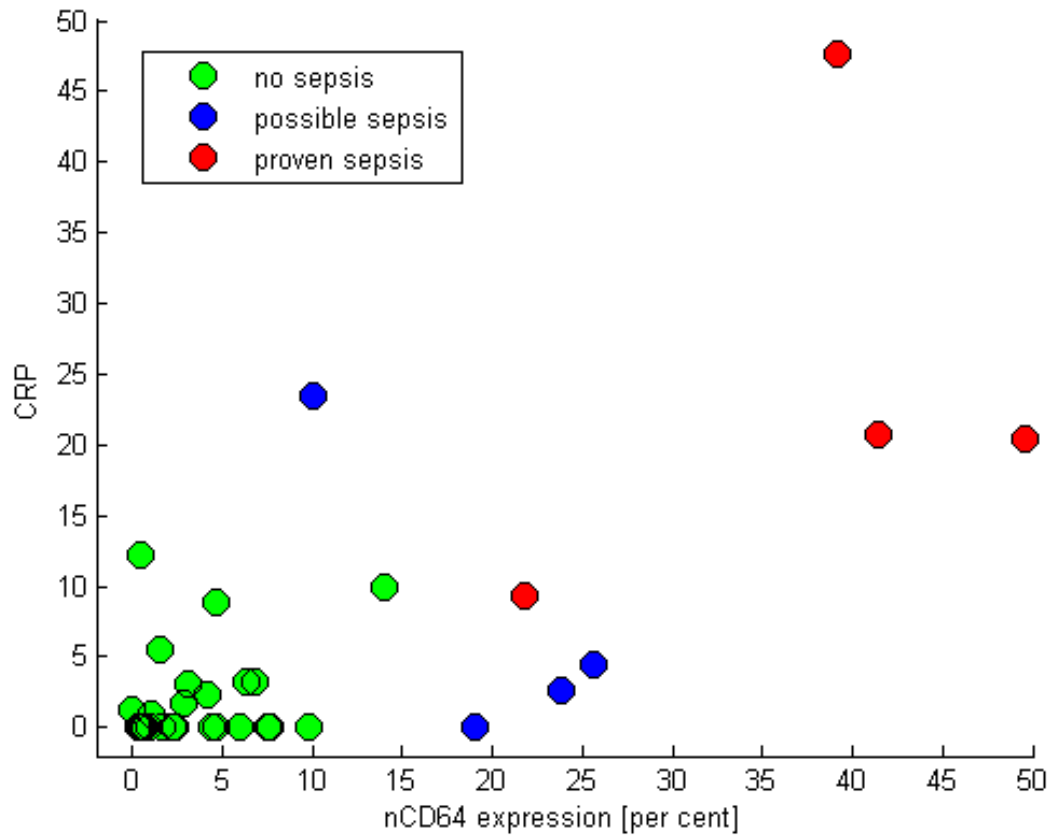
Ve druhé skupině (zaměřené na diagnózu pozdní novorozenecké sepse) bylo vyšetřeno 43 novorozenců. Průměrná porodní hmotnost byla 1282 g, (410 – 2200 g), gestační věk při narození 31 týdnů (24 - 33), u 4 pacientů se jednalo dle kritérií o sepsi jistou (a), u 4 o sepsi pravděpodobnou (b), 35 pacientů sepsi nemělo. I v této skupině pacientů byla průkazná asociace hodnot nCD64 se sepsí (pravděpodobnou nebo jistou, $p < 0.0001$), signifikantní byl i rozdíl hodnot nCD64 mezi oběma skupinami pacientů se sepsí ($p = 0.0001$; viz Graf 14). Pro nízký počet pacientů nebyla konstruována a hodnocena křivka ROC. U těchto pacientů jsme provedli analýzu srovnávající asociaci nCD64 ve srovnání s CRP a počtem leukocytů,

které byly odebrány ve stejné době. Asociace je těsnější v případě nCD64 ve srovnání s hodnotou CRP i leukocytů (graf 15,16).

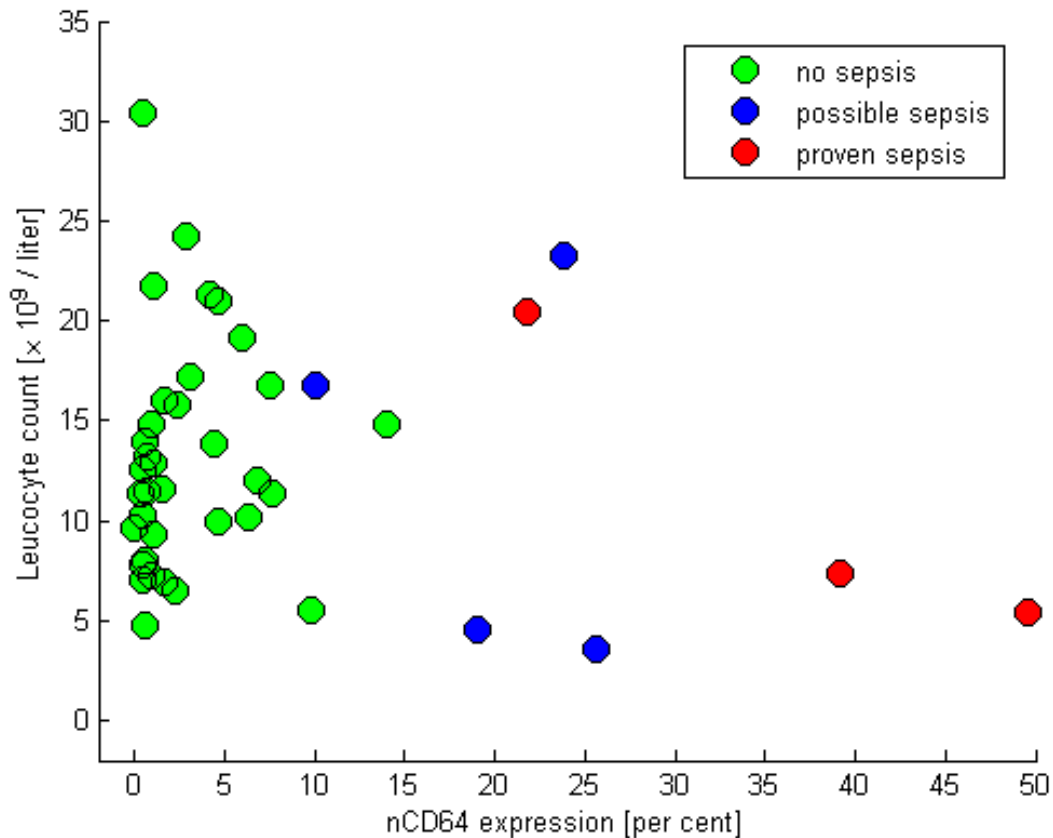
Graf 14. Srovnání hodnot exprese nCD64 v kategoriích pozdní novorozenecké sepse (LOS). Rozdíly mezi skupinami jsou významné na hladině $p = 0.0001$.



Graf 15. Srovnání markerů (CRP [mg/l] a nCD64) a jejich výtěžnosti v diagnostice pozdní novorozenecké sepse (LOS). Exprese nCD64 stratifikuje pacienty zřetelně lépe (vertikální dělení) než CRP (horizontální dělení).



Graf 16. Srovnání markerů (počet leukocytů a nCD64) a jejich výtěžnosti v diagnostice pozdní novorozenecké sepse (LOS). Exprese nCD64 stratifikuje pacienty zřetelně lépe (vertikální dělení) než počet leukocytů (horizontální dělení).



3.3.4 Diskuze a závěr

V literatuře přibývá důkazů o možnosti využití nCD64 v diagnostice novorozenecké sepse u donošených i předčasně narozených novorozenců. Dle publikovaných dat jde o laboratorní parametr s časným vzestupem. Další výhodou je stabilita jeho hodnot v časném poporodním období¹¹⁶. Výsledky studií jsou však nejednoznačné, což může být dáno jak rozdílností použitých metod stanovení nCD64, tak zejména malou homogenitou zkoumaných souborů. Velká část publikovaných studií nedostatečně rozlišuje jednotlivé skupiny pacientů (předčasně narozené děti, děti narozené v termínu), odlišnou patofyziologii onemocnění (rozdílná dynamika onemocnění při prenatálně vzniklé infekci ve srovnání s mikrobiální invazí postnatální), často není přesně stanovena doba odběru, což zcela opomíjí dynamiku vzestupu infekčních markerů^{117–120}. Doposud byly publikovány dvě meta-analýzy, ani tyto se neshodují

ve svých závěrech: zatímco první považuje nCD64 za ukazatel spíše málo přínosný⁷⁸, druhá popisuje jeho excelentní diagnostickou přesnost¹²¹.

Výsledky naší pilotní studie ukazují na velmi těsnou a významnou asociaci nCD64 s výskytem novorozenecké sepse. Tato zjištění však nelze generalizovat z vícero důvodů: námi použitá metodika je odlišná od převážně používaných způsobů stanovení nCD64 – výsledná hodnota uvádí podíl CD64 pozitivních neutrofilů, nejde o nejčastěji používaný index vůči standardu. Studovaná populace je malá s nízkým zastoupením novorozenců se sepsí – z tohoto důvodu bude nutno v dalších studiích zpřesnit indikační kritéria a soubor adekvátním způsobem rozšířit.

4 Shrnutí experimentální části

Ve všech třech pilotních studiích jsme se zaměřili na dynamiku a diagnostickou přesnost nových perspektivních laboratorních znaků časné i pozdní novorozenecké sepse. Právě dynamika těchto biomarkerů je v procesu pochopení a umění interpretace předložených výsledků klíčová. Jako typický příklad, kdy znalost dynamiky laboratorního parametru je nezbytná, lze uvést CRP v diagnostice časné novorozenecké sepse. Zde se jeho užití nedoporučuje, a to právě pro jeho pomalou reakci a výrazné zpoždění za klinickým obrazem. Je však vhodný k monitorování úspěšnosti zvolené terapie. Naproti tomu vhodný biomarker v diagnostice časné novorozenecké sepse je centrální cytokin IL-6. Jeho extrémní dynamiku jsme prokázali také v naší studii. Tento cytokin pro monitoraci na rozdíl od zmíněného CRP vhodný není.

Studované kohorty v našem projektu, resp. projektech byly vyvážené co do skladby testovaných novorozenců, tak do časové přesnosti odebraných vzorků. Určitou nevýhodou, kterou je třeba brát v potaz v interpretaci výsledků, je nízký počet septických novorozenců, a to ve všech třech projektech. Naproti tomu výhodou naší studie je poměrně vysoký počet naměřených vzorků.

Zásadním přínosem naší studie pro klinickou praxi je zavedení neinvazivního odběru pupečnickové krve k měření IL-6. Tato metoda zcela nahradila odběr z periferní krve v průběhu prvních 2 hodin života. V rámci skríninku časné novorozenecké sepse tento odběr podstupují všichni novorozenci narození před 35. týdnem gestace, kteří jsou hospitalizováni na Jednotce intenzivní a resuscitační péče Novorozeneckého oddělení Fakultní nemocnice Olomouc.

5 Použitá literatura

1. Bizzarro J, Dembry LL-M, Baltimore RRS, et al. Changing Patterns in Neonatal Escherichia coli Sepsis and Ampicillin Resistance in the Era of Intrapartum Antibiotic Prophylaxis. *Pediatrics*. 2008;121(4):689-696. doi: 10.1542/peds.2007-2171.
2. Fleischmann-Struzek C, Goldfarb DM, Schlattmann P, et al. The global burden of paediatric and neonatal sepsis: a systematic review. *Lancet Respir Med*. 2018;6(3):223-230. doi:10.1016/S2213-2600(18)30063-8.
3. McCall B. Neonatal Sepsis Morbidity and Mortality High Across Rich and Poor Countries. Medscape. <https://www.medscape.com/viewarticle/973236>. Published May 02, 2022. Accessed October 20, 2023.
4. Hornik CP, Fort P, Clark RH, et al. Early and late onset sepsis in very-low-birth-weight infants from a large group of neonatal intensive care units. *Early Hum Dev*. 2012;88(2):69-74. doi:10.1016/S0378-3782(12)70019-1.
5. Dong Y, Speer CP. Late-onset neonatal sepsis:Recent developments. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2015;100(3):F257-F263. doi:10.1136/archdischild-2014-306213.
6. Kramer MS, Demissie K, Yang H, et al. The Contribution of Mild and Moderate Preterm Birth to Infant Mortality. *JAMA*.2000;284(7):843-849. doi:10.1001/jama.284.7.843.
7. Goldstein B, Brett G, Adrienne R. International pediatric sepsis consensus conference: Definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med*. 2005;6(1):2-8. doi: 10.1097/01.PCC.0000149131.72248.E6.
8. Modi N, Doré CJ, Saraswatula A, et al. A case definition for national and international neonatal bloodstream infection surveillance. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2009;94(1):F8-12. doi: 10.1136/adc.2007.126458. Epub 2008 May 22.
9. Wynn JL, Polin RA. Progress in the management of neonatal sepsis: The importance of a consensus definition. *Pediatr Res*. 2018;83(1-1):13-15. doi: 10.1038/pr.2017.224. Epub 2017 Oct 11.

10. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016;315(8):801-810. doi:10.1001/jama.2016.0287.
11. Cai S, Thompson DK, Anderson PJ, et al. Short- and Long-Term Neurodevelopmental Outcomes of Very Preterm Infants with Neonatal Sepsis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Children (Basel)*. 2019;6(12):131. doi:10.3390/children6120131.
12. Ng PC, Ma TPY, Lam HS. The use of laboratory biomarkers for surveillance, diagnosis and prediction of clinical outcomes in neonatal sepsis and necrotising enterocolitis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2015;100(5):F448-452. doi: 10.1136/archdischild-2014-307656. Epub 2015 Jan 2.
13. Klingenberg C, Kornelisse RF, Buonocore G, et al. Culture-negative early-onset neonatal sepsis - at the crossroad between efficient sepsis care and antimicrobial stewardship. *Front Pediatr*. 2018; 6:285. doi: 10.3389/fped.2018.00285. eCollection 2018.
14. BATTERY JP. Blood cultures in newborns and children: Optimising an everyday test. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2002;87(1):F25-28. doi:10.1136/fn.87.1.f25.
15. Rozycki HJ, Stahl GE, Baumgart S. Impaired sensitivity of a single early leukocyte count in screening for neonatal sepsis. *Pediatr Infect Dis J*. 1987;6(5):440-442. doi: 10.1097/00006454-198705000-00004.
16. Christensen RD, Rothstein G, Hill HR, et al. Fatal early onset group B streptococcal sepsis with normal leukocyte counts. *Pediatr Infect Dis J*. 1985;4(3):242-245. doi: 10.1097/00006454-198505000-00006.
17. Hornik CP, Benjamin DK, Becker KC, et al. Use of the Complete Blood Cell Count in Early-Onset Neonatal Sepsis. *Pediatr Infect Dis J*. 2012;31(8):799-802. doi:10.1097/INF.0b013e318256905c.
18. Gude SS, Peddi NC, Vuppalapati S, et al. Biomarkers of Neonatal Sepsis: From Being Mere Numbers to Becoming Guiding Diagnostics. *Cureus*. 2022;14(3):e23215. doi: 10.7759/cureus.23215.eCollection 2022 Mar.

19. Li T, Dong G, Zhang M, et al. Association of neutrophil-lymphocyte ratio and the presence of neonatal sepsis. *J Immunol Res.* 2020;2020:7650713. doi: 10.1155/2020/7650713. eCollection 2020.
20. Zhang S, Luan X, Zhang W, et al. Platelet-to-Lymphocyte and Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio as Predictive Biomarkers for Early-onset Neonatal Sepsis. *J Coll Physicians Surg Pak.* 2021 Jul;31(7):821-824. doi: 10.29271/jcpsp.2021.07.821.
21. Racek J, Rajdl D, Brož P, et al. *Klinická Biochemie.* 2. vydání. Praha: Galén; 2006.
22. Ceron JJ, Eckersall PD, Martýnez-Subiela S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Vet Clin Pathol.* 2005;34(2):85-99. doi:10.1111/j.1939-165x.2005.tb00019.x.
23. Gelain EM, Bonsembiante F. Acute phase proteins in marine mammals: State of art, perspectives and challenges. *Front Immunol.* 2019;10:1220. doi: 10.3389/fimmu.2019.01220.eCollection 2019.
24. Tillett WS, Francis T. Serological reactions in pneumonia with a nonprotein somatic fraction of pneumococcus. *J Exp Med.* 1930;52:561-571. doi: 10.1084/jem.52.4.561.
25. Abernethy TJ, Avery OT. The occurrence during acute infections of a protein not
26. normally present in the blood: I. Distribution of the reactive protein in patients' sera and the effect of calcium on the flocculation reaction with C polysaccharide of pneumococcus. *J Exp Med.* 1941;73(2):173-182. doi:10.1084/jem.73.2.173.
27. Black S, Kushner I, Samols D. C-reactive protein. *J Biol Chem.* 2004;279(47):48487-48490. doi:10.1074/jbc.R400025200. Epub 2004 Aug 26.
28. Marnell L, Mold C, Du Clos TW. C-reactive protein: Ligands, receptors and role in inflammation. *Clin Immunol.* 2005;117(2):104-111. doi:10.1016/j.clim.2005.08.004.
29. Volanakis JE. Human C-reactive protein: Expression, structure, and function. *Mol Immunol.* 2001;38(2-3):189-197. doi:10.1016/S0161-5890(01)00042-6.

30. Rhodes B, Fürnrohr BG, Vyse TJ. C-reactive protein in rheumatology: biology and genetics. *Nat Rev Rheumatol*. 2011;7(5):282-289. doi:10.1038/nrrheum.2011.37. Epub 2011 Apr 5.
31. Ahmed N, Thorley R, Xia D, et al. Transgenic mice expressing rabbit C-reactive protein exhibit diminished chemotactic factor-induced alveolitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;153(3):1141-1147. doi:10.1164/ajrccm.153.3.8630558.
32. Xia D, Samols D. Transgenic mice expressing rabbit C-reactive protein are resistant to endotoxemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(6):2575-2580. doi:10.1073/pnas.94.6.2575.
33. Jiang S, Xia D, Samols D. Expression of rabbit C-reactive protein in transgenic mice inhibits development of antigen-induced arthritis. *Scand J Rheumatol*. 2006;35(5):351-355. doi:10.1080/03009740600757963.
34. Zouki C, Beauchamp M, Baron C, et al. Prevention of in vitro neutrophil adhesion to endothelial cells through shedding of L-selectin by C-reactive protein and peptides derived from C-reactive protein. *J Clin Invest*. 1997;100(3):522-529. doi:10.1172/JCI119561.
35. Gershov D, Kim S, Brot N, et al. C-reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an antiinflammatory innate immune response: Implications for systemic autoimmunity. *J Exp Med*. 2000;192(9):1353-1364. doi:10.1084/jem.192.9.1353.
36. Cekic C, Arabul M, Alper E, et al. Evaluation of the relationship between serum ghrelin, C-reactive protein and interleukin-6 levels, and disease activity in inflammatory bowel diseases. *Hepatology*. 2014;61(133):1196-1200.
37. Worthmann H, Tryc AB, Dirks M, et al. Lipopolysaccharide binding protein, interleukin-10, interleukin-6 and C-reactive protein blood levels in acute ischemic stroke patients with post-stroke infection. *J Neuroinflammation*. 2015;12:13. doi:10.1186/s12974-014-0231-2.

38. Eschborn S, Weitkamp JH. Procalcitonin versus C-reactive protein: review of kinetics and performance for diagnosis of neonatal sepsis. *J Perinatol.* 2019;39(7):893-903. doi:10.1038/s41372-019-0363-4. Epub 2019 Mar 29.
39. Póvoa P. C-reactive protein: a valuable marker of sepsis. *Intensive Care Med.* 2002;28(3):235-243. doi:10.1007/s00134-002-1209-6. Epub 2002 Feb 6.
40. Hofer N, Zacharias E, Müller W, et al. An update on the use of C-reactive protein in early-Onset neonatal sepsis: Current insights and new tasks. *Neonatology.* 2012;102(1):25-36. doi: 10.1159/000336629. Epub 2012 Apr 11.
41. Chiesa C, Osborn JF, Pacifico L, et al. Gestational- and age-specific CRP reference intervals in the newborn. *Clin Chim Acta.* 2011;412(19-20):1889-1890. doi: 10.1016/j.cca.2011.06.022. Epub 2011 Jun 25.
42. Bender L, Thaarup J, Varming K, et al. Early and late markers for the detection of early-onset neonatal sepsis. *Dan Med Bull.* 2008;55(4):219-223.
43. Lai M-Y, Tsai M-H, Lee C-W, et al. Characteristics of neonates with culture-proven bloodstream infection who have low levels of C-reactive protein (≤ 10 mg/L). *BMC Infect Dis.* 2015;15:320. doi: 10.1186/s12879-015-1069-7.
44. Ng PC, Cheng SH, Chui KM, et al. Diagnosis of late onset neonatal sepsis with cytokines, adhesion molecule, and C-reactive protein in preterm very low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 1997;77(3):F221-227. doi: 10.1136/fn.77.3.f221.
45. Abdollahi A, Shoar S, Nayyeri F, et al. Diagnostic value of simultaneous measurement of procalcitonin, interleukin-6 and hs-CRP in prediction of early-onset neonatal sepsis. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2012;4(1):e2012028. doi: 10.4084/MJHID.2012.028. Epub 2012 May 6.
46. Medková A, Hálek J, Mihál V. Classic and recent laboratory markers of newborn sepsis. *Pediatr pro Praxi.* 2017;18(4):150-154.
47. Moore BW. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun.* 1965;19(6):739-744. doi: 10.1016/0006-291x(65)90320-7.

48. Bertheloot D, Latz E. HMGB1, IL-1 α , IL-33 and S100 proteins: Dual-function alarmins. *Cell Mol Immunol.* 2017;14(1):43-64. doi: 10.1038/cmi.2016.34.Epub 2016 Aug 29.
49. Boteanu RM, Suica VI, Uyy E, et al. Alarmins in chronic noncommunicable diseases: Atherosclerosis, diabetes and cancer. *J Proteomics.* 2017;153:21-29. doi: 10.1016/j.jprot.2016.11.006. Epub 2016 Nov 11.
50. Johnstone KF, Herzberg MC. Antimicrobial peptides: Defending the mucosal epithelial barrier. *Front Oral Heal.* 2022 Aug 1;3:958480. doi: 10.3389/froh.2022.958480.eCollection 2022.
51. Hessian PA, Edgeworth J, Hogg N. MRP-8 and MRP-14, two abundant Ca(2+)-binding proteins of neutrophils and monocytes. *J Leukoc Biol.* 1993;53(2):197-204.
52. Stříž I, Trebichavský I. Calprotectin - A pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation. *Physiol Res.* 2004;53(3):245-253.
53. Lozoya Angulo ME, de Las Heras Gómez I, Martínez Villanueva M, et al. Faecal calprotectin, an useful marker in discriminating between inflammatory bowel disease and functional gastrointestinal disorders. *Gastroenterol Hepatol.* 2017;40(3):125-131. doi: 10.1016/j.gastrohep.2016.04.009. Epub 2016 May 31.
54. Zhulina Y, Cao Y, Amcoff K, et al. The prognostic significance of faecal calprotectin in patients with inactive inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2016;44(5):495-504. doi: 10.1111/apt.13731. Epub 2016 Jul 12
55. Akutko K, Iwańczak B. Evaluation of Fecal Calprotectin, Serum C-Reactive Protein, Erythrocyte Sedimentation Rate, Seromuroid and Procalcitonin in the Diagnostics and Monitoring of Crohn's Disease in Children. *J Clin Med.* 2022 Oct 15;11(20):6086. doi: 10.3390/jcm11206086.
56. Altobelli E, Angeletti PM, Petrocelli R, et al. Serum calprotectin a potential biomarker in juvenile idiopathic arthritis: A meta-analysis. *J Clin Med.* 2021 Oct 22;10(21):4861. doi: 10.3390/jcm10214861.
57. Chan JK, Roth J, Oppenheim JJ, et al. Alarmins: Awaiting a clinical response. *J Clin Invest.* 2012;122(8):2711-2719. doi: 10.1172/JCI62423. Epub 2012 Aug 1.

58. Jin M, Khan AI. Procalcitonin: Uses in the Clinical Laboratory for the Diagnosis of Sepsis. *Lab Med.* 2010;41(3):173-177. doi:10.1309/LMQ2GRR4QLFKHCH9.
59. Christ-Crain M, Müller B. Biomarkers in respiratory tract infections: diagnostic guides to antibiotic prescription, prognostic markers and mediators. *Eur Respir J.* 2007;30(3):556-573. doi:doi: 10.1183/09031936.00166106.
60. Müller B, White JC, Nylén ES, et al. Ubiquitous Expression of the Calcitonin-I Gene in Multiple Tissues in Response to Sepsis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(1):396-404. doi: 10.1210/jcem.86.1.7089.
61. van Rossum AMC, Wulkan RW, Oudesluys-Murphy AM. Procalcitonin as an early marker of infection in neonates and children. *Lancet Infect Dis.* 2004;4(10):620-630. doi:10.1016/S1473-3099(04)01146-6.
62. Chiesa C, Panero A, Rossi N, et al. Reliability of procalcitonin concentrations for the diagnosis of sepsis in critically ill neonates. *Clin Infect Dis.* 1998;26(3):664-672. doi:10.1086/514576.
63. Chiesa C, Pellegrini G, Panero A, et al. C-Reactive Protein, Interleukin-6, and Procalcitonin in the Immediate Postnatal Period: Influence of Illness Severity, Risk Status, Antenatal and Perinatal Complications, and Infection. *Clin Chem.* 2003;49(1):60-68. doi: 10.1373/49.1.60.
64. Altunhan H, Annagür A, Örs R, et al. Procalcitonin measurement at 24hours of age may be helpful in the prompt diagnosis of early-onset neonatal sepsis. *Int J Infect Dis.* 2011;15(12):854-858. doi:10.1016/j.ijid.2011.09.007. Epub 2011 Oct 22.
65. Mwesigye P, Rizwan F, Alassaf N, et al. The Role and Validity of Diagnostic Biomarkers in Late-Onset Neonatal Sepsis. *Cureus.* 2021;13(8):e17065. doi: 10.7759/cureus.17065.eCollection 2021 Aug.
66. Anugu NR, Khan S. Comparing the Diagnostic Accuracy of Procalcitonin and C-Reactive Protein in Neonatal Sepsis: A Systematic Review. *Cureus.* 2021;13(11):e19485. doi: 10.7759/cureus.19485. eCollection 2021 Nov.

67. Tang YH, Jeng MJ, Wang HH, et al. Risk factors and predictive markers for early and late-onset neonatal bacteremic sepsis in preterm and term infants. *J Chin Med Assoc.* 2022;85(4):507-513. doi:10.1097/JCMA.0000000000000681.
68. Chiesa C, Pacifico L, Natale F, et al. Fetal and early neonatal interleukin-6 response. *Cytokine.* 2015;76(1):1-12. doi:10.1016/j.cyto.2015.03.015. Epub 2015 Apr 15.
69. Cava F, González C, Pascual MJ, et al. Biological variation of interleukin 6 (IL-6) and soluble interleukin 2 receptor (sIL2R) in serum of healthy individuals. *Cytokine.* 2000;12(9):1423-1425. doi:10.1006/CYTO.2000.0714.
70. Kishimoto T. The Biology of Interleukin-6. *Blood.* 1989;74(1):1-10.
71. Simpson RJ, Hammacher A, Smith DK, et al. Interleukin-6: Structure-function relationships. *Protein Sci.* 1997;6(5):929-955. doi: 10.1002/pro.5560060501.
72. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(10):a016295. doi: 10.1101/cshperspect.a016295.
73. Mantovani A, Garlanda C. Humoral Innate Immunity and Acute-Phase Proteins. *N Engl J Med.* 2023;388(5):439-452. doi:10.1056/NEJMra2206346.
74. Eichberger J, Resch B. Reliability of Interleukin-6 Alone and in Combination for Diagnosis of Early Onset Neonatal Sepsis: Systematic Review. *Front Pediatr.* 2022;10:840778. doi: 10.3389/fped.2022.840778. eCollection 2022.
75. Küster H, Weiss M, Willeitner AE, et al. Interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-6 for early diagnosis of neonatal sepsis 2 days before clinical manifestation. *Lancet.* 1998;352(9136):1271-1277. doi:10.1016/S0140-6736(98)08148-3.
76. Halek J, Novak M, Medkova A, Furst T, Juranova J. The role of nCD64 in the diagnosis of neonatal sepsis in preterm newborns. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2018;162:(XX):1-5. doi: 10.5507/bp.2018.033.
77. Buhimschi CS, Buhimschi IA, Abdel-Razeq S, et al. Proteomic biomarkers of intra-amniotic inflammation: Relationship with funisitis and early-onset sepsis in the premature neonate. *Pediatr Res.* 2007;61(3):318-324. doi:10.1203/01.pdr.0000252439.48564.37.

78. Dilli D, Oguz ŞS, Dilmen U, et al. Predictive values of neutrophil CD64 expression compared with interleukin-6 and C-reactive protein in early diagnosis of neonatal sepsis. *J Clin Lab Anal.* 2010;24(6):363-370. doi:10.1002/jcla.20370.
79. Shi J, Tang J, Chen D. Meta-analysis of diagnostic accuracy of neutrophil CD64 for neonatal sepsis. *Ital J Pediatr.* 2016;42(1):57. doi:10.1186/s13052-016-0268-1.
80. Song Y, Chen Y, Dong X, et al. Diagnostic value of neutrophil CD64 combined with CRP for neonatal sepsis: A meta-analysis. *Am J Emerg Med.* 2019;37(8):1571-1576. doi: 10.1016/j.ajem.2019.05.001. Epub 2019 May 3.
81. Cruz AT, Lane RD, Balamuth F, et al. Updates on pediatric sepsis. *J Am Coll Emerg Physicians Open.* 2020;1(5):981-993. doi: 10.1002/emp2.12173. eCollection 2020 Oct.
82. Schlapbach LJ, Kissoon N. Defining Pediatric Sepsis. *JAMA Pediatr.* 2018;172(4):313-314. doi:10.1001/jamapediatrics.2017.5208.
83. Weiss SL, Peters MJ, Alhazzani W, et al. Surviving sepsis campaign international guidelines for the management of septic shock and sepsis-associated organ dysfunction in children. *Intensive Care Med.* 2020;46(s1):10-67. doi:10.1007/s00134-019-05878-6.
84. Glaser MA, Hughes LM, Jnah A, et al. Neonatal Sepsis: A Review of Pathophysiology and Current Management Strategies. *Adv Neonatal Care.* 2021;21(1):49-60. doi:10.1097/ANC.0000000000000769.
85. Hayes R, Hartnett J, Semova G, et al. Neonatal sepsis definitions from randomised clinical trials. *Pediatr Res.* 2021. doi: 10.1038/s41390-021-01749-3. Online ahead of print.
86. Hensler E, Petros H, Gray CC, et al. The Neonatal Innate Immune Response to Sepsis: Checkpoint Proteins as Novel Mediators of This Response and as Possible Therapeutic/Diagnostic Levers. *Front Immunol.* 2022;13:940930. doi: 10.3389/fimmu.2022.940930.eCollection 2022.
87. Ulevitch RJ. Therapeutics targeting the innate immune system. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(7):512-520. doi:10.1038/nri1396.

88. Li M, Pan S, Chen H, et al. Effect of TLR-4 gene polymorphism on sepsis susceptibility in neonates: a systemic review and meta-analysis. *Biomark Med.* 2022;16(13):1005-1017. doi: 10.2217/bmm-2022-0390. Epub 2022 Sep 2.
89. Kollmann TR, Kampmann B, Mazmanian SK, et al. Protecting the Newborn and Young Infant from Infectious Diseases: Lessons from Immune Ontogeny. *Immunity.* 2017 Mar 21;46(3):350-363. doi: 10.1016/j.immuni.2017.03.009.
90. Dias ML, O'Connor KM, Dempsey EM, et al. Targeting the Toll-like receptor pathway as a therapeutic strategy for neonatal infection. *Am J Physiol Integr Comp Physiol.* 2021;321(6):R879-R902. doi: 10.1152/ajpregu.00307.2020. Epub 2021 Oct 6.
91. Erdman SH, Christensen RD, Bradley PP, et al. Supply and release of storage neutrophils. A developmental study. *Biol Neonate.* 1982;41(3-4):132-137. doi:10.1159/000241541.
92. Terrin G, Passariello A, Manguso F, et al. Serum calprotectin: An antimicrobial peptide as a new marker for the diagnosis of sepsis in very low birth weight newborns. *Clin Dev Immunol.* 2011;2011:291085. doi: 10.1155/2011/291085. Epub 2011 May 30.
93. Abdel-Maaboud M, El-Mazary AAM, Osman AM. Serum calprotectin as a diagnostic marker of late onset sepsis in full-term neonates. *Egypt J Pediatr Allergy Immunol.* 2012;10(1):19-24.
94. Decembrino L, De Amici M, Pozzi M, et al. Serum Calprotectin: A Potential Biomarker for Neonatal Sepsis. *J Immunol Res.* 2015;2015:147973. doi: 10.1155/2015/147973. Epub 2015 Aug 26.
95. Johne B, Fagerhol MK, Lyberg T, et al. Functional and clinical aspects of the myelomonocyte protein calprotectin. *J Clin Pathol - Mol Pathol.* 1997;50(3):113-123. doi:10.1136/mp.50.3.113.
96. Shams SF, Boskabadi H, Keramati MR, et al. Evaluation of immature neutrophil ratio and calprotectin level for the diagnosis of neonatal sepsis. *Iran J Neonatol.* 2017;8(3):19-24. doi:10.22038/ijn.2017.19345.1220.
97. Pirr S, Dauter L, Vogl T, et al. S100A8/A9 is the first predictive marker for neonatal sepsis. *Clin Transl Med.* 2021;11(4):e338. doi: 10.1002/ctm2.338.

98. Silverman MA, Konnikova L, Gerber JS. Impact of Antibiotics on Necrotizing Enterocolitis and Antibiotic-Associated Diarrhea. *Gastroenterol Clin North Am.* 2017;46(1):61-76. doi: 10.1016/j.gtc.2016.09.010.
99. Chiesa C, Signore F, Assumma M, et al. Serial measurements of C-reactive protein and interleukin-6 in the immediate postnatal period: Reference intervals and analysis of maternal and perinatal confounders. *Clin Chem.* 2001;47(6):1016-1022.
100. D'Alton ME, Hankins GDV, Berkowitz RL. Neonatal Encephalopathy and Neurologic Outcome. *Obs Gynecol.* 2014;123(4):896-901. doi: 10.1097/01.AOG.0000445580.65983.d2.
101. Scorza WE. (2024). Prelabor rupture of membranes at term: Management. In Lockwood CJ (Ed.), *UpToDate*. Retriever March, 2024, from <https://www.uptodate.com/contents/prelabor-rupture-of-membranes-at-term-management>.
102. Krueger M, Nauck MS, Sang S, et al. Cord blood levels of interleukin-6 and interleukin-8 for the immediate diagnosis of early-onset infection in premature infants. *Biol Neonate.* 2001;80(2):118-123. doi:10.1159/000047130.
103. Døllner H, Vatten L, Linnebo I, et al. Inflammatory mediators in umbilical plasma from neonates who develop early-onset sepsis. *Biol Neonate.* 2001;80(1):41-47. doi: 10.1159/000047118.
104. Velemínský MJr, Stránský P, Velemínský SSr, et al. Relationship of IL-6, IL-8, TNF and sICAM-1 levels to PROM, pPROM, and the risk of early-onset neonatal sepsis. *Neuro Endocrinol Lett.* 2008;29(3):303-311.
105. Weeks JW, Reynolds L, Taylor D, et al. Umbilical cord blood interleukin-6 levels and neonatal morbidity. *Obstet Gynecol.* 1997;90(5):815-818. doi: 10.1016/S0029-7844(97)00421-3.
106. Cernada M, Badía N, Modesto V, et al. Cord blood interleukin-6 as a predictor of early-onset neonatal sepsis. *Acta Paediatr.* 2012;101(5):e203-207. doi: 10.1111/j.1651-2227.2011.02577.x. Epub 2012 Jan 10.

107. Cobo T, Kacerovsky M, Andrys C, et al. Umbilical Cord Blood IL-6 as Predictor of Early-Onset Neonatal Sepsis in Women with Preterm Prelabour Rupture of Membranes. *PLoS One*. 2013;8(7):e69341. doi: 10.1371/journal.pone.0069341. Print 2013.
108. Fan Y, Yu J-L. Umbilical blood biomarkers for predicting early-onset neonatal sepsis. *World J Pediatr*. 2012;8(2):101-108. doi: 10.1007/s12519-012-0347-3. Epub 2012 May 10.
109. Steinberger E, Hofer N, Resch B. Cord blood procalcitonin and Interleukin-6 are highly sensitive and specific in the prediction of early-onset sepsis in preterm infants. *Scand J Clin Lab Invest*. 2014;74(5):432-436. doi: 10.3109/00365513.2014.900696. Epub 2014 Apr 16.
110. Santana C, Guindeo MC, González G, et al. Cord blood levels of cytokines as predictors of early neonatal sepsis. *Acta Paediatr*. 2001;90(10):1176-1181. doi:10.1080/080352501317061602.
111. Eichberger J, Resch B. Reliability of Interleukin-6 Alone and in Combination for Diagnosis of Early Onset Neonatal Sepsis: Systematic Review. *Front Pediatr*. 2022 Mar 23;10:840778. doi: 10.3389/fped.2022.840778. eCollection 2022.
112. Simonsen KA, Anderson-Berry AL, Delair SF, et al. Early-onset neonatal sepsis. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27(1):21-47. doi:10.1128/CMR.00031-13.
113. Arunachalm A, Pammi M. Biomarkers in early-Onset Neonatal Sepsis: An Update. *Ann Clin Med Microbio*. 2015;1(2):1007.
114. Faix JD. Established and novel biomarkers of sepsis. *Biomark Med*. 2011;5(2):117-130. doi:10.2217/bmm.11.21.
115. Faix JD. Biomarkers of sepsis. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2013;50(1):23-36. doi:10.3109/10408363.2013.764490.
116. Delanghe JR, Speeckaert MM. Translational research and biomarkers in neonatal sepsis. *Clin Chim Acta*. 2015;451(Pt A):46-64. doi: 10.1016/j.cca.2015.01.031. Epub 2015 Feb 4.

117. Miyake F, Ishii M, Hoshina T, et al. Analysis of the Physiological Variation in Neutrophil CD64 Expression during the Early Neonatal Period. *Am J Perinatol.* 2016;33(14):1377-1381. doi: 10.1055/s-0036-1583191. Epub 2016 May 4.
118. Streimish I, Bizzarro M, Northrup V, et al. Neutrophil Cd64 as a Diagnostic Marker in Neonatal Sepsis. *Pediatr Infect Dis J.* 2012;31(7):777-781. doi: 10.1097/INF.0b013e318256fb07.
119. Fang DH, Fan CH, Li J, et al. Ratios of CD64 expressed on neutrophils, monocytes, and lymphocytes may be a novel method for diagnosis of neonatal sepsis. *J Infect Dev Ctries.* 2015;9(2):175-181. doi:10.3855/jidc.4992.
120. Camargo TZS, Marra AR, Bacal NS, et al. Evaluation of Two Methods for Determination of CD64 as a Diagnostic Marker of Infection in Critically Ill Adults. *Biomed Res Int.* 2016;2016:6593232. doi: 10.1155/2016/6593232. Epub 2016 Dec 20.
121. Pradhan R, Jain P, Paria A, et al. Ratio of neutrophilic CD64 and monocytic HLA-DR: A novel parameter in diagnosis and prognostication of neonatal sepsis. *Cytom Part B - Clin Cytom.* 2016;90(3):295-302. doi: 10.1002/cyto.b.21244. Epub 2015 May 29.
122. Dai J, Jiang W, Min Z, et al. Neutrophil CD64 as a diagnostic marker for neonatal sepsis: Meta-analysis. *Adv Clin Exp Med.* 2017;26(2):327-332. doi:10.17219/acem/58782.

6 Seznam použitých zkratk

ANC – absolute neutrophil count

APC – antigen prezentující buňky

APPs – proteiny akutní fáze

ATB – antibiotika

CRP – C-reaktivní protein

CFU – colony forming units

DAMPs – damage associated molecular pattern molecules

EOS – časná novorozenecká sepse, early-onset sepsis

GBS – *Streptococcus agalactiae*, grampozitivní β -hemolytický kok skupiny B

IBD – nespecifický střevní zánět

I/T index – immature to total neutrophil ratio

IL-6 – interleukin-6

IL-1 β – interleukin-1 β

JIA – juvenilní idiopatická artritida

LOS – pozdní novorozenecká sepse, late-onset sepsis

MRI – magnetická rezonance

NET – Neutrophil Extracellular Trap

NLR – neutrofil/lymfocyt index

PAMPs – pathogen associated molecular patterns

PCT – prokalcitonin

PROM – předčasně odteklá plodová voda

PRR – receptory rozpoznávající patogeny

RDS – syndrom dechové tísně novorozence

ROC – Receiver Operating Characteristic

sC – císařský řez

SIRS – systémová zánětlivá reakce organismu

SOFA – Sequential Organ Failure Assessment

TNF- α – tumor necrosis factor- α

TLRs – Toll-like receptory

TTP – time to positivity

UPV – umělá plicní ventilace

7 Seznam tabulek

Tabulka 1. Synonyma S100 proteinu S100A8/A9

Tabulka 2. Synonyma interleukinu-6

Tabulka 3. Výsledky odběrů z publikovaných studií zaměřených na kalprotektin a novorozeneckou sepsi

Tabulka 4. Demografická data sledované kohorty

Tabulka 5. Naměřené hodnoty IL-6 v pupečnickové a periferní krvi (ng/l)

8 Seznam grafů a obrázků

Graf 1. Věkové specifické referenční rozmezí (95_%) pro prokalcitonin u zdravých novorozenců

Graf 2. Distribuce hodnot prokalcitoninu získaných od novorozenců přijatých na JIP pro jiný než infekční důvod

Graf 3. Distribuce hodnot prokalcitoninu získaných u pacientů s časnou novorozeneckou sepsí

Graf 4. Srovnání hodnot sérového kalprotektinu u novorozenců s časnou novorozeneckou sepsí a zdravých kontrol

Graf 5. Srovnání hodnot interleukinu-6 v pupečnickové a periferní krvi

Graf 6. Predikce hodnot interleukinu-6 v periferní krvi na základě hodnot v krvi pupečnickové

Graf 7. Závislost vzrůstu interleukinu-6 v periferní krvi oproti jeho hodnotě v krvi pupečnickové na předčasně odteklé plodové vodě (PROM=1)

Graf 8. Závislost vzrůstu interleukinu-6 v periferní krvi oproti jeho hodnotě v krvi pupečnickové na antibiotické terapii podané matce před porodem (ATB=1)

Graf 9. Závislost vzrůstu interleukinu-6 v periferní krvi oproti jeho hodnotě v krvi pupečnickové na způsobu porodu

Graf 10. Závislost vzrůstu interleukinu-6 v periferní krvi oproti jeho hodnotě v krvi pupečnickové na asfyxii

Graf 11. Závislost vzrůstu interleukinu-6 v periferní krvi oproti jeho hodnotě v krvi pupečnickové na sepsi

Graf 12. Hodnoty nCD64: srovnání skupin pacientů s a bez EOS

Graf 13. Výsek ROC křivky, srovnání senzitivity a specificity pro jednotlivé cut-off hodnoty nCD64

Graf 14. Srovnání hodnot exprese nCD64 v kategoriích pozdní novorozenecké sepse

Graf 15. Srovnání markerů (CRP [mg/l] a nCD64) a jejich výtěžnosti v diagnostice pozdní novorozenecké sepsy

Graf 16. Srovnání markerů (počet leukocytů a nCD64) a jejich výtěžnosti v diagnostice pozdní novorozenecké sepsy

Obrázek 1. Přehled biologického působení interleukinu-6

Obrázek 2. Interleukin-6 při imunitní odpovědi, při zánětu a onemocnění

Obrázek 3. Kaskáda imunitní odpovědi a interakce vrozeného a získaného imunitního systému

Obrázek 4. Vrozená imunita – buněčné a humorální rameno

Obrázek 5. Odběr krve z pupečnickové tepny těsně po vybavení placenty

Obrázek 6. Odběr krve z kubitální žíly u novorozence

9 Seznam publikační a přednáškové činnosti autora

9.1 Seznam publikací a přednášek souvisejících s dizertační prací

9.1.1 Publikace v časopisech s impakt faktorem

Review v časopise s IF: **Medkova, A.**, Srovnal, J., Potomkova, J., Volejnikova, J., Mihal, V. **Multifarious diagnostic possibilities of the S100 protein family: predominantly in pediatrics and neonatology.** World J Pediatr. 2018 Aug;14(4):315-321. doi: 10.1007/s12519-018-0163-5. Epub 2018 Jun 1. PMID: 29858979. (IF=1,03).

Původní vědecká publikace v časopise s IF: Halek, J., Novak, M., **Medkova, A.**, Juranova, J. **The Role of nCD64 in the diagnosis of neonatal sepsis in preterm newborns.** Biomedical Papers. 2018;162(4):284-88. doi: 10.5507/bp.2018.033. (IF=1,141)

9.1.2 Publikace v recenzovaných časopisech

Původní vědecká publikace v recenzovaném časopise: **Bastan, A.**, Halek, J., Furst, T., Mihal, V. **Diagnostický význam postnatální dynamiky interleukinu-6 u předčasně narozených novorozenců.** Pediatr. praxi. 2023;24(6):398-402.

Přehledový článek v recenzovaném časopise: **Medková, A.**, Hálek, J., Mihál, V. **Staré a nové laboratorní znaky novorozenecké sepse.** Pediatr. praxi. 2017;18(4):219-222.

9.1.3 Publikace v nerecenzovaných časopisech

Přehledový článek: **Baštan, A.**, Prošková, J. **Možnosti laboratorní diagnostiky novorozenecké sepse.** Roche Labor Aktuell. 2020;24(1):4-9.

9.1.4 Přednášková činnost

Vědecký poster: **Srovnání sérových hodnot prokalcitoninu a interleukinu-6 z pupečnickové a periferní krve novorozence** na neonatologické konferenci v Českých Budějovicích (XXXIII. Neonatologické dny s mezinárodní, 8.-10.11.2017)

Vědecký poster: **Role nCD64 v diagnostice novorozenecké sepse u předčasně narozených novorozenců** na neonatologické konferenci v Hradci Králové (XXXIV. Neonatologické dny, 10.-12.10.2018)

Vědecký poster: **The role of nCD64 in the diagnosis of neonatal sepsis in preterm newborns** na neonatologické konferenci v Amsterdamu, Nizozemsko (Euro Neonatology 2018, 6. - 7. 12. 2018)

Přednáška: **Novorozenecká sepse. Srovnání pupeční a periferní hodnoty IL-6 u předčasně narozených novorozenců** na pediatrickém kongrese v Olomouci (XIV. Pediatrický kongres s mezinárodní účastí, 26.-28.9. 2019).

9.2 Ostatní publikační a přednášková činnost

Kazuistické sdělení v recenzovaném časopise: **Baštan, A., Ludíková, B., Novák, Z., Karásková, E. Burkittův lymfom žaludku jako příčina sideropenické anemie u 14letého chlapce.** Pediatr. praxi. 2020;21(2): 150-3.

Přehledový článek: **Baštan, A., Ludíková, B. Vrozené hemolytické anemie jako příčiny nekonjugované hyperbilirubinemie u novorozenců – stručný přehled.** Neonatologické listy. 2020;26(2):16-8.

Přehledový článek: Bodnár V., **Baštan, A. Protein S100B a perinatální asfyxie.** Roche Labor Aktuell. 2021;25(3):22-30.

Kapitola v knize: **Baštan, A. Anemizace plodu a novorozence. Dva viníci?** In: Dokoupilová, M., Černý, M. et al. Kazuistiky z neonatologie. Praha: Maxdorf, s.r.o., 2020, pp 159-163. ISBN 978-80-7345-649-9.

Přednáška: **Neobvyklá příčina hepatosplenomegalie** na pediatrickém kongrese v Luhačovicích (Festival kazuistik, 20.-22.4. 2018).

Přednáška: **Není zvracení jako zvracení** na pediatrickém kongrese v Luhačovicích (Festival kazuistik, 26.-28.4. 2019).

10 Grantová činnost

Start-up grant FN Olomouc 2016 – Stanovení sérové hladiny calprotectinu u novorozenců a jeho využití v diagnostice novorozenecké sepse

Start-up grant FN Olomouc 2018, MZ ČR – RVO (FNOI, 00098892) - Vytvoření sofistikovaného systému sběru a vyhodnocování dat u novorozeneckých infekcí s cílem využít analýzu takto získaných dat pro časnou diagnostiku a racionalizaci ATB terapie septických novorozenců

IGA_LF_2018_043 - Molekulární a imunologická podstata vybraných cytopenií u dětí

IGA_LF_2021_047 - Onemocnění dětského věku

11 Přílohy

Příloha 1 – Multifarious diagnostic possibilities of the S100 protein family: predominantly in pediatrics and neonatology

Multifarious diagnostic possibilities of the S100 protein family: predominantly in pediatrics and neonatology

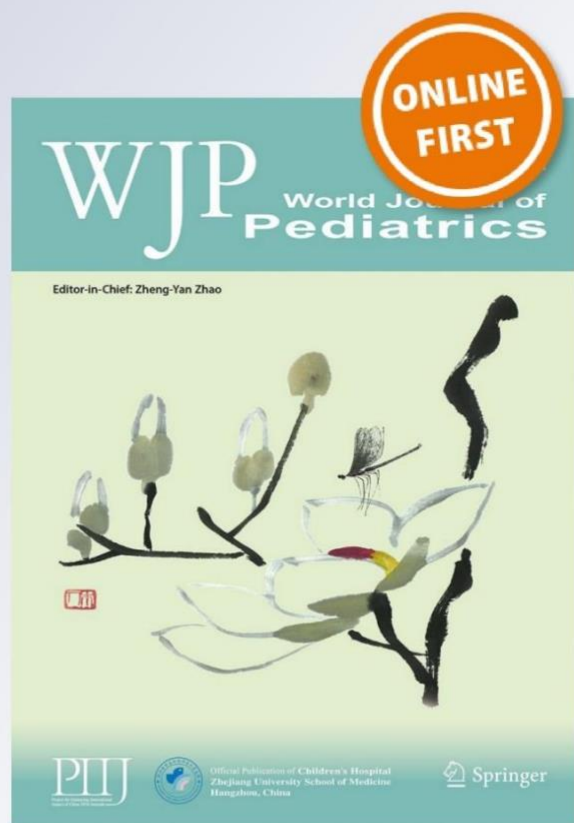
Anna Medkova, Josef Srovnal, Jarmila Potomkova, Jana Volejnikova & Vladimir Mihal

World Journal of Pediatrics

ISSN 1708-8569

World J Pediatr

DOI 10.1007/s12519-018-0163-5



 Springer

Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Children's Hospital, Zhejiang University School of Medicine. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".



Multifarious diagnostic possibilities of the S100 protein family: predominantly in pediatrics and neonatology

Anna Medkova¹ · Josef Srovnal^{1,2} · Jarmila Potomkova^{1,3} · Jana Volejnikova^{1,2} · Vladimir Mihal^{1,2}Received: 26 June 2017 / Accepted: 11 May 2018
© Children's Hospital, Zhejiang University School of Medicine 2018

Abstract

Background Numerous articles related to S100 proteins have been recently published. This review aims to introduce this large protein family and its importance in the diagnostics of many pathological conditions in children and adults.

Data sources Based on original publications found in database systems, we summarize the current knowledge about the S100 protein group and highlight the most important proteins with focus on pediatric use.

Results The S100 family is composed of Ca²⁺ and Zn²⁺ binding proteins, which are present only in vertebrates. Some of these proteins can be used as diagnostic markers in cardiology (S100A1, S100A12), oncology (S100A2, S100A5, S100A6, S100A14, S100A16, S100P, S100B), neurology (S100B), rheumatology (S100A8/A9, S100A4, S100A6, and S100A12), nephrology and infections (S100A8, S100A9, S100A8/A9, S100A12). The most useful S100 proteins in pediatrics are S100A8, S100A9, heterodimers S100A8/A9, S100B and S100A12.

Conclusions The S100 family members are promising biomarkers and provide numerous possibilities for implementation into clinical practice to optimize the differential diagnostic process.

Keywords S100 · Diagnostics · Marker · Pediatrics

Introduction

S100 proteins, found only in vertebrates [1], are low molecular weight proteins with two Ca²⁺ binding sites of EF-hand type [2]. Another ion, which is bound by these proteins and is intensively studied, is Zn²⁺; thanks to this, S100 proteins exert important intracellular and extracellular roles [3]. They can also bind other transition metals like Cu²⁺ and Mn²⁺ [4]. S100 proteins received their name due to their solubility in 100% saturated ammonium sulphate [5]. Most recently, 21–25 members of the S100 family have been described [6, 7]. They are tissue- and cell-specific [8]; some of them have an intracellular or an

extracellular function only while others have both of the mentioned roles [9]. After they transit from intracellular to extracellular space, they begin to act as alarmins, also known as damage-associated molecular pattern molecules [10]. According to Boteanu et al., alarmins are a multifactorial group of molecules which are able to activate immune cells through specific receptors and are critical for immune response to tissue stress [11]. They also play a role in tissue repair, for example, S100A4 is neuroprotective in brain injuries [12], equally as S100B [13, 14]. Furthermore, some S100 proteins (e.g., S100B and S100A8) extinguish the inflammatory response [15–18]. Extracellular S100 proteins function through interacting with cell-surface receptors, such as G protein-coupled receptors, scavenger receptors and cell-surface heparan sulphate proteoglycans, but predominantly with receptors for advanced glycosylation end products (RAGE) and Toll-like receptor 4 (TLR4) [9, 10]. TLR4 are mainly known to recognize lipopolysaccharide, a component present in G-negative bacteria [19]. They activate polymorphonuclear leukocytes, monocytes and macrophages and thus initiate an immune response [20–22]. RAGE are expressed mainly in cells involved in the immune-inflammatory response [23]. They are present in normal tissues but upregulated upon accumulation of ligands [24]. RAGE

✉ Anna Medkova
medkova.andula@gmail.com

¹ Department of Pediatrics, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University and University Hospital Olomouc, I. P. Pavlova 6, 779 00 Olomouc, Czech Republic

² Faculty of Medicine and Dentistry, Institute of Molecular and Translational Medicine, Palacky University Olomouc, Hněvotínská, 1333/5, 779 00 Olomouc, Czech Republic

³ Department of Science and Research, University Hospital Olomouc, I. P. Pavlova 6, 779 00 Olomouc, Czech Republic

are also probably one of the main regulators of tissue repair and acute injuries [25]. RAGE are quiescent in adult skeletal muscles, but become expressed in activated, proliferating satellite cells and differentiating myoblasts in injured muscles, with cessation after muscle regeneration [26].

Diagnostic markers in adult medicine

Cardiology

The main cardiospecific S100 protein is S100A1 with important Ca^{2+} mediated functions in myocardial cells. Different degrees of ischemia during cardiopulmonary bypass terminated by reperfusion are induced and influenced by Ca^{2+} cytosolic overload. Thus, S100A1 might be an important intracellular link in ischemia–reperfusion injury of the heart [27]. S100A1 can also be detected in extracellular compartments after myocardial ischemia [28]. S100A1 is required for appropriate cardiomyocyte contraction [29, 30]. As was shown by Most et al. in 2004, adenovirus-mediated myocardial *S100A1* gene delivery can restore S100A1 protein expression in a failing myocardium and rescue contractile dysfunction through normalised intracellular Ca^{2+} and Na^+ handling [30]. Another S100 protein which appears to be important in cardiology is a S100A8/A9 heterodimer, whose increased plasma level might be a warning sign of cardiovascular event [31]. S100A6 is significantly elevated in acute coronary syndrome and myocardial infarction [32].

Neurology

High levels of S100B are found in the serum and cerebrospinal fluid (CSF) after a brain injury with levels in the CSF being 10–100 times higher than in the serum [33]. The half-time in the serum is approximately 30 minutes [34]. Even a minor brain injury may substantially increase the levels of S100B during the first days after the injury [35]. According to a study published in 2012 by Cervellin et al., in which they assessed the diagnostic accuracy of serum S100B protein in comparison with computed tomography (CT) findings in patients with mild head injuries, the levels of S100B were significantly higher in patients with a CT scan pathology. Therefore, serum S100B levels might allow the omission of CT in some patients with mild head injury [36]. However, this would require maximum caution because enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test or mass spectrometry are much slower than CT scan and cannot evaluate the size and anatomical position of the lesion.

S100A6 is another S100 protein important in neurology, especially regarding the pathophysiology of Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis (ALS). S100A6 is upregulated in the white matter in Alzheimer's disease mouse models

and is overexpressed in astrocytes located near the impaired motoneuron axons in ALS [32].

Rheumatology

The most useful and best known S100 protein in rheumatology is S100A8/A9 heterodimer, also known as calprotectin. A systematic review from 2015 clearly shows that serum levels of S100A8/A9 are elevated in active rheumatoid arthritis (RA) and decrease after successful therapy. S100A8/A9 is an independent and significant predictor of erosive disease and a marker for monitoring the effectiveness of biological treatment. The level of S100A8/A9 is high in the synovial fluid of RA patients which suggests local production by inflamed synovium [37].

Tantivitayakul et al. in a study from 2016 showed that proteins S100A8 and S100A9 can be used as non-invasive prognostic markers in patients with lupus nephritis. The mRNA levels of S100A8 and S100A9 in the peripheral blood leukocytes were significantly higher in active lupus nephritis patients than in patients with quiescent lupus nephritis or healthy controls and correlated significantly with treatment response. Moreover, mRNA expression levels of the S100A8 and S100A9 in the kidney were associated with an early loss of kidney function [38].

Oncology

Many S100 proteins may have both pro- and anti-tumorigenic effects. S100P is upregulated in almost all cancers that have been studied; it is detected in primary tumours and metastatic lesions in serum, saliva, bile and faeces [6]. S100B is released into the extracellular space by astrocytes [39] and promotes glioma growth. Tumour progression and angiogenesis can be decelerated by inhibiting S100B [40]. S100B inhibition might also be used in the treatment of malignant melanoma [41]. S100B is also important in monitoring of breast cancer treatment: elevated tissue and serum levels of S100B predict poor disease-free survival in endocrine-treated patients and are strongly associated with subsequent disease recurrence [42]. S100A7 is detected in the serum of patients with lung and ovarian cancer and can serve as a potential marker of these cancers [43, 44]. S100A6 is significantly elevated in the early stages of non-small cell lung cancer, gastric cancer, urinary bladder urothelial carcinoma and ovarian cancer [32]. According to a 2013 meta-analysis, S100A4 overexpression in colorectal carcinoma patients correlates with tumour progression and poor prognosis [45]. Upregulation of S100A6, S100A7, S100A8, S100A9, S100A11, S100A15, S100P and S100Z can be seen in breast cancer, where conversely S100A2 and S100A4 are down-regulated [7]. Zhang et al. proved that serum and mRNA expression of S100A8 and S100A9 is upregulated in renal cell carcinoma compared with benign kidney lesions, other urological tumours or non-cancer controls [46].

Diabetes

S100A8/A9 plays an important role in atherogenesis in type I diabetes by interacting with RAGE receptors. This interaction on hepatic Kupffer cells, as a response to hyperglycemia, results in increased production of interleukin-6, which is involved in inflammatory thrombocytosis. Inhibition of the S100A8/A9 binding to RAGE (e.g., using paquinimod), therefore, reduces diabetes-induced thrombocytosis [47]. Other authors demonstrated that hyperglycaemia triggers release of S100A8/A9 from neutrophils and by binding to RAGE it ultimately leads to increased thrombopoietin (TPO) production in the liver. TPO causes megakaryocyte proliferation and increased platelet production [48].

Chronic wounds show disturbances in proteins regulating the healing process. Krisp et al. showed in 2013 that expression of the inflammatory response stimulating S100 proteins—largely S100A8 and S100A9—in chronic diabetic foot exudates was almost ten times higher [49].

S100 proteins in pediatrics

In contrast with adult medicine, the S100 proteins have different use in pediatrics, mainly due to a divergent disease spectrum. The most widely explored member of the S100 family in pediatrics is the S100A8/A9 heterodimer, which can be found under several synonyms in the literature, such as calprotectin, calgranulin A/B, MRP8/14, cystic fibrosis factor, etc (Table 1). S100A8/A9 is an antimicrobial, calcium- and zinc-binding heterocomplex protein contained in the cytosol of innate immune cells, such as neutrophils, and is expressed on the membrane of monocytes [61]. It is released immediately after host–pathogen interaction and, therefore, has been used as a nonspecific marker of activation of granulocytes and mononuclear phagocytes. S100A8/A9 represents about one half of the total cytosolic protein content in neutrophils and approximately 5% in monocytes [62]. It interacts with cytoskeletal components and this function is very important for transendothelial migration [63]. Its antimicrobial activity is probably exerted through its zinc molecule [64]. S100A8/A9 can be measured in all body fluids (including serum, saliva, faeces, urine, semen, sputum, liquor, abscess fluid).

Gastroenterology

S100A8/A9 in faeces (faecal calprotectin, FC) can be quantified in patients with inflammatory bowel diseases (IBD) and correlates positively with disease activity. Patients with moderate and severe IBD have elevated FC levels, most markedly in ulcerative colitis (UC) with extensive large bowel involvement; conversely, FC levels are low when only the rectum is affected. Similarly in Crohn's disease (CD) patients, the highest levels of FC are seen when large intestine is involved. Interestingly,

Table 1 Synonyms of S100A8/A9 protein adapted from Dhas 2012 [50]

Synonyms	Authors
L1 antigen	Fagerhol et al. (1980) [51]
27E10 antigen	Zwadlo et al. (1986) [52]
Cystic fibrosis antigen	Dorin et al. (1987) [53]
MRP8/14 ^a	Odink et al. (1987) [54]
L1 light and heavy chain	Andersson et al. (1988) [55]
Calgranulin A (CAGA)/calgranulin B (CAGB)	Wilkinson et al. (1988) [56]
p8,14	Hogg et al. (1989) [57]
60B8-A and B antigen	Tobe et al. (1989) [58]
Calprotectin	Steinbakk et al. (1990) [59]
S100A8/S100A9	Schafer et al. (1995) [60]

^aMethylated related protein [51]

UC and CD patients in remission have elevated S100A8/A9, either because endoscopic remission occurs later than clinical remission, or because it might predict disease recurrence [65]. A meta-analysis from 2010 evaluated whether FC examination in suspected IBD could reduce the number of endoscopic procedures, and confirmed that FC is an appropriate screening tool for patients with suspected IBD [66]. However, significant evidence to safely exclude IBD was rather found in studies involving adults patients. Two years later, Van de Vijver et al. proved that normal levels of faecal S100A8/A9 can safely rule out IBD [67]. This might be helpful for general practitioners dealing with patients with abdominal symptoms and/or other complaints resembling IBD, where normal levels of FC (<50 µg/g) can justify a “watch and wait” strategy. On the contrary, FC is of no significant value in the routine diagnostic work-up in coeliac disease [68].

Pneumology

In 2013, Cobanoglu et al. explored whether bronchial asthma, atopy and lung functions are related to serum levels of S100A8/A9 as an inflammatory marker in children. Although bronchial asthma is an inflammatory condition, they failed to confirm this hypothesis [69]. On the other hand, as early as in 1996, Golden et al. discovered that serum levels of S100A8/A9 were significantly higher in patients with cystic fibrosis (CF), reflecting the extent of inflammation [70]. Serum S100A8/A9 plays an important role in predicting the time to CF exacerbation. Monitoring the S100A8/A9 levels in both serum and sputum might be used to check the efficacy of antimicrobial treatment in CF exacerbation, because the levels decrease significantly after an appropriate therapy [71]. The results of this study were partially confirmed by Horsley, who observed no changes in sputum S100A8/A9 levels but a significant

decrease in serum S100A8/A9 levels after an antibiotic treatment [72]. Clearly, there is a need for further studies to be performed.

Rheumatology

Like in adults with rheumatoid arthritis where serum levels of heterodimer S100A8/A9 are used to monitor impact of biological treatment and to predict erosive disease, S100A8/A9 levels in children predict the response to biological (anti-tumor necrosis factor) treatment of juvenile idiopathic arthritis (JIA) [73]. The S100A8/A9 levels decrease after the initiation of therapy in good responders and vice versa, the disease recurrence can be predicted by their re-elevation in JIA patients in remission. In terms of Kawasaki disease, persistent high levels of serum S100A8/A9 are associated with a higher risk of developing coronary arterial lesions [74]. Henoch-Schönlein purpura, one of the most frequent vasculitis in the pediatric population [75], affects mainly the small vessels of the skin, joints, gastrointestinal tract and kidneys [76]. Here, serum S100A8/A9 is a reliable marker of renal injury [64]. Recent study from 2017 [77] evaluated S100 proteins (S100A4, S100A6, S100A8/9 and S100A12) in the serum and urine as potential biomarkers of global and renal-specific disease activity in childhood-onset systemic lupus erythematosus (cSLE). The results showed that higher urine levels of S100 proteins, but not the serum levels, are associated with increased lupus nephritis activity in cSLE. S100A4 was the most promising lupus nephritis activity predictor.

Neonatology

During the last two decades, we have witnessed much progress in neonatology, particularly in caring for premature newborns. Neonates who are born prematurely are prone to many pathological conditions, e.g., necrotizing enterocolitis (NEC). NEC is a serious intestinal disorder with high mortality and morbidity, which is difficult to diagnose due to its non-specific symptoms. Many diagnostic markers are studied, one of which is S100A8/A9 (FC) protein in the stool. A systematic review from 2016 clearly shows that faecal S100A8/A9 is elevated in newborns suffering from NEC, but further studies are needed to define cut-off values according to postnatal and gestational age [78]. Compeotto et al. found no correlation between S100A8/A9 levels in the stool and gestational age [79]. Yang et al. also found that FC levels had no correlation with gestational age, but they tended to decrease insignificantly with postnatal age [80]. Conversely, fecal S100A8/A9 significantly increased with postnatal age in a study by Josefsson et al. [81]. Strong postnatal and gestational dependences were also confirmed in a study by Zoppelli et al. [82].

In addition to S100A8/A9, another S100 protein was studied as a diagnostic marker of NEC,

namely S100A12 (Calgranulin-C, MRP6). S100A12 is predominantly expressed and secreted by neutrophil granulocytes [83] and in small amounts by monocytes [84]. In healthy subjects, it can be found in tissues and organs where neutrophils and monocytes/macrophages are common. The main properties of this protein comprise chemotactic activity and activation of intracellular signalling cascades leading to cytokine production and induction of oxidative stress [85, 86]. According to studies from 2012 and 2013, S100A12 might be an early marker of NEC, but its cut-off levels must be estimated [87, 88].

Neonatal sepsis is a serious, potentially life-threatening disease with high mortality and morbidity, especially in preterm newborns. It is necessary to distinguish between early-onset and late-onset sepsis. Early-onset sepsis (EOS) is associated with acquisition of microorganisms from the mother's body and appears during the first 3 days of a newborn's life. Late-onset sepsis (LOS) is attributed to medical care, so the spectrum of pathogens is different from EOS. It occurs between the 4th and 90th day of life. Early diagnosis is essential for adequate therapy of neonatal sepsis and involves two main factors: systemic inflammatory reaction and detection of microorganisms in the bloodstream (blood culture). This is complicated particularly in prematures, where clinical signs of sepsis are nonspecific and blood culture has poor sensitivity in EOS (ongoing antibiotherapy, technical problems, etc.). Numerous classical markers of sepsis are being used, but none of them is entirely ideal.

A few works examined whether S100A8/A9 could be a suitable marker of neonatal sepsis. To achieve good predictive value, it is important to precisely define the cohort of newborns in terms of gestational age, postnatal age and the time of sepsis onset (LOS or EOS). A 2011 multicentre study evaluated diagnostic accuracy of serum S100A8/A9 in diagnosing LOS in very low birth weight premature newborns. Serum S100A8/A9 was significantly higher in the septic group compared to the control group [89]. An Egyptian study in 2012 focusing on full-term neonates [90] observed significantly higher serum S100A8/A9 levels in neonates with LOS compared to the controls. The levels of S100A8/A9 correlated positively with hemoculture results, morbidity and mortality, because the cases with positive blood cultures and poor outcomes had the highest levels of serum calprotectin. The most recent study appeared in 2015 [91], where the investigators did not distinguish between preterm and full-term neonates, nor between EOS and LOS. They studied a small cohort of 41 neonates without a control group; 8 had sepsis with a positive blood culture and 33 had suspected clinical sepsis. The data showed that plasma concentration of S100A8/A9 was elevated in newborns with sepsis. The authors established a cut-off for the diagnosis of sepsis to be 2.2 µg/mL of S100A8/A9 in the plasma with a sensitivity and specificity of 62.5 and 69.7%, respectively.

Asphyxia and post-asphyctic complications represent another pathological condition which should be handled intensively. Intraventricular haemorrhage is one of these complications and the most common form of cerebral haemorrhage in preterm neonates. It is difficult to diagnose, because during the first 72-hour clinical symptoms may be missing and radiologic imaging for brain damage might be negative [92]. S100B protein in serum and even in the urine is a useful marker for early detection of intraventricular haemorrhage in the post-asphyctic period [93, 94]. Its examination can identify newborns at risk of hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) after asphyxia, reflect the extent of brain damage and help with prognostication in infants with HIE [50, 51, 95].

Laboratory methods

The most commonly used laboratory procedure is ELISA, a plate-based assay technique enabling detection and quantification of peptides, proteins, antibodies and hormones. ELISA is cheap and quick, but rather a semiquantitative method. The future belongs to mass spectrometry, which serves as a versatile and effective tool in chemical analysis. It provides highly specific molecular information with excellent sensitivity. The disadvantages of ELISA are, above all, accuracy and price. Moreover, cut-off levels must be set up carefully for every single test, diagnosis, material and pathological condition.

Conclusions

The S100 family has multiple members; some of them are well known, others waiting to be investigated. The S100 proteins are promising biomarkers and may be suitable for implementation into clinical practice and differential diagnostics. In pediatric practice, the leading S100 protein is the S100A8/A9 heterodimer, better known as calprotectin. Larger clinical trials are needed to validate the clinical significance of S100 proteins. Some clinical trials related to S100 proteins are ongoing, mostly focused on S100B in brain trauma and headache.

Acknowledgements Funding was provided by Palacky University Olomouc and Ministry of Education, Youth and Sports (grant nos IGA LF UP 2017_13, NPU LO 1304).

Author contributions AM is the principal author of this review. JS was responsible for laboratory part of the article and drafted part of the manuscript from the point of senior researcher's view. JP searched for publications in database systems and revised the manuscript. JV revised the manuscript and performed the language editing. VM was a supervisor of the project.

Funding This review was supported by grants NPU LO 1304 and IGA LF UP 2017_13.

Compliance with ethical standards

Ethical approval Not required for this review article.

Conflict of interest All authors declared that they have no conflict of interest.

References

- Schäfer BW, Heizmann CW. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem Sci.* 1996;21:134–40.
- Donato R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech.* 2003;60:540–51.
- Baudier J, Glasser N, Gerard D. Ions binding to S100 proteins. I. Calcium- and zinc-binding properties of bovine brain S100 α , S100 α ($\alpha\beta$), and S100 β ($\beta\beta$) protein: Zn²⁺ regulates Ca²⁺ binding on S100 β protein. *J Biol Chem.* 1986;261:18192–203.
- Gilston BA, Skaar EP, Chazin WJ. Binding of transition metals to S100 proteins. *Sci China Life Sci.* 2016;59:792–801.
- Moore B. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun.* 1965;19:739–44.
- Bresnick AR, Weber DJ, Zimmer DB. S100 proteins in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2015;15:96–109.
- Li F, Men X, Zhang W. S100 protein in breast tumor. *Indian J Cancer.* 2014;51:67–71.
- Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001;33:637–68.
- Donato R, Cannon BR, Sorci G, Riuzzi F, Hsu K, Weber DJ, et al. Functions of S100 proteins. *Curr Mol Med.* 2013;13:24–57.
- Bertheloot D, Latz E. HMGB1, IL-1 α , IL-33 and S100 proteins: dual-function alarmins. *Cell Mol Immunol.* 2016;14:43–64.
- Boteanu RM, Suica VI, Uyy E, Ivan L, Dima SO, Popescu I, et al. Alarmins in chronic noncommunicable diseases: atherosclerosis, diabetes and cancer. *J Proteom.* 2016;153:21–9.
- Dmytriyeva O, Pankratova O, Owczarek S, Sonn K, Soroka V, Ridley CM, et al. The metastasis-promoting S100A4 protein confers neuroprotection in brain injury. *Nat Commun.* 2012;3:1197.
- Willoughby KA, Kleindienst A, Müller C, Chen T, Muir JK, Ellis EF. S100B protein is released by in vitro trauma and reduces delayed neuronal injury. *J Neurochem.* 2004;91:1284–91.
- Ellis EF, Willoughby KA, Sparks SA, Chen T. S100B protein is released from rat neonatal neurons, astrocytes, and microglia by in vitro trauma and anti-S100 increases trauma-induced delayed neuronal injury and negates the protective effect of exogenous S100B on neurons. *J Neurochem.* 2007;101:1463–70.
- Sorci G, Giovannini G, Riuzzi F, Bonifazi P, Zelante T, Zagarella S, et al. The danger signal S100B integrates pathogen- and danger-sensing pathways to restrain inflammation. *PLoS Pathog.* 2011;7:e1001315.
- Zhao J, Endoh I, Hsu K, Tedla N, Endoh Y, Geczy CL. S100A8 modulates mast cell function and suppresses eosinophil migration in acute asthma. *Antioxid Redox Signal.* 2011;14:1589–600.
- Caldwell RL, Opalenik SR, Davidson JM, Caprioli RM, Nanney LB. Tissue profiling MALDI mass spectrometry reveals prominent calcium-binding proteins in the proteome of regenerative MRL mouse wounds. *Wound Repair Regen.* 2008;16:442–9.
- Sroussi HY, Williams RL, Zhang QL, Villines D, Marucha PT. Ala42S100A8 ameliorates psychological-stress impaired cutaneous wound healing. *Brain Behav Immun.* 2009;23:755–9.

19. Anderberg SB, Luther T, Frithiof R. Physiological aspects of Toll-like receptor 4 activation in sepsis-induced acute kidney injury. *Acta Physiol (Oxf)*. 2017;219:573–88.
20. Farina C, Theil D, Semlinger B, Hohlfeld R, Meinl E. Distinct responses to monocytes to Toll-like receptor ligands and inflammatory cytokines. *Int Immunol*. 2004;16:799–809.
21. Hayashi F, Means TK, Luster AD. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood*. 2003;102:2660–9.
22. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2001;1:135–45.
23. Ramasamy R, Yan SF, Herold K, Clynes R, Schmidt AM. Receptor for advanced glycation end products: fundamental roles in the inflammatory response: winding the way to the pathogenesis of endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1126:7–13.
24. Chavakis T, Bierhaus A, Nawroth PP. RAGE (receptor for advanced glycation end products): a central player in the inflammatory response. *Microbes Infect*. 2004;6:1219–25.
25. Sorci G, Riuzzi F, Giambanco I, Donato R. RAGE in tissue homeostasis, repair and regeneration. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1833:101–9.
26. Riuzzi F, Sorci G, Sagheddu R, Donato R. HMGB1–RAGE regulates muscle satellite cell homeostasis through p38-MAPK- and myogenin-dependent repression of Pax7 transcription. *J Cell Sci*. 2012;125:1440–54.
27. Brett W, Mandinova A, Remppis A, Sauder U, Rüter F, Heizmann CW, et al. Translocation of S100A1 calcium binding protein during heart surgery. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;284:698–703.
28. Reppel M, Sasse P, Pickorz R, Tang M, Roell W, Duan Y, et al. S100A1 enhances the L-type Ca^{2+} current in embryonic mouse and neonatal rat ventricular cardiomyocytes. *J Biol Chem*. 2005;280:36019–28.
29. Most P, Seifert H, Gao E, Funakoshi H, Völkers M, Heierhorst J, et al. Cardiac S100A1 protein levels determine contractile performance and propensity toward heart failure after myocardial infarction. *Circulation*. 2006;114:1258–68.
30. Most P, Pleger ST, Völkers M, Heidt B, Boerries M, Weichenhan D, et al. Cardiac adenoviral S100A1 gene delivery rescues failing myocardium. *J Clin Invest*. 2004;114:1550–63.
31. Averill MM, Kerkhoff C, Bornfeldt KE. S100A8 and S100A9 in cardiovascular biology and disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32:223–9.
32. Donato R, Sorci G, Giambanco I. S100A6 protein: functional roles. *Cell Mol Life Sci*. 2017;74:2749–60.
33. Petzold A, Keir G, Lim D, Smith M, Thompson EJ. Cerebrospinal fluid (CSF) and serum S100B: release and wash-out pattern. *In Brain Res Bull*. 2003;61:281–5.
34. Ghanem G, Loir B, Morandini R, Sales F, Lienard D, Eggermont A, et al. On the release and half-life of S100B protein in the peripheral blood of melanoma patients. *Int J Cancer*. 2001;94:586–90.
35. Ercole A, Thelin EP, Holst A, Bellander BM, Nelson DW. Kinetic modelling of serum S100b after traumatic brain injury. *BMC Neurol*. 2016;16:93.
36. Cervellin G, Benatti M, Carubicchio A, Mattei L, Cerasti D, Aloe R, Lippi G. Serum levels of protein S100B predict intracranial lesions in mild head injury. *Clin Biochem*. 2012;45:408–11.
37. Abildtrup M, Kingsley GH, Scott DL. Calprotectin as a biomarker for rheumatoid arthritis: a systematic review. *J Rheumatol*. 2015;42:760–70.
38. Tantivitayakul P, Benjachat T, Somporn P, Leelahavanichkul A, Kittikovit V, Hirankarn N, et al. Elevated expressions of myeloid-related proteins-8 and -14 are danger biomarkers for lupus nephritis. *Lupus*. 2016;25:38–45.
39. Winningham-Major F, Staecker JL, Barger SW, Coats S, Van Eldik LJ. Neurite extension and neuronal survival activities of recombinant S100 beta proteins that differ in the content and position of cysteine residues. *J Cell Biol*. 1989;109:3063–71.
40. Wang H, Zhang L, Zhang IY, Chen X, Da Fonseca A, Wu S, et al. S100B promotes glioma growth through chemoattraction of myeloid-derived macrophages. *Clin Cancer Res*. 2013;19:3764–75.
41. Hartman KG, McKnight LE, Liriano MA, Weber DJ. The evolution of S100B inhibitors for the treatment of malignant melanoma. *Future Med Chem*. 2013;5:97–109.
42. Charmsaz S, Hughes É, Bane FT, Tibbitts P, McIlroy M, Byrne C, et al. S100β as a serum marker in endocrine resistant breast cancer. *BMC Med*. 2017;15:79.
43. Gagnon A, Kim JH, Schorge JO, Ye B, Liu B, Hasselblatt K, et al. Use of a combination of approaches to identify and validate relevant tumor-associated antigens and their corresponding autoantibodies in ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2008;14:764–71.
44. Zhang H, Zhao Q, Chen Y, Wang Y, Gao S, Mao Y, et al. Selective expression of S100A7 in lung squamous cell carcinomas and large cell carcinomas but not in adenocarcinomas and small cell carcinomas. *Thorax*. 2008;63:352–9.
45. Liu Y, Tang W, Wang J, Xie L, Li T, He Y, et al. Clinicopathological and prognostic significance of S100A4 overexpression in colorectal cancer: a meta-analysis. *Diagn Pathol*. 2013;8:181.
46. Zhang L, Jiang H, Xu G, Wen H, Gu B, Liu J, et al. Proteins S100A8 and S100A9 are potential biomarkers for renal cell carcinoma in the early stages: results from a proteomic study integrated with bioinformatics analysis. *Mol Med Rep*. 2015;11:4093–100.
47. Kraakman MJ, Lee MK, Al-Sharea A, Dragoljevic D, Barret TJ, Montenot E. Neutrophil-derived S100 calcium-binding proteins A8/A9 promote reticulated thrombocytosis and atherogenesis in diabetes. *J Clin Invest*. 2017;127:2133–47.
48. Lee RH, Bergmeier W. Sugar makes neutrophils RAGE: linking diabetes-associated hyperglycemia to thrombocytosis and platelet reactivity. *J Clin Invest*. 2017;127:2040–3.
49. Krisp C, Jacobsen F, McKay MJ, Molloy MP, Steintraesser L, Wolters DA. Proteome analysis reveals antiangiogenic environments in chronic wounds of diabetes mellitus type 2 patients. *Proteomics*. 2013;13:2670–81.
50. Dhas B, Bha VT, Ganc B. Role of calprotectin in infection and inflammation. *Curr Pediatr Res*. 2012;16:83–94.
51. Fagerhol MK, Dale I, Andersson T. Release and quantitation of a leukocyte derived protein (L1). *Scan J Haematol*. 1980;24:393–8.
52. Zwadlo G, Schlegel R, Sorg C. A monoclonal antibody to a subset of human monocytes found only in the peripheral blood and inflammatory tissues. *J Immunol*. 1986;137:512–8.
53. Dorin JR, Novak M, Hill RE, Brock DJ, Secher DS, van Heyningen V. A clue to the basic defect in cystic fibrosis from cloning the CF antigen gene. *Nature*. 1987;326:614–7.
54. Odink K, Cerletti N, Brügger J, Clerc RG, Tarcsay L, Zwado G, et al. Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages of rheumatoid arthritis. *Nature*. 1987;330:80–2.
55. Andersson KB, Sletten K, Berntzen HB, Dale I, Brandtzaeg P, Jellum E, et al. The leucocyte L1 protein: identity with the cystic fibrosis antigen and the calcium-binding MRP-8 and MRP-14 macrophage components. *Scand J Immunol*. 1988;28:241–5.
56. Wilkinson MM, Busuttill A, Hayward C, Brock DJ, Dorin JR, van Heyningen V. Expression pattern of two related cystic fibrosis-associated calcium-binding proteins in normal and abnormal tissues. *J Cell Sci*. 1988;91:221–30.
57. Hogg N, Allen C, Edgeworth J. Monoclonal antibody 5.5 reacts with p8,14, a myeloid molecule associated with some vascular endothelium. *Eur J Immunol*. 1989;19:1053–61.
58. Tobe T, Murakami K, Tomita M, Nozawa R. Amino acid sequences of 60B8 antigens induced in HL-60 cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. The antigens are identical with

- macrophage-related protein-14 and -8. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1989;37:1576–80.
59. Steinbakk M, Naess-Andersen CF, Lingaas E, Dale I, Brandtzaeg P, Fagerhol MK. Antimicrobial actions of calcium binding leucocyte L1 protein, calprotectin. *Lancet*. 1990;336:763–5.
 60. Schafer BW, Wicki R, Engelkamp D, Mattei MG, Heizmann CW. Isolation of a YAC clone covering a cluster of nine S100 genes on human chromosome 1q21: rationale for a new nomenclature of the S100 calcium-binding protein family. *Genomics*. 1995;25:638–43.
 61. Stříž I, Trebichavský I. Calprotectin—a pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation. *Physiol Res*. 2004;53:245–53.
 62. Hessian PA, Edgeworth J, Hogg N. MRP-8 and MRP-14, two abundant Ca(2+)-binding proteins of neutrophils and monocytes. *J Leukoc Biol*. 1993;53:197–204.
 63. Vogl T, Ludwig S, Goebeler M, Strey A, Thorey IS, Reichelt R, et al. MRP8 and MRP14 control microtubule reorganization during transendothelial migration of phagocytes. *Blood*. 2004;104:4260–8.
 64. Mariani A, Marsili M, Nozzi M, Faricelli R, Chiarelli F, Breda L. Serum calprotectin: review of its usefulness and validity in pediatric rheumatic diseases. *Clin Exp Rheumatol*. 2015;33:109–14.
 65. Krzesiek E. Fecal calprotectin as an activity marker of inflammatory bowel disease in children. *Adv Clin Exp Med*. 2015;24:815–22.
 66. van Rheenen PF, Van de Vijver E, Fidler V. Faecal calprotectin for screening of patients with suspected inflammatory bowel disease: diagnostic meta-analysis. *BMJ*. 2010;341:c3369.
 67. Van de Vijver E, Schreuder aB, Cnossen WR, Muller Kobold aC, van Rheenen PF. Safely ruling out inflammatory bowel disease in children and teenagers without referral for endoscopy. *Arch Dis Child*. 2012;97:1014–8.
 68. Biskou O, Gardner-Medwin J, Mackinder M, Bertz M, Clark C, Svolos V, et al. Faecal calprotectin in treated and untreated children with coeliac disease and juvenile idiopathic arthritis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2016;63:112–5.
 69. Cobanoglu N, Galip N, Dalkan C, Bahceci NN. Leptin, ghrelin and calprotectin: inflammatory markers in childhood asthma? *Multidiscip Respir Med*. 2013;8:62.
 70. Golden BE, Clohessy PA, Russell G, Fagerhol MK. Calprotectin as a marker of inflammation in cystic fibrosis. *Arch Dis Child*. 1996;74:136–9.
 71. Gray RD, Imrie M, Boyd AC, Porteous D, Innes JA, Greening AP. Sputum and serum calprotectin are useful biomarkers during CF exacerbation. *J Cyst Fibros*. 2010;9:193–8.
 72. Horsley AR, Davies JC, Gray RD, Macleod KA, Donovan J, Aziz ZA, et al. Changes in physiological, functional and structural markers of cystic fibrosis lung disease with treatment of a pulmonary exacerbation. *Thorax*. 2013;68:532–9.
 73. Anink J, Van Suijlekom-Smit LW, Otten MH, Prince FH, van Rossum MA, Dolman KM, et al. MRP8/14 serum levels as a predictor of response to starting and stopping anti-TNF treatment in juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2015;17:200.
 74. Abe J, Jibiki T, Noma S, Nakajima T, Saito H, Terai M. Gene expression profiling of the effect of high-dose intravenous Ig in patients with Kawasaki disease. *J Immunol*. 2005;174:5837–45.
 75. Saulsbury FT. Clinical update: Henoch Schonlein Purpura. *Lancet*. 2007;369:976–8.
 76. Chen O, Zhu XB, Ren P, Wang YB, Sun RP, Wei DE. Henoch Schonlein Purpura in children: clinical analysis of 120 cases. *Afr Health Sci*. 2013;13:94–9.
 77. Turnier JL, Fall N, Thornton S, Witte D, Bennett MR, Appenzeller S, et al. Urine S100 proteins as potential biomarkers of lupus nephritis activity. *Arthritis Res Ther*. 2017;19:242.
 78. Pergialiotis V, Konstantopoulos P, Karampetsou N, Koutaki D, Gkioka E, Perrea DN, et al. Calprotectin levels in necrotizing enterocolitis: a systematic review of the literature. *Inflamm Res*. 2016;65:847–52.
 79. Campeotto F, Baldassarre M, Butel MJ, Viallon V, Nganzali F, Soulaines P, et al. Fecal calprotectin: cutoff values for identifying intestinal distress in preterm infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2009;48:507–10.
 80. Yang Q, Smith PB, Goldberg RN, Cotton CM. Dynamic change of fecal calprotectin in very low birth weight infants during the first month of life. *Neonatology*. 2008;94:267–71.
 81. Josefsson S, Bunn SK, Domellof M. Fecal calprotectin in very low birth weight infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2007;44:407–13.
 82. Zoppelli L, Güttel C, Bittrich HJ, Andrée C, Wirth S, Jenke A. Fecal calprotectin concentrations in premature infants have a lower limit and show postnatal and gestational age dependence. *Neonatology*. 2012;102:68–74.
 83. Pietzsch J, Hoppmann S. Human S100A12: a novel key player in inflammation? *Amino Acids*. 2009;36:381–9.
 84. Guignard F, Mauel J, Markert M. Identification and characterization of a novel human neutrophil protein related to the S100 family. *Biochemical J*. 1995;309:395–401.
 85. Yang Z, Yan WX, Cai H, Tedla N, Armishaw C, Di Girolamo N, et al. S100A12 provokes mast cell activation: a potential amplification pathway in asthma and innate immunity. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119:106–14.
 86. Yilmaz Y, Yonal O, Eren F, Atug O, Hamzaoglu HO. Serum levels of soluble receptor for advanced glycation endproducts (sRAGE) are higher in ulcerative colitis and correlate with disease activity. *J Crohns Colitis*. 2011;5:402–6.
 87. Däbritz J, Foell D, Wirth S, Jenke A. Fecal S100A12: identifying intestinal distress in very-low-birth-weight infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2013;57:204–10.
 88. Däbritz J, Jenke A, Wirth S, Foell D. Fecal phagocyte-specific S100A12 for diagnosing necrotizing enterocolitis. *J Pediatr*. 2012;161:1059–64.
 89. Terrin G, Passariello A, Manguso F, Salvia G, Rapacciuolo L, Messina F, et al. Serum calprotectin: an antimicrobial peptide as a new marker for the diagnosis of sepsis in very low birth weight newborns. *Clin Dev Immunol*. 2011;2011:291085.
 90. Abdel-Maaboud M, El-Mazary AA, Osman AM. Serum calprotectin as a diagnostic marker of late onset sepsis in full-term neonates. *Egypt J Pediatr Allergy Immunol*. 2012;10:19–24.
 91. Decembrino L, De Amici M, Pozzi M, De Silvestri A, Stronati M. Serum calprotectin: a potential biomarker for neonatal sepsis. *J Immunol Res*. 2015;2015:147973.
 92. Avery GB, Fletcher MA, MacDonald MG. *Neonatology: pathophysiology and management of the newborn*. Philadelphia: Lippincott; 1994.
 93. Gazzolo D, Di Iorio R, Marioni E, Masetti P, Serra G, Giovannini L, et al. S100B protein is increased in asphyxiated term infants developing intraventricular hemorrhage. *Crit Care Med*. 2002;30:1356–60.
 94. Gazzolo D, Bruschetti M, Lituania M, Serra G, Bonacci W, Michetti F. Increased urinary S100B protein as an early indicator of intraventricular hemorrhage in preterm infants: correlation with the grade of hemorrhage. *Clin Chem*. 2001;47:1836–8.
 95. Gazzolo D, Marinoni E, Di Iorio R, Bruschetti M, Kornacka M, Lituania M, et al. Urinary S100B protein measurements: a tool for the early identification of hypoxic-ischemic encephalopathy in asphyxiated full-term infants. *Crit Care Med*. 2004;32:131–6.

The role of nCD64 in the diagnosis of neonatal sepsis in preterm newborns

Jan Halek^a, Martin Novak^b, Anna Medkova^a, Tomas Furst^c, Jarmila Juranova^b

Background. Diagnosing neonatal sepsis is difficult, particularly in preterm newborns. A promising method appears to be evaluation of cell surface markers by flow cytometry.

Methods. This prospective study investigated 217 newborns suspected of having early- or late-onset neonatal sepsis. In all, flow cytometry was used to determine the proportion of CD64-positive neutrophils (nCD64). Based on the clinical course and laboratory test results, newborns were categorized as having proven, possible, clinical or no neonatal sepsis. Subsequently, associations between the categories and nCD64 values were analyzed.

Results. There were significant associations between nCD64 values and the development of sepsis in newborns with both early- or late-onset sepsis.

Conclusion. nCD64 expression is significantly elevated in preterm newborn with early and late onset sepsis. The results show that nCD64 is a reliable marker for diagnosing neonatal sepsis.

Key words: CD64, neonatal sepsis, preterm newborn

Received: December 20, 2017; Accepted: June 5, 2018; Available online: June 21, 2018
<https://doi.org/10.5507/bp.2018.033>

^aNeonatal Ward and Department of Pediatrics, University Hospital Olomouc and Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc, Czech Republic

^bDepartment of Hemato-Oncology, University Hospital Olomouc and Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc, Czech Republic

^cDepartment of Mathematical Analysis and Mathematical Applications, Faculty of Science, Palacky University Olomouc, Czech Republic
Corresponding author: Jan Halek, e-mail: jan.halek@fnol.cz

BACKGROUND

Neonatal sepsis (NS) is a rather serious but relatively common health problem. The incidence is around 2.7%, being particularly high in the population of very-low-birth-weight (VLBW) infants^{1,2}. The consequences of NS can be minimized by early initiation of antibiotic therapy. Due to high NS rates, vulnerability of the organism in the neonatal period and concerns about consequences (considerable mortality, association with other acute or chronic complications, etc.), antibiotic therapy is commonly started in clinical practice even though nonspecific clinical signs develop. This is in spite of the fact that antibiotic overuse is linked to major negative outcomes (development of necrotizing enterocolitis, emergence of resistant bacterial strains, impact on the neonatal microbiome, etc.) (ref.^{3,4}). The reliable and early diagnosis of NS is therefore essential but, unfortunately, rather difficult. Traditionally, it relies on identifying the pathogen causing bacterial infection in the bloodstream and the presence of typical clinical signs. However, the sensitivity of blood culture is low, particularly in early-onset sepsis (EOS), mainly due to antibiotic therapy frequently administered to mothers in the perinatal period, varying bacterial counts in samples and technical difficulties such as collecting enough blood, particularly in VLBW neonates. Another drawback of classical bacteriological tests is their duration since it takes 48 to 72 h from collection to identify a sample as clearly negative⁵. In the neonatal period, the clinical signs of infection are nonspecific, once again, mainly in preterm newborns; they overlap with other immaturity

complications (infant respiratory distress syndrome, circulatory instability, patent ductus arteriosus, impaired thermoregulation, etc.) (ref.^{6,7}). Given the pitfalls of diagnosing NS, novel markers are searched for and used. Under ideal circumstances, these should fulfill the following criteria: Such markers should allow diagnosis in both the early and late stages of infection and timely response to adequate therapy. The sensitivity of an ideal marker should approach 100%, and so should its specificity. With regard to patients, the marker should be detected in small sample volumes; the tests should be rapid, simple and inexpensive. These criteria are not met by any of the currently used markers. The so-called classical hematological markers (leukocyte, neutrophil and platelet counts, I:T ratio, immature leukocyte count, various hematological indices, etc.) are commonly included in examination patterns but their diagnostic accuracy and specificity are limited. Probably the most widely used "biochemical" marker of NS, C-reactive protein (CRP), is one of the so-called late markers. Its sensitivity is mainly low in the early stages of infection; its reliability increases, particularly with serial measurements. In that case, its negativity practically rules out the presence of NS. It is not completely specific for NS (ref.^{7,9}). Procalcitonin (PCT), an intermediate marker, is relatively specific, providing prognostic information as well; it decreases rapidly in response to effective therapy. However, its complex postnatal "physiological" dynamics makes its measurements difficult, particularly in EOS (ref.^{10,11}). Among cytokines, interleukin 6 (and, possibly, interleukin 8) seems to be most commonly used in practice. This very early NS marker is pathophysiologically

involved in the initial phases of the organism's response to microorganism invasion. The drawback is its very fast dynamics as it rapidly decreases after the initial phases of the infectious process. Therefore, it should be used in combination with an intermediate or late marker (PCT, CRP) (ref.^{4,7,8,12}). Studies have tested the use of numerous other potential markers such as proteins, cytokines, metabolomic and genomic markers. Additionally, molecular genetic methods such as polymerase chain reaction or sequencing are definitely promising as these may improve pathogen detection, particularly in EOS (ref.^{13,14}).

Flow cytometry is a bioanalytical method which combines the principles of fluorescence microscopy and haematological analyser. It is based on measuring and subsequently analysing the physical characteristics of cells in the carrier fluid in interaction with light radiation. The basic quantities usually analysed are the size of the cells, the density of their inner content (granularity) and the intensity of fluorescently marked monoclonal antibodies for the detection of complementary antigens on the surface and inside the analysed cells. Given its high sensitivity, rapid laboratory response, wide range of analytical possibilities and also relatively low cost of an examination, flow cytometry became a "gold standard" in many branches of biometric analysis.

The organism's response to pathogenic strain invasion may be recognized early by detecting surface markers on cells involved in the immune response. Numerous markers on the surface of leukocytes and macrophages have been studied, one of them being CD64. Also known as Fc-gamma receptor 1, CD64 is a high-affinity receptor for monomeric IgG antibodies, thus involved in the process of phagocytosis of opsonized bacteria. Since the expression of the receptor on neutrophil surfaces increases approximately one hour after invasion, it may be a relative early marker of infectious complications. Reports on the use of CD64 expression on neutrophils (nCD64) in diagnosing NS are somewhat contradictory, yielding inconsistent results¹³. The presented pilot study aimed to verify whether one of possible methods for nCD64 measurements may be used for diagnosing NS in preterm newborns.

MATERIALS AND METHODS

Patients

The study analyzed blood samples collected from pre-term neonates (born before gestational week 34) cared for in the University Hospital Olomouc Neonatal Ward between March 2016 and June 2017. There were two groups of patients: (1) According to the standard ward routine, blood samples were collected 12 to 14 h postnatally for blood cell counts, biochemical analysis and EOS diagnosis. (2) Blood samples were collected for repeated laboratory tests or in case of suspected late-onset sepsis (LOS) at any time but no sooner than 72 h postnatally.

Methods

The analysis utilized samples collected to determine the numbers of blood elements and perform differential

blood count. In all samples, assessment and quantification of given surface cell markers were carried out by means of flow cytometry. Analysis of the acquired samples was carried out by means of multicolour flow cytometry with an antibody panel against CD3, CD4, CD8, CD16+CD56+, CD14, CD15, CD163, CD19, CD138, CD45RO, CD64 and the appropriate isotope controls (EXBIO, eBioscience, BD Biosciences) on a cytometer FACSCanto II (Becton Dickinson). The samples were processed by a lyse-no-wash method, a volume of 50 µL of peripheral blood was incubated with the antibodies for 30 minutes in the dark at the temperature of 5 °C, and subsequently, erythrocytes were lysed by adding lysing solution BD FACS lyse (Becton Dickinson) for 30 minutes in the dark at the temperature of 25 °C.

The proportion of the target subpopulation CD64 on CD15-positive granulocytes was determined by means of the analytical software FACS Diva ver. 8.0.1 (BD Biosciences), while at least 50 000 events in the granulocyte gate were collected for the data analysis. CD64 positivity was assessed by median fluorescence intensity, with T-lymphocytes as the population of reference.

The other diagnostic and therapeutic procedures were carried out in accordance with the previously established ward standards; these included common biochemical marker measurements. Prior to therapy, blood samples were collected for microbiology tests.

Subsequently, the disease status and course was assessed and, based on the clinical course and laboratory test results, newborns were categorized as follows:

A: Possible (clinical) sepsis (infection without proof of pathogen): All of the following criteria must be met:

1. Treating physician institutes appropriate antimicrobial therapy for bloodstream infection for at least 5 days
2. NO pathogens detected in blood culture or blood cultures not performed
3. NO apparent infection at another site AND two of the following criteria must be met:
 - a. Fever or temperature instability (frequent incubator adjustment) or hypothermia
 - b. Tachycardia or new/more frequent bradycardia
 - c. Recapillarization time >2 s
 - d. New or more frequent apnea (>20 s)
 - e. Other signs of bloodstream infection: skin color, laboratory evidence (CRP, interleukin), increased O₂ requirement (intubation), unstable condition, apathy

B: Proven sepsis (Laboratory-confirmed bloodstream infection with proof of pathogen) Pathogen isolated in blood culture or cerebrospinal fluid (pathogen not related to infections at other sites) AND two of the following criteria

- a. Fever (>38 °C) or temperature instability (frequent incubator adjustment) or hypothermia
- b. Tachycardia (> 200/min) or new/ more frequent bradycardia
- c. Recapillarization time >2 s
- d. New or more frequent apnea (>20 s)

- e. Other sign of bloodstream infection: skin color (only when recapillarization time is not used); laboratory findings (CRP, interleukin), increased oxygen requirement (intubation), unstable condition, apathy

C: No sepsis (negative clinical and laboratory signs, negative blood culture) (ref.^{15,16}).

Statistical analysis

Differences in continuous variables between groups (e.g. difference in nCD64 expression between patients with and without sepsis) were determined using boxplots and the Kruskal–Wallis test. Standard ROC curves were created as follows: for all possible cutoff values of the tested predictor, 1–specificity (x axis) was plotted against sensitivity (y axis). Given the small number of patients, data visualization was generally preferred to hypothesis testing. 0.05 was the significance level. All analyses were conducted using MATLAB 2013b and Statistics Toolbox (The MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts, United States).

Ethics

No additional sample collection was necessary as the analyses were performed using material obtained by blood sampling in accordance with the standard ward routine. Complementary examinations were consistent with informed parental consent.

RESULTS

Group 1 comprised a total of 174 patients with a mean birth weight of 1613 g (410-2450) and a mean gestational age at birth of 13 weeks (24-33), of whom 23 had proven (n=1) or possible (n=22) sepsis; the others had no infectious complications. In all 23 patients with proven or possible sepsis, antibiotic therapy was initiated according to the ward standards. Statistical analysis clearly showed

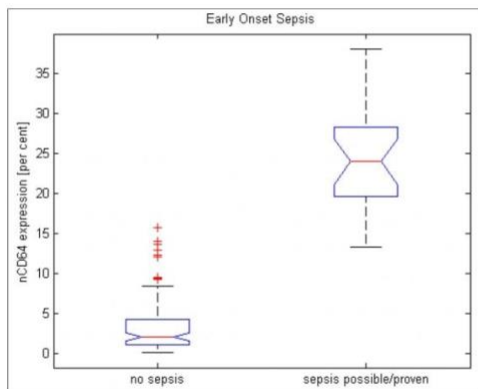


Fig. 1. nCD64 values: comparison of EOS patients with and without sepsis. The difference in nCD64 expression is statistically significant at a significance level of 10^{-13} .

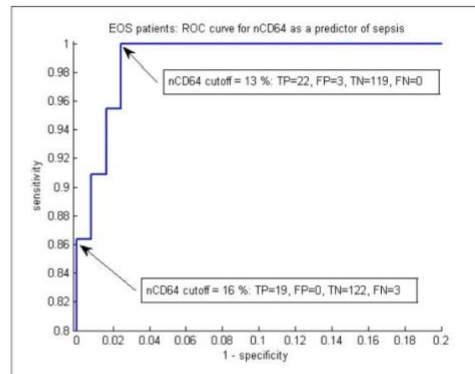


Fig. 2. A portion of the ROC curve: comparison of sensitivity and specificity for various nCD64 cutoffs; true positive (TP), false positive (FP), true negative (TN) and false negative (FN) cases.

a significant association between nCD64 values and the presence of sepsis, either proven or possible (Fig. 1).

A portion of the ROC curve (Fig. 2) indicates, once again, an excellent predictive value of nCD64 expression for NS (proven or possible). The ideal cutoff appears to be 13% (sensitivity and specificity, negative and positive predictive values).

Group 2 (LOS) comprised 43 patients with a mean birth weight of 1282 g (410-2200) and a mean gestational age at birth of 31 weeks (24-33), of whom 4 had proven and 4 had possible sepsis; the other 35 patients had no sepsis. Once again, nCD64 values were clearly associated with sepsis (proven or possible, $P < 0.0001$); also significant was the difference in nCD64 values between the two groups of patients with sepsis ($P = 0.0001$, see Fig. 3). Due to the small number of patients, the ROC curve was not plotted and assessed. In these patients, another analysis compared nCD64 association with CRP and leukocyte count performed at the same time. The association was closer for nCD64 than for CRP or leukocyte count (Fig. 4 and 5).

DISCUSSION

There is increasing evidence in the literature to support the use of nCD64 for diagnosing sepsis in general as well as neonatal sepsis, in both full-term and preterm newborns^{15,17-22}. The data obtained so far show that this marker has a relatively early increase; the advantage is that its values are stable in the early postnatal period²³. Study results are inconsistent, possibly due to different methods used to measure nCD64 (ref.²⁴⁻²⁷) or, especially, due to low homogeneity of study samples. A great proportion of the published studies fail to properly consider different patient groups (preterm vs full-term newborns), disease pathophysiology (in case of EOS, the disease has different dynamics depending on whether infection develops prenatally or is due to postnatal microbial invasion; LOS)

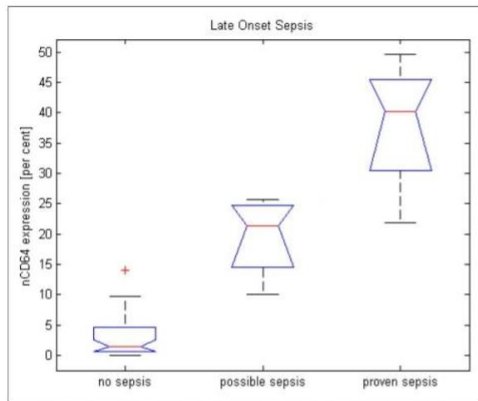


Fig. 3. Comparing nCD64 expression values between LOS categories; the differences are significant at a level of $P=0.0001$.

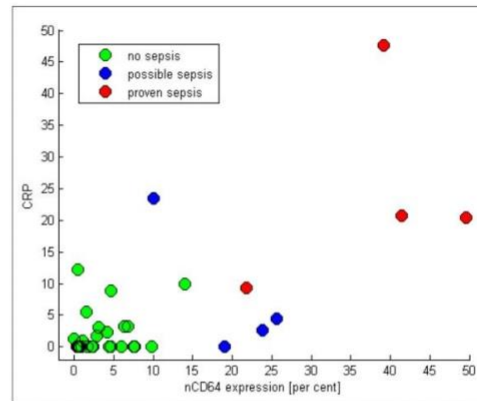


Fig. 4. Comparing markers (CRP [mg/L] and nCD64) and their yields in the diagnosis of LOS. Expression of nCD64 (vertical distribution) is clearly better at stratifying patients than CRP (horizontal distribution).

or time of sample collection, ignoring the dynamics of increase in markers of infection.

So far, two meta-analyses have been published. Surprisingly, even those do not provide consistent conclusions. One considers nCD64 a marker of little benefit²⁸ while the other reports its excellent diagnostic accuracy²⁹. Comparison of the yields of nCD64 and CRP in the diagnosis of LOS shows a closer association in case of nCD64, reflecting the fact the rise of CRP after bacterial invasion is slower in the neonatal population, making it the so-called late marker of infection³⁰.

The present study's results show a very close and significant association between nCD64 and NS. For several reasons, however, the findings cannot be generalized. First, our method is different from those commonly used to measure nCD64 (ref.^{24,26}) as it is based on the proportion of CD64-positive neutrophils which is not an index most frequently compared with the standard. Second, the study sample was small and, moreover, the NS rate was relatively low. Therefore, more accurate criteria and larger samples will be needed in further studies.

Based on our findings, flow cytometry proves to be a useful tool for early and sensitive detection of neonatal sepsis. Currently, there are however only a few facilities able to carry out comprehensive multicolour examination by flow cytometry, especially due to difficult method standardization and data interpretation, which require long-term training of laboratory staff. Due to the same reasons, examinations are available almost only during the usual working hours, which reduces the potential to rapidly detect sepsis markers in the time window of 1-12 h after the invasion of pathogens into the blood flow. Nevertheless, rapid development of technology in the field of flow cytometry, especially in analytical software and algorithm assessment, bears the promise of fast progress and therefore better availability of even comprehensive assessments also in this field.

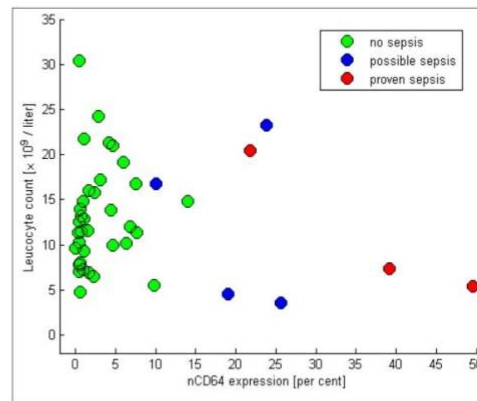


Fig. 5. Comparing markers (leukocyte count and nCD64) and their yields in the diagnosis of LOS. Expression of nCD64 (vertical distribution) is clearly better at stratifying patients than leukocyte count (horizontal distribution).

CONCLUSION

nCD64 expression is closely and significantly associated with neonatal sepsis in preterm newborn. The present study's results show nCD64 to be a useful tool for early and sensitive detection of neonatal sepsis in the specific population of preterm newborn. Before it is introduced into routine clinical practice, however, further investigation is needed - with more accurate criteria and larger samples.

Abbreviations: NS, Neonatal sepsis; VLBW, Very low birth weight; EOS, Early-onset sepsis; CRP, C-reactive protein; PCT, Procalcitonin; LOS, Late-onset sepsis; TP, True positive; FP, False positive; TN, True negative; FN, False negative.

Acknowledgement: Supported by Ministry of Health, Czech Republic – conceptual development of research organization (FNOL, 0098892).

Author contributions: JH: study design, collection and analysis of clinical data, clinical evaluation data analysis and interpretation, writing of the manuscript; MN: study design, laboratory analysis, data analysis and interpretation, writing of the manuscript; AM: collection and analysis of clinical data, clinical evaluation data analysis and interpretation JJ: laboratory analysis, data analysis and interpretation TF: data analysis and interpretation

Conflict of interest statement: The authors state that there are no conflicts of interest regarding the publication of this article.

REFERENCES

- Umlauf VN, Dreschers S, Orlikowsky TW. Flow Cytometry in the Detection of Neonatal Sepsis. *Int J Pediatr* 2013;2013:763191. doi: 10.1155/2013/763191
- Gillfillan M, Bhandari V. Biomarkers for the diagnosis of neonatal sepsis and necrotizing enterocolitis: Clinical practice guidelines. *Early Hum Dev* 2017;105:25-33.
- Simonsen KA, Anderson-Berry AL, Delair SF, Davies HD. Early-onset neonatal sepsis. *Clin Microbiol Rev* 2014;27(1):21-47.
- Rajh AA, Mohan P. Biomarkers in early-onset neonatal sepsis: an update *Ann Clin Med Microbio* 2015;1(2):1007.
- Chirico G, Loda C. Laboratory aid to the diagnosis and therapy of infection in the neonate. *Pediatr Rep* 2011;3(1):e1.
- Faix JD. Established and novel biomarkers of sepsis. *Biomark Med* 2011;5(2):117-30.
- Faix JD. Biomarkers of sepsis. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2013;50(1):23-36.
- Bhandari V. Effective Biomarkers for Diagnosis of Neonatal Sepsis. *J Pediatric Infect Dis Soc* 2014;3(3):234-45.
- Wang K, Bhandari V, Chepustanova S, Huber G, O'Hara S, O'Hern CS, Shattuck MD, Kirby M. Which biomarkers reveal neonatal sepsis? *PLoS One* 2013;8(12):e82700.
- Machado JR, Soave DF, da Silva MV, de Menezes LB, Etchebehere RM, Monteiro ML, dos Reis MA, Corrêa RR, Celes MR. Neonatal sepsis and inflammatory mediators. *Mediators Inflamm* 2014;2014:269681. doi: 10.1155/2014/269681
- Steinberger E, Hofer N, Resch B. Cord blood procalcitonin and Interleukin-6 are highly sensitive and specific in the prediction of early-onset sepsis in preterm infants. *Scand J Clin Lab Invest* 2014;74(5):432-6.
- Huang FK, Chen HL, Yang PH, Lin HC. Bird's Eye View of a Neonatologist: Clinical Approach to Emergency Neonatal Infection. *Pediatr Neonatol* 2016;57(3):167-73. doi: 10.1016/j.pedneo.2015.06.004
- Delanghe JR, Speckaert MM. Translational research and biomarkers in neonatal sepsis. *Clin Chim Acta* 2015;451(Pt A):46-64.
- Chauhan N, Tiwari S, Jain U. Potential biomarkers for effective screening of neonatal sepsis infections: An overview. *Microb Pathog* 2017;107:234-42.
- Kipfmüller F, Schneider J, Prusseit J, Dimitriou I, Zur B, Franz AR, Bartmann P, Mueller A. Role of Neutrophil CD64 Index as a Screening Marker for Late-Onset Sepsis in Very Low Birth Weight Infants. *PLoS One* 2015;10(4):e0124634.
- Leistner R, Piening B, Gastmeier P, Geffers C, Schwab F. Nosocomial infections in very low birthweight infants in Germany: current data from the National Surveillance System NEO-KISS. *Klin Paediatr* 2013;225(2):75-80.
- Du J, Li L, Dou Y, Li P, Chen R, Liu H. Diagnostic utility of neutrophil CD64 as a marker for early-onset sepsis in preterm neonates. *PLoS One* 2014;9(7):e102647.
- Stremish I, Bizzarro M, Northrup V, Wang C, Renna S, Koval N, Li FY, Ehrenkranz R, Rinder HM, Bhandari V. Neutrophil CD64 as a diagnostic marker in neonatal sepsis. *Pediatr Infect Dis J* 2012;31(7):777-81.
- Soni S, Wadhwa N, Kumar R, Faridi MM, Sharma S, Chopra A, Singh S. Evaluation of CD64 expression on neutrophils as an early indicator of neonatal sepsis. *Pediatr Infect Dis J* 2013;32(1):e33-7.
- Elawady S, Botros SK, Sorour AE, Ghany EA, Elbatran G, Ali R. Neutrophil CD64 as a diagnostic marker of sepsis in neonates. *J Investig Med* 2014;62(3):644-9.
- Bhandari V, Wang C, Rinder C, Rinder H. Hematologic profile of sepsis in neonates: neutrophil CD64 as a diagnostic marker. *Pediatrics* 2008;121(1):129-34.
- Juskewitch JE, Abraham RS, League SC, Jenkins SM, Smith CY, Enders FT, Grebe SK, Carey WA, Huskins WC. Monocyte HLA-DR expression and neutrophil CD64 expression as biomarkers of infection in critically ill neonates and infants. *Pediatr Res* 2015;78(6):683-90.
- Miyake F, Ishii M, Hoshina T, Ichikawa S, Araki S, Kinjo T, Shibata E, Hachisuga T, Kusuhara K. Analysis of the Physiological Variation in Neutrophil CD64 Expression during the Early Neonatal Period. *Am J Perinatol* 2016;33(14):1377-81.
- Stremish I, Bizzarro M, Northrup V, Wang C, Renna S, Koval N, Li FY, Ehrenkranz R, Rinder HM, Bhandari V. Neutrophil CD64 as a Diagnostic Marker in Neonatal Sepsis. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 2012;31(7):777-81.
- Fang DH, Fan CH, Li J, An Q, Yao H, Ji Q, Niu G. Ratios of CD64 expressed on neutrophils, monocytes, and lymphocytes may be a novel method for diagnosis of neonatal sepsis. *J Infect Dev Ctries* 2015;9(2):175-81.
- Zinsly Sampaio Camargo T, Marra AR, Bacal NS, Casaroto E, Pinto LM, Pasternak J, Victor ED, Dos Santos OF, Edmond MB. Evaluation of Two Methods for Determination of CD64 as a Diagnostic Marker of Infection in Critically Ill Adults. *Biomed Res Int* 2016;2016:6593232. doi: 10.1155/2016/6593232
- Pradhan R, Jain P, Paria A, Saha A, Sahoo J, Sen A, Mukherjee S, Som T, Hazra A, Warner N, Singh AK, Chatterjee M. Ratio of neutrophilic CD64 and monocytic HLA-DR: A novel parameter in diagnosis and prognostication of neonatal sepsis. *Cytometry B Clin Cytom* 2016;90(3):295-302.
- Shi J, Tang J, Chen D. Meta-analysis of diagnostic accuracy of neutrophil CD64 for neonatal sepsis. *Ital J Pediatr* 2016;42(1):57.
- Dai J, Jiang W, Min Z, Yang J, Tan Y, Ma T, Ge Z. Neutrophil CD64 as a diagnostic marker for neonatal sepsis: Meta-analysis. *Adv Clin Exp Med* 2017;26(2):327-32.
- Choo YK, Cho HS, Seo IB, Lee HS. Comparison of the accuracy of neutrophil CD64 and C-reactive protein as a single test for the early detection of neonatal sepsis. *Korean J Pediatr* 2012;55(1):11-7.

Příloha 3 - Diagnostický význam postnatální dynamiky interleukinu-6 u předčasně narozených novorozenců

► PŘEHLEDOVÉ ČLÁNKY

DIAGNOSTICKÝ VÝZNAM POSTNATÁLNÍ DYNAMIKY INTERLEUKINU-6 U PŘEDČASNĚ NAROZENÝCH NOVOROZENCŮ

Diagnostický význam postnatální dynamiky interleukinu-6 u předčasně narozených novorozenců

MUDr. Anna Baštan¹, MUDr. Jan Hálek, Ph.D.^{1,2}, RNDr. Tomáš Fürst, Ph.D.³, prof. MUDr. Vladimír Mihál, CSc.¹

¹Dětská klinika, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta Univerzity Palackého Olomouc

²Novorozenecké oddělení, Fakultní nemocnice Olomouc

³Katedra matematické analýzy a aplikací matematiky, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého, Olomouc

Úvod: Cílem této studie bylo porovnat hodnoty interleukinu-6 v pupečnickové a periferní krvi novorozence. Klinickým cílem bylo zjistit, zda lze vyšetřením krve z pupečnicku nahradit brzký postnatální odběr periferní krve.

Pacienti a metody: Do studie byli zahrnuti novorozenci (< 35. týden gestace) narození v roce 2016–2018 ve Fakultní nemocnici Olomouc. U těchto novorozenců se zároveň podařilo odebrat dostatečné množství krve z pupečnicku.

Výsledek: Párový odběr se zdařil u 73 novorozenců. Mezi pupečnickovou a periferní hodnotou interleukinu-6 byl zjištěn významný rozdíl ($p < 0,001$). Medián prvního měření (pupečnicková krev) byl 6,5 ng/l, medián druhého měření (periferní krev) 56 ng/l. Nárůst je téměř desetinásobný.

Závěr: Hodnoty interleukinu-6 z pupečnickové krve a z časného postnatálního odběru se podstatně liší. Na tuto skutečnost je nutné myslet při jeho klinickém využití.

Klíčová slova: novorozeneček, sepsis, interleukin-6, pupečník.

Diagnostic significance of postnatal interleukin-6 dynamics in preterm neonates

Introduction: The aim of this study was to compare interleukin-6 values in umbilical cord and peripheral blood of newborns. The clinical goal was to determine whether the examination of cord blood can replace early postnatal peripheral blood collection.

Patients and methods: Study included premature newborns (< 35th week of gestation) born in 2016–2018 at Olomouc University Hospital. At the same time, it was possible to collect a sufficient amount of blood from the umbilical cord in these newborns.

Results: Paired sampling was successful in 73 of these newborns. A significant difference ($p < 0,001$) was found between the umbilical cord and peripheral interleukin-6 values. The median of the first measurement (cord blood) was 6,5 ng/l, the median of the second measurement (peripheral blood) was 56 ng/l. The increase is almost ten times bigger.

Conclusion: The difference of values between interleukin-6 from umbilical cord blood and from early postnatal collection are significantly different and it is necessary to keep it in mind during its clinical use.

Key words: newborn, sepsis, interleukin-6, umbilical cord.

Úvod

Neonatologie zaznamenala v péči o předčasně narozené novorozence v posledních 20 letech obrovský pokrok. Velkým problémem nadále zůstává včasná diagnostika a léčba infekčních, resp. septických novorozenců. Dle statistiky publikované Yale-New Haven Hospital

je novorozenecká sepsis příčinou 11 % všech úmrtí v novorozeneckém věku (1). Zranitelnost těchto pacientů je dána především jejich nezralým imunitním systémem.

Ideálním postupem je razantní léčba dětí s novorozeneckou sepsí a naopak vynechání antimikrobiální léčby u novorozenců bez

onemocnění. Nadbytečná antibiotická terapie zasahuje do organismu nezralého dítěte, prokazatelně zvyšuje riziko vzniku nozokomiálních infekcí a dalších komplikací – např. nekrotizující enterokolitidy (2). Časná a spolehlivá diagnostika novorozenecké sepsis je jedním ze zásadních témat současné neonatologie.



MUDr. Anna Baštan
Dětská klinika, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta Univerzity Palackého Olomouc
Anna.Bastan@fnol.cz

Cit. zkr: Pediatr. praxi. 2023;24(6):x-x
Článek přijat redakcí: 5. 9. 2023
Článek přijat k publikaci: 24. 10. 2023

Základními pilíři diagnostiky novorozenecké sepsy jsou klinické příznaky a laboratorní diagnostika (průkaz patogenu a laboratorní průkaz reakce organismu na infekci). Rozpoznat včas novorozence se sepsí je obtížné. Klinické příznaky jsou nespecifické a mohou být nenápadné. Nejčastější příznaky rozvíjejícího se septického stavu u novorozence jsou: náhle vzniklá potřeba kyslíku či ventilační podpory, apnoické pauly, bradykardie, hypotenze, intolerance glukózy, kapilární návrat > 3 s, rozdíl teploty mezi periferií a tělesným jádrem > 2 °C, letargie/dráždivost, tepelná nestabilita, intolerance stravy, zvýšení sérového bilirubinu, oligurie a metabolická acidóza (3). Tyto příznaky se objevují i u řady neinfekčních stavů.

Zlatým standardem v diagnostice sepsy je mikrobiologické kulturační vyšetření krve. V určitých případech provádíme také kulturační průkaz z jiných biologických zdrojů (mozkomíšni mok, kůže, moč, stolice a jiné). Hemokultura má v novorozeneckém věku řadu úskalí. Výtěžnost vyšetření klesá díky častému antenatálnímu podání ATB matce či malému množství odebraného vzorku. Pokud jsou mikroorganismy přítomny ve velmi malých koncentracích (< 4 CFU/ml) (colony forming unit), je pro detekci těchto patogenů potřeba minimálně 1 ml krve. Pro zjištění přítomnosti bakteriemie je ale ve většině případů dostačující 0,5 ml krve. Při použití moderního kontinuálního monitorovacího systému je medián TTP (time to positivity) u novorozenecké sepsy 9–18 hodin. U *Streptococcus agalactiae* (GBS) a *Escherichia coli* je přibližně 96–100% pozitivních do 36 hodin, zatímco detekce koaguláza negativních stafylokoků může trvat až 48 hodin (4). U poměrně významné části septických novorozenců se z výše uvedených důvodů průkaz původce nezdaří. Klingenberg uvádí, že počet septických novorozenců s negativní hemokulturou až 16x převyšuje počet septických novorozenců s pozitivní hemokulturou. Negativní hemokulturu vidíme převážně u novorozenců vyšetřovaných při podezření na časnou novorozeneckou sepsi (4). Naším úkolem je hledání pomocného diagnostického znaku s nejvyšší specifičností a senzitivitou.

Hypotetický ideální marker sepsy by měl mít dobře definovanou optimální „cut-off“ hodnotu a co největší senzitivitu a negativní prediktivní hodnotu. Měl by předpovědět zá-

važnost infekce v počátku klinických příznaků a umět rozlišit jednotlivé skupiny etiologických agens. Podle jeho dynamiky bychom měli poznat vývoj nemoci a reakce na ATB terapii, popřípadě vznik komplikací. Měl by umět předpovědět prognózu a mortalitu a pro jeho detekci by mělo stačit malé množství odebrané krve (5). V neposlední řadě by měl být cenově dostupný pro většinu novorozeneckých oddělení. Hojně využívanými laboratorními markery jsou proteiny akutní fáze a prozánětlivé cytokiny. Jedním z důležitých laboratorních markerů je interleukin-6 (IL-6).

Interleukin-6 je cytokin, který hraje jednu z hlavních rolí v obraně organismu, a to díky svému imunitnímu a hematopoetickému působení a schopnosti vyvolat odpověď akutní fáze (3). Interakce mikroorganismů s rodinou toll-like receptorů (TLRs) je dobře známá. TLRs jsou součástí vrozené imunity. Jejich vzájemné působení s mikroorganismy je zásadní pro produkci a uvolnění cytokinů (6). Například TLR4 jsou známé především proto, že rozeznávají lipopolysacharidy buněčné stěny gramnegativních bakterií. Aktivují polymorfonukleární, monocyty a makrofágy a tyto pak spouští imunitní odpověď (7). Expresí TLRs je u novorozenců, dětí i dospělých podobná. Byla ale popsána nižší exprese TLR4 a TLR2 na povrchu makrofágů u předčasně narozených novorozenců. Následné reakce na vazbu PAMPs-TLR (pathogen-associated molecular patterns) se liší. V novorozeneckém období jsou funkce TLRs insuficientní, a to je jeden z predisponujících faktorů k rozvoji septického stavu (8). Po stimulaci jednotlivých TLRs in vitro produkují novorozenecké antigen prezentující buňky méně prozánětlivých (interleukin-1b, TNF-α) a Th1 podporujících cytokinů (IL-12p70, typ 1 interferon), ale stejné nebo větší množství cytokinů podporujících Th17 (IL-23, IL-6) ve srovnání s dospělými buňkami (9). Syntéza IL-6 makrofágy je zahájena bezprostředně jako odpověď makrofágů na PAMPs, resp. DAMPs (damage-associated molecular patterns) (10). Velkou roli v reakci novorozeneckého organismu na infekci hrají genetické faktory. Do budoucna bude potřeba se tyto genetické faktory naučit poznávat, studovat a pracovat s nimi převážně v terapeutické rovině. Polymorfismus TLR4, který je důležitý pro zahájení vrozené imunitní odpovědi

aktivováním intracelulárních signálních cest a rozpoznáním lipopolysacharidů gramnegativních bakterií, je spojován s možnou příčinou zvýšené náchylnosti k septickým stavům (11).

Interleukin-6 je velmi rychlý a dynamický marker. Poté co dojde k uvolnění částí bakteriální buněčné stěny, např. endotoxinů, hladina IL-6 rychle vzroste a maximálních hodnot dosáhne do několika hodin (12). Vzhledem k jeho krátkému poločasu je již 24 hodin po infekčním stimulu v plazmě téměř neměřitelný a není vhodný k monitorování léčby (13). Chiesa et al. (14) nám ve své studii podal přehledný popis referenčních hodnot a postnatální dynamiky IL-6. Průměrná hodnota IL-6 u zdravých donošených novorozenců ihned po narození byla 1,69 pg/ml, ve 24. hodině života 4,09 pg/ml a 3,45 pg/ml ve 48. hodině života. Dynamika interleukinu-6 u zdravých novorozenců narozených těsně před termínem s těmito výsledky korespondovala; 10,9 pg/ml (0 h), 9,3 pg/ml (24 h), a 8,4 pg/ml (48 h). Výhodou použití interleukinů, resp. interleukinu-6 je velmi rychlý nárůst po infekčním inzultu, který napomáhá k časné diagnóze. Kvůli jejich krátkému poločasu ale nemusíme zachytit peak. Při použití by měl být kombinován s „pozdějším markerem“, např. C-reaktivním proteinem (4). Jakmile se IL-6 dostane krevním řečištěm do jater, dochází k rychlé syntéze a uvolnění proteinů akutní fáze (C-reaktivní protein, sérový amyloid A, fibrinogen a haptoglobin) a snížení hladiny albuminu či transferinu (15). Překážkou pro dostupnost IL-6 na některých pracovištích zůstává jeho cena.

Novorozenci, především ti předčasně narození, patří mezi nejzranitelnější populaci dětských pacientů. Neinvasivní vyšetřovací metody by měly vždy, pokud to situace a stav dítěte dovolí, předcházet těm invazivním. Klinickým cílem naší studie bylo zjistit, zda lze vyšetřením krve z pupečnicku nahradit brzký postnatální odběr periferní krve. Jde o snahu omezit odběr periferní krve a nahradit ho nebolešivým odběrem z pupečnicku. Bylo nutné popsat hladiny IL-6 v pupečnickové krvi předčasně narozeného novorozence. Odběr IL-6 z periferní krve je již standardně zaveden v rámci diagnostiky novorozenecké sepsy. Známe jeho cut-off hodnoty. Dále byla snaha porovnat pupečnickové a periferní hodnoty IL-6 a najít mezi nimi vztah v závislosti na ostatních perinatálních faktorech, jako je

PREHLEDOVÉ ČLÁNKY

DIAGNOSTICKÝ VÝZNAM POSTNATALNÍ DYNAMIKY INTERLEUKINU-6 U PŘEDČASNĚ NAROZENÝCH NOVOROZENCŮ

gestační stáří, způsob porodu, ATB podaná matce prenatálně, předčasný odtok plodové vody (PPROM), sepse a asfyxie. Popřípadě zjistit, zda lze z pupečnickové hodnoty predikovat hodnotu periferní. Naše studie se týkala procesu diagnostiky časné novorozenecké sepse.

Pacienti a metody

Pacienti

Do studie byli zahrnuti novorozenci narození před ukončením 35. týdnem gestace, u kterých se zdařil odběr dostatečného množství pupečnickové krve.

Metody

Prospektivní studie probíhala od dubna 2016 do srpna 2018 na Jednotce intenzivní a resuscitační péče Novorozeneckého oddělení Fakultní nemocnice Olomouc. Odběr pupečnickové krve byl proveden standardně z pupečnickové arterie těsně po vybavení placenty, odběr krve z periferní žíly novorozence byl proveden do 2 hodin od porodu. Hodnoty IL-6 byly stanoveny na analytickém systému Cobas 8000 (výrobce Roche/Hitachi). Použita byla kvantitativní metoda „ECLIA“ (= elektrochemiluminiscenční imunostanovení). K analýze vzorku nebylo třeba zvláštního odběru. Vyšetření byla provedena z materiálu získaného pro odběry prováděné standardním způsobem dle zvyklostí pracoviště. Doplnění vyšetření bylo v souladu s informovaným souhlasem stvrzeným zákonnými zástupci dítěte.

Statistické metody

Pro srovnání spojitého znaku (hladina IL-6 či její logaritmus) mezi dvěma skupinami pacientů jsme použili neparametrický Kruskal-Wallisův test. Tento test je pro dvě skupiny ekvivalentní Wilcoxonovu testu. Neparametrický test jsme volili díky výrazné nenormalitě hladin IL-6 a také proto, že jeho výsledek závisí na pořadí hodnot v obou skupinách, lze tedy lépe přecházet mezi původními hodnotami a jejich logaritmy. Pro predikci (na úrovni logaritmu obou hladin) jsme použili standardní lineární regresi. Všechny testy proběhly na hladině 0,05.

Výsledky

Párový odběr se podařil realizovat u 73 novorozenců. Průměrné gestační stáří bylo

Tab. 1. Demografická data sledované kohorty

průměrné gestační stáří	průměrná hmotnost	počet PPRM	počet ATB matce	počet SC	počet asfyxií	počet sepsí
32 + 0	1 740g	35	42	36	3	16

Tab. 2. Průměrné, maximální a minimální hodnoty IL-6 z pupečnického a periferního odběru. Hodnoty jsou udávány v ng/l

	průměr	median	minimum	maximum
pupečnicková krev	16,88	6,5	1,7	984,7
postnatální odběr	288,93	56	4,7	11 932

32 + 0 týdnů gestace, průměrná hmotnost byla 1 740 g. Z celkového počtu 73 novorozenců bylo 36 rozeno císařským řezem, 3 novorozenci byli po porodu asfyktičtí s potřebou kardiopulmonální resuscitace a 16 novorozenců bylo léčeno antibiotiky pro časnou novorozeneckou sepsi. 42 matek dostalo prenatálně či perinatálně antibiotika a u 35 rodiček byla předčasně odtéká plodová voda. Tato demografická data uvádí tabulka 1.

Tabulka 2 uvádí naměřené hodnoty interleukinu-6 v pupečnickové a periferní krvi. Jak vidíme, hodnoty v periferní krvi jsou mnohonásobně vyšší než hodnoty v krvi pupečnickové. Průměrná hodnota IL-6 v pupečnickové krvi byla 16,88 ng/l, v krvi periferní 288,93 ng/l. Medián v krvi pupečnickové byl 6,5 ng/l, v krvi periferní 56 ng/l. Minimální naměřená hodnota interleukinu-6 v pupečnickové krvi byla 1,7 ng/l, maximální hodnota 984,7 ng/l. Nejnižší hodnota IL-6 zaznamenaná v periférii byla 4,7 ng/l, oproti maximu, které dosáhlo v jednom případě až 11 932 ng/l. Mezi prvními (pupečnick) a druhými (periferie) měřeními IL-6 byl zjištěn signifikantní rozdíl ($p < 0,001$). Medián prvního měření je 6,5 ng/l, medián druhého měření je 56 ng/l, nárůst je téměř desetinasobný. Grafické znázornění vidíme na grafu 1.

V další analýze jsme se soustředili na možnou závislost vzrůstu IL-6 v periferní krvi oproti jeho hodnotě v krvi pupečnickové na dalších proměnných (předčasně odtéká plodová voda, ATB podaná matce před porodem, císařský řez, poporodní asfyxie, sepse). Vzrůst hladiny IL-6 jsme definovali jako $\log(\text{IL6_perif}) - \log(\text{IL6_pup})$. Vzrůst hladiny interleukinu-6 není na zmíněných faktorech statisticky závislý (graf 2–6). Není závislý na tom, zda předčasně odtéká plodová voda ($p = 0,5$), na ATB podaných matce prenatálně ($p = 0,14$), na způsobu porodu ($p = 0,75$), na asfyxií ($p = 0,10$), ani na sepsi ($p = 0,16$).

Diskuze a závěr

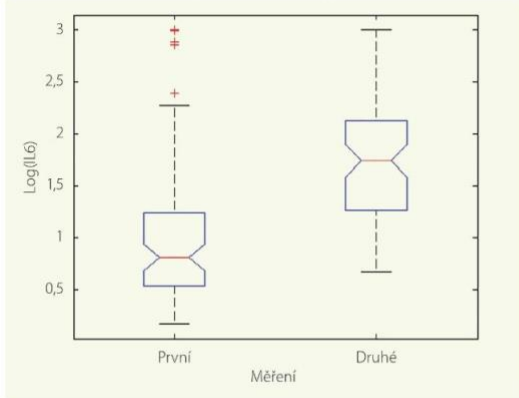
Novorozenecké sepse jsou stále palčivým tématem a jedním z hlavních výzkumných témat v odborném neonatologickém světě. Problém v časném rozpoznání septického novorozence tkví převážně v nezralém imunitním systému předčasně narozeného novorozence a v nespecifickém klinickém obraze. Dalším problémem je množství krve nutné k biochemickému zpracování. Objem krve nezralého novorozence činí asi 80 ml/kg tělesné hmotnosti. Vzhledem ke zranitelnosti těchto nejmenších pacientů je snaha všech ošetřujících lékařů volit přístupy co nejméně invazivní. V diagnostice časné novorozenecké sepse by odběr pupečnickové krve mohl nahradit odběr z periferní krve, který se provádí v prvních hodinách života.

Proběhla řada studií, ve kterých se autoři zaměřili na pupečnickový IL-6 jakožto diagnostický nástroj novorozenecké sepse. Ve všech těchto studiích měl pupečnickový interleukin-6 u septických novorozenců zvýšené hodnoty. Nebrali ale v úvahu dynamiku tohoto cytokinu. Používali stejné cut-off hodnoty jako v periferní krvi (12, 16–23).

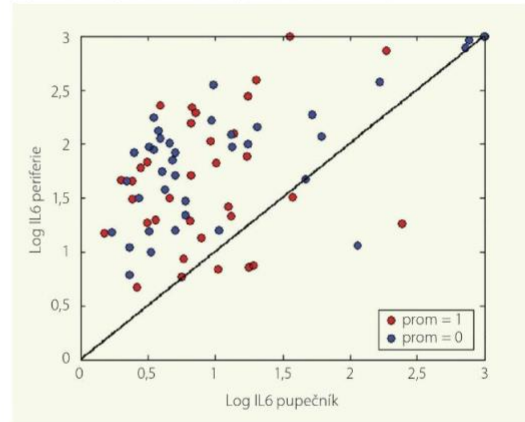
Studie, která porovnává pupečnickové a periferní hodnoty IL-6 u zdravých a septických novorozenců, je studie týmu indických lékařů z roku 2013. Periferní krev byla odebrána v okamžiku vzniku klinických známek sepse. U zdravých kontrol čas není definován. Přesný čas odběru periferní krve neznáme. U septických novorozenců byla elevace IL-6 v pupečnickové i periferní krvi ve srovnání se zdravými kontrolami přibližně desetinasobná. Limitací je i u této studie používání stejných cut-off hodnot pro pupečnickovou i periferní krev (24).

Ve studii italských autorů z roku 2011 se zaměřili na referenční rozmezí postnatálních hodnot IL-6 při narození, ve 24. a 48. hodině života. Do studie zahrnuli 148 novorozenců narozených po ukončeném 35. týdnu gestace. Tito

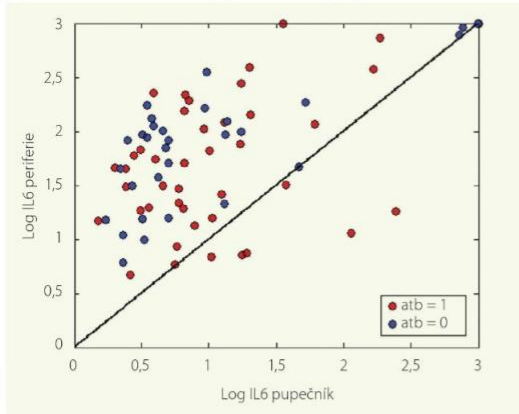
Graf 1. Srovnání hladiny IL-6 z pupečnickové a periferní krve. Osa y je zobrazena v logaritmické škále. Rozdíl mezi hodnotami je významný ($p < 0,001$). Rozdíl byl testován neparametrickým Kruskal-Wallisovým testem



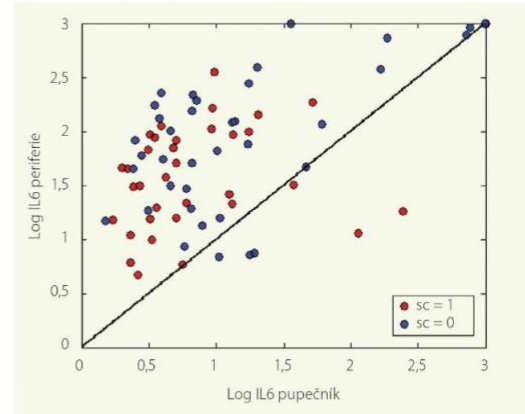
Graf 2. Závislost vzrůstu interleukinu-6 v periferní krvi oproti jeho hodnotě v krvi pupečnickové na předčasně odtěklé plodové vodě (PROM = 1)



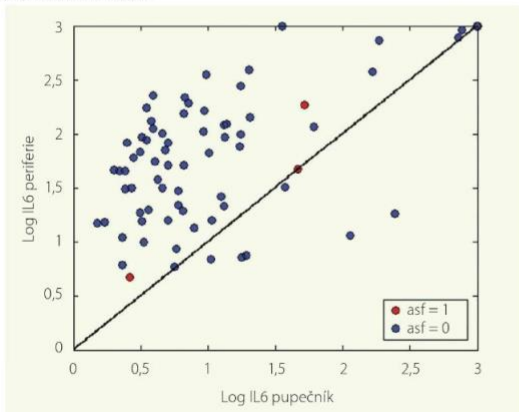
Graf 3. Závislost vzrůstu interleukinu-6 v periferní krvi oproti jeho hodnotě v krvi pupečnickové na antibiotické terapii podané matce před porodem (ATB = 1)



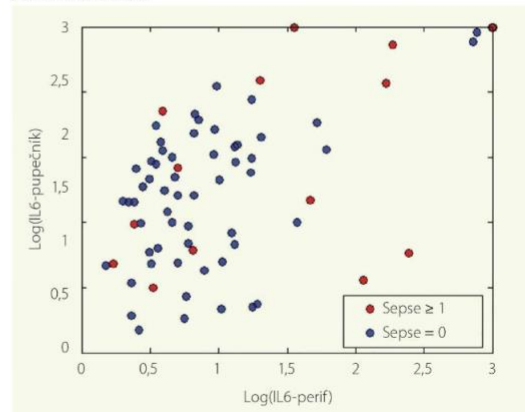
Graf 4. Závislost vzrůstu interleukinu-6 v periferní krvi oproti jeho hodnotě v krvi pupečnickové na způsobu porodu



Graf 5. Závislost vzrůstu interleukinu-6 v periferní krvi oproti jeho hodnotě v krvi pupečnickové na asfyxii



Graf 6. Závislost vzrůstu interleukinu-6 v periferní krvi oproti jeho hodnotě v krvi pupečnickové na sepsi



► PŘEHLEDOVÉ ČLÁNKY

DIAGNOSTICKÝ VÝZNAM POSTNATALNÍ DYNAMIKY INTERLEUKINU-6 U PŘEDČASNĚ NAROZENÝCH NOVOROZENCŮ

novorozenci byli po dobu sledování (4 týdny) bez infekčních komplikací. Naměřené hodnoty ve všech třech časových bodech (0, 24, 48 hodin) negativně korelují s gestačním věkem. U termínových dětí byla průměrná hodnota IL-6 v pupečnickové krvi signifikantně nižší (1,69 ng/l) než ve 24. (4,09 ng/l) a 48. hodině (3,45 ng/l). U novorozenců předčasně narozených byla pupečnicková hodnota vyšší než u dětí termínových a to 10,9 ng/l. Zde nevidíme tak výrazný rozdíl ve 24. (9,3 ng/l) a 48. hodině (8,4 ng/l). Autoři se domnívají, že u předčasně narozených dětí začíná stresová reakce organismu již před narozením, proto tyto vyšší hodnoty v pupečnickové krvi (14). V naší studii byla průměrná hodnota IL-6 v pupečnickové krvi 16,88 ng/l. Možným důvodem by mohla být skutečnost, že naše kohorta sestávala z novorozenců narozených před ukončením 35. týdnem gestace, průměrně 32. týden. Jednalo se o novorozence předčasně narozené, u nichž, jak bylo zmíněno výše, začíná pravděpodobně stresová reakce organismu již intrauterinně. Hodnota ve 24. hodině života se zásadně liší od námi naměřených hodnot v prvních dvou hodinách života.

Není pochyb o tom, že dynamika IL-6 je obrovská. Důvody pro razantní vzestup v rozpětí krátkého časového období (do 2 hodin) jsou nejasné. Je možné uvažovat o stresové reakci organismu způsobenou porodem, oxidačním stresem, reakce na změnu vnějšího prostředí a kontakt s mikrobiálními antigeny... K objasnění je nutné provést doplňující studie zaměřené tímto směrem. Naše studie je jedinečná tím, že poukázala na nutnost používání jiných cut-off hodnot při užití pupečnickového interleukinu-6 jakožto laboratorního znaku časné novorozenecké sepse. Limitací studie by mohl být výběr kohorty a fakt, že téměř jedna čtvrtina novorozenců byla zatížena patologií (sepsé, asfyxií). Avšak při statistickém zpracování jednotlivých proměnných vidíme nezávislost vzestupu interleukinu-6 na těchto proměnných. Tato „nezávislost“ je zajímavá a potvrzuje jeho prediktivní univerzálnost. Dle metaanalýzy z roku 2022, která se zaměřila na periferní a pupečnickový IL-6 v diagnostice časné novorozenecké sepse, je senzitivita a specifita IL-6 v pupečnickové krvi vyšší než

v krvi periferní – 83 vs. 71 % a 85 vs. 77 % (25). Další výhodou pupečnickového interleukinu-6 je bezbolestný odběr krve k jeho měření.

Na našem pracovišti pupečnickový interleukin-6 nahradil časný odběr z periferní krve. Pupečnickový interleukin-6 bereme u všech dětí pod <34 + 6 (včetně) týdnů gestace. Dle výsledků naší studie, klinické praxe a literárních zdrojů pracujeme s následujícími pravidly:

- pupečnickové hodnoty, při klinických známkách: 20–25 ng/l velmi suspektní
- sérové hladiny, při klinických známkách: 250–300 ng/l velmi suspektní
- při těchto hodnotách a klinických známkách indikujeme ATB a ev. dle dalšího monitoringu časně vysadíme
- pokud jsou tyto hodnoty bez klinických známek sepse, čili odběr se bral z jiného důvodu, pak ATB neindikujeme
- hodnoty (pupečnickové i periferní) 1000 ng/l a více – ATB indikujeme i bez klinických známek sepse

Článek vznikl za podpory grantu
IGA_LF_2021_047.

LITERATURA

1. Bizzarro MJ, Demby LM, Baltimore RS, et al. Changing patterns in neonatal escherichia coli sepsis and ampicillin resistance in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *Pediatrics*. 2008;121(4):689–696. doi:10.1542/peds.2007-2171.
2. Silverman MA, Konnikova L, Gerber JS. Impact of Antibiotics on Necrotizing Enterocolitis and Antibiotic-Associated Diarrhea. *Gastroenterol Clin North Am*. 2017;46(1):61–76.
3. Modi N, Doré CJ, Saraswata A, et al. A case definition for national and international neonatal bloodstream infection surveillance. *Arch Dis Child – Fetal Neonatal Ed*. 2009;94(1):F8–12. <http://fn.bmj.com/content/94/1/F8.abstract>.
4. Klingenberg C, Kornelisse RF, Buonocore G, et al. Culture-negative early-onset neonatal sepsis - at the crossroad between efficient sepsis care and antimicrobial stewardship. *Front Pediatr*. 2018;6(285):1–9. doi:10.3389/fped.2018.00285.
5. Ng PC, Ma TPY, Lam HS. The use of laboratory biomarkers for surveillance, diagnosis and prediction of clinical outcomes in neonatal sepsis and necrotising enterocolitis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2015;0:1–5. doi:10.1136/archdischild-2014-307656.
6. Ulevitch RJ. Therapeutics targeting the innate immune system. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(7):512–520. doi:10.1038/nri1396.
7. Medkova A, Srovnal J, Potomkova J, et al. Multifarious diagnostic possibilities of the S100 protein family: predominantly in pediatrics and neonatology. *World J Pediatr*. 2018;14(4). doi:10.1007/s12519-018-0163-5.
8. Dias ML, O'Connor KM, Dempsey EM, et al. Targeting the Toll-like receptor pathway as a therapeutic strategy for neonatal infection. *Am J Physiol Integr Comp Physiol*. 2021;321(6):R879–R902. doi:10.1152/ajpregu.00307.2020.

9. Kollmann TR, Kampmann B, Mazmanian SK, et al. Protecting the Newborn and Young Infant from Infectious Diseases: Lessons from Immune Ontogeny. *Immunity*. 2017;46(3):350–363. doi:10.1016/j.immuni.2017.03.009.
10. Cava F, González C, Pascual M, et al. Biological variation of interleukin 6 (IL-6) and soluble interleukin 2 receptor (sIL2R) in serum of healthy individuals. *Cytokine*. 2000;12(9):1423–1425. doi:10.1006/CYTO.2000.0714.
11. Li M, Pan S, Chen H, et al. Effect of TLR-4 gene polymorphism on sepsis susceptibility in neonates: a systemic review and meta-analysis. *Biomark Med*. 2022;16(13):1005–1017.
12. Krueger M, Nauck MS, Sang S, et al. Cord blood levels of interleukin-6 and interleukin-8 for the immediate diagnosis of early-onset infection in premature infants. *Biol Neonate*. 2001;80(2):118–123. doi:10.1159/000047130.
13. Abdollahi A, Shoar S, Nayyeri F, et al. Diagnostic value of simultaneous measurement of procalcitonin, interleukin-6 and hs-CRP in prediction of early-onset neonatal sepsis. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2012;4(1). doi:10.4084/MJHID.2012.028.
14. Chiesa C, Signore F, Assumma M, et al. Serial measurements of C-reactive protein and interleukin-6 in the immediate postnatal period: Reference intervals and analysis of maternal and perinatal confounders. *Clin Chem*. 2001;47(6):1016–1022. doi:10.1093/clinchem/47.6.1016.
15. Tanaka T, Masashi Narazaki TK. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014;6. doi:10.1101/cshperspect.a005728.
16. Dollner H, Vatten L, Linnebo I, et al. Inflammatory mediators in umbilical plasma from neonates who develop early-onset sepsis. *Biol Neonate*. 2001;80(1):41–47.
17. Velemínský MJ, Stránský P, Velemínský SS, et al. Relationship of IL-6, IL-8, TNF and sICAM-1 levels to PROM, pPROM,

and the risk of early-onset neonatal sepsis. *Neuro Endocrinol Lett*. 2008;29(3):303–311.

18. Weeks J, Reynolds L, Taylor D, et al. Umbilical cord blood interleukin-6 levels and neonatal morbidity. *Obstet Gynecol*. 1997;90(5):815–818.
19. Cernada M, Badia N, Modesto V, et al. Cord blood interleukin-6 as a predictor of early-onset neonatal sepsis. *Acta Paediatr Int J Paediatr*. 2011;101(5):203–207. doi:10.1111/j.1651-2227.2011.02577.x.
20. Cobo T, Kacerovsky M, Andrys C, et al. Umbilical Cord Blood IL-6 as Predictor of Early-Onset Neonatal Sepsis in Women with Preterm Prelabour Rupture of Membranes. *PLoS One*. 2013;8(7):1–9. doi:10.1371/journal.pone.0069341.
21. Fan Y, Yu JL. Umbilical blood biomarkers for predicting early-onset neonatal sepsis. *World J Pediatr*. 2012;8(2):101–108. doi:10.1007/s12519-012-0347-3.
22. Steinberger E, Hofer N, Resch B. Cord blood procalcitonin and Interleukin-6 are highly sensitive and specific in the prediction of early-onset sepsis in preterm infants. *Scand J Clin Lab Invest*. 2014;74(5):432–436. doi:10.3109/00365513.2014.900696.
23. Santana C, Guindeo M, González G, et al. Cord blood levels of cytokines as predictors of early neonatal sepsis. *Acta Paediatr*. 2001;90(10):1176–1181. doi:10.1080/080352501317061602.
24. Marhukumar R, Thangam EB. Differential regulation of inflammatory mediators and granulocyte-associated mediators in neonatal sepsis observed in cord and peripheral blood. *Int J Interf Cytokine Mediat Res*. 2013;5:33–37. doi:https://doi.org/10.2147/IJICMR.S54301.
25. Eichberger J, Resch B. Reliability of Interleukin-6 Alone and in Combination for Diagnosis of Early Onset Neonatal Sepsis: Systematic Review. *Front Pediatr*. 2022;10(March). doi:10.3389/fped.2022.840778. eCollection 2022.

Příloha 4 - „Staré“ a „nové“ laboratorní znaky novorozenecké sepse

► PŘEHLEDOVÉ ČLÁNKY

„STARÉ“ A „NOVÉ“ LABORATORNÍ ZNAKY NOVOROZENECKÉ SEPSE

„Staré“ a „nové“ laboratorní znaky novorozenecké sepse

MUDr. Anna Medková¹, MUDr. Jan Hálek, Ph.D.^{1,2}, prof. MUDr. Vladimír Mihál, CSc.¹

¹Dětská klinika, Fakultní nemocnice Olomouc

²Novorozenecké oddělení, Fakultní nemocnice Olomouc

Navzdory obrovskému pokroku v neonatologické péči, a to především v péči o nezralé novorozence, zůstává stále velkým problémem novorozenecká sepse. Novorozeneckou sepsi dělíme na časnou, tzv. „early-onset sepsis“ a pozdní, tzv. „late-onset sepsis“. V tomto přehledovém článku se zaměříme především na novorozeneckou sepsi časnou. Včasná diagnostika a zahájení terapie rozhoduje zásadním způsobem o dalším osudu dítěte. Klasická definice sepse se opírá o klinické známky a průkaz patogenu. V klinické praxi je to však problematické a jsou tedy používány také pomocné laboratorní znaky bakteriální infekce. V přehledu uvádíme stručné informace o běžně užívaných laboratorních znacích. Druhou část sdělení věnujeme novým možnostem diagnostiky, konkrétně vyšetření sérového kalprotektinu a CD64 – povrchového markeru leukocytů.

Klíčová slova: novorozenecká sepse, markery, kalprotektin, CD64.

Classic and recent laboratory markers of newborn sepsis

Despite the huge progress in neonatology, especially in care of premature infants, newborn sepsis remains a big problem. In neonatology, we talk about early-onset newborn sepsis and late-onset newborn sepsis. This review is focused on early-onset sepsis. Early diagnosis and initiation of therapy is essential for infant's good prognosis. Classic definition of sepsis is based on the clinical signs and proof of pathogen in the blood stream. But, this is problematic in clinical practice, so another laboratory markers of bacterial infection are used. In this review article, we discuss commonly used markers. In the second part of this article we introduce new diagnostic possibilities, especially new laboratory markers – calprotectin and CD64 (surface marker of leukocytes).

Key words: newborn sepsis, markers, calprotectin, CD64.

Úvod

Neonatologie je jeden z nejrychleji se rozvíjejících medicínských oborů. Za posledních 20 let učinila obrovský pokrok v péči o nezralé novorozence. Avšak velkým problémem nadále zůstává novorozenecká sepse a komplikace s ní spojené. Novorozenecká sepse je důležitou příčinou morbidit a mortality novorozenců, dle statistiky publikované Yale-New Haven Hospital činí úmrtí na novorozenecké sepse 11 % ze všech příčin úmrtí v novorozeneckém věku (1). Novorozenecké sepse dělíme na tzv.

„early-onset sepsis“ (EOS), tedy časnou novorozeneckou sepsi a „late-onset sepsis“ (LOS), pozdní novorozeneckou sepsi. Jak již bylo zmíněno v abstraktu, v tomto review se budeme věnovat novorozenecké sepsi časné. EOS je definována jako sepse, která vznikla přestupem bakterií vertikálně z matky na dítě před nebo během porodu a objeví se do 72 h po porodu (2). Novorozenecká sepse ohrožuje novorozence narozené v termínu i novorozence předčasně narozené, její výskyt a četnost komplikací je vyšší v populaci novorozenců nízké

porodní hmotnosti (3). Základním problémem je její včasná diagnostika, ta spolu s včasnou a správnou léčbou rozhoduje o dalším osudu novorozence, a to především u novorozence předčasně narozeného.

Definice novorozenecké sepse: Klasickými diagnostickými pilíři pro diagnostiku novorozenecké sepse je výskyt klinických příznaků zánětlivé reakce organismu (SIRS) a průkaz patogenní bakterie v krevním vzorku (pozitivní hemokultura).

Klinické příznaky zánětlivé reakce organismu jsou v novorozeneckém období nespecifické



KORESPONDENČNÍ ADRESA AUTORA: MUDr. Anna Medková, medkova.andula@gmail.com
Dětská klinika, Fakultní nemocnice Olomouc
I. P. Pavlova 6, 779 00 Olomouc

Cit. zkr: *Pediatr. praxi.* 2017; 18(4): 150–154
Článek přijat redakcí: 19. 5. 2017
Článek přijat k publikaci: 8. 6. 2017

ké. Dle jedné recentní studie, která shromáždila data z 26 britských neonatologických center (4), jsou nejčastějšími klinickými známkami sepse náhle vzniklá potřeba kyslíku či ventilační podpory, apnoické pauzy, bradykardie, hypotenze, intolerance glukózy, kapilární návrat > 3 s, rozdíl teploty mezi periferií a tělesným jádrem > 2°C, letargie/dráždivost, tepelná nestabilita, intolerance stravy, zvýšení sérového bilirubinu, oligurie, metabolická acidóza. Žádný z těchto znaků není pro sepsi specifický a je pozorován i u řady neinfekčních stavů. Kritéria SIRS navržená pro jiné věkové skupiny pacientů se sepsi mají v novorozeneckém věku malou diagnostickou hodnotu.

Zlatým standardem v diagnostice sepse je průkaz původce z hemokultury. Také tohle vyšetření má v novorozeneckém věku řadu úskalí; výsledek nemáme k dispozici dříve než za 24 či 48 h. Výtěžnost vyšetření klesá díky častému antenatálnímu podání ATB matce, technickým potížím či malému množství odebraného vzorku. (Minimální požadované množství by mělo být 1 ml, ideálně 2 ml, což v případě novorozence není množství zanedbatelné) (5). U poměrně významné části novorozenců se sepsi se z výše uvedených důvodů průkaz původce nezdaří.

Laboratorní známky novorozenecké sepse

Vzhledem k výše uvedeným problémům se v klinické praxi používají různé laboratorní markery infekce.

C-reaktivní protein je protein akutní fáze; je syntetizován játry a jeho sérová koncentrace se zvyšuje o 5 mg/16 h po infekčním stimulu s maximem do 48 h (6, 7). Stimulem pro vyplavení CRP je IL-6 (8, 9). V interpretaci výsledků je důležité si uvědomit postnatální dynamiku; nejčastěji udávaný cut-off 1. den života je 4–5 mg/l, dále pak 10–12 mg/l (10).

Bender a kol. ve své studii z roku 2008, do které bylo zahrnuto 123 novorozenců uvádí, že medián maximální hladiny CRP je po infekčním stimulu 16–24 h. Dále zjistili, že CRP začalo stoupat v době, kdy sérové hladiny cytokinů (IL-6 a IL-8) již klesaly (11). Z uvedeného vyplývá, že CRP není vhodným markerem pro včasnou diagnostiku časné novorozenecké sepse. Navíc zvýšené koncentrace CRP byly pozorovány i u neinfekčních stavů jako je aspirace mekonia,

Obr. 1. Normální hodnoty PCT s ohledem na věk (Upraveno dle Stocker et al. 2010 (23))



nekróza tkáně, po operaci (12, 13). C-reaktivní protein je vhodný k monitoraci léčby, jelikož jeho hladina klesá po eradikaci infekčního stimulu (14).

Dalším klasickým laboratorním markerem sepse je **procalcitonin (PCT)**. PCT je peptid sestávající ze 116 aminokyselin a je prekurzorem calcitoninu (CT) (15). Procalcitonin je kódován *CALC-1* genem lokalizovaným na chromozomu 11 (56, 57). Při nepřítomnosti infekčního stimulu je transkripce *CALC-1* genu pro procalcitonin v non-neuroendokrinních tkáních potlačena; kromě C-buněk štítné žlázy, kde se expresí tohoto genu produkuje PCT, prekurzor calcitoninu u zdravých neinfekčních jedinců (16). Mikrobiální infekce je tedy zodpovědná za zvýšení exprese genu *CALC-1* a následně uvolnění prekurzorů calcitoninu ze všech tkání a buněk celého těla (17). Co se týká užití PCT jako markeru časné novorozenecké sepse hlavním úskalím je jeho fyziologické zvýšení v prvních hodinách a dnech života (18). Nejvyšších fyziologických hodnot dosahuje PCT mezi 18. a 30. hodinou života; k base-line se vrací mezi 42. a 48. hodinou života (19, 20, 21, 22). PCT patří svou dynamikou mezi časné laboratorní markery infekce, jeho reakce je tedy rychlejší ve srovnání s CRP, také rychleji reaguje na úspěšnou ATB léčbu infekce. Hladina PCT koreluje s tíží infekce, není ovlivněna virovými infekty. Při zohlednění fyziologického postnatálního vzestupu je PCT dobrým a poměrně specifickým markerem bakteriální infekce v novorozeneckém věku.

Mezi další klasické laboratorní znaky, rutinně používané v diagnostice novorozenecké sepse, můžeme zařadit také **interleukin-6 (IL-6)**. IL-6 je cytokin, který díky svému rozsáhlému imunitnímu a hematopoetickému působení a schopnosti vyvolat odpověď akutní fáze, hraje jednu z hlavních rolí v obraně organismu (4). Cytokiny jsou malé molekuly, jejichž počasí v séru je minuty až hodiny (24).

IL-6 patří k časným markerům novorozenecké infekce. Je jedním ze základních mediátorů zánětlivé reakce organismu, podílí se i na vyvolání některých klinických příznaků. Jde o velmi časný marker, významná elevace je přítomna při nebo i před vznikem klinických projevů.

Bylo publikováno mnoho studií, ve kterých hodnotili využití **krvního obrazu, diferenciálního rozpočtu a I/T indexu** v diagnostice novorozenecké sepse. Přestože má krevní obraz sám o sobě nízkou prediktivní hodnotu, normální hodnoty naměřené vícekrát po sobě by měly zvýšit pravděpodobnost nepřítomnosti sepse (25, 26). Kdežto nízký počet leukocytů, nízké ANC a vysoká hodnota I/T indexu jsou spojeny s vyšším rizikem infekce (27).

„Nové markery novorozenecké sepse“

Jelikož klasické, téměř ve všech neonatologických centrech používané, markery sepse nespĺňují požadavky na marker ideální, je vynakládáno velké úsilí k objevení nového perspektivního markeru novorozenecké sepse. Pro klinickou praxi by byla nejpřínosnější taková laboratorní známka sepse, která by rozlišila infekčního novorozence ještě před objevením klinických známek sepse. Hypotetický ideální marker sepse by měl mít dobře definovanou optimální „cut-off“ hodnotu, senzitivitu a negativní prediktivní hodnotu blízkou 1,00 a specifitu a pozitivní prediktivní hodnotu > 0,85, předpovědět závažnost infekce v počátku klinických příznaků, rozlišit jednotlivé skupiny etiologických agens, měl by se podle jeho dynamiky dát poznat vývoj nemoci a reakce na ATB terapii, popřípadě komplikace, předpovědět prognózu a mortalitu, dále by pro jeho detekci mělo stačit malé množství odebrané krve, shoda mezi žilní a kapilární hodnotou a měl by být levný (28).

► PŘEHLEDOVÉ ČLÁNKY

„STARÉ“ A „NOVÉ“ LABORATORNÍ ZNAKY NOVOROZENECKÉ SEPSĚ

Jeden z možných potenciálně ideálních markerů by mohl být **kalprotektin**. Kalprotektin je členem rodiny S100 proteinů. Některé proteiny této rodiny mají intracelulární regulační efekt, některé intra i extracelulární funkci a jiné regulační efekt pouze extracelulární. Vykazují buněčnou specifitu, avšak za jistých patologických okolností může být konkrétní protein exprimován buňkou, ve které se za fyziologického stavu nenachází (29).

Kalprotektin je antimikrobiální, kalcium a zinek vázající protein, který se nachází v cytosolu buněk vrozené imunity a uvolňuje se bezprostředně po interakci hostitel-patogen. Pro tuto svou vlastnost se používá jako laboratorní známka aktivity granulocytů a mononukleárů (30). V cytosolu zaujímá téměř polovinu ze všech cytosolových proteinů (31).

Měření hladiny tohoto S100 proteinu ve stolici je již rutinně zavedeno v gastroenterologii, jednak v diferenciální diagnostice funkčních gastroenterologických potíží a nespecifických střevních zánětů, a jednak odráží aktivitu nemoci u pacientů s nespecifickými střevními záněty (32, 33). Také v revmatologii se kalprotektin stal běžně užívaným markerem například pro strategii biologické léčby juvenilní idiopatické artritidy (34).

V klinické studii z roku 2011 porovnával Terrin a spol. u 231 novorozenců s PH < 1 500 g diagnostickou přesností sérového kalprotektinu s běžně užívanými markery jako je WBC, I/T index, počet krevních destiček a CRP v diagnostice pozdní novorozenecké sepsě. Sérová koncentrace kalprotektinu byla signifikantně vyšší ($p < 0,001$) u 62 novorozenců s potvrzenou sepsí. Hodnota kalprotektinu byla u septických novorozenců $3,1 \pm 1,0 \mu\text{g/l}$ narozdíl od hodnoty $1,1 \pm 0,3 \mu\text{g/l}$ u 29 novorozenců neinfekčních a $0,91 \pm 0,58 \mu\text{g/l}$ u 110 zdravých kontrol (35).

Decembrino a spol. v roce 2015 také porovnával diagnostické možnosti a přesnost u již zavedených laboratorních znaků (leukocyty, neutrofilie, trombocyty, CRP) a kalprotektinu u novorozenecké sepsě (tentokrát nerozlišovali EOS a LOS). Soubor čítal 41 novorozenců. 8 z těchto novorozenců mělo pozitivní hemokulturu, 33 vykazovali klinické známky sepsě, avšak bez pozitivní hemokultury (36). Data z této studie ukazují, že by kalprotektin mohl být užíván jako časný marker sepsě. Jeho sérová hladina není

ovlivněna stářím, pohlavím, způsobem porodu či počtem leukocytů.

CD64 je vysoko afinní Fc receptor, tedy receptor, který specificky váže Fc oblast protilátek. Za fyziologických okolností je exprimován převážně monocyty a velmi slabě neaktivními neutrofilie (37). Při aktivaci imunitního systému vidíme výrazný nárůst exprese CD64 na neutrofilech, a to do jedné hodiny po invazi bakteriálním patogenem (38). Tento Fc receptor je možné rychle a elegantně detekovat pomocí průtokové cytometrie, kde je zapotřebí velmi malé množství krve, což je v případě nezralého novorozence velkou výhodou (39).

Již v roce 2004 se Nehal a spol. zamýšlel nad možným významem CD64 v diagnostice časné novorozenecké sepsě. U 60 novorozenců s antenatálními rizikovými faktory pro vznik časné novorozenecké sepsě odebírali v nulté (z pupečníku), 8., 24. a 48. hodině po porodu krev a měřili hladinu CD64. Retrospektivně pak rozdělili novorozence do dvou skupin – septičtí a neinfekční. V septické skupině byla exprese CD64 signifikantně vyšší než v neinfekční skupině. Ve 24. hodině po porodu „cut-off“ hodnota 50% exprese měla 100% specifitu a senzitivitu pro predikci mortality (40).

V klinické studii z roku 2010 El-Mazary a spol. porovnával hladinu CD64 a hodnoty klasických zánětlivých markerů (CRP, IL-6, leukocyty, trombocyty) u novorozenců, kteří byli přijati na JIP se známkami časné novorozenecké sepsě. Vzorky byly odebrány mezi 0. a 48. h života před nasazením ATB terapie. V této studii potvrdili, že exprese CD64 je výrazně vyšší u septických pacientů, než u zdravých kontrol, kdy je hodnota $p = 0,001$.

Další klinickou studii, která dokazuje význam CD64 jako markeru novorozenecké sepsě je studie z roku 2012 vedená Streimishem. CD64 odebírali u novorozenců (celkem 749), kteří byli vyšetřováni pro podezření na novorozeneckou sepsi. Cut-off hodnota 2,38 měla 100% senzitivitu a 100% negativní prediktivní hodnotu. Z této studie vyplývá, že negativní CD64 by mohlo být vhodným markerem k vyloučení časné novorozenecké sepsě (41).

Význam CD64 jako brzkého laboratorního znaku časné novorozenecké sepsě dokazuje také studie z roku 2013 vedená Du a spol. Zde u 88 septických novorozenců prokázali signifikantně zvýšené hladiny CD64 v porovnání se zdravými kontrolami (42).

Diskuze

Jak již bylo v úvodu řečeno, novorozenecká sepsě zůstává jedním ze základních problémů neonatologie. Včasná diagnostika je základním předpokladem pro úspěšnost léčby a outcome dítěte. Existuje řada klinických i laboratorních znaků novorozenecké sepsě. Klinické znaky jsou však převážně u předčasně narozených novorozenců značně nespecifické.

Klasické laboratorní markery mají řadu nevýhod. Je třeba znát jejich fyziologickou dynamiku a k hodnocení výsledků je nutno přistupovat individuálně. Nejběžněji používaný marker CRP je ovlivněn i neinfekčními stavy jako aspirací mekonie, nekrozou tkáně, zvyšuje se po operaci, proto je jeho interpretace značně obtížná a nespecifická.

U nových perspektivních markerů, výše zmíněných, je potřeba jednak správně prozkoumat postnatální dynamiku a jednak najít správné „cut-off“ hodnoty s ohledem na gestační věk a porodní hmotnost.

Dva výše zmíněné markery mají značnou výhodu v tom, že k jejich zpracování a měření je třeba pouze malé množství krve či séra; při zpracování CD64 pomocí metod průtokové cytometrie je zapotřebí 50 μL krve (39), v případě kalprotektinu je to 20 μL séra při použití imunochromatografických metod (Bühlmann, The Quantum Blue®). Pro zpracování a měření CRP, PCT a IL-6 je to 200 μL séra, vidíme tedy, že objemy se liší až 10x, což je, převážně u nedonošených novorozenců či novorozenců s nízkou porodní hmotností, velká výhoda.

V diskuzi je také nutno zmínit možný přínos identifikace profilů genové exprese pomocí metod microarrays u septických novorozenců. V recentních článcích se tato metoda jeví velmi nadějně (43, 44).

Závěr

Novorozenecká sepsě, ať už časná či pozdní, je téma v neonatologických kruzích stále živě diskutované. Za poslední dobu proběhla řada klinických studií týkajících se včasné a hlavně správné diagnostiky neonatální sepsě. Některé studie jsou přesvědčivé, jiné méně, jak už to ve vědeckém světě bývá.

Tento článek byl podpořen grantovým projektem IGA LF UP 2017_13.

LITERATURA

1. Bizzarro MJ, Demby L-M, Baltimore RS, et al. Changing Patterns in Neonatal Sepsis and Ampicillin Resistance in the Era of Intrapartum Antibiotic Prophylaxis. *Pediatrics*. 2008; 121(4): 689 LP–696.
2. Hornik CP, Fort P, Clark RH, et al. Early and late onset sepsis in very-low-birth-weight infants from a large group of neonatal intensive care units. *Early Hum Dev*. 2012; 88(2): 69–74.
3. Kramer MS, Demissie K, Yang H, et al. The Contribution of Mild and Moderate Preterm Birth to Infant Mortality. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. 2000; 284(7): 843–849.
4. Modi N, Doré CJ, Saraswatula A, et al. A case definition for national and international neonatal bloodstream infection surveillance. *Archives of Disease in Childhood – Fetal and Neonatal Edition*. 2008; 94(1): F8 LP–F12.
5. Neal PR, Kleiman MB, Reynolds JK. Volume of blood submitted for culture from neonates. *Journal of Clinical Microbiology*. 1986; 24(3): 353–356.
6. Hofer N, Zacharias E, Müller, et al. An update on the use of C reactive protein in early-onset neonatal sepsis: Current insights and new tasks. *Neonatology*. 2012; 102(1): 25–36.
7. Póvoa P. C-reactive protein: a valuable marker of sepsis. *Intensive Care Medicine*. 2002; 28(3): 235–243.
8. Cekic C, Arabul M, Alper E, et al. Evaluation of the relationship between serum ghrelin, C-reactive protein and interleukin-6 levels, and disease activity in inflammatory bowel diseases. *HepatoGastroenterology*. 2014; 61(133): 1196–1200.
9. Worthmann H, Tryc AB, Dirks M, et al. Lipopolysaccharide binding protein, Interleukin-10, interleukin-6 and C-reactive protein blood levels in acute ischemic stroke patients with post-stroke infection. *Journal of Neuroinflammation*. 2015; 12(1): 13.
10. Chiesa C, Osborn JF, Pacifico, et al. Gestational- and age-specific CRP reference intervals in the newborn. *Clinica Chimica Acta*. 2011; 412(19–20): 1889–1890.
11. Bender L, Thaarup J, Varming K, et al. Early and late markers for the detection of early-onset neonatal sepsis. *Danish Medical Bulletin*. 2008; 55(4): 219–223.
12. Ng PC, Cheng SH, Chui KM, et al. Diagnosis of late onset neonatal sepsis with cytokines, adhesion molecule, and C-reactive protein in preterm very low birthweight infants. *Archives of Disease in Childhood – Fetal and Neonatal Edition*. 1997; 77(3): F221 LP–F227.
13. Pourcyrus M, Bada HS, Korones SB, et al. Significance of Serial C-Reactive Protein Responses in Neonatal Infection and Other Disorders. *Pediatrics*. 1993; 92(3): 431 LP–435.
14. Ehl S, Gehring B, Pohlandt F. A detailed analysis of changes in serum C-reactive protein levels in neonates treated for bacterial infection. *Eur J Pediatr*. 1999; 158(3): 238–242.
15. Jin M, Khan, et al. Procalcitonin: Uses in the Clinical Laboratory for the Diagnosis of Sepsis. *Laboratory Medicine*. 2010; 41(3): 173–177.
16. Christ-Crain M, Müller B. Biomarkers in respiratory tract infections: diagnostic guides to antibiotic prescription, prognostic markers and mediators. *European Respiratory Journal*. 2007; 30(3): 556 LP–573.
17. Muller B, White JC, Nylén ES, et al. Ubiquitous Expression of the Calcitonin-I Gene in Multiple Tissues in Response to Sepsis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86(1): 396–404.
18. van Rossum AMC, Wulkan RW, Oudesluys-Murphy AM. Procalcitonin as an early marker of infection in neonates and children. *Lancet Infectious Diseases*. 2004; 4(10): 620–630.
19. Chiesa C, Panero A, Rossi N, et al. Reliability of procalcitonin concentrations for the diagnosis of sepsis in critically ill neonates. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*. 1998; 26(3): 664–672.
20. Chiesa C, Pellegrini G, Panero A, et al. C-Reactive Protein, Interleukin-6, and Procalcitonin in the Immediate Postnatal Period: Influence of Illness Severity, Risk Status, Antenatal and Perinatal Complications, and Infection. *Clinical Chemistry*. 2003; 49(1): 60 LP–68.
21. Sachse C, Dressler F, Henkel E. Increased Serum Procalcitonin in Newborn Infants without Infection. *Clinical Chemistry*. 1998; 44(6): 1343 LP–1344.
22. Monneret G, Labaune JM, Isaac C, et al. Procalcitonin and C-reactive protein levels in neonatal infections. *Acta Paediatr*. 1997; 86: 209–212.
23. Stocker M, Hop WC, van Rossum, et al. Neonatal Procalcitonin Intervention Study (NeoPIS): Effect of Procalcitonin-guided decision making on Duration of antibiotic Therapy in suspected neonatal early-onset Sepsis: A multi-centre randomized superiority and non inferiority Intervention Study. *BMC Pediatrics*. 2010; 10(1): 89.
24. de Jong HK, van der Poll T, Wiersinga WJ. The systemic proinflammatory response in sepsis. *J Innate Immun*. 2010; 422–430.
25. Rozycki HJ, Stahl GE, Baumgart S. Impaired sensitivity of a single early leukocyte count in screening for neonatal sepsis. *Pediatr. Infect. Dis. J*. 1987; 6: 440–442.
26. Christensen RD, Rothstein G, Hill HR, et al. Fatal early onset group B streptococcal sepsis with normal leukocyte counts. *Pediatr. Infect. Dis*. 1985; 4: 242–245.
27. Hornik CP, Benjamin DK, Becker. Use of the Complete Blood Cell Count in Early-Onset Neonatal Sepsis. *Pediatr Infect Dis J*. 2012; 31(8): 799–802.
28. Ng PC, Ma TP, Lam, HS. The use of laboratory biomarkers for surveillance, diagnosis and prediction of clinical outcomes in neonatal sepsis and necrotising enterocolitis. *Archives of Disease in Childhood – Fetal and Neonatal Edition*. 2015; 1–6.
29. Donato R, Cannon BR, Sorci G, et al. Functions of S100 proteins. *Current Molecular Medicine*. 2013; 13(1): 24–57.
30. Striž I, Trebichavský I. Calprotectin – A pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation. *Physiological Research*. 2004; 53(3): 245–253.
31. Hessian PA, Edgeworth J, Hogg N. MRP-8 and MRP-14, two abundant Ca(2+)-binding proteins of neutrophils and monocytes. *Journal of Leukocyte Biology*. 1993; 53(2): 197–204.
32. Lozoya Angulo ME, de las Heras Gómez I, Martínez Villanueva M. Faecal calprotectin, an useful marker in discriminating between inflammatory bowel disease and functional gastrointestinal disorders. *Gastroenterol Hepatol*. 2017; 40(3): 125–131.
33. Zhulina Y, Cao Y, Amcoff K. Prognostic significance of faecal calprotectin in patients with inactive inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2016; 44: 495–504.
34. Anink J, Van Suijlekom-Smit LWA, Otten MH, et al. MRP8/14 serum levels as a predictor of response to starting and stopping anti-TNF treatment in juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Research & Therapy*. 2015; 17(1): 200.
35. Terrin G, Passariello A, Manguso F, et al. Serum calprotectin: An antimicrobial peptide as a new marker for the diagnosis of sepsis in very low birth weight newborns. *Clin Dev Immunol*. 2011; 2011: 291085.
36. Decembrino L, De Amici M, Pozzi M, et al. Serum Calprotectin: A Potential Biomarker for Neonatal Sepsis. *J Immunol Res*. 2015; 147973.
37. Fjaertoft G, Hakansson L, Ewald U, 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(6): 871–876.
38. van der Meer W, Pickkers P, Scott CS, et al. Hematological indices, inflammatory markers and neutrophil CD64 expression: comparative trends during experimental human endotoxemia. *J Endotoxin Res*. 2007; 13: 94–100.
39. Umlauf VN, Dreschers S, Orlikowsky TW. Flow cytometry in the detection of neonatal sepsis. *International Journal of Pediatrics*. 2013; 763191.
40. El-Raggal NM, El-Barbar MN, Youssef MF, et al. Neutrophil-surface antigens CD11b and CD64 expression: a potential predictor of early-onset neonatal sepsis. *Egypt J Pediatr Allergy Immunol*. 2004; 2(2): 90–100.
41. Streimish I, Bizzarro M, Northrup V, et al. Neutrophil Cd64 as a Diagnostic Marker in Neonatal Sepsis. *Pediatr Infect Dis J*. 2012; 31(7): 777–781.
42. Du J, Li L, Dou Y, et al. Diagnostic utility of neutrophil CD64 as a marker for early-onset sepsis in preterm neonates. *PLoS One*. 2014; 9(7).
43. Sweeney TE, Wynn JL, Cernada M, et al. Validation of the Sepsis MetaScore for Diagnosis of Neonatal Sepsis. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2017; Apr 13.
44. Dickinson P, Smith CL, Forster T. Whole blood gene expression profiling of neonates with confirmed bacterial sepsis. *Genom Data*. 2015; 3: 41–48.

Příloha 5 - Možnosti laboratorní diagnostiky novorozenecké sepse



KLINICKÁ HODNOTA DIAGNOSTIKY

Neonatologie zaznamenala za poslední desetiletí obrovský pokrok, a to převážně v péči o předčasně narozené novorozence. Co však zůstává stále palčivým problémem a tématem mnoha výzkumných skupin, je novorozenecká sepe. Péče o předčasně narozené novorozence se soustřeďuje do perinatologických center (v ČR 12), je to tedy okruh velmi úzký. Avšak se septickým novorozencem se setkává i lékař pracující na oddělení fyziologických novorozenců. V tomto článku uvádíme přehled běžně užívaných laboratorních markerů. Druhou část sdělení věnujeme novým možnostem diagnostiky sepse.

Možnosti laboratorní diagnostiky novorozenecké sepse

MUDr. ANNA BAŠTAN,¹ RNDr. JITKA PROŠKOVÁ²

¹ Dětská klinika Lékařské fakulty a Fakultní nemocnice Olomouc

² Oddělení klinické biochemie Fakultní nemocnice Olomouc

Úvod

Novorozeneckou sepsi dělíme na časnou, tzv. early-onset sepsis (EOS), a pozdní, tzv. late-onset sepsis (LOS). EOS je definována jako sepe, která vznikla přestupem bakterií vertikálně z matky na dítě před porodem nebo během něj a objeví se do 72 hodin od porodu.

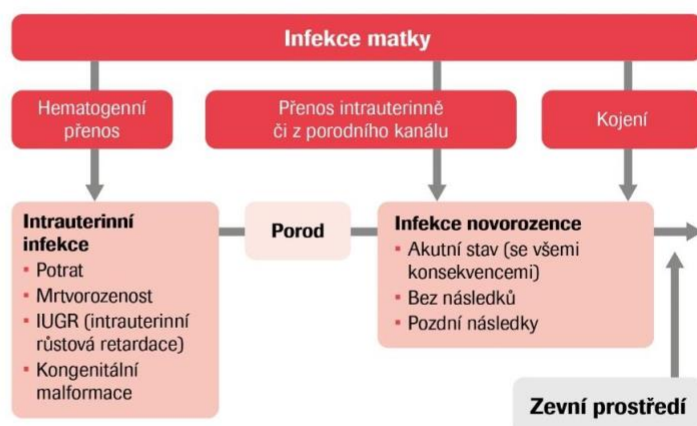
Naproti tomu pozdní sepsi definujeme jako sepsi vzniklou až po 72 hodinách života novorozence a je způsobena

patogeny získanými během porodu či častěji „díky“ pobytu dítěte v nemocnici.¹

Včasná diagnostika a zahájení terapie rozhodují zásadním způsobem o osudu dítěte. Novorozenecká sepe je důležitou příčinou morbidit a mortality novorozenců.

Klasická definice sepse se opírá o výskyt klinických příznaků zánětlivé reakce organismu (SIRS) a průkaz patogenní bakterie v krevním vzorku (pozitivní hemokultura).

Interpretace výsledků je však komplikovaná (viz níže) a klinické příznaky zánětlivé reakce organismu jsou v novorozeneckém období nespecifické, proto je zapotřebí dalších laboratorních diagnostických nástrojů.



▲ Cesty přenosu kongenitálních infekcí a časně a pozdně novorozenecké sepse a jejich následky. Upraveno dle Vergnano S., Heath, P.T. Fetal and neonatal infections. *Medicine* 41(12). 723-729 (2013).



Laboratorní markery sepse – běžně využívané

Hemokultura

Zlatým standardem v diagnostice sepse je průkaz původce z hemokultury. Jak již bylo řečeno, u novorozence je interpretace výsledků mnohdy složitá. Výsledek nemáme k dispozici dříve než za 24 či 48 h. Výtěžnost vyšetření klesá kvůli častému antenatálnímu podání ATB matce, technickým potížím či malému množství odebraného vzorku. Minimální požadované množství by mělo být 1 ml, ideálně 2 ml, což v případě novorozence není množství zanedbatelné.²

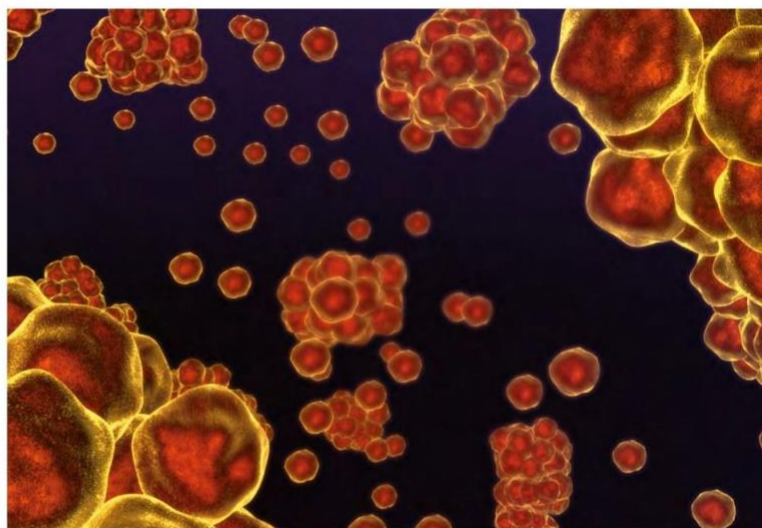
C-reaktivní protein

C-reaktivní protein (CRP) je syntetizován játry a patří mezi tzv. proteiny akutní fáze. Je to nejčastěji používaný laboratorní marker infekce. V porovnání s ostatními markery sepse je levný a běžně dostupný ve všech nemocnicích. Interpretace hodnoty CRP v akutní fázi infekce je ale sporná. CRP není vhodným markerem pro včasnou diagnostiku časně novorozenecké sepse, je však vhodný k monitoraci léčby, jelikož jeho hladina klesá po eradikaci infekčního stimulu.³

Stimulem pro vyplavení CRP je interleukin-6.^{4,5} Bender a kol. ve své studii z roku 2008 uvádějí, že medián maximální hladiny CRP je po infekčním stimulu 16–24 h, a zároveň zjistili, že CRP začne stoupat v době, kdy sérové hladiny IL-6 již klesají.⁶ Je to také marker nespecifický – zvýšené koncentrace CRP byly pozorovány i u neinfekčních stavů, jako je aspirace mekonium, nekroza tkáně, ale i po operaci.^{7,8}

Prokalcitonin

Prokalcitonin (PCT) je peptid, který je kódován CALC-1 genem lokalizovaným na chromozomu 11, a je prekurzorem kalcitoninu. Bakteriální infekce má za následek zvýšení exprese CALC-1 a následně uvolnění prekurzorů kalcitoninu ze všech tkání a buněk.⁹



▲ 3D ilustrace znázorňuje *Staphylococcus aureus* na černém pozadí, autor sonorileto, zdroj: Shutterstock

Prokalcitonin je využíván k diagnostice bakteriálních infekcí a k hodnocení prognózy septických onemocnění. V diagnostice časně novorozenecké sepse je však hlavním úskalím jeho fyziologické zvýšení v prvních hodinách a dnech života. Nejvyšších fyziologických hodnot dosahuje mezi 18. a 30. hodinou života a k poklesu na obvyklé hodnoty dochází až během 48 hodin.^{10,11}

V diagnostice pozdní novorozenecké sepse patří PCT svou dynamikou mezi střednědobé laboratorní markery infekce, jeho reakce je tedy rychlejší ve srovnání s CRP a také rychleji reaguje na úspěšnou ATB léčbu infekce.¹² Hladina PCT koreluje s tíží infekce, není ovlivněna virovými infekty.^{13,14} Při zohlednění fyziologického postnatálního vzestupu je PCT dobrým a poměrně specifickým markerem bakteriální infekce v novorozeneckém věku.

Stanovení PCT má ve své nabídce již většina laboratoří a výsledky jsou k dispozici ve statimovém režimu. PCT se stanovuje imunochemicky s vysokou přesností a citlivostí, cena vyšetření je oproti CRP více než desetinasobná.

Interleukin-6

Dalším proteinem akutní fáze využívaným v rámci časně i pozdní novorozenecké sepse je interleukin-6 (IL-6). IL-6 je cytokin, který hraje jednu z hlavních rolí v obraně organismu, a to díky svému imunitnímu a hematopoetickému působení a – jak už bylo řečeno – schopnosti vyvolat odpověď akutní fáze.¹⁵ Cytokiny jsou malé molekuly, jejichž poločas v séru jsou minuty až hodiny.¹⁶ Jakmile dojde k uvolnění složek bakteriální buněčné stěny, hladina IL-6 rychle vzroste a maximálních hladin dosahuje v řádu několika hodin.¹⁷ Jde o velmi časný marker novorozenecké sepse. Vzhledem k jeho krátkému poločasu je již 24 hodin po infekčním stimulu v plazmě téměř neměřitelný a není tedy vhodný k monitorování léčby.¹⁸

Překážkou pro dostupnost IL-6 na některých pracovištích zůstává jeho vysoká cena. Dnem 1. ledna 2020 nabyla účinnost vyhláška č. 269/2019 Sb., která mimo jiné přináší zařazení nového výkonu 81301 – Stanovení interleukinu IL6 v lidském séru a plazmě pro odbornost 801 (klinické biochemie). Tím by se měla zlepšit dostupnost IL-6 na některých



▲ Ilustrační foto z Novorozeneckého oddělení FN Olomouc

pracovištích, protože dříve byl výkon vázán pouze na odbornost 813 (alergologie a klinická imunologie).

Všechna jmenovaná vyšetření ve FN Olomouc provádíme také z pupečnickové krve. Cut-off hodnoty vyšetření, které používáme v naší nemocnici, jsou uvedeny v tab. č. 1.

Laboratorní markery seps – „nové“

Existuje celá řada slibných laboratorních markerů seps. Jejich užití je však zatím koncentrováno převážně do perinatologických center, a to v rámci probíhajících studií.

Kalprotektin

Kalprotektin je členem rodiny S100 proteinů.¹⁹ Je to antimikrobiální protein,

který se nachází v cytosolu buněk vrozené imunity a uvolňuje se bezprostředně po interakci hostitel–patogen. Pro tuto svou vlastnost se používá jako laboratorní známka aktivace granulocytů a mononukleárů.²⁰ Měření hladiny tohoto S100 proteinu je již rutinně zavedeno např. v gastroenterologii v rámci diagnostiky nespecifických střevních zánětů či v revmatologii pro strategii biologické léčby juvenilní idiopatické artritidy.^{21–23}

Studii zaměřených na diagnostiku novorozenecké seps je však zatím stále málo. V roce 2011 se Terrin a spol. zaměřili na diagnostiku pozdní novorozenecké seps. Porovnávali kalprotektin s běžně užívanými laboratorními markery (leukocyty, trombocyty, poměr nezralých a zralých forem neutrofilů, CRP). Sérová koncentrace kalprotektinu byla signifikantně vyšší ($p < 0,001$) u novorozenců

s potvrzenou sepsí oproti novorozencům neinfekčním a zdravým.²⁴

O 4 roky později, v roce 2015, Decembri- no a spol. také porovnávali diagnostické možnosti a přesnost již zavedených laboratorních znaků (leukocyty, neutrofilly, trombocyty, CRP) a kalprotektinu u novorozenecké seps (tentokrát nerozlišovali sepsi časnou a pozdní). Data z této studie ukazují, že by kalprotektin mohl být užíván jako časný marker seps. Jeho sérová hladina není ovlivněna stářím, pohlavím, způsobem porodu či počtem leukocytů.²⁵

Dynamika tohoto proteinu během novorozenecké seps není zatím detailně prozkoumána, ale z dostupné literatury se zdá, že se jedná o marker pozdní, vhodný spíše pro monitoraci klinického stavu a léčby.

CD64

CD64 je vysoko afinní Fc receptor, tedy receptor, který specificky váže Fc oblast protilátek. Za fyziologických okolností je exprimován převážně monocyty a velmi slabě neaktivními neutrofilly.²⁶ Při aktivaci imunitního systému vidíme výrazný nárůst exprese CD64 na neutrofilech, a to do jedné hodiny po invazi bakteriálním patogenem.²⁷ Tento Fc receptor je možné rychle a elegantně detekovat pomocí průtokové cytometrie, kde je zapotřebí velmi malého množství krve, což je v případě nezralého novorozence velkou výhodou.²⁸ Expresce CD64 je u septických novorozenců signifikantně vyšší ve srovnání s neinfekčními pacienty.^{29–33}

Presepsin

Presepsin je solubilní fragment molekuly CD14. CD14 je glykoprotein exprimovaný na membránách makrofágů, monocytů a granulocytů. Fyziologickou funkcí presepsinu je identifikace antigenů bakterií, virů a plísní a spuštění signální dráhy zprostředkované toll-like receptory. Po aktivaci této signální dráhy

Stáří dítěte	CRP mg/l	PCT ug/l	IL-6 ng/l
při narození	>4	>1	>30 (2. h života >300)
24 h	>10	>100	>300
48 h	>10	>50	>300

▲ Tab. č. 1: Cut-off hodnoty vyšetření

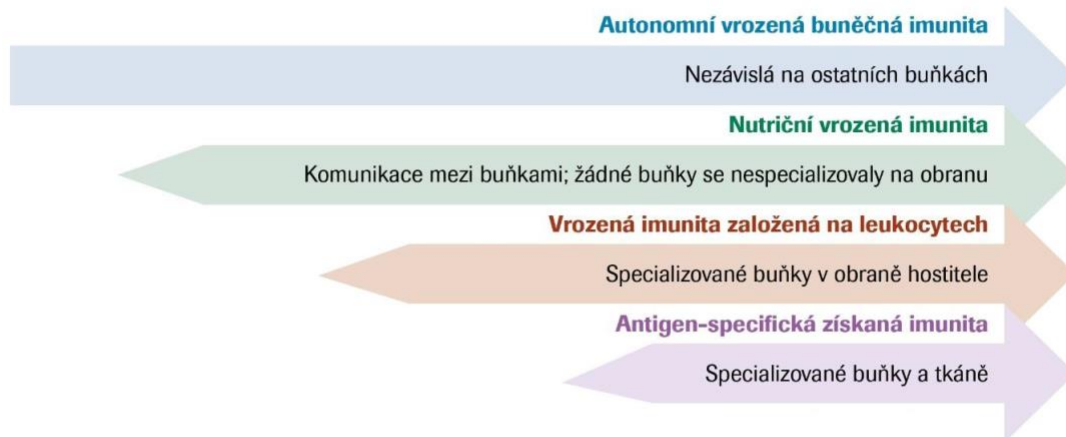
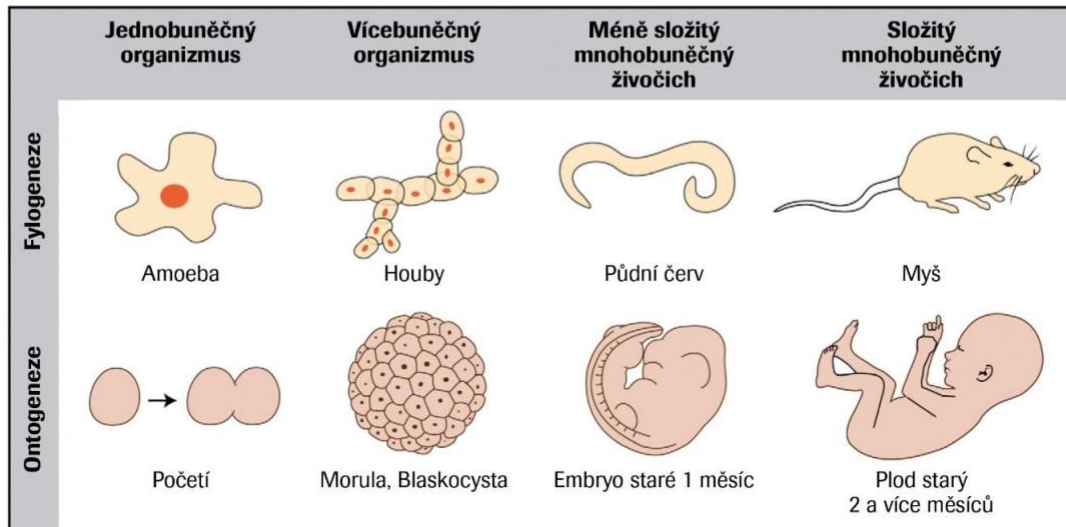


je CD14 odloučen z buněčné membrány a detekován v krvi.³⁴ Studii zabývajících se presepsinem jakožto možným laboratorním markerem novorozenecké sepse je celá řada, avšak užití v praxi zatím běžné není. Jako u všech „nových“ markerů je třeba detailně prozkoumat jeho dynamiku, stanovit cut-off hodnoty a zjistit jeho chování v prvních hodinách života novorozence.

Diskuse

Základní poučka pediatrie zní, že dítě není malý dospělý. O novorozenci to platí dvojnásob. Novorozenecké období je charakteristické nezralým a rozvíjejícím se imunitním systémem a tím se novorozenec stává vulnérabilnějším vůči infekci. Včasná diagnostika novorozenecké sepse je základním předpokladem pro

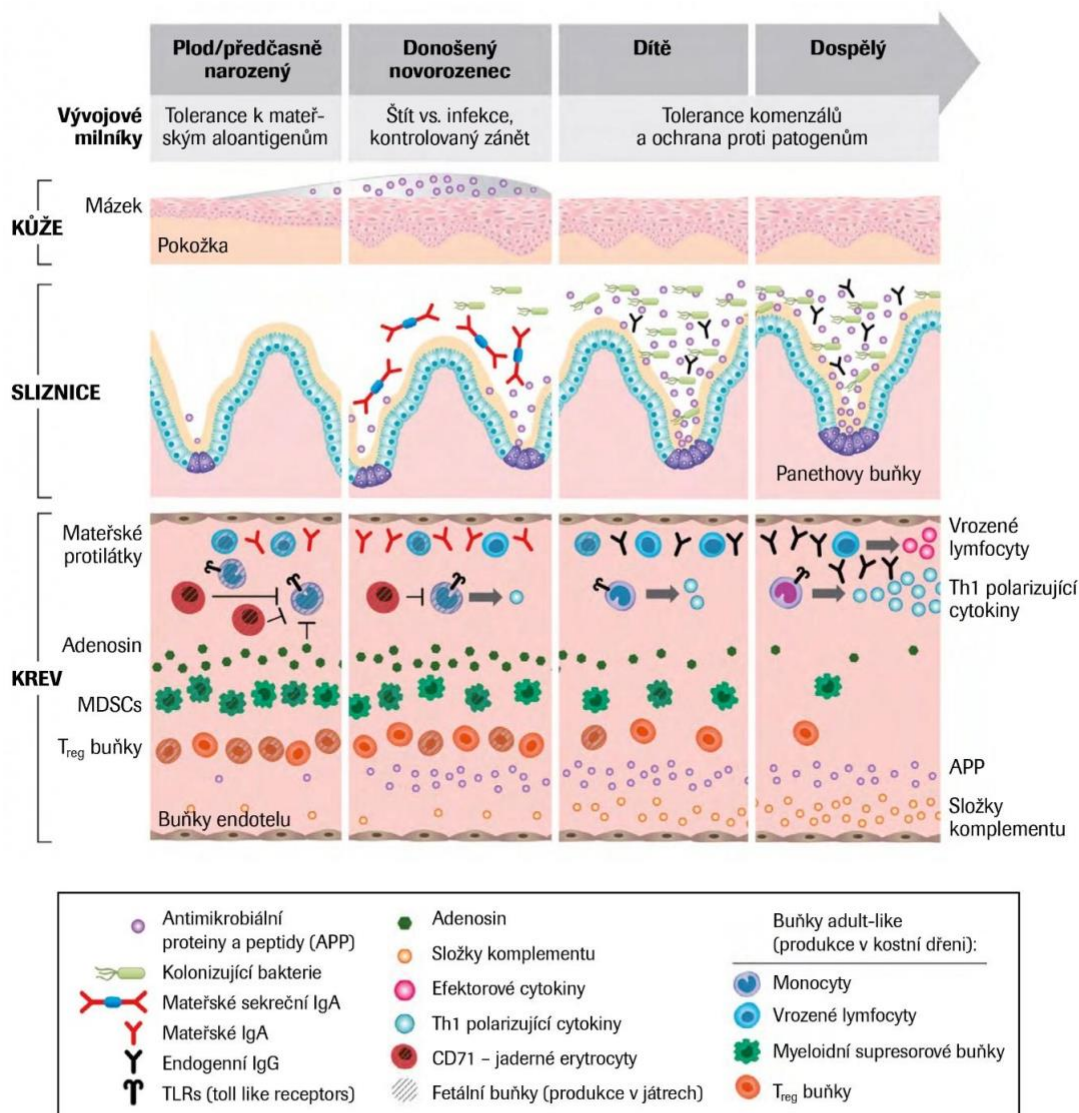
úspěšnost léčby a outcome dítěte. Existuje řada klinických i laboratorních znaků novorozenecké sepse. Klinické znaky jsou však převážně u předčasně narozených novorozenců značně nespecifické, proto je třeba využít a hlavně umět správně interpretovat markery laboratorní. Je třeba znát jejich fyziologickou dynamiku a k hodnocení výsledků je nutno přistupovat individuálně.



▲ Obr. č. 1: **Klíčové prvky imunity.** Obrana hostitele proti infekci se vyvíjela v průběhu evoluce (fylogeneze) a dále se vyvíjí po celou dobu života daného jedince (ontogeneze). U jednobuněčného stadia (améba, stadium brzy po koncepci) je buněčná autonomní imunita klíčem k přežití. Biochemická komunikace mezi mnohobuněčnými organismy jakými jsou např. houby je zprostředkována pomocí tzv. nutriční imunity, to stejné se děje v průběhu stadia moruly a blastuly. Imunita méně komplexních mnohobuněčných živočichův jako např. *C. elegans* je typem vrozené imunity založené na expresi leukocytů. Stejně tak je tomu v prvním měsíci embryonálního vývoje. U vysoce komplexních živočichů již popisujeme klasickou získanou imunitu založenou na spolupráci vysoce specializovaných buněk a tkání imunitního systému a to stejně jako u plodu od 2. měsíce těhotenství.³⁵



KLINICKÁ HODNOTA DIAGNOSTIKY



▲ Obr. č. 2: Ontogeneze přirozené obrany hostitele (plodu, novorozence a kojence) vůči patogenu. Mezi základní bariérové obranné mechanismy patří fyzikální, chemická a funkční složka epitelu kůže a sliznice. Je třeba tento vývoj chápat i v kontextu vývoje jedince jako takového (plod, novorozenec, kojeneček atd.). (A) **Kůže**. Fyzikální a chemická složka je – a to především u předčasně narozených novorozenců – zredukovaná. Oproti tomu mázeq u donošených novorozenců exprimuje velké množství APP (antimikrobiální protein a peptid). (B) **Sliznice**. Současně se množením střevní mikroflóry se mění také struktura novorozenecké střevní sliznice, a to zvětšením krypt a množením Panethových buněk. Funkční změna představuje zvýraznění exprese APP. (C) **Krev**. Krev novorozence má relativně nízkou koncentraci komplementu a APP a vysokou koncentraci imunosupresivního purinového metabolitu adenosinu. Plazma obsahuje jednak mateřské protilátky, které se transplacentárně přenášejí od poloviny těhotenství, a na straně druhé také protilátky, které se do krve novorozence a kojence dostávají z mateřského mléka. Vrozená imunita se dá detekovat od konce prvního měsíce těhotenství, přičemž následné změny jsou způsobeny převážně rostoucí expozicí mikrobům životního prostředí. Monocyty exprimují PRR (Pattern recognition receptors, např. Toll-like receptory; TLR) s odlišnou funkcí odpovědi, jako je například menší produkce Th1 polarizujících cytokinů na většinu podnětů. Získaná imunita se vyvíjí od 4. měsíce těhotenství.³⁵



MUDr. Anna Baštan, roz. Medková

Fakultní nemocnice Olomouc, Dětská klinika, JIRP, I. P. Pavlova 6, Olomouc

Kontakt: medkova.andula@gmail.com

Studium všeobecného lékařství úspěšně zakončila na 1. lékařské fakultě Univerzity Karlovy. Lékařské povolání zahájila na Novorozeneckém oddělení Nemocnice na Bulovce. Od roku 2015 pracuje na Dětské klinice Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, t. č. na Jednotce intenzivní a resuscitační péče. Ve svém Ph.D. studiu se věnuje diagnostice novorozenecké sepsy.

RNDr. Jitka Prošková

Fakultní nemocnice Olomouc, Oddělení klinické biochemie, I. P. Pavlova 6, Olomouc

Kontakt: jitka.proskova@fnol.cz

Absolventka PfF UP Olomouc – obor Analytická chemie. Atestace z Vyšetřovacích metod v klinické hematologii a v klinické biochemii. Ve zdravotnických laboratořích pracuje od roku 1999. V současnosti jako zástupce vedoucího Oddělení klinické biochemie ve Fakultní nemocnici Olomouc. Ve volném čase ráda čte, cestuje nebo tráví čas v přírodě.



LITERATURA

- Horník, C., Fort, P., Clark, R. & Al, E. Early and late onset sepsis in very-low-birth-weight infants from a large group of neonatal intensive care units. *Early Hum Dev* 88, 69–74 (2012).
- Neal, P. R. et al. Volume of blood submitted for culture from neonates. *J. Clin. Microbiol.* 24, 353–356 (1986).
- Ehl, S., Gehring, B. & Pohlandt, F. A detailed analysis of changes in serum C-reactive protein levels in neonates treated for bacterial infection. *Eur. J. Pediatr.* 158, 238–242 (1999).
- Cekic, C. et al. Evaluation of the relationship between serum ghrelin, C-reactive protein and interleukin-6 levels, and disease activity in inflammatory bowel diseases. *Hepatology* 61, 1196–1200 (2014).
- Worthmann, H. et al. Lipopolysaccharide binding protein, interleukin-10, interleukin-6 and C-reactive protein blood levels in acute ischemic stroke patients with post-stroke infection. *J. Neuroinflammation* 12, 13 (2015).
- Bender, L. et al. Early and late markers for the detection of early-onset neonatal sepsis. *Dan. Med. Bull.* 55, 219–223 (2008).
- Ng, P. C. et al. Diagnosis of late onset neonatal sepsis with cytokines, adhesion molecule, and C-reactive protein in preterm very low birthweight infants. *Arch. Dis. Child. - Fetal Neonatal Ed.* 77, F221 LP-F227 (1997).
- Pourcyros, M., Bada, H. S., Korones, S. B., Baselski, V. & Wong, S. P. Significance of Serial C-Reactive Protein Responses in Neonatal Infection and Other Disorders. *Pediatrics* 92, 431 LP – 435 (1993).
- Müller, B. et al. Ubiquitous Expression of the Calcitonin-1 Gene in Multiple Tissues in Response to Sepsis. *J Clin Endocrinol Metab.* 86, 396–404 (2016).
- Chiesa, C. et al. Reliability of procalcitonin concentrations for the diagnosis of sepsis in critically ill neonates. *Clin Infect Dis* 26, 664–72 (1998).
- Sachse, C., Dressler, F. & Henkel, E. Increased Serum Procalcitonin in Newborn Infants without Infection. *Clin. Chem.* 44, 1343 LP – 1344 (1998).
- Becker, K., Snider, R. & Nylén, E. Procalcitonin assay in systemic inflammation, infection, and sepsis: Clinical utility and limitations. *Crit. Care Med.* 36, 941–952 (2008).
- Meisner, M. Pathobiochemistry and clinical use of procalcitonin. *Clin Chim Acta* 323, 17–29 (2002).
- Rossum, A. M. C. Van, Wulkan, R. W. & Oudesluys-Murphy, A. M. Procalcitonin as an early marker of infection in neonates and children. *Lancet Infect. Dis.* 4, 620–630 (2004).
- Modi, N. et al. A case definition for national and international neonatal bloodstream infection surveillance. *Arch. Dis. Child. - Fetal Neonatal Ed.* 94, F8 LP-F12 (2008).
- De Jong, H. K., Van Der Poll, T. & Wiersinga, W. J. The systemic pro-inflammatory response in sepsis. *J. Innate Immun.* 2, 422–430 (2010).
- Krueger, M. et al. Cord blood levels of interleukin-6 and interleukin-8 for the immediate diagnosis of early-onset infection in premature infants. *Biol Neonate* 80, 118–123 (2001).
- Abdollahi, A., Shoar, S., Nayyeri, F. & Shariati, M. Diagnostic value of simultaneous measurement of procalcitonin, interleukin-6 and hs-CRP in prediction of early-onset neonatal sepsis. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* 4, (2012).
- Donato, R. et al. Functions of S100 proteins. *Curr. Mol. Med.* 13, 24–57 (2013).
- Stříž, I. & Trebichavský, I. Calprotectin - A pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation. *Physiol. Res.* 53, 245–253 (2004).
- ME, L. A., I, de L. H. G., M, M. V., JA, N. V. & F, A. P. Faecal calprotectin, an useful marker in discriminating between inflammatory bowel disease and functional gastrointestinal disorders. *Gastroenterol Hepatol.* 40, 125–131 (2017).
- Zhulina, Y. et al. The prognostic significance of faecal calprotectin in patients with inactive inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 44, 495–504 (2016).
- Anink, J. et al. MRPS14 serum levels as a predictor of response to starting and stopping anti-TNF treatment in juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 17, 200 (2015).
- Terrin, G. et al. Serum calprotectin: An antimicrobial peptide as a new marker for the diagnosis of sepsis in very low birth weight newborns. *Clin. Dev. Immunol.* 2011, (2011).
- Decembrino, L., De Amici, M., Pozzi, M., De Silvestri, A. & Stronati, M. Serum Calprotectin: A Potential Biomarker for Neonatal Sepsis. *J. Immunol. Res.* 2015, 147973 (2015).
- Fjaertoft, G., Hakansson, L., Ewald, U., Foucard, T. & Venge, P. Neutrophils from Term and Preterm Newborn Infants Express the High Affinity Fc[gamma]-Receptor 1 (CD64) During Bacterial Infections. *Pediatr Res* 45, 871–876 (1999).
- van der Meer, W., Pickkers, P., Scott, C., van der Hoeven, J. & Gunnewiek, J. Hematological indices, inflammatory markers and neutrophil CD64 expression: comparative trends during experimental human endotoxemia. *J Endotoxin Res* 13, 94–100 (2007).
- Umlauf, V. N., Dreschers, S. & Orlikowsky, T. W. Flow cytometry in the detection of neonatal sepsis. *Int. J. Pediatr.* 2013, 763191 (2013).
- El-Raggal, N. M., El-Barbar, M. N., Youssef, M. F. & El-Mansy, H. A. Neutrophil-surface antigens CD11b and CD64 expression: a potential predictor of early-onset neonatal sepsis. *Egypt J Pediatr Allergy Immunol* 2, 90–100 (2004).
- Mohamed, I., Abdel-Azeem, M., Maher, S. & Mohamed, F. Original article Neutrophil CD64 in early-onset neonatal sepsis. *J Pediatr Allergy Immunol* 8, 19–25 (2010).
- Streimish, I. et al. Neutrophil Cd64 as a Diagnostic Marker in Neonatal Sepsis. *Pediatr Infect Dis J.* 31, 777–781 (2012).
- Du, J. et al. Diagnostic utility of neutrophil CD64 as a marker for early-onset sepsis in preterm neonates. *PLoS One* 9, (2014).
- Halek, J., Novak, M., Medkova, A., Furst, T. & Juranova, J. The role of nCD64 in the diagnosis of neonatal sepsis in preterm newborns. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* (2018).
- https://www2.ikem.cz/plm_lp/_LP_18011-L0000006.htm.
- Kollmann, T.R., Kampmann, B., Mazmanian, S.K., Marchant, A., Levy, O. Protecting the Newborn and Young Infant from Infectious Diseases: Lessons from Immune Ontogeny *Immunity* 46: 350-362 (2017).

Příloha 6 - Srovnání sérových hodnot prokalcitoninu a interleukinu-6 z pupečnickové a periferní krve novorozence



Lékařská
fakulta
Univerzita Palackého
v Olomouci

Srovnání sérových hodnot prokalcitoninu a interleukinu-6 z pupečnickové a periferní krve novorozence



MUDr. Anna Medková^{1,2,4}, MUDr. Jan Hálek, Ph.D.^{1,2,3}, prof. MUDr. Vladimír Mihál, CSc.^{1,2,4}, Mgr. Pavla Kouřilová, Ph.D.⁴

1 Dětská klinika, Fakultní nemocnice Olomouc, Olomouc, 2 Lékařská fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc, 3 Novorozenecké oddělení, Fakultní nemocnice Olomouc, Olomouc, 4 Ústav molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, Olomouc

Úvod

Neonatologie zaznamenala v posledních 20 letech obrovský pokrok v péči o předčasně narozené novorozence. Velkým problémem však nadále zůstává včasná diagnostika a léčba novorozenců s infekcí, resp. sepsí. Dle studie z Yale-New Haven Hospital činí úmrť na novorozenecké sepse 11 % ze všech příčin úmrtí v novorozeneckém věku (1). Zranitelnost těchto pacientů je dána především jejich nezralým imunitním systémem.

Rozpoznat včas novorozence se sepsí činí mnohdy velké obtíže. Nejčastější příznaky rozvíjejícího se septického stavu u novorozence jsou: náhle vzniklá potřeba kyslíku či ventilační podpory, apnoické pauly, bradykardie, hypotenze, intolerance glukózy, kapilární návrat > 3 s, rozdíl teploty mezi periferií a tělesným jádrem > 2 °C, letargie/dráždivost, tepelná nestabilita, intolerance stravy, zvýšení sérového bilirubinu, oligurie, metabolická acidóza (2). Tyto příznaky jsou nespecifické a objevují se u řady neinfekčních stavů v rámci základní diagnózy, kterou je nezralost. Je tedy snaha najít a zavést do praxe laboratorní marker, který by byl rychlý a specifický.

V diagnostice novorozenecké sepse mohou tedy pomoci časné biochemické markery zánětu, zejména IL6 a PCT. V případě časné diagnostiky lze použít odběr pupečnickové krve a případně tak nahradit postnatální odběry.

Cílem této studie bylo porovnat párové hodnoty (pupečník vs. periferie do 2h od porodu) IL-6 a PCT u předčasně narozených dětí a ev. zavedení odběru pupečnickové krve k měření PCT a IL-6 do standardních diagnostických postupů.

Literatura

1. Bizzarro MJ, et al. (2008). Changing Patterns in Neonatal Escherichia coli Sepsis and Ampicillin Resistance in the Era of Intraventricular Antibiotics. *Pediatrics*, 121, 234-242.
2. Modi N, et al. (2005). A case definition for national and international neonatal bloodstream infection surveillance. *Arch Dis Child Fetal Neonatal*, 90(1), 8-17.
3. Kordeh A, et al. (2002). Umbilical cord blood serum procalcitonin concentration in the diagnosis of early neonatal infection. *J Perinatol*, 22(2), 144-151.
4. Kordek A, et al. (2006). Early detection of an early-onset infection in the neonate based on measurements of procalcitonin and C-reactive protein concentrations in cord blood. *Clin Chem Lab Med*, 44(8), 1113-1118.
5. Lerout S, et al. (2014). A new procalcitonin cut-point algorithm in early-onset neonatal infection: For a change of paradigm. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 33(7), 1229-1238.
6. Plonka T, et al. (2008). Concentration of procalcitonin in maternal blood, amniotic fluid and in umbilical cord blood as an indicator of neonatal infection. *Med Wroclaw*, 10(4), 1043-1053.
7. Sauguet O, et al. (2012). Cord blood procalcitonin in the assessment of early-onset neonatal sepsis. *Am J Perinatol*, 35(4), 314-318.
8. Caborec S, et al. (2012). Diagnostic value of a new procalcitonin cut-point algorithm to manage newborns in respect of early-onset infection. *Arch Pediatr*, 20(5), 551-562.
9. Uroczek E, et al. (2007). Umbilical cord blood serum procalcitonin by Time-Resolved Amnifluor Cryptate Emission (TRANCE) technology: Reference values of a potential marker of vertically transmitted neonatal sepsis. *Clin Chem Lab Med*, 45(11), 1531-1535.
10. Cersósimo M, et al. (2012). Cord blood interleukin-6 as a predictor of early-onset neonatal sepsis. *Acta Paediatr*, 101(5), 703-707.
11. Cobelli, et al. (2015). Umbilical Cord IL-6 as a Predictor of Early-Onset Neonatal Sepsis in Women with Preterm Placenta or History of Membrane Rupture. *PLoS ONE*, 10(1), e0117112.
12. Wang H, et al. (2011). Cord blood levels of interleukin-6 and interleukin-8 for the immediate diagnosis of early-onset infection in premature infants. *BioMedicine*, 8(2), 118-123.
13. Hwang E, et al. (2014). Cord blood procalcitonin and interleukin-6 are highly sensitive and specific in the prediction of early-onset sepsis in preterm infants. *Scand J Clin Lab Invest*, 74(5), 432-436.
14. Fan Y, et al. (2012). Umbilical blood biomarkers for predicting early-onset neonatal sepsis. *World J Pediatr*, 8(2), 101-108.

Pacienti a metody

Prospektivní studie probíhala od dubna do listopadu 2016 na Novorozeneckém oddělení Fakultní nemocnice Olomouc. Do studie byli zahrnuti všichni novorozenci narození před ukončeným 37. týdnem gestace, bez ohledu na porodní hmotnost, celkem tedy 90 novorozenců.

Odběr pupečnickové krve byl proveden těsně po vybavení placenty z pupeční arterie, odběr z periferie byl proveden do 2h od porodu.

Prokalcitonin i interleukin-6 byly stanoveny na analytickém systému Cobas 8000 (výrobce Roche/Hitachi). Pro oba analyty byla použita kvantitativní metoda „ECLIA“ (= elektrochemiluminiscenční imunostanovení).

Párový odběr a změření hodnot IL-6 se podařilo u 62 novorozenců, PCT u 46.

Výsledky

Hodnoty z pupečnickové krve a postnatálního odběru se v případě PCT neliší (tab. č. 1).

Mezi odběrem z periferní krve a pupečníku je signifikantní rozdíl (na hladině významnosti 5 %) pouze u IL-6 (tab. č. 1), a to i po samostatné analýze v podskupinách dle sepse a typu porodu (tab. č. 2, 3, graf č. 1, 2).

Hodnoty pupečnickového IL-6 jsou signifikantně vyšší u spontánních porodů ve srovnání s porody císařským řezem

Wilcoxonův test nulovosti stř. hodnoty		
proměnná	Diff_IL	Diff_PCT
počet pozorování	62	47
p-value	2,76E-07	0,81027

tab. č. 1

Test nulovosti pro podskupiny s a bez sepse				
proměnná	Diff_IL+SepA	Diff_IL+SepN	Diff_PCT+SepA	Diff_PCT+SepN
počet pozorování	15	47	10	33
p-value	0,004	9,60E-07	0,4982	0,5953

tab. č. 2

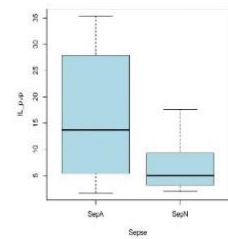
Test nulovosti pro podskupiny dle typu porodu (SC, spont)				
proměnná	Diff_IL+SC	Diff_IL+spont.	Diff_PCT+SC	Diff_PCT+spont.
počet pozorování	28	31	22	22
p-value	0,00275	3,00E-05	0,5715	0,477

tab. č. 3

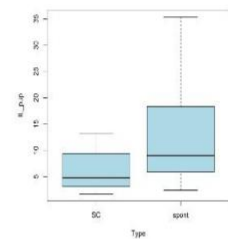
Diskuze a závěr

Novorozenecká sepse a její diagnostika je stále "žhavým" tématem v mnoha prestižních lékařských časopisech. Je snaha najít ideální diagnostický marker. Tématu odběru pupečnickové krve k měření hladin zánětlivých parametrů, převážně IL-6 a PCT, se věnuje řada studií (3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14). Žádná však neřešila diferencí mezi hodnotami IL6 a PCT v pupečnickové a periferní krvi.

Z výsledků usuzujeme, že pupečník a periferní hodnotu lze u PCT používat promiscue. Postnatální odběr krve k měření hladin PCT lze nahradit odběrem z pupečníku. U IL-6 se hodnoty liší, a to i v případě, že novorozenec časnou novorozeneckou sepsí neprodělal. IL-6 je tedy výrazně dynamický marker, který je pravděpodobně ovlivněn i způsobem porodu. Použití pupečnickovou krev k měření IL-6 tedy lze, ale nelze používat stejné cut off hodnoty jako u postnatálního odběru.



graf č. 1



graf č. 2

Podpora

MZ ČR – RVO (FN01, 00098892)



Příloha 7 - Role nCD64 v diagnostice novorozenecké sepse u předčasně narozených novorozenců



Role nCD64 v diagnostice novorozenecké sepse u předčasně narozených novorozenců

Anna Medkova¹, Jan Hálek¹, Martin Novák², Tomáš Fürst³, Jarmila Juráňová²

¹ Novorozenecké oddělení a Dětská klinika Lékařské fakulty a Fakultní nemocnice Olomouc, ² Hemato-onkologická klinika Lékařské fakulty a Fakultní nemocnice Olomouc ³ Katedra matematické analýzy a aplikací matematiky, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci

Úvod

Neonatologie zaznamenala v posledních 20 letech obrovský pokrok v péči o předčasně narozené novorozence. Velkým problémem však nadále zůstává včasná diagnostika a léčba novorozenců s infekcí, resp. sepsí. Zranitelnost těchto pacientů je dána především jejich nezralým imunitním systémem. Incidence novorozenecké sepse se pohybuje kolem 2,7%, u novorozenců s velmi nízkou porodní hmotností je toto číslo ještě vyšší. (1,2)

Rozpoznat včas septického novorozence činí mnohdy velké obtíže. Nejčastější příznaky rozvíjejícího se septického stavu u novorozence jsou: náhle vzniklá potřeba kyslíku či ventilační podpory, apnoické pauzy, bradykardie, hypotenze, intolerance glukózy, kapilární návrat > 3 s, rozdíl teploty mezi periferií a tělesným jádrem > 2 °C, letargie/dráždivost, tepelná nestabilita, intolerance stravy, zvýšení sérového bilirubinu, oligurie, metabolická acidóza (3). Tyto příznaky jsou nespecifické a objevují se u řady neinfekčních stavů v rámci základní diagnózy, kterou je nezralost. Je tedy snaha najít a zavést do praxe laboratorní marker, který by byl rychlý a specifický.

Průtoková cytometrie je bioanalytická metoda, která kombinuje principy fluorescenční mikroskopie a hematologického analyzátoru. Základními zkoumanými objekty jsou buňky a hustota jejich vnitřního prostředí (granulace), dále pak intenzita fluorescenčně značených monoklonálních protilátek určených k detekci komplementárního antigenu na povrchu či uvnitř analyzovaných buněk. Průtoková cytometrie je vysoce senzitivní, relativně levná a rychlá metoda s širokým využitím.

Odpověď organismu na invazi patogena může být rozeznána rychle a to detekcí povrchových znaků na buňkách imunitního systému. Jedním z nich je také CD64, vysoce afinní receptor IgG protilátek důležitých v procesu fagocytózy opsonizovaných bakterií. Expres tohoto receptoru na povrchu neutrofilů se zvýší do 1 hodiny po invazi patogena, z tohoto důvodu by CD64 mohl být časným znakem infekce.

Pacienti a metody

Prospektivní studie probíhala od března 2016 do června 2017 na Novorozeneckém oddělení Fakultní nemocnice Olomouc. Do studie byli zahrnuti všichni novorozenci narození před ukončeným 34. týdnem gestace, bez ohledu na porodní hmotnost.

Děti byly rozděleny do dvou skupin: (1) Odběr vzorků dle standardu oddělení; tedy 12 až 14h po porodu. (2) Opakované odběry při podezření na pozdní novorozeneckou sepsi a to kdykoli, ne však dříve než 72h od porodu.

Na základně klinického a laboratorního hodnocení byli novorozenci rozděleni do 3 kategorií. (A) Možná (klinická) sepsi: Infekce bez prokázání patogena. (B) Prokázaná sepsi: Pozitivní hemokultura. (C) Bez sepse: Bez klinických či laboratorních známek sepse.

U všech těchto novorozenců byl odebrán krevní obraz, základní biochemie včetně klasických markerů sepse jako je CRP, IL-6 a PCT. A dále bylo provedeno měření CD64 pomocí průtokové cytometrie.

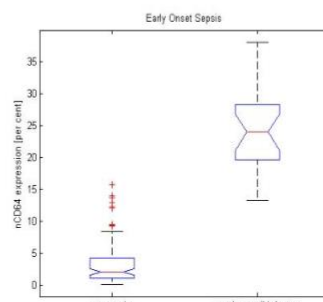
Závěr

Jak z našich výsledků, tak z literárních zdrojů vyplývá, že CD64 je užitečný nástroj k časnému a citlivému rozpoznání novorozenecké sepse. Výhodou CD64 je také jeho stabilní hodnota v časném novorozeneckém období.

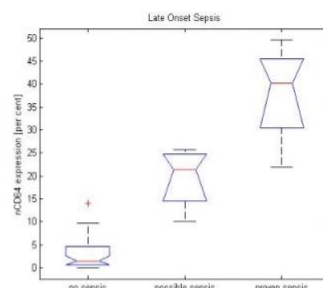
Výsledky

Ve skupině 1 bylo celkem 174 novorozenců, 22 mělo prokázanou sepsi a 1 sepsi možnou. Všem těmto 23 pacientům byla nasazena standardní ATB terapie. Statistická analýza dokazuje jasný vztah mezi hodnotami CD64 a přítomností sepse (Obr. 1.). Na obrázku 2 opět vidíme excelentní prediktivní hodnotu exprese nCD64 u septických novorozenců. Ideální cut-off zdá se být 13%.

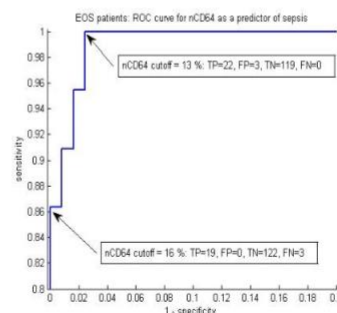
Skupina 2 tvořila 43 novorozenců, 4 z nich měli prokázanou sepsi, 4 z nich sepsi možnou a 35 novorozenců sepsi nemělo. A opět, exprese nCD64 byla spojena se sepsí. Signifikantní byl také rozdíl hodnot mezi jednotlivými skupinami septických dětí (Obr. 3).



Obr. 1. Rozdíly hodnot nCD64 mezi novorozenci s a bez EOS jsou signifikantně významné (na hladině 10⁻¹³).



Obr. 3. Srovnání hodnot exprese mezi jednotlivými kategoriemi LOS; rozdíly jsou signifikantní na hladině P=0,0001.



Obr. 2. Porce ROC: srovnání senzitivity a specifity pro různá cut off nCD64.

Příloha 8 - The role of nCD64 in the diagnosis of neonatal sepsis in preterm newborns



The role of nCD64 in the diagnosis of neonatal sepsis in preterm newborns



Palacký University
Olomouc

Anna Medkova¹, Jan Hálek¹, Martin Novák², Tomáš Fürst³, Jarmila Juráňová²

¹ Neonatal Ward and Department of Pediatrics, University Hospital Olomouc and Faculty of Medicine and Dentistry at Palacký University Olomouc, Czech Republic, ² Department of Hemato-Oncology, University Hospital Olomouc and Faculty of Medicine and Dentistry at Palacký University Olomouc, ³ Department of Mathematical Analysis and Mathematical Applications, Faculty of Science, Palacký University Olomouc

Introduction

- For the past 20 years – the major advances in neonatology regarding the care of prematurely born infants. Early diagnosis and treatment of newborns with sepsis - still remain a serious issue. Vulnerability of these patient is caused mainly by their immature immune system.
- Clinical signs of septic newborn are non-specific (sudden need for oxygen or ventilation support, apnoea, bradycardia, hypotension, glucose intolerance, capillary refill time > 3 s, difference in temperatures between peripheral and core body > 2 °C, lethargy/irritation, unstable temperature, food intolerance, increased serum bilirubin, oliguria, metabolic acidosis).
- Therefore, the aim is to find and to put into practice a laboratory marker which would be fast and specific.
- Flow cytometry is a bioanalytical method combining the principles of fluorescence microscopy and hematology analysis. Flow cytometry is a highly sensitive, relatively cheap and fast method with a wide use.
- The response of the body to the pathogenic invasion can be quickly recognized by detection of surface markers on the cells of the immune system.
- One of the markers is CD64, a high-affinity receptor for IgG antibodies important for the process of phagocytosis of opsonized bacteria. Since the expression of this receptor on the surface of neutrophils increases within 1 hour after the pathogen invasion, the CD64 could be an early sign of the infection.

Patients and Methods

- Prospective study lasted from March 2016 to June 2017.
- The study enrolled all newborns born before completing the gestational week 34.
- Patients were divided into two groups: 1. Samples collected based on the ward standards, i.e., 12 to 14 hours postnatally. 2. Repeated collection of blood samples when the late-onset of neonatal sepsis was suspected, at any time but no sooner than 72 hours postnatally.
- Based on clinical and laboratory assessments, the newborns were divided into 3 categories: (A) Possible (clinical) sepsis: infection without a confirmed pathogen. (B) Confirmed sepsis: Positive blood culture. (C) No sepsis: Negative clinical or laboratory results for sepsis.
- For all these newborns, the performed tests included blood count, and basic biochemistry including common markers for sepsis such as CRP, IL-6, and PCT. In addition, flow cytometry was used to measure CD64.

Results

- Group 1 comprised a total of 174 newborns - 22 had confirmed sepsis and 1 possibly having sepsis. All of the 23 patients were administered standard antibiotic therapy. The statistical analysis shows a clear relationship between the measured values of CD64 and the presence of sepsis (Fig. 1). Figure 2 again shows an excellent predictive value of nCD64 expression in newborns with sepsis. The ideal cut-off seems to be 13%.
- Group 2 comprised 43 newborns - 4 had confirmed sepsis, 4 had possible sepsis, and 35 did not have sepsis. The expression of nCD64 was again related to the sepsis. The difference between the values of the individual newborn groups with sepsis was also significant (Fig. 3).

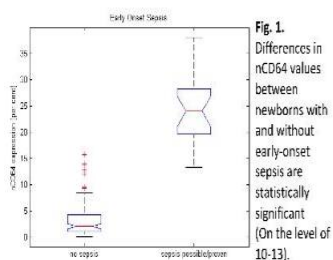


Fig. 1. Differences in nCD64 values between newborns with and without early-onset sepsis are statistically significant (On the level of 10-13).

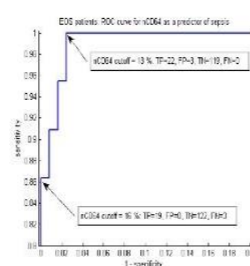


Fig. 2. Portion of ROC: comparisons of sensitivity and specificity for various nCD64 cut-off values.

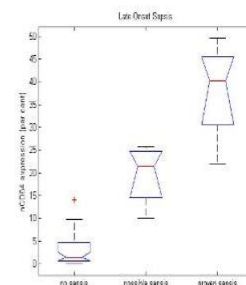


Fig. 3. Comparison of the expression values between individual categories of late-onset sepsis; differences are statistically significant on the level of $p=0.0001$.

Conclusion

Based on our results and based on current available literature, CD64 is an important instrument for early and sensitive recognition of neonatal sepsis. The advantage of CD64 is its stable value in the early neonatal period.

Supported

Supported by Ministry of Health, Czech Republic – conceptual development of research organization (FNOI, 0098892)