Učinkovitost određivanja leukocitnih biljega CD15s, CD11b i CD64 u dijagnostici ozbiljne bakterijske infekcije dojenčadi s vrućicom

Markić, Joško

Doctoral thesis / Disertacija

2013

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:789729

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
UNIVERSITAS STUDIORUM SPALATENSIS
FACULTAS MEDICA

Repository / Repozitorij:

MEFST Repository

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

JOŠKO MARKIĆ

UČINKOVITOST ODREĐIVANJA LEUKOCITNIH BILJEGA CD15s, CD11b I CD64 U DIJAGNOSTICI OZBILJNE BAKTERIJSKE INFEKCIJE DOJENČADI S VRUĆICOM

Doktorska disertacija

Split
2013.

Doktorska disertacija je izrađena u:

- Klinici za dječje bolesti KBC Split
- Katedri za medicinsku kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu
- Zavodu za medicinsku laboratorijsku dijagnostiku KBC Split

Voditelji rada:

doc.dr.sc. **Vedrana Čikeš Čulić**, dipl.inž. med.biokem.
prof.dr.sc. **Julije Meštrović**, dr.med., spec. pedijatar, subspec. intenzivne medicine

Zahvaljujem dragim mentorima na idejama i sugestijama te pomoći, potpori i korisnim savjetima tijekom izrade ove disertacije.

Zahvaljujem doc. dr. sc. **Ani Jerončić** na upornosti i neizmjernoj energiji koja je bila ključna za nastavak započetog posla.

Zahvaljujem prim. mr. sc. **Branki Polić**, prof. dr. sc. **Aniti Markotić** i mr. sc. **Tanji Kovačević** na poticaju i bezuvjetnoj podršci. Hvala i dragim kolegicama i kolegama, medicinskim sestrama i pomoćnicama s Klinike za dječje bolesti te osoblju Zavoda za medicinsku laboratorijsku dijagnostiku KBC Split jer bez vas bi sve bilo mnogo teže.

Zahvaljujem članovima Povjerenstva – prof. dr. sc. **Janošu Terziću**, prof. dr. sc. **Vjekoslavu Krželju** i prof. dr. sc. **Davoru Eteroviću** na vrijednim savjetima i na pažljivom čitanju teksta ovoga rada.

Veliku zahvalnost upućujem mojoj obitelji na strpljenju i ljubavi.

SADRŽAJ

Popis oznaka i kratica 4
1. UVOD 6
1.1. Ozbiljna bakterijska infekcija 6
1.1.1. Definicija 6
1.1.2. Učestalost 7
1.1.3. Dijagnostički postupci 8
1.2. Uloga biomarkera u suvremenoj laboratorijskoj dijagnostici 9
1.3. Biomarkeri ozbiljne bakterijske infekcije 11
1.3.1. Broj leukocita 12
1.3.2. Proteini akutne faze 15
1.3.2.1. C-reaktivni protein (CRP) 15
1.3.2.2. Prokalcitonin (PCT) 19
1.3.3. Sustavi bodovanja 23
1.3.4. Molekule na staničnoj površini leukocita 25
1.3.4.1. Uloga neutrofila u imunološkom sustavu 25
1.3.4.2. Biomarkeri na staničnoj površini leukocita: CD64 31
1.3.4.3. Biomarkeri na staničnoj površini leukocita: CD11b 39
1.3.4.4. Biomarkeri na staničnoj površini leukocita: CD15s 42
2. CILJEVI I HIPOTEZE 47
3. ISPITANICI I METODE 48
3.1. Ustroj istraživanja 48
3.2. Ishod istraživanja i njegova mjera 48
3.3. Etička načela 49
3.4. Ispitanici 49
3.4.1. Kriteriji odabira ispitanika i razvrstavanja u skupine 49
3.4.2. Hodogram odabira ispitanika i razvrstavanja u skupine 52
3.4.3. Snaga istraživanja 52
3.5. Metode 53
3.5.1. Određivanje koncentracije CRP i PCT u serumu 53
3.5.2. Određivanje CD64, CD11b i CD15s na staničnoj površini neutrofila 53
3.5.3. Statistički postupci 54
4. REZULTATI 56
5. RASPRAVA 67

6. ZAKLJUČAK 73
7. SAŽETAK 74
7.1. Abstract 75
8. DODATAK 76
9. POPIS LITERATURE 85
10. ŽIVOTOPIS 101

POPIS OZNAKA I KRATICA

OBI - ozbiljna bakterijska infekcija

SIRS - sindrom sustavnog upalnog odgovora (engl. *systemic inflammatory response syndrome*)

CRP - C-reaktivni protein

PCT - prokalcitonin

L - broj leukocita

ABN - apsolutni broj neutrofila

ROC – engl. *receiver operating characteristic*

IL – interleukin

TNF – tumor nekrotizirajući čimbenik

PPV - pozitivna prediktivna vrijednost

NPV - negativna prediktivna vrijednost

AUC – površina ispod ROC krivulje (engl. *area under an ROC curve*)

HLDA - Humani Leukocitni Diferencijacijski Antigeni (engl. *Human Leukocyte Differentiation Antigens*)

HCDM - Humane Stanične Diferencijacijske Molekule (engl. *Human Cell Differentiation Molecules*)

CD – klaster diferencijacije (engl. *the cluster of differentiation*)

mAb – monoklonsko protutijelo

fMLP - formil-metionil-leucil-fenilalanin

ELAM – endotelna leukocitna adhezijska molekula

LAM – leukocitna adhezijska molekula

PADGEM – trombocit aktivacijski-ovisna granula na vanjski membranski protein (engl. *Platelet Activation-Dependent Granule to External Membrane Protein*)

GMP – granularni membranski protein

LFA - leukocitni funkcijski antigen

Mac – makrofag

PSGL - P-selektin glikoproteinski ligand

ICAM - unutar stanična adhezijska molekula

sLe^x - sijalil Lewis x

GlyCAM – glikozilacijski-ovisna stanična adhezijska molekula

LPS - lipopolisaharid

ESL- E-selektin ligand

Ig – imunoglobulin

FcγRI - Fcγ receptor I

IFN – interferon

G-CSF - čimbenik stimulacije granulocita

RSV - respiracijski sincicijski virus

CR - komplement receptor

RFU - relativne fluorescentne jedinice

1. UVOD

Vrućica je jedan od najčešćih razloga zbog kojeg se djecu mlađu od 3 godine dovodi na pregled u Zavode za hitnu medicinu ili hitne/prijemne ambulante ustrojene u bolnicama. Udjel ovih pregleda u ukupnom broju pregleda je između 10 i 35% (1). Oko 65% djece do dobi 2 godine barem jednom će biti pregledano u svog izabranog liječnika primarne zdravstvene zaštite zbog akutne bolesti praćene vrućicom (2). U većini slučajeva (oko 75%) vrućica će biti do 39°C. Iako će većina te djece bolovati od samoograničavajuće virusne infekcije, a opće stanje u trenutku pregleda bit će dobro, dio njih imat će se ozbiljnu bakterijsku infekciju (OBI) (3). Simptomi i znakovi OBI u dojenčeta i djeteta s vrućicom obično su nespecifični i ponekad ih je teško razlikovati od simptoma i znakova virusne infekcije, naročito u ranoj fazi bolesti (4, 5).
Kako rano postavljanje dijagnoze OBI i uvođenje ispravne terapije vode boljem ishodu liječenja s manjom učestalošću komplikacija ili drugih posljedica, iznimno je značajno pravodobno postaviti ispravnu dijagnozu (6, 7). Pri tome treba imati na umu da će liječenje virusne infekcije antibioticima biti neučinkovito, da ono dovodi do povećane rezistencije mikroorganizama na antibiotike, da povećava troškove zdravstvene skrbi i povećava rizik od razvoja toksičnosti ili alergijskih reakcija (8). Osim toga, intravenska primjena antibiotika zahtijevat će prijem novorođenčadi i dojenčadi u bolnicu i njihovo odvajanje od roditelja u osjetljivom razdoblju života (9).

1.1. Ozbiljna bakterijska infekcija

1.1.1. Definicija

Ozbiljnom bakterijskom infekcijom (OBI) smatra se:
a) bakterijemija kod koje je mikrobiološki potvrđen patološki mikroorganizam u nalazu hemokulture
b) bakterijski meningitis kod kojeg je mikrobiološki potvrđen patološki mikroorganizam u nalazu kulture cerebrospinalnog likvora

c) sepsa, čija je dijagnoza postavljena prema kriterijima koje je postavio Levy i sur., a uključuje mikrobiološki potvrđenu infekciju ili postojanje sumnje na infekciju s nalazom upale ili zatajenja organa te simptomima hemodinamske nestabilnosti i poremećene tkivne prokrvljenosti (10)
d) infekcija mokraćnog sustava kod koje je mikrobiološki potvrđen patološki mikroorganizam u nalazu urinokulture (>10^5 kolonija/ml urina prikupljenog sterilnim načinom preko postavljenog urinarnog katetera)
e) pneumonija koja je potvrđena nalazom upalnog infiltrata na radiološkoj snimci pluća
f) bakterijski gastroenteritis kod kojeg je mikrobiološki potvrđen patološki mikroorganizam u nalazu koprokulture
g) celulitis praćen prikladnim fizikalnim nalazom (11).

1.1.2. Učestalost

Ozbiljne bakterijske infekcije vodeći su uzrok pobolijevanja i smrtnosti djece širom svijeta (12), a u zemljama u razvoju odgovorne su i za skoro 60% smrtnosti (13). Pregledno istraživanje uzroka smrti djece u Engleskoj, Walesu i Sjevernoj Irskoj potvrdilo je da je najveći pojedinačni uzrok smrti djece koja umiru zbog akutne bolesti bila infekcija, a utvrđeno je da su liječnici, kako u bolnicama tako i u ustanovama primarne zdravstvene zaštite, imali poteškoća pri pravovremenom postavljanju dijagnoze OBI (14). Kao potvrda ovog podatka može se istaknuti istraživanje kojim je bilo obuhvaćeno više od 400 djece s meningokoknom sepsom u Velikoj Britaniji, a tek je polovica bila upućena na bolničko liječenje nakon pregleda u izabranog liječnika primarne zdravstvene zaštite i to nekoliko sati nakon pojave prvih simptoma ili znakova sepse (15).

Unatoč korištenju najnovijih antibiotika i ostale suvremene terapije i uređaja, sepsa je i dalje vodeći uzrok smrti kritično bolesnih pacijenata (16).

Ovisno o istraživanju, učestalost OBI u dojenčadi s vrućicom iznad 38°C je različita, a najčešće se kreće od 8 do 12%. Bilavsky i sur. (17) su u istraživanju iz 2009. pokazali učestalost OBI od 11.4% u dojenčadi s vrućicom koja su bila mlađa od 90 dana. Godinu dana kasnije, Huppler i sur. su u preglednom radu analizirali podatke za 8540 dojenčadi. Ukupni broj OBI je bio 931 što je činilo učestalost od 10.9% (18), koja je u skladu s učestalošću uobičajeno nađenoj i u ostaloj

literaturi. Slične rezultate imali su Ashkenazi-Hoffnung i sur. (19) koji su našli učestalost OBI u dojenčadi ≤ 90 dana od 9.4%.

Međutim, u nekim istraživanjima učestalost OBI bila je značajno viša.
Olaciregui i sur. (11) su u svom istraživanju utvrdili učestalost OBI od 23.6% što je značajno, čak i dvostruko više od učestalosti OBI koja je utvrđena u većini drugih istraživanja, ali je u skladu s rezultatima u slično ustrojenim istraživanjima te provedenim u usporedivom kliničkom okružju ambulanti hitne službe (20-23). U jednom od njih ispitanici su bili djeca mlađa od 3 godine, a učestalost OBI je bila oko 20% (23). Ta je učestalost viša od učestalosti nađene u prijašnjem istraživanju u ambulanti hitne službe (24).

U istraživanju autora Brauner i sur. iz 2010., analizirani su klinički i laboratorijski podaci djece dobi od 3 do 36 mjeseci koja su primljena na pregled u ambulante hitne službe zbog vrućice iznad 38°C (25). OBI je nađen u 39% bolesnika kojima je laboratorijskim nalazima nađena ekstremna leukocitoza (broj leukocita > 25,000/mm^3), za razliku od djece čija je vrijednost leukocita bila 15 000–24 999/mm^3 (umjerena leukocitoza) i kod kojih je učestalost OBI bila značajno manja (15.4%) (25). Razlog ovoj razlici je činjenica da je u djece s ekstremnom leukocitozom postojao povećani rizik za razvoj pneumonije.

1.1.3. Dijagnostički postupci

Djeca mlađa od 3 godine s vrućicom nepoznatog uzroka i dalje su klinički izazov liječnicima koji u svom radu dolaze u doticaj s ovim bolesnicima jer se infekcije mokraćnog sustava, pneumonija ili okultna bakterijemija ne mogu u potpunosti i s apsolutnom sigurnošću isključiti u djeteta koje dobro izgleda i čije je opće stanje u trenutku pregleda dobro (26). Kombinacija kliničkog pregleda i broja leukocita te nalaz diferencijalne krvne slike obično se koriste pri postavljanju dijagnoze (1, 27, 28). Mikrobiološka potvrda pozitivnog nalaza hemokulture zlatni je standard za dijagnozu bakterijemije, ali pri tome su moguće brojne poteškoće. Naime, inkubacija bakterija najčešće traje nekoliko dana (2-4 dana), a prisutna bakterijemija može ostati nedetektirana u velikog broja inficirane djece jer se za analizu uzima mali volumen krvi. Važna prepreka ranoj dijagnostici bakterijemija je i činjenica da je ona u novorođenčeta često prolazna ili intermitentna, posebno tijekom ranih stadija infekcije (29).

1.2. Uloga biomarkera u suvremenoj laboratorijskoj dijagnostici

Biomarkeri imaju važno i nezaobilazno mjesto u laboratorijskoj dijagnostici mnogih bolesti, a poglavito infekcija. Oni pomažu u diferencijaciji bakterijske od virusne ili gljivične infekcije te doprinose objektivnoj procjeni težine bolesti poput razlikovanja sepse od blaže lokalne infekcije. Ponekad, čak i u današnje vrijeme, unatoč velikom napretku u laboratorijskoj dijagnostici i dostupnim suvremenim uređajima, teško je na temelju kliničke slike razlikovati bakterijsku infekciju ili sepsu od mogućih drugih neinfektivnih uzroka sindroma sustavnog upalnog odgovora (SIRS, engl. *systemic inflammatory response syndrome*) (30). Imajući u vidu da je godišnji trošak liječenja bolesnika sa sepsom u Sjedinjenim Američkih Državama skoro 17 milijardi dolara (16), razumljivo je zbog čega je istraživanje i potraga za učinkovitijim biomarkerima u stalnom tijeku.

Temeljem zaključaka konferencije Nacionalnog instituta za zdravlje (engl. *National Institutes of Health*) Sjedinjenih Američkih Država iz 2001. (31), biomarker se široko definira kao parametar koji se može objektivno izmjeriti i koji služi kao pokazatelj promjena koje se događaju tijekom uobičajenih (normalnih) bioloških procesa, tijekom patoloških procesa ili će nam poslužiti za procjenu farmakološkog odgovor na neku terapijsku intervenciju (31). Također, izraz 'biomarker' odnosi se na dobiveni rezultat nekog testa koji se izvodi analizirajući uzorak tjelesne tekućine (npr. krv, urin ili cerebrospinalni likvor), a koji liječniku daje informaciju o bolesniku i njegovom stanju koja se ne može dobiti koristeći druge uobičajene i dostupne dijagnostičke metode (32).

Postoje četiri glavna tipa biomarkera: dijagnostički, monitorirajući, stratificirajući i surogatni biomarker (33, 34).

Dijagnostički biomarkeri služe za utvrđivanje prisutnosti ili odsustva bolesti ili nekog drugog kliničkog stanja. Najveća moguća važnost i korist većine dijagnostičkih biomarkera postići će se ako ih se razmatra u sklopu određenog specifičnog kliničkog konteksta i uz uvažavanje nalaza drugih dodatnih dijagnostičkih testova. Iznimno su rijetki dijagnostički markeri koji se definiraju kao „prisutni" ili „odsutni". Većinom se vrijednost biomarkera izražava kao kontinuirana varijabla kojoj treba odrediti optimalnu graničnu vrijednost. Biomarker će tada, ovisno o tome je li njegova vrijednost iznad ili ispod granice, ukazivati na postojanje ili nepostojanje određene bolesti ili stanja.

U sklopu ove skupine biomarkera, uključena je podgrupa tzv. „screening“ ili probirnih biomarkera. Korištenje probirnih biomarkera omogućava jednostavan, jeftin i niskorizičan probir mogućih bolesnika u populaciji, a koji se upravo analizom ovog biomarkera mogu detektirati (npr. analiza novorođenačke kapi krvi na određene metaboličke bolesti). Idealni probirni biomarker ima visoku osjetljivost, međutim ne treba imati visoku specifičnost. Stoga, kako probirni biomarker ne može sa sigurnošću potvrditi dijagnozu bolesti potrebne su dodatne i složenije dijagnostičke pretrage i postupci s većom specifičnosti.

Monitorirajući biomarkeri su obično molekule ili proteini čije se koncentracije ili količine dinamično mijenjaju ovisno o razvoju bolesti ili ovisno o postignutom učinku određene terapijske intervencije. Praćenje vrijednosti ovih biomarkera pomaže liječniku u nadzoru razvoja bolesti ili u procjeni ispravnosti primijenjenih postupaka liječenja. Dobar monitorirajući biomarker stoga mora biti funkcionalno povezan s mehanizmom djelovanja primijenjene terapijske intervencije.

Stratifikacijski biomarkeri koriste se za razvrstavanje bolesnika u različite skupine ovisno o težini ili stupnju njihove bolesti, a s ciljem da se određeno liječenje ili terapijska intervencija primjeni samo u onoj skupini bolesnika u kojih se od te intervencije očekuje najveća korist praćena najmanjim mogućim rizikom razvoja neželjenih posljedica ili nuspojava. Korištenjem dobrog stratifikacijskog biomarkera moguće je odabrati bolesnike s visokim rizikom u kojih je potrebno primijeniti terapiju koja ima veći rizik razvoja nuspojava, koja je toksičnija ili agresivnija od uobičajene terapije. Učinkoviti stratifikacijski biomarker identificirat će bolesnike u kojih postoji veća vjerojatnost dobrog ishoda liječenja korištenjem standardne terapije pa se stoga objektivno mogu izdvojiti pacijenti koje nije potrebno izlagati agresivnijoj terapiji. Dakle, korištenjem ovog biomarkera moguće je odabrati najprikladnije mjere liječenja u skladu s rizikom i dobrobiti primijenjene terapije.

Surogatni biomarkeri primarno se koriste za predviđanje ishoda bolesti, a ne za praćenje tijeka bolesti ili za prilagođavanje terapije i drugih postupaka liječenja terapije. Vrsta terapije koja se koristi mora imati direktan utjecaj na vrijednost učinkovitog i dobro odabranog surogatnog biomarkera.

Da bi bio klinički koristan u dijagnozi infekcije, biomarker treba imati slijedeće laboratorijske i kliničke karakteristike:

1) dobro definirana granična vrijednost za razlikovanje bolesnika s infekcijom od onih koji nemaju infekciju
2) vrijednost biomarkera omogućuje prepoznavanje bolesnika s infekcijom u ranom stadiju bolesti
3) biomarker treba biti biokemijski stabilan jer ponekad postoji potreba za pohranjivanjem uzoraka zbog nemogućnosti analize biomarkera u danom trenutku

Za dijagnostičke potrebe poželjne su visoka osjetljivost (udio bolesnih ispitanika u kojih je test dao pozitivan nalaz) i negativna prediktivna vrijednost (što bliža 100%) te dobra specifičnost (udio zdravih ispitanika u kojih je test dao negativan nalaz) i pozitivna prediktivna vrijednost (>85%). Ako navedeno nije moguće tada se optimalna granična vrijednost biomarkera određuje tako da su i osjetljivost i specifičnost što bliži 80%. Biomarkeri koji su visoko osjetljivi imaju niski udio lažno negativnih rezultata, a oni koji su visoko specifični imaju niski udio lažno pozitivnih rezultata. Optimalno, dobar biomarker će biti visoko osjetljiv i visoko specifičan, a njihove vrijednosti ovisit će o tome gdje je postavljena granična vrijednost.

1.3. Biomarkeri ozbiljne bakterijske infekcije

Kvalitetni klinički i laboratorijski parametri neophodni su za rano prepoznavanje i liječenje djece s ozbiljnom akutnom bolesti, posebice OBI (14). Stoga, tijekom posljednjih desetljeća, mnogi znanstvenici u svojim istraživanjima traže učinkovitije i sve bolje biomarkere pomoću kojih bi se što točnije i ranije postavila dijagnoza OBI. Na takav način bilo bi moguće rano prepoznati djecu s povećanim rizikom za razvoj OBI te ih razlikovati npr. od onih koja imaju virusnu infekciju i koju se može zbrinuti i liječiti kod kuće. Uobičajeni, rutinski postupci laboratorijske dijagnostike infekcije i dalje se temelje na nekim dijagnostičkim testovima koji su u uporabi posljednjih 40-tak godina.

Analiza i određivanje učinkovitosti biomarkera OBI iznimno je važno. Bitno je istaknuti njihovu korist i vrijednost u obradi djece dobi od 1 mjeseca do 3 godine koji dolaze na pregled u hitne pedijatrijske ambulante zbog vrućice nepoznatog uzroka. Pokazano je da su C-reaktivni protein (CRP), prokalcitonin (PCT), broj leukocita i apsolutni broj neutrofila dobri prediktori OBI i da za postavljanje dijagnoze OBI imaju bolju vrijednost nego što ju ima sami klinički pregled ili klinička evaluacija stanja bolesnika korištenjem vizualne analogne ljestvice (35).

U sklopu obrade dojenčadi i djece s vrućicom, a poglavito one mlađe od 2 mjeseca, potrebno je svakako napraviti hematološku i biokemijsku analizu uzorka krvi, urina, a ako postoji indikacija i cerebrospinalnog likvora. Često je dojenčad potrebno zaprimiti na bolničko liječenje zbog dodatnog promatranja, a ponekad je potrebno ordinirati i empirijsku primjenu antibiotika. U slučaju da zatražene dijagnostičke (laboratorijske, radiološke i/ili mikrobiološke) pretrage te kliničko stanje dojenčeta pokažu da primjena antibiotika nije bila opravdana, ona će se nakon 3-4 dana prekinuti. Do 1985. bilo je preporučljivo da se sva febrilna dojenčad mlađa od 2 mjeseca hospitalizira i liječi parenteralnim pripravcima antibiotika nakon što se uzmu uzorci za dijagnostičku obradu zbog toga jer su se različiti korišteni kriteriji za prepoznavanje "visoko rizične" dojenčadi pokazali nedovoljno osjetljivima u prepoznavanju dojenčadi s OBI (36).

U dosadašnjim istraživanjima, analizirala se učinkovitost mnogih biomarkera ili rizičnih čimbenika kao mogućih prediktora postojanja OBI. Neki od njih su tjelesna temperatura, broj leukocita (L), apsolutni broj neutrofila (ABN), brzina sedimentacije eritrocita, koncentracija CRP-a i PCT-a u serumu, antagonisti interleukinskih (IL) receptora i mikrobiološke kulture. Nažalost, niti jedan od njih nije se pokazao dovoljno osjetljivim ili specifičnim da s potpunom sigurnošću može potvrditi ili opovrgnuti postojanje OBI u dojenčeta/djeteta koje dolazi na liječnički pregled zbog vrućice (1, 37-40). Isto tako, istraživala se i svrsishodnost određivanja i učinkovitost mnogih proteina akutne faze uključujući alfa-1-antitripsin, fibronektin, haptoglobin, laktoferin, neopterin, orosomukoid i antitrombin u dijagnostici novorođenačke sepse (41). Međutim niti jedan od njih se nije počeo rutinski koristiti u kliničkom radu niti je istraživan na većem broju ispitanika.

1.3.1. Broj leukocita

Broj leukocita je vjerojatno najčešće korišteni biomarker u kliničkoj praksi, a mnogi postupnici koji se koriste u obradi novorođenčadi, dojenčadi i djece s vrućicom kao važan sastavni dio imaju određivanje broja leukocita (42, 43).

U djece s vrućicom se broj leukocita < 5 ili $\geq 15 \times 10^9$/l smatra povezanim s povećanim rizikom za postojanje OBI (1, 37). Međutim, mnoga istraživanja su dovela u pitanje njegovu vrijednost kao pouzdanog i dobrog prediktora OBI u djece s vrućicom (4, 27, 44). U skladu s tim

istraživanjima su i rezultati koje su objavili Rudinsky i sur. (45), a koji su našli da predložene granične vrijednosti broja leukocita < 5 i > 15 x 10^9/l nisu pouzdani prediktor OBI u djece dobi od 3 do 24 mjeseca. Nikakva statistički značajna razlika nije nađena u vrijednostima broja leukocita između skupina koje su obuhvaćale ispitanike s OBI (13.8 ± 5.8 x 10^9/l) i onih koji nisu imali OBI (11.7 ± 5.6 x 10^9/l). Istodobno, na ROC krivulji (engl. *receiver operating characteristic*) nije utvrđena granična vrijednost broja leukocita koja bi imala klinički značajnu i korisnu osjetljivost i specifičnost te se pokazala pouzdanim prediktorom OBI (45).

Rezultati istraživanja Bonsu i sur. (46) pokazali su da granična vrijednost broja leukocita od 15 x 10^9/l ima osjetljivost od samo 45% i specifičnost od 78%. Čak i korištenje iznimno niskih graničnih vrijednosti, poput 5 x 10^9/l , propustit će dijagnosticirati 21% bolesnika s bakterijemijom.

Slične razočaravajuće rezultate su godinu dana ranije objavili i Carrol i sur. (47) Autori su istraživali korist određivanja broja leukocita te drugih mogućih dobrih prediktora infekcije u djece s meningokoknom bolesti. Od 108 ispitanika kod kojih je postojala sumnja na meningokoknu bolest, nađeno je da je broj leukocita bio viši u čak 44 djece bez meningokokne bolesti (11.2 x 10^9/l) nego u one u koje je postavljena dijagnoza meningokokne bolesti (10.4 x 10^9/l) (47).

Lošu prediktivnu vrijednost određivanja broja leukocita u dijagnostici bakterijemije u novorođenčadi pokazali su u svom istraživanju Brown i sur. (48), a u dijagnostici OBI kod djece s vrućicom Pulliam i sur. (49).

Te iste 2001. godine, objavljeni su i rezultati istraživanja koje su proveli Galletto-Lacour i sur. (21) Oni su također potvrdili da su broj leukocita te rezultati analize diferencijalne krvne slike, čije se vrijednosti često uzimaju u obzir pri postavljanju dijagnoze infekcije, loši prediktori infekcije u usporedbi s nalazom koncentracije PCT-a i CRP-a u serumu. Granična vrijednost broja leukocita od 15 x 10^9/l imala je osjetljivost od 68%, a specifičnost od 77%. Broj štapićastih (nesegmentiranih) leukocita > 1.5 x 10^9/l pokazao je osjetljivost od 29%, a specifičnost od 91%. Slijedeće istraživanje iste skupine autora pokazalo je također lošu prediktivnu vrijednost broja leukocita. Koristeći graničnu vrijednost broja leukocita od 15 x 10^9/l, nađena je loša osjetljivost od 52%, a tek srednje dobra specifičnost od 74%. Prediktivna vrijednost određivanja broja štapićastih leukocita bilo je još lošija, s osjetljivošću od samo 11% (22).

U tablici 1. prikazani su rezultati raznih istraživanja uz granične vrijednosti broja leukocita koje su autori sami odredili i predložili kao najoptimalnije te osjetljivost i specifičnost koja je pri toj vrijednosti nađena.

Tablica 1. Osjetljivosti i specifičnosti za predložene granične vrijednosti broja leukocita u dijagnostici OBI: pregled rezultata nekih od istraživanja koja su određivala prediktivnu vrijednost broja leukocita u dijagnostici OBI.

Istraživanje	Optimalna granična vrijednost broja leukocita (x 10^9/l)	Osjetljivost (%)	Specifičnost (%)
Bonsu i sur. (46)	15.0	45.0	78.0
Carrol i sur.(47)	15.0	69.0	67.0
Fernandez-Lopez i sur. (50)	16.5	50.9	79.2
Galetto-Lacour i sur. (21)	15.0	68.0	77.0
Galetto-Lacour i sur. (22)	15.0	52.0	74.0
Pulliam i sur.(49)	15.0	80.0	69.0
Olaciregui i sur. (11)	15.0	38.0	84.0
Rudinsky i sur. (45)	15.0	42.0	74.0
Bilavsky i sur. (17)	15.0	48.0	84.1
Bilavsky i sur. (17)	20.0	21.6	95.2

Nekoliko istraživanja posebnu je pažnju usmjerilo na povezanost bakterijske infekcije i nalaza ekstremne leukocitoze (broj leukocita $\geq 25 \times 10^9$/l).

Mazur i sur. (51) kao ispitanike imali su djecu od novorođenačke dobi do dobi od punih 18 godina. Autori su našli da je u ispitanika s ekstremnom leukocitozom učestalost OBI bila 17%. Relativni rizik potvrđene OBI bio je u djece s ekstremnom leukocitozom 1.58 puta veći nego u djece s umjerenom leukocitozom (broj leukocita 15 – 24.999 x 10^9/l). Nažalost, autori nisu u svom radu iznijeli koje su točno dijagnoze bolesti bile u djece s leukocitozom, a kao mogući ograničavajući čimbenik istraživanja je činjenica da iz njega nisu bila isključena djeca s

pridruženim bolestima koje mogu dovesti do povećane učestalosti OBI (npr. kronične bolesti, anemija srpastih stanica i leukemija).

U istraživanju Brauner i sur. iz 2010., ispitanici su bila djeca dobi od 3 do 36 mjeseci koja su dovedena na liječnički pregled u hitnu pedijatrijsku ambulantu zbog vrućice iznad >38°C (25). Dijagnoza OBI je utvrđena u 39% bolesnika s ekstremnom leukocitozom, što se statistički značajno razlikuje od učestalosti OBI od 15.4% koja je nađena u ispitanika u kontrolnoj skupini. Kontrolnu skupinu su činili ispitanici s vrućicom čiji je broj leukocita 15 – 24.999 x 10^9/l. Autori su u ovom radu istaknuli da je povećani rizik za razvoj OBI u skupini ispitanika s ekstremnom leukocitozom uglavnom bio uzrokovan povećanim rizikom za postojanje pneumonije u ovih bolesnika.

Suprotno ovim rezultatima, Shah i sur. (52) nisu našli razliku u učestalosti OBI između djece s vrućicom koja su imala ekstremnu leukocitozu i djece s vrućicom u kojih je leukocitoza bila umjerena.

1.3.2. Proteini akutne faze

Koncentracije CRP-a i PCT-a u serumu često su korišteni biomarkeri infekcije. Ovi proteini akutne faze su endogeni peptidi koje proizvodi jetra u sklopu odgovora na infekciju ili ozljedu tkiva. Pokazano je da su CRP i PCT bolji prediktori OBI u djece s vrućicom nego što je to broj leukocita (21-23, 50, 53, 54).

1.3.2.1. C-reaktivni protein (CRP)

C-reaktivni protein je dobio takvo ime jer precipitira iz seruma u prisutnosti C-polisaharida iz staničnog zida pneumokoka. On je reaktant akutne faze upale kojeg se nađe u krvi, a sintetizira ga jetra u sklopu odgovora na povišene razine citokina (razni interleukini, tumor nekrotizirajući čimbenik-α). Do njegove pojačane proizvodnje dolazi 4 do 6 sati nakon početka upale ili ozljede tkiva. Vrijednost koncentracije u serumu udvostručuje se svakih slijedećih 8 sati, a vrhunac vrijednosti dosegne otprilike nakon 36 sati (55, 56).

CRP se već duže vrijeme koristi kao osjetljivi pokazatelj bakterijske infekcije, a cijelo vrijeme su u tijeku i mnoga istraživanja koja utvrđuju njegova učinkovitost kao prediktora infekcije. Obzirom da postoji odmak u vremenu tj. potrebno je proći određeno vrijeme od početka infekcije do povećanja vrijednosti CRP-a, često se CRP koristi u kombinaciji s drugim biomarkerima u serumu (57, 58). Zbog nepostojanja opće prihvaćenog stava koja je granična vrijednost CRP koja najbolje može odrediti ili predvidjeti postojanje ili nepostojanje OBI, razni autori su u svojim istraživanjima koristili različite granične vrijednosti koncentracije CRP-a u serumu. (Tablica 2.)

Tablica 2. Osjetljivosti i specifičnosti za predložene granične vrijednosti C-reaktivnog proteina (CRP) u istraživanjima koja su određivala prediktivnu vrijednost CRP-a u dijagnostici ozbiljne bakterijske infekcije.

Istraživanje	Granična vrijednost C-reaktivnog proteina (mg/l)	Osjetljivost (%)	Specifičnost (%)
Carrol i sur.* (47)	30.0	81.0	89.0
Fernandez-Lopez i sur. (50)	27.5	63.5	84.2
Gendrel i sur. (53)	10.0	98.0	50.0
Galetto-Lacour i sur. 2001 (21)	40.0	89.0	75.0
Galetto-Lacour i sur. 2003 (22)	40.0	79.0	79.0
Pulliam i sur. (49)	70.0	79.0	91.0
Olaciregui i sur. (11)	20.0	64.0	84.0
Olaciregui i sur. (11)	30.0	59.0	89.0
Bilavsky i sur. (17)	80.0	23.5	98.2
Bilavsky i sur. (17)	40.0	44.1	92.2
Isaacman i sur. (24)	44.0	62.0	81.0
Berger i sur. (59)	20.0	83.0	67.0
Andreola i sur. (23)	40.0	71.0	81.0
*Samo meningokokna bolest.			

U neonatologiji, Philip i Mills preporučili su da treba novorođenče kod kojeg je vrijednost CRP-a ≥10 mg/l, a postoji jedan (ili više) kliničkih znakova ili jedan (ili više) rizičnih čimbenika za razvoj infekcije, premjestiti iz odjela za zdravu novorođenčad u odjel za bolesnu novorođenčad i da se mora započeti liječenje antibioticima (60). Slično smatraju Franz i sur. za koje je vrijednost CRP >10 mg/l, uz prisutnost jednog (ili više) kliničkih znakova koji ukazuju na postojanje infekcije, kriterij za postavljanje dijagnoze kliničke septikemije te za premještanje novorođenčeta u odjel za bolesnu novorođenčad, a ponekad čak i u jedinicu intenzivnog liječenja novorođenčadi (58, 61).

Bilavsky i sur. (17) pokazali su da je vrijednost CRP-a vrlo koristan laboratorijski pokazatelj u procjeni rizika OBI u dojenčadi mlađe od 3 mjeseca koja imaju vrućicu. Oni su našli da su različite granične vrijednosti CRP-a imale bolju osjetljivost i specifičnost nego različite granične vrijednosti broja leukocita u dijagnostici OBI. Autori su pokazali da vrijednost CRP-a iznad 50 mg *l* upućuje na veliku vjerojatnost postojanja OBI. Ipak, usprkos velikoj specifičnosti, osjetljivost mu je mala.

U istraživanju koje su proveli Olaciregui i sur. (11) ispitanici su također bila dojenčad mlađa od 3 mjeseca. CRP je pokazan kao učinkoviti prediktor OBI, međutim preporučeno je koristiti ga u kombinaciji s drugim biomarkerima u postavljanju dijagnoze. Autori su pokazali da je mogućnost isključivanja dijagnoze OBI značajno povećana ako bolesnik ima vrijednosti CRP-a < 30 mg/l, PCT-a < 0.5 ng/ml, a broj leukocita je između 5 i 15 x 10^9/l. Istovremeno, dotadašnja anamneza dojenčeta trebala biti uredna, njegovo opće stanje treba biti dobro, a nalaz analize urina uredan. Ova kombinacija kliničkih i laboratorijskih pokazatelja je imala osjetljivost 96%, specifičnost 35%, pozitivnu prediktivnu vrijednost (PPV) od 32% i negativnu prediktivnu vrijednost (NPV) od 96% za dijagnostiku OBI, a u dijagnostici sepse i bakterijemije vrijednosti su bile: osjetljivost 100%, specifičnost 29%, PPV 6% i NPV 100%.

Pulliam i sur. (49) su 2001. godine objavili rezultate prospektivnog istraživanja u kojem su istraživali učinkovitost određivanja CRP-a u djece s vrućicom > 39°C. U istraživanje je bilo uključeno 77 djece dobi 1 do 36 mjeseci. Osim CRP-a, određivan je broj leukocita, a zatraženi su i nalazi hemokulture i urinokulture. Učestalost OBI je bila 18% (6 ispitanika imalo je infekciju gornjih mokraćnih putova, 4 pneumoniju, a 5 bakterijemiju). Pokazano je da je CRP značajno učinkovitiji prediktor OBI nego što je to broj leukocita u ispitivanoj skupini pacijenata, a granična vrijednost CRP od 70 mg/l imala je osjetljivost od 79% i specifičnost od 91%.

Ograničavajući čimbenik u prosudbi vrijednosti istraživanja je bio taj da bolesnici nisu randomizirano uključeni u istraživanje te da je broj mlađe dojenčadi bio malen.

Galetto-Lacour i sur.(21) također su istraživali učinkovitost određivanja CRP-a i drugih potencijalnih biomarkera u dijagnostici infekcije. U istraživanje, koje je provedeno u hitnoj pedijatrijskoj ambulanti sveučilišne bolnice, prospektivno je bilo uključeno 124 djece u dobi od 7 dana do 36 mjeseci. Učestalost OBI bila je 23% (najčešće dijagnoze bile su pijelonefritis, lobarni infiltrat pluća i bakterijemija. Granična vrijednost CRP-a od 40 mg/l imala je osjetljivost od 89% i specifičnost od 75%. Utvrđena osjetljivost je bila veća od osjetljivosti u istraživanju Pulliam i sur. (49), ali je specifičnost bila manja. Slične rezultate našla je ova skupina autora i dvije godine kasnije u nastavku istraživanja (22). Pokazali su da je u laboratorijskoj obradi sumnje na OBI tj. za postavljanje dijagnoze OBI određivanje koncentracije CRP-a u serumu korisnije i važnije od određivanja broja leukocita, a nađena osjetljivost i specifičnost su bile 79%.

Najveću osjetljivost CRP-a utvrdili su Gendrel i sur. (53). Oni su ispitanike podijelili u tri skupine: invazivna bakterijska infekcija, neinvazivna bakterijska infekcija, te virusna infekcija. Nađene srednje vrijednosti CRP-a po skupinama bile su 148.4, 82.8, te 19.5 mg/l. Analizirana je učinkovitost CRP-a kao biomarkera koji pomaže u diferenciranju bakterijske od virusne infekcije te je nađena osjetljivost od 98%. Međutim, granična vrijednost koju su autori predložili za tu diferencijaciju bila je 10 mg/l. Ta je granična vrijednost bila zamjetno manja od srednje vrijednosti CRP-a u bolesnika koji su imali virusnu infekciju (19.5 mg/l). Očekivano, zbog toga je dobivena CRP specifičnost bila tek 50%.

Važan pregledni rad koji daje bolji uvid u učinkovitost i vrijednost CRP-a kao biomarkera objavili su 2008. godine Sanders i sur. (62). Sva istraživanja koja su bila uključena u ovaj pregledni rad bila su provedena u hitnim pedijatrijskim ambulantama ili hitnim službama. Pokazano je da CRP ima osrednju vrijednost za isključenje OBI u djeteta s vrućicom, ali je još ograničenija bila njegova vrijednost za isključenje svih bakterijskih infekcija. Naime, dijagnostička vrijednost ovog laboratorijskog testa za sve bakterijske infekcije ograničena je činjenicom da postoji značajno preklapanje vrijednosti CRP-a u djece s virusnom infekcijom i djece s bakterijskom infekcijom.

1.3.2.2. Prokalcitonin (PCT)

Prokalcitonin je reaktant akutne faze kojeg proizvode monociti i hepatociti. On je peptid sa 116 aminokiselina i jedan je od preteča (prekursora) kalcitonina. Kalcitonin se proizvodi u štitnoj žlijezdi i regulira koncentraciju kalcija u serumu. Sva tkiva u tijelu mogu proizvoditi PCT, međutim u normalnim stanjima jedino parafolikularne stanice štitne žlijezde proizvode PCT pa je njegova koncentracija u serumu vrlo malena. Kada u organizmu dođe do razvoja infekcije, započinje proces značajne proizvodnje PCT-a u ostalim tkivima cijelog organizma, uključujući jetru, slezenu i masno tkivo, a koncentracija u serumu se povećava.

U bakterijskim infekcijama, koncentracija PCT-a u serumu se povećava od vrijednosti koje se mjere u pikogramima/ml (razina koja je manja od razine detekcije koja je moguća trenutno dostupnim testovima) do koncentracija koje su čak i do 1000 ng/ml. Ovaj porast je često u skladu s težinom bolesti i s postotkom smrtnosti (63-66). Koncentracija PCT-a u serumu se počinje povećavati 2-4 sata nakon izloženosti bakterijskom endotoksinu, vrhunac vrijednosti dosegne nakon 6-8 sati, a zatim te vrijednosti ostaju povećanima barem slijedeća 24 sata (67). Do povećanja vrijednosti koncentracije PCT-a dolazi mnogo brže nego do povećanja CRP-a, a i vrhunac vrijednosti PCT-a dosegne se unutar mnogo kraćeg vremenskog razdoblja. Važno je istaknuti da, kada pacijent dobro reagira na primijenjenu terapiju, vrijednost PCT-a mnogo brže pada i vraća se na normalne vrijednosti nego kod CRP-a.

U dijagnostici bolesti kod odraslih pacijenata, PCT se počeo koristiti pred više od 20 godina. Cilj određivanja njegovih koncentracija u serumu je lakša dijagnostika težine sistemskog upalnog odgovora jer služi kao pokazatelj napredovanja infekcije prema stanju sepse ili septičkog šoka. PCT je također učinkovit i u procjeni odgovora pacijenta na primijenjeno liječenje i u procjeni ishoda bolesti (67). Dakle, klinička važnost ili primjenjivost PCT-a kao biomarkera je ta da se on može koristiti za određivanje trenutka započinjanja liječenja (dijagnostički biomarker) i za određivanje duljine trajanja liječenja (monitorirajući biomarker) (34).

Najveću osjetljivost i specifičnost PCT našli su Carrol i sur. (47). Njihovo istraživanje bilo je ograničeno samo na djecu u koje je postojala klinička sumnja na meningokoknu bolest. Autori su našli da je PCT najosjetljiviji test i za optimalnu graničnu vrijednost PCT od 2 ng/ml utvrdili su osjetljivost od 94%, a specifičnost od 93% za dijagnosticiranje djece s ili bez meningokokne bolesti. Kako se istraživanje provelo na ciljanoj populaciji samo one djece u koje je postojala

visoka sumnja na meningokoknu bolest, šira primjena rezultata ovog istraživanja je ograničavajuća.

Istraživanja učinkovitosti i vrijednosti PCT-a pokazala su da je on biomarker s većom specifičnošću nego CRP (68) i da je bolji prognostički pokazatelj od CRP-a (69). Ove su se tvrdnje dodatno potvrdile u istraživanjima u kojima su ispitanici bila djeca s teškim, invazivnim bakterijskim infekcijama i koja su pokazala veću osjetljivost i specifičnost PCT-a nego CRP-a (47, 50, 70-72). Međutim, neka istraživanja dovode i dijagnostičku učinkovitost PCT-a u pitanje (67).

U dojenčadi mlađe od 3 mjeseca s vrućicom nepoznatog uzroka, PCT je imao bolju dijagnostičku učinkovitost nego CRP ili broj leukocita za predviđanje OBI (11). Isto je potvrdilo i istraživanje Maniaci i sur. koji su kao ispitanike također imali dojenčad mlađu od 3 mjeseca s vrućicom. U 12.8% dojenčadi postavljena je dijagnoza sigurne, a u 5.1% moguće OBI. Srednje vrijednosti PCT-a bile su značajno više u skupini dojenčadi s OBI u odnosu na skupinu bez OBI. Autori su pokazali da je PCT učinkovit i koristan biomarker OBI, bolji nego broj leukocita i apsolutni broj neutrofila. Optimalna granična vrijednost koja se koristila za PCT bila je 0.12 ng/ml, što je niže nego u drugim istraživanjima, a imala je osjetljivost od 95.2%, ali na račun niže specifičnosti koja je bila tek 25.5% uz NPV od 96.1% (73).

Od mnogih istraživanja koja su analizirala dijagnostičku vrijednost određivanja koncentracije CRP-a i PCT-a u serumu, rijetka su istraživanja provedena ispitujući njihovu učinkovitost u dijagnostici OBI u djece s vrućicom koja dolaze na preglede u hitne pedijatrijske ambulante (21-23, 49, 50, 53, 59, 74).

Od pretraga koje se traže u obradi pacijenata u hitnoj pedijatrijskoj ambulanti, Galetto-Lacour i sur. našli su da je određivanje koncentracije PCT-a najosjetljiviji test (21). Kao što je ranije navedeno, CRP s graničnom vrijednosti od 40 mg/dl pokazao se visoko osjetljivim (89%) i osrednje specifičnim (75%), za razliku od boljih karakteristika utvrđenih za PCT kod graničnih vrijednosti od 0.9 ng/ml – osjetljivost je bila bolja (93%), kao i specifičnost (78%). Kombinacijom oba biomarkera uspjela se postići bolja osjetljivost, koja je dosegla čak 96%, ali je specifičnost bila lošija i pala je na 67% (21). Dvije godine kasnije, Galetto-Lacour i sur. proveli su još jedno prospektivno istraživanje i potvrdili bolju učinkovitost PCT-a (22). U istraživanje su bila uključena djeca mlađa od 3 godine koju su roditelji ili staratelji doveli na pregled u hitnu pedijatrijsku ambulantu zbog vrućice iznad 38°C. Djeca su bila uključena u

ispitivanje ako tijekom pregleda nisu nađeni lokalizirajući znakovi infekcije tj. nije bilo moguće pregledom postaviti dijagnozu fokalne infekcije, te ako nisu prije dolaska u ambulantu već počeli uzimati antibiotike. Bolesnici u kojih je vrućica trajala više od tjedan dana nisu razmatrana za uključivanje. U konačnici je u ispitivanje uključeno 99 ispitanika, a u 29 od njih postavljena je dijagnoza OBI što čini učestalost OBI od 29.3%. Za graničnu vrijednost PCT-a od 0.5 ng/ml izračunata je osjetljivost od 93% i specifičnost od 74%, slično rezultatima iz prethodnog istraživanja ovih autora. CRP je bio čak manje osjetljiv i manje specifičan nego ranije: za optimalnu granična vrijednost CRP-a od 40 mg/l osjetljivost je bila 52%, a specifičnost 74%.

U hitnoj pedijatrijskoj ambulanti tercijarne ustanove svoje su istraživanje proveli Andreola i sur. (23). Većina djece nije bila teže bolesna pa ih je otprilike 50% nakon pregleda otpušteno kući. PCT i CRP pokazali su sličnu dijagnostičku učinkovitost i vrijednost što je u skladu s rezultatima koje su ranije bili dobili Galetto-Lacour i sur. (21, 22). Ipak, treba izdvojiti da je u ovom istraživanju PCT bio malo više specifičniji, a CRP je bio osjetljiviji u dijagnostici OBI. Korištene optimalne granične vrijednosti bile su za PCT 0.8 ng/l, a za CRP 32 mg/l, a određene su temeljem ROC analize (od engl. *receiver operating characteristic*). Kombinacijom PCT-a i CRP-a uz korištenje istih graničnih vrijednosti, postignuta je bolja mogućnost isključenja OBI temeljem ovih nalaza (osjetljivost od 92.6%), ali na račun smanjenja njihove specifičnosti (69.8%). Ispitanici u istraživanju bili su dobi do 3 godine. Kada su iz te skupine izdvojena dojenčad mlađa od 3 mjeseca, nije nađena razlika u površini ispod ROC krivulje (AUC, engl. *area under an ROC curve*) za PCT i CRP, a u odnosu na cijelu ispitivanu skupinu djece.

U istom okružju, veliko multicentrično istraživanje u Španjolskoj proveli se Fernandez-Lopez i sur. (50). Oni su isto željeli odrediti učinkovitost PCT-a i CRP-a kao prediktora bakterijske infekcije. Kriteriji za uključivanje bili su klinički indicirana potreba za uzimanjem i analizom uzorka krvi te postavljena indikacija za hospitalizaciju. Shodno tome, ispitanici u ovom istraživanju imali su viši rizik za razvoj bakterijske infekcije od ispitanika koji su analizirani u drugim istraživanjima. U devet hitnih pedijatrijskih ambulanti, u istraživanje je uključeno 445 djece mlađe od 3 godine. Virusna bolest je dijagnosticirana u 122 djece, a ostatak ispitanika je podijeljen u tri skupine. Osamdeset djece je imalo postavljenu dijagnozu lokalizirane bakterijske infekcije (npr. infekcija mokraćnog mjehura, bakterijski gastroenteritis, otorinolaringealna infekcija), a u 150 ispitanika je dijagnosticirana invazivna bakterijska infekcija (npr. pijelonefritis, meningitis, lobarna pneumonija). Devedeset troje pacijenata je bilo isključeno iz istraživanja jer u njih konačna dijagnoza nije bila postavljena. Slično rezultatima iz istraživanja Galetto-Lacour i sur., i ovdje su autori našli da je PCT najbolji prediktor bakterijske infekcije i

da ima bolju dijagnostičku točnost nego što CRP. Za optimalnu graničnu vrijednosti PCT-a od 0.53 ng/ml, nađena je osjetljivost od 65.5% i specifičnost od 94.3%. CRP, kod optimalne granične vrijednosti od 27.5 mg/L, bio je manje osjetljiv (63.5%) i manje specifičan (84.2%). Kada su se ovi biomarkeri koristili samo za dijagnostiku tj. detekciju djece s invazivnom bakterijskom bolesti, za optimalnu graničnu vrijednost PCT-a osjetljivost je bila 91.3%, a specifičnost 93.5%. Te vrijednosti su mnogo bolje od onih koje su utvrđene za optimalnu graničnu vrijednost CRP-a: osjetljivosti od 78%, specifičnosti od 75%.

Najopsežnije istraživanje o učinkovitosti PCT objavili su Gendrel i sur. (53). Ispitanici su bili 1500 djece u dobi od 1 mjesec do 15 godina koja su zaprimljena na bolničko liječenje nakon pregleda u hitnoj pedijatrijskoj ambulanti gdje su dovedeni s vrućicom iznad 38.5°C. Autori su bili u mogućnosti utvrditi vrijednost koncentracije PCT-a u trenutku prijema za 700 od njih (46.7%). Od ovog broja ispitanika, za nešto više od polovice njih (360) utvrđena je infekciozna etiologija bolesti. Ostalih 340 ispitanika je isključeno iz daljnjeg istraživanja jer se kod njih nije mogao utvrditi niti bakterijski niti virusni uzročnik vrućice. Na temelju postavljene konačne dijagnoze bolesti, autori su ispitanike podijelili u tri različite skupine: skupina 1 - invazivna bakterijska infekcija (n = 46), skupina 2 - lokalizirana bakterijska infekcija (n = 78) i skupina 3 - virusna infekcija (n = 236). Među invazivne bakterijske infekcije bile su uključene septikemija i meningitis, a među lokalizirane bakterijske infekcije upala srednjeg uha i infekcija mokraćnog sustava. Gendrel i sur. utvrdili su statistički značajnu razliku između srednjih vrijednosti koncentracije PCT-a u različitim skupinama. Srednja vrijednost koncentracije PCT-a u serumu u skupini 1 (invazivna bakterijska infekcija) bila je 45.9 ng/ml, a u skupinama 2 i 3 bila je 4.2 ng/ml i 0.4 ng/ml. U samo tri bolesnika s virusnom infekcijom vrijednost PCT-a bila je iznad 2 ng/ml, dok je 44 od 46 djece s invazivnom bakterijskom infekcijom imalo tako velike vrijednosti PCT-a. ROC analizom potvrđeno je da je određivanje vrijednosti koncentracije PCT-a u serumu najkorisniji test s AUC vrijednosti od 0.94, što je za 0.05 više nego za CRP koji je slijedeći najbolji dijagnostički prediktor. Optimalna granična vrijednost PCT-a od 1 μg/l izračunata je kao najprikladnija za diferenciranje bakterijske od virusne infekcije. Kod ove granične vrijednosti, osjetljivost je bila 83%, a specifičnost 93%. Kada su autori odlučili diferencirati samo invazivne bakterijske infekcije od ostalih infekcija (virusne i neinvazivne bakterijske infekcije), izračunata optimalna granična vrijednost PCT-a bila je 2 ng/ml, a kod te vrijednosti osjetljivost je bila 96% uz specifičnost od 87%. Ograničavajući čimbenik u donošenju konačnog suda o vrijednosti PCT kao prediktora infekcije, a temeljem ovog istraživanja, je veliki broj isključenih bolesnika (340 od 700; 48.6%).

1.3.3. Sustavi bodovanja

Mnogi klinički sustavi bodovanja razvijeni su s ciljem identifikacije dojenčadi i djece koja imaju visoki ili niski rizik za razvoj OBI, ali je uglavnom korist ovih sustava bodovanja bila razočaravajuća (21, 23, 42, 75, 76). Smjernice za liječenje koje su razvili Baraff i sur. (75) te Bachur i sur. (4) koristile su kombinaciju visine vrućice i broja leukocita u razvrstavanju bolesnika u različite skupine rizika. Te smjernice služile su i kao pomoć pri odabiru daljnjih dijagnostičkih pretraga i postupaka.

Najprošireniji pristup dijagnostici OBI je korištenje kombinacije anamnestičkih podataka, kliničkih i laboratorijskih pokazatelja koji zajedno čine Rochesterske kriterije**.** Cilj korištenja ovih kriterija bilo je prepoznavanje dojenčadi mlađe od 60 dana s vrućicom ≥ 38°C koja će imati nizak rizik ili visok rizik za OBI (Tablica 3) (77-81).

Tablica 3. Rochesterski kriteriji (77, 80)

Opće stanje dojenčeta je dobro
Dojenče je prethodno bilo zdravo - rođen u očekivanom terminu (≥37 gestacijskih tjedana) - nije liječen antibioticima u perinatalnom razdoblju - nije liječen zbog hiperbilirubinemije neobjašnjivog uzroka - nije primao i ne prima antibiotsku terapiju - nije bio prethodno hospitaliziran - nema kroničnu ili drugu osnovnu bolest - nije bio hospitaliziran dulje od majke nakon porođaja
Nema znakova infekcije kože, mekih tkiva, kosti, zglobova ili uha
Laboratorijske vrijednosti: - Broj leukocita u perifernoj krvi 5 - 15 x 10^9/l - Apsolutni broj štapićastih (nesegmentiranih) leukocita ≤ 1.5 x 10^9/L - ≤10 leukocita po vidnom polju (x49) na mikroskopskom pregledu sedimenta urina - ≤5 leukocita po vidnom polju (x49) na mikroskopskom pregledu razmaza stolice (samo u dojenčadi s proljevom)

Meta analiza provedena 1992. godine, a koja je uključivala 14 istraživanja obavljenih između 1977. i 1990. godine u kojima su kao ispitanici bila uključena dojenčad s vrućicom, pokazala je da je u dojenčadi klasificirane u skupinu niskog rizika učestalost OBI bila 1.4%, dok je u dojenčadi klasificirane u skupinu visokog rizika učestalost OBI bila 21% (82).

Značajnu razliku u učestalosti OBI među skupinama pokazalo je i istraživanje Byington i sur. kod kojih je učestalost OBI u dojenčadi s niskim rizikom bila 2.6%, a u dojenčadi s visokim rizikom bila je 12.8% (81).

U 1994. godini, na temelju podataka od Jaskiewicz i sur. (80), objavljeno je da je NPV Rochesterskih kriterija 98.9% za sve OBI, a 99.5% za bakterijemije. Ovi podaci potvrđuju sposobnost Rochesterskih kriterija da prepoznaju dojenčad s vrućicom za koju je malo vjerojatno da imaju OBI i pokazuju da u dojenčadi koja izgledaju dobro na kliničkom pregledu Rochesterski kriteriji dobro funkcioniraju. Također, njihovi podaci ukazuju na činjenicu da dojenčad koja zadovolji Rochesterske kriterije mogu biti zbrinuta te liječena samo pažljivim nadzorom i praćenjem daljnjeg razvoja kliničke slike, a bez započinjanja parenteralne antibiotske terapije u tom trenutku (80).

Galetto-Lacour i sur. (83) razvili su bodovni sustav za procjenu rizika bolesti, a koji su nazvali Laboratorijski zbroj (engl. *Laboratory score*). Pomoću multivarijantne analize, PCT, CRP i nalaz analize urina potvrđeni su kao značajni prediktori koji su neovisno povezani s OBI. Osjetljivost ovog bodovnog sustava u dijagnosticiranju OBI bila je 94%, a specifičnost 81%. Dobra specifičnost trebala bi omogućiti pouzdani odabir djece koja trebaju biti liječena antibioticima bez straha da će se djeca koja imaju virusnu infekciju nepotrebno liječiti antibioticima. Nakon što je Laboratorijski zbroj testiran na neovisnom uzorku ispitanika, postignuti su slični rezultati uz osjetljivost od 94% i specifičnost od 78%. Za broj leukocita nije nađeno da je neovisno vezan s učestalošću OBI tj. da je statistički značajan neovisni prediktor OBI.

Zbog nemogućnosti sigurnog dijagnosticiranja OBI temeljem anamneze, kliničke slike tj. fizikalnog nalaza te mikrobioloških i rutinskih laboratorijskih nalaza mnogi su istraživači svoje djelovanje usmjerili na otkrivanje novih i boljih biomarkera OBI (21, 84).

1.3.4. Molekule na staničnoj površini leukocita

Noviji pristup ranoj te što bržoj dijagnostici infekcije ili sepse je detekcija i praćenje molekularnih promjena koje se događaju na stanicama koje sudjeluju u imunološkom odgovoru, a upravo su posljedica razvoja same infekcije ili sepse.
Interakcija leukocita s njihovom okolinom događa se posredovanjem stanične membrane, posebice preko specifičnih membranskih proteina (glikoproteina) i glikolipida. Specijalizirana funkcija stanica očituje se u prilagođenoj građi stanične površine (85). Molekule na staničnoj površini leukocita su posrednici u mnogim interakcijama između imunološkog sustava i antigena, između različitih sastavnica imunološkog sustava, te između imunološkog sustava i drugih sustava u organizmu, npr. živčanog sustava. Postoji više od 4000 različitih molekula na membrani leukocita (86). Karakterizacija i nazivlje leukocitnih površinskih molekula je u djelokrugu rada organizacije koja se ranije zvala Humani Leukocitni Diferencijacijski Antigeni (HLDA, engl. *Human Leukocyte Differentiation Antigens*), a zatim je preimenovana u Humane Stanične Diferencijacijske Molekule (HCDM, engl. *Human Cell Differentiation Molecules*). Za označavanje i imenovanje molekula koje su prisutne na staničnoj površini leukocita koristi se „the cluster of differentiation“ (CD) protokol.
HCDM izdaje CD nazivlje i objavljuje povremene izvještaje o novoutvrđenim molekulama na površini humanih stanica.

CD nazivlje je predloženo i utemeljeno na Prvoj međunarodnoj radionici i konferenciji o humanim leukocitnim diferencijacijskim antigenima (engl. *1st International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens*). Ovaj sustav služi za klasifikaciju monoklonskih protutijela (mAb) koji su proizvedeni u različitim laboratorijima širom svijeta, a djeluju na epitope koji se nalaze na molekulama na površini leukocita. Određenoj molekuli na staničnoj površini se dodjeljuje CD broj nakon što se za dva specifična monoklonska protutijela pokaže da se vežu za nju. Ako molekula nije još dovoljno dobro istražena tj. karakterizirana ili ima samo jedno mAb, dodjeljuje joj se privremeni indikator "w".

1.3.4.1. Uloga neutrofila u imunološkom sustavu

Neutrofilni leukociti čine veliki udio u broju leukocita te imaju iznimno važnu ulogu u obrani organizma od bakterijske infekcije. Proces morfološkog sazrijevanja neutrofila uključuje

različite oblike: mijeloblaste, promijelocite, mijelocite, metamijelocite, štapićaste i konačno segmentirane neutrofile, a dozrijevanje se dovršava u koštanoj srži. Dio ih se tu i pohranjuje, a veći dio prelazi u krvotok. Na površini neutrofila nalaze se antigeni koji imaju ulogu bioloških senzora, a tijekom procesa sazrijevanja neutrofila dolazi do promjena u zastupljenosti tih antigena. Uloga neutrofila je da osjete promjene u okolišu i reagiraju na njih pa će stoga i bakterijska eliminacija ovisiti o brzom dolasku neutrofila do mjesta infekcije tj. njihovoj migraciji iz intravaskularnog u ekstravaskularni prostor.

Neutrofili postoje u tri oblika: mirujući (engl. *resting, unstimulated*), podraženi (engl. *primed*) i aktivirani (engl. *activated*). U stanjima bez upale, leukociti cirkuliraju krvožiljem u mirnom stanju. Podraženi neutrofili su oni koji su došli u doticaj s proupalnim čimbenikom ili proizvodom patološkog mikroorganizma što dovodi do sniženja praga potrebnog za aktivaciju neutrofila, a aktivirani neutrofili su oni koji su preuzeli svoju definiranu konačnu funkciju.

Kao posljedica kemijskog podražaja i kao reakcija na njega, neutrofili se priljubljuju i moraju adherirati na zid krvne žile prije nego započnu aktivni prolazak kroz krvožilnu stjenku (dijapedeza). Dijapedeza neutrofila, dakle, uključuje cijeli niz adhezivnih interakcija i međusobnih signalnih zbivanja (87-89). Nakon toga započinje migracija neutrofilnih leukocita u prostor oko krvne žile i u okolno tkivo (ekstravazacija). Kemotaksija je potaknuta čimbenicima koji se otpuštaju na mjestu infekcije, poput ulomaka komplementa (posebice C5a), leukotriena, čimbenika aktivacije trombocita, bakterijskog peptida formil-metionil-leucil-fenilalanin (fMLP) i interleukina 8 (90).

U procesu zaustavljanja neutrofila na endotel krve žile iznimno važno mjesto imaju dvije vrste adhezijskih molekula: selektini i integrini. (Tablica 4.) Selektini posreduju u inicijalnom priljubljivanju leukocita za endotelne stanice venula što zatim dovodi do njihovog kotrljanja (engl. *rolling*) po endotelu krvne žile, a integrini imaju ulogu u adheziji leukocita (91, 92). Postoje dvije podobitelji integrina: β1 i β2. Oni su heterodimeri s različitim α lancem, a zajedničkim β lancem koji definira obitelj.

Tablica 4. Selektini i dio β2 integrina koji sudjeluju u interakcijama između leukocita i endotela krvne žile (93)

	Sinonim:	**Stanica na kojoj je eksprimiran:**	**Ligand**
Selektini:			
CD62E	E-selektin; ELAM-1	Endotel	Sijalil Lewis^x (CD15s)
CD62L	L-selektin; MEL-14; LAM-1	Neutrofili, monociti, makrofagi, eozinofili i neki limfociti	Sijalil Lewis^x (CD15s), GlyCAM-a, CD34
CD62P	P-selektin; PADGEM; GMP-140	Endotel, Trombociti	Sijalil Lewis^x (CD15s), PSGL-1
β2 integrini:			
α lanac			
CD11a	LFA-1	Neutrofili, monociti, makrofagi, T stanice	ICAM-1,2,3
CD11b	Mac-1 (makrofag 1)	Neutrofili, monociti, makrofagi	ICAM-1 (CD54), iC3b, fibrinogen
Zajednički β lanac CD18			

ELAM, endotelna leukocitna adhezijska molekula; LAM, leukocitna adhezijska molekula; GlyCAM, glikolizacijski-ovisna stanična adhezijska molekula; PADGEM, trombocit aktivacijski-ovisna granula na vanjski membranski protein; GMP, granulski membranski protein; PSGL, P-selektin glikoproteinski ligand; LFA, leukocitni funkcijski antigen; ICAM, unutar stanična adhezijska molekula; Mac, makrofag

Obitelj selektina čine tri srodne molekule: L-selektin, E-selektin i P-selektin (94). Na površini neutrofila, L-selektin dolazi u interakciju sa specifičnim oligosaharidnim strukturama na glikoproteinima sa stanične površine endotela. Na endotelu E-selektin i P-selektin slično prepoznaju specifične neutrofilne ugljikohidratne strukture (90).

L-selektin je eksprimiran na mikrovilima većine leukocita, uključujući na svim mijeloidnim stanicama, na naivnim T i B stanicama te na nekim memorijskim i efektorskim T stanicama (95). L-selektin ima ulogu u adheziji neutrofila, eozinofila i monocita za endotel krvne žile. Miševi kojima nedostaje L-selektin imaju poteškoća u nakupljanju leukocita u mjesta upale.

P-selektin je otkriven kao antigen koji se nalazi na površini trombocita. Eksprimiran je u megakariocitima te se nalazi u α-granulama cirkulirajućih trombocita. Također, eksprimiran je na Weibel-Palade tjelešcima vaskularnih endotelnih stanica (96). Nekoliko minuta nakon aktivacije endotelnih stanica proupalnim medijatorima, P-selektin se mobilizira na staničnu površinu endotela jer dolazi do spajanja Weibel-Palade tjelešaca s plazma membranom. Istodobno dolazi i do ekspresije P-selektina pohranjenog u α-granulama na površini trombocita. Inducirajući čimbenici su trombin, histamin, fragmenti komplementa, slobodni radikali kisika i citokini. Zbog brze ekspresije P-selektina na staničnoj površini koja se mjeri u minutama, P-selektin je idealni kandidat za posredovanje u interakcijama između leukocita i endotela i najvjerojatnije je uključen u ranu fazu kotrljanja. Blokiranje funkcije P-selektina *in vivo* značajno smanjuje inicijalno kotrljanje leukocita u venulama (97). Osim što je u miševa kojima nedostaje P-selektin uočeno poremećeno kotrljanje leukocita, smanjeno je i nakupljanje neutrofila i monocita u područjima upale (98). Međutim, kotrljanje se postupno oporavi nakon razdoblja od 10 do 15 minuta, što upućuje na sudjelovanje L- ili E-selektina tijekom slijedećih stadija ovog procesa. Također, P-selektin s površine aktiviranih trombocita doprinosi upali, hemostazi i trombozi.

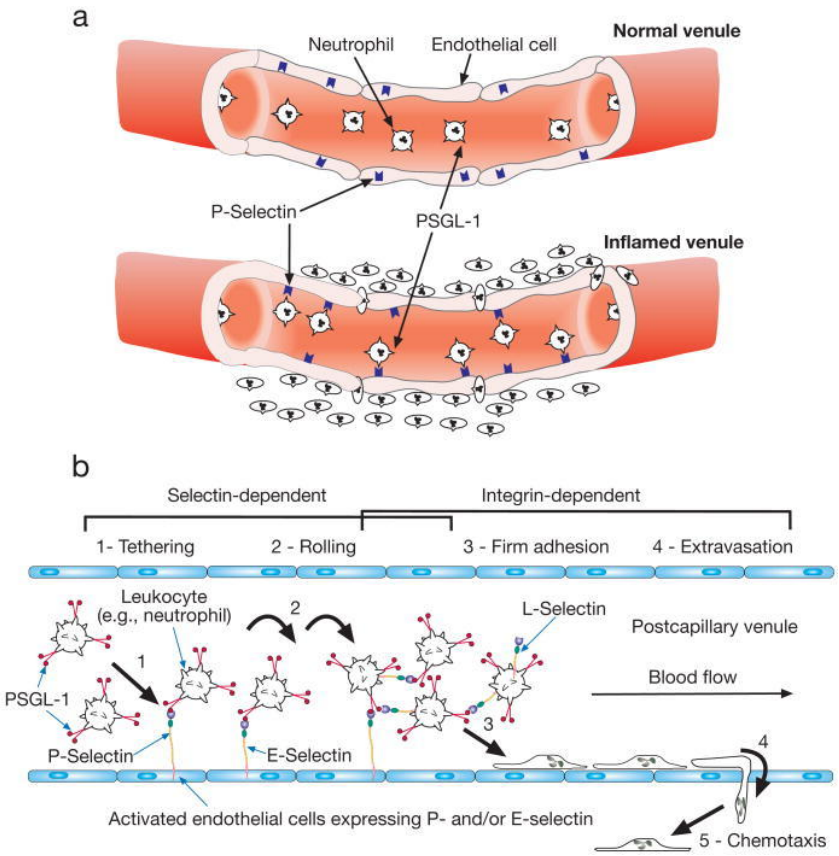
E-selektin je značajno eksprimiran na endotelu krvnih žila u područjima upale, a lociran je u lipidnim mikrodomenama tzv. lipidnim splavima (99). Njegovo stvaranje snažno potiču različiti upalni medijatori uključujući interleukin-1 (IL-1), tumor nekrotizirajući čimbenik-α (TNF-α), interferon-γ (IFN-γ) i lipopolisaharid (LPS) (100). U in vitro istraživanjima, ekspresija E-selektina započinje oko 2 sata nakon poticaja citokinima, a njegova najveća ekspresija nađena je nakon oko 4 sata. U *in vitro* uvjetima, nakon 12 do 24 sata dolazi do vraćanja razine ekspresije E-selektina na početne razine, ali na mjestima upale u *in vivo* okružju njegova ekspresija može biti kronična. Akutna i kronična upalna stanja koja su povezana s povećano eksprimiranim E-selektinom uključuju stanje sepse, reumatoidnog artritisa i transplantacije organa.

U vezanju neutrofila i njihovom kotrljanju niz endotel krvne žile, a posredovano E-selektinom, važnu ulogu imaju ligandi na neutrofilima, a među kojima su P-selektin glikoproteinski ligand-1 (PSGL-1), L-selektin, E-selektin ligand-1 (ESL-1), CD44 te CD43. Sličnost svih ovih liganada je

u tome da svi imaju na sebi eksprimirane sijalil fukozilirane glikane (glikane tipa sLe^x), a za koje se smatra da su uključeni u prepoznavanje E-selektina (101).

Iako je vezanje posredovano selektinom odgovorno za većinu aktivnosti tijekom kotrljanja, interakcije integrina sa svojim endotelijalnim ligandima također doprinose kotrljanju koje je započeto posredovanjem selektina (94).

Kotrljanje pomaže neutrofilima uspostaviti kontakt s upalnim čimbenicima koji su eksprimirani na površini endotela. Ova interakcija stimulira neutrofile na brzo povećanje ekspresije i dostupnosti β2 integrina (CD11a i CD11b) na površini neutrofila za ligand s endotela - ICAM-1 (unutarstanična adhezijska molekula 1, od engl. *intercellular adhesion molecule*, CD54). (Slika 1.) Povećana ekspresija CD54 na endotelu je također potaknuta proupalnim čimbenicima (npr. TNF-α, IL-1, LPS) koji se otpuštaju na mjestima bakterijske infekcije.



Slika 1. Priljubljivanje cirkulirajućih leukocita za endotel posredstvom interakcija između selektina i njihovih liganda. (*a*) U normalnim venulama, leukociti cirkuliraju bez adhezivnih interakcija s endotelom, dok u upalnim uvjetima dolazi do ekspresije selektina i integrinskih liganada na površini endotela. Ovo dovodi do priljubljivanja leukocita uz endotel krvne žile, njihovog kotrljanja i zaustavljanja te zatim ekstravazacije iz cirkulacije u prostor oko krvne žile. (*b*) Prikazani su neutrofili koji na svojim mikrovilima eksprimiraju PSGL-1 i L-selektin. Ove stanice dolaze u kontakt sa P-selektinom na endotelnim stanicama posredstvom PSGL-1. E-selektin također može sudjelovati u ovim interakcijama vezanjem za PSGL-1 ili za druge ligande na ovim stanicama. Sve ove interakcije omogućavaju leukocitima priljubljivanje uz endotel i kotrljanje niz njega. Aktivirani leukociti eksprimiraju integrine (npr. CD11b/CD18) koji dolaze u interakciju s receptorima na endotelnim stanicama (ICAM-1, ICAM-2), a s ciljem pojačavanja adhezije i olakšavanja ekstravazacije stanica iz cirkulacije u okolni prostor oko krvnih žila (102).

Vezanje neutrofila za bakterije značajno je olakšano kada su patogeni mikroorganizmi obloženi s imunoglobulinima G (IgG). Fcγ receptor I na neutrofilima, koji je visoko osjetljivi receptor za IgG1 i IgG3, prepoznaje monoklonsko protu-CD64 protutijelo (8). Ostali receptori koji također imaju ulogu u olakšavanju fagocitoze i prepoznavanju patoloških mikroorganizama su CD14

(receptor za lipopolisaharide na monocitima), C3b receptor te CD16 i CD32. Oni se poput CD64 vežu za Fc mjesta na IgG (90).

Više dosadašnjih istraživanja u svojim rezultatima iznijelo je dokaze da je ekspresija CD64 i CD11b/CD18 na površini neutrofila povećana nakon što dođe do aktivacije neutrofila te da se ovi biljezi na staničnoj površini neutrofila ponašaju kao aktivacijski antigeni (103, 104). Upravo stoga, očekuje se da će tijekom bakterijske infekcije, a poglavito sepse, bakterijski proizvodi stimulirati oslobađanje proupalnih čimbenika koji će inducirati aktivaciju neutrofila i istovremeno dovesti do promjene u ekspresiji leukocitnih antigena s porastom razine ekspresije CD11b/CD18 i CD64 na staničnoj površini. Kao posljedica tih zbivanja, ovi antigeni (molekule) na staničnoj površini neutrofila mogu poslužiti kao učinkoviti biomarkeri čija se detekcija i analiza metodom protočne citometrije može pokazati brzom i jednostavnom metodom za postavljanje dijagnoze infekcije i/ili sepse, za procjenu težine infekcije ili za razlikovanje bakterijske infekcije od virusne infekcije.

1.3.4.2. Biomarkeri na staničnoj površini leukocita: CD64

CD64 (Fcγ receptor I, FcγRI) je biomarker na staničnoj površini neutrofilnih leukocita. Njegova molekulska težina je 72 kD, a kodiraju ga tri gena (A, B, i C) koja se nalaze na kromosomu 1. Njihove su lokacije: 1q21.2-q21.3, 1p11.2 i 1q21.1. Ekspresija CD64 na staničnoj površini održava se tijekom granulopoeze do razine neutrofilnih metamijelocita (105). CD64 je eksprimiran u visokim koncentracijama na monocitima i makrofagima, manje na eozinofilima, a u vrlo niskoj koncentraciji na mirujućim neutrofilima (106). Nakon što se imunološki sustav susretne s infekcijskim patološkim mikroorganizmom dolazi do aktivacije neutrofila i značajnog povećanja ekspresije CD64 na staničnoj površini neutrofila (107-109). Do te snažne pojačane ekspresije dovode proupalni čimbenici poput IFN-γ i čimbenika stimulacije granulocita (G-CSF), a koji se proizvode tijekom infekcije ili tijekom izloženosti endotoksinu (110, 111). Porast ekspresije CD64 na neutrofilima značajno raste od svojih početnih vrijednosti tijekom 24 sata nakon početka stimulacije s interferonom, zatim značajno pada tijekom 48 sati od prestanka stimulacije i vraća se na početne, uobičajene vrijednosti do sedmog dana (110).

Određivanje ekspresije CD64 na neutrofilima predstavlja obećavajući probirni test u detekciji i dijagnostici infekcije zbog svoje kinetike i laboratorijskih karakteristika (8). Naime, u mnogim

istraživanjima analizirala se učinkovitost određivanja CD64 u ranoj dijagnostici bakterijske infekcije ili sepse. Kako su rezultati tih istraživanja bili ohrabrujući, određivanje vrijednosti ekspresije CD64 na površini neutrofila, kao učinkovitog biomarkera, nekoliko posljednjih godina sve se češće počelo predlagati u dijagnostici infekcije u djece i odraslih (108, 109, 112-121). U prilog idu i rezultati istraživanja u kojima je, za postavljanje dijagnoze sepse u odraslih, pokazana bolja učinkovitost određivanja ekspresije CD64 na neutrofilima nego što je pokazano za PCT (122, 123) i CRP (122, 124) koji su uobičajeni i široko korišteni dijagnostički biomarkeri sepse.

Osim pojedinačnog određivanja intenziteta fluorescencije na određenoj populaciji leukocita, kao što je npr. geometrijski srednji intenzitet fluorescencije korišten i opisan u ovom istraživanju, ekspresija CD64 može se određivati protočnom citometrijom i korištenjem tvornički dostupnih setova, poput Leuko64Tmkit, kojima se određuje CD64 indeks. Pomoću prikladnog kompjuterskog programa, CD64 indeks će se izračunati kao omjer srednjeg intenziteta fluorescencije ispitivane stanične populacije i intenziteta fluorescencije zrnaca obilježenih fluoresceinom.

Cid i sur.(125) proveli su meta-analizu rezultata do tada provedenih istraživanja o učinkovitosti određivanja ekspresije CD64 na neutrofilima kao biomarkera bakterijske infekcije te su dobili, kada su skupno analizirali odrasle i pedijatrijske bolesnike, osjetljivost od 79%, a specifičnost od 91%. Nakon što su iz te skupine izdvojena samo istraživanja u kojima su kao ispitanici sudjelovala djeca, nađena je osjetljivost od 71% i specifičnost od 87%. Autori ove meta-analize, temeljem tih rezultata, zaključili su da je i u djece i u odraslih CD64 dobar biomarker infekcije, ali također je istaknuto da je metodološka vrijednost nekih istraživanja koja su uključili u svoju analizu bila loša. Iz Tablice 5. vidljivo je da su u većini istraživanja ispitanici bile odrasle osobe ili novorođenčad, a mnogo manje ih je za ispitanike imalo dojenčad i ostalu djecu.

Tablica 5. Osjetljivosti i specifičnosti za predložene granične vrijednosti CD64 u dijagnostici ozbiljne bakterijske infekcije: pregled rezultata istraživanja iz Cid i sur. meta-analize (125)

Istraživanje	Godina	Način analize CD64	Ispitanici	Granična vrijednost	Osjetljivost (%)	Specifičnost (%)
Layseca-Espinosa i sur. (109)	2002	PC	Novorođenčad	NN	25.8	96.8
Ng i sur. (108)	2002	PC	Nedonoščad	4000 mol/ stanica	95	88
Allen i sur. (120)	2002	PC	Odrasli	2000 mol/ stanica	85	91
Ng i sur. (118)	2004	PC	Novorođenčad	6136 mol/ stanica	79	89
Ng i sur. (126)	2006	PC	Novorođenčad	6136 mol/ stanica	78	90
Livaditi i sur. (122)	2006	PC	Odrasli	2566 mol/ stanica	94.6	100
Matsui i sur. (127)	2006	PC	Odrasli	2000 mol/ stanica	92.7	96.5
Groselj-Grenc i sur. (128)	2008	PC	Djeca	72 MFI/stanica	65.5	92.6
Bhandari i sur. (129)	2008	Leuko64	Novorođenčad	2.30	70	62
Cardelli i sur. (123)	2008	PC	Odrasli	2398 mol/ stanica	96	95
Tillinger i sur. (130)	2009	PC	Odrasli	10000 mol/ stanica	96	97
Tanaka i sur. (131)	2009	PC	Odrasli	2000 mol/ stanica	60.9	97.9
Groselj-Grenc i sur. (132)	2009	Leuko64	Novorođenčad	1.86	77	79
Groselj-Grenc i sur. (132)	2009	Leuko64	Djeca	2.38	71	100
PC - protočna citometrija; Leuko64 - originalno dostupan proizvod za analizu CD64 indeksa; NN - nije navedeno; MFI/stanica - srednji intenzitet fluorescencije/stanica.						

U okružju jedinica intenzivnog liječenja za odraslu populaciju istraživana je učinkovitost i dijagnostička vrijednost određivanja ekspresije CD64 u kritično bolesnih pacijenata. Jedno od istraživanja pokazalo je da je uz nađenu povećanu ekspresiju CD64 na staničnoj površini neutrofila bilo moguće u ispitivanom uzorku od 112 bolesnika predvidjeti bakterijemiju s osjetljivošću i specifičnošću većom od 90% (123). U drugom istraživanju željelo se istražiti postoji li mogućnost da se određivanjem ekspresije CD64 olakša razlikovanje bolesnika u kojih postoji stanje teške sepse ili septičkog šoka od upalnih sindroma. Rezultati su bili iznimno zadovoljavajući te je pokazana osjetljivost od 89% i specifičnost od 96% u uzorku od 66 bolesnika (133).

U nedavnom istraživanju iz 2012. godine objavljeno je da se korištenjem graničnih vrijednosti CD64 indeksa od 2.2 mogu razlikovati bakterijske infekcije od ostalih upalnih ili infekcijskih stanja s osjetljivošću od 63%, a specifičnošću od 89%. PPV testa bila je 85.3%, a NPV 70.1% (134). Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je CD64 indeks niže osjetljiv, ali visoko specifičan biomarker bakterijske infekcije u bolesnika koji su zaprimljeni na liječenje u jedinicu intenzivnog liječenja te da njegova vrijednosti ovisi o težini infekcije koju bolesnik ima. Autori su istaknuli korisnu ulogu koju u dijagnostici bolesti ima određivanje CD64 indeksa, ali je važno da se on pri tome ne koristi kao isključivi samostalni biomarker. Određivanje CD64 indeksa treba koristiti u kombinaciji s drugim visoko osjetljivim biomarkerom kao što je CRP, ali kojem nedostaje specifičnost. Kao razlog niske osjetljivosti CD64 indeksa, autori su kao mogući ograničavajući čimbenik ovog istraživanja istaknuli podatak da je većina bakterijskih infekcija u istraživanju bila uzrokovana Gram-pozitivnim bakterijama i to čak njih 64%. Naime, rezultati istraživanja drugih autora pokazali su da je ekspresija CD64 na površini neutrofila bila manja u bolesnika koji su imali Gram-pozitivnu infekciju, a u odnosu na one s Gram-negativnom infekcijom (135). Veću ekspresiju CD64 na neutrofilima bolesnika s Gram-negativnom sepsom u usporedbi s ekspresijom u Gram-pozitivne sepse, u odraslih bolesnika, našli su i Herra i sur. (116). Drugi razlog za nižu osjetljivost mogla bi biti činjenica da je u dijela ispitanika već bilo započeto liječenje antibioticima. Nedavno istraživanje pokazalo je da vrijednost CD64 indeksa može brzo pasti nakon što se započne s adekvatnim antibiotskim liječenjem (136).

Za razliku od istraživanja provedenih u bolnicama i njihovim jedinicama intenzivnog liječenja, Cid i sur. istraživali su učinkovitost i dijagnostičku vrijednost određivanja ekspresije CD64 na neutrofilima u dijagnostici bakterijske infekcije u odraslih osoba koje su dolazile na pregled u hitne ambulante zbog vrućice. Njihovo prospektivno istraživanje uključivalo je ispitanike (N = 132) koji bi sami izvijestili da imaju vrućicu ≥ 38ºC koja traje barem posljednjih 24 sata, a za

koje je nadležni liječnik nakon pregleda smatrao potrebnim provesti dodatnu dijagnostičku obradu koja je obuhvaćala nalaz krvne slike i uzimanje uzroka krvi za mikrobiološku analizu. Uzorak krvi bio je pohranjen u hladnjaku na 4°C dok se ne bi izvršilo mjerenje ekspresije CD64 dan nakon prijema bolesnika na pregled u ambulantu. Autori su pokazali da je u ispitanika kod kojih je postavljena dijagnoza bakterijske infekcije srednja vrijednost CD64 indeksa bila značajno veća u usporedbi s vrijednosti u ispitanika kod kojih nije postojala bakterijska infekcija (3.7±3.2 prema 2.5±2.3; p= 0.03) (137). Utvrđeno je da CD64 indeks s optimalnom graničnom vrijednosti ≥ 1.5 ima dobru osjetljivost (87%), ali nisku specifičnost (41%) za detekciju bakterijske infekcije.

Icardi i sur. (136) određivali su postoji li značajna korelacija između razine ekspresije CD64 i klinički postavljene dijagnoze bakterijske infekcije u odraslih ispitanika. Istraživanjem se željelo utvrditi može li se temeljem nalaza CD64 predvidjeti nalaz pacijentove hemokulture. Autori su našli da CD64 indeks > 1.19, kao biomarker bakterijske infekcije, ima osjetljivost od 94.6% i specifičnost od 88.7%. PPV i NPV bile su 89.8% i 94%. Istodobno je nađeno da u bolesnika koji su primali ispravno antibiotsko liječenje nakon 2 do 3 dana dolazi do brzog smanjenja vrijednosti CD64 te da je to smanjenje u skladu i praćeno regresijom kliničkih znakova sepse.

Ranije je navedeno da se, ako se ograničimo samo na pedijatrijsku populaciju, CD64 najčešće istraživao u području neonatologije gdje je analizirana njegova učinkovitost u dijagnostici sepse kod prijevremeno rođene novorođenčadi i novorođenčadi rođene u očekivanom terminu (129, 132, 138). U većini ovih istraživanja, CD64 se pokazao osrednje dobrim biomarkerom.

U nekoliko istraživanja uspoređena je učinkovitost CD64 s dijagnostičkom vrijednosti i učinkovitosti koju su pokazali CRP i PCT. Konačni sud je li ili nije CD64 bolji dijagnostički biomarker nije se mogao donijeti jer su rezultati istraživanja bili dvojbeni.

Fjaertoft i sur. našli su na površini neutrofila nedonoščadi srednje povećanu razinu ekspresije CD64 koja se, tijekom novorođenačkog razdoblja, smanjuje na razine koje su nađene na neutrofilima u terminske novorođenčadi i odraslih (139). Suprotno ovome, Dilli i sur. nisu našli značajnu razliku između ekspresije CD64 na neutrofilima u prijevremeno rođene novorođenčadi u odnosu na novorođenčad rođenu u očekivanom terminu (140). Značajno je istaknuti da ekspresija CD64 na neutrofilima prijevremene i terminski rođene novorođenčadi koja nisu imala infekciju, iako je ponešto bila veća nego na neutrofilima u odraslih osoba, nije dosegla razinu

koja bi bila usporediva s razinom ekspresije CD64 koje su nađene tijekom bakterijske infekcije (107, 141).

Ng i sur. objavili su nekoliko istraživanja o učinkovitosti određivanja različitih biomarkera na površini leukocita (neutrofila i limfocita) u novorođenčadi. Veliko kohortno istraživanje koje je ispitivalo učinkovitost dva neutrofilna (CD11b i CD64) i dva limfocitna biomarkera (CD25 i CD45RO) u dijagnostici kasne novorođenačke sepse pokazalo je da CD64 ima najvišu osjetljivost (95–97%) i specifičnost (88–90%) za detekciju sepse u trenutku početka infekcije te 24 sata kasnije (108). Autori su i u svojim slijedećim istraživanjima potvrdili da je razina ekspresije CD64 na neutrofilima značajno povećana tijekom infekcije i da je on učinkoviti biomarker u dijagnostici i prepoznavanju terminske novorođenčadi s kliničkom slikom sepse i pneumonijom (118). U dijagnostici rane novorođenačke sepse, CD64 je imao osjetljivost od 81% i NPV od 89%. Dvadesetčetiri sata nakon početka sepse, osjetljivost i NPV ovog biomarkera bili su još bolji i povećali su se na 96 i 97%. Ovo je istraživanje također pokazalo i da dodatno korištenje CRP-a tj. kombiniranje ova dva biomarkera nije značajno povećalo osjetljivost, ali je imalo negativan učinak na specifičnost testa te je dovelo do njegovog pada (118). Zaključno, u svojim istraživanjima Ng i sur. pokazali su da CD64 ima visoku osjetljivost i NPV za ranu i kasno nastalu infekciju u novorođenčadi (118, 142). Kombinacijom koja se dobije korištenjem dodatnog biomarkera poput IL-6 ili CRP dobila se poboljšana osjetljivost i NPV od 100% uz specifičnost od 88% i PPV od 80% (142).

I istraživanje koje su proveli Layseca-Espinosa i sur. potvrdilo je CD64 kao visoko specifičan prediktor u dijagnostici novorođenačke sepse (109). Autori su pokazali da ovaj biomarker ima visoku specifičnost od 96.8% i PPV za sepsu od 88.8%, iako je osjetljivost bila niska (25.8%), a NPV osrednja (57.4%). Visoka specifičnost CD64 postignuta je na temelju samo jednog njegovog određivanja, a nađeno je i da je visoki postotak CD64+ stanica viđenih u novorođenačkoj sepsi održan u ovih bolesnika barem još slijedeća 24 sata. Stoga su autori zaključili, iako je osjetljivost bila vrlo niska, da je CD64 koristan biomarker u dijagnostici novorođenačke sepse.

Prošle godine su Genel i sur. objavili da je ekspresija CD64 na staničnoj površini neutrofila trostruko povećana, a na monocitima dvostruko povećana u novorođenčadi s infekcijom u odnosu na novorođenčad bez infekcije. Za CD64 koji se određivao na neutrofilima, u detekciji novorođenačke infekcije, osjetljivost je bila 81%, specifičnost 77%, a NPV 75% (143). Istovremeno su Choo i sur. usporedili učinkovitost određivanja ekspresije CD64 na neutrofilima

i CRP-a kao samostalnih testova koji se koriste u dijagnostici i ranoj detekciji novorođenačke sepse. Ispitanici su bili podijeljeni u tri skupine. Prvu skupinu činila su novorođenčad u kojih je sepsa bila mikrobiološki dokumentirana tj. potvrđena nalazom pozitivne bakterijske kulture krvi uz postojanje 2 ili više kliničkih znakova ili simptoma infekcije. Drugu skupinu sačinjavali su ispitanici s postavljenom kliničkom dijagnozom sepse koji su imali mikrobiološki negativnu kulturu krvi, ali su u njih postojala 2 ili više kliničkih znakova ili simptoma infekcije. Treća skupina je bila kontrolna. Rezultati istraživanja pokazali su da je CD64 indeks značajno povećan u skupinama ispitanika s klinički postavljenom dijagnozom sepse i skupini s mikrobiološki dokumentiranom sepsom, a u usporedbi s kontrolnom skupinom. Također, vrijednosti CD64 indeksa bile su veće u skupini s dokumentiranom sepsom u odnosu na skupinu s klinički dijagnosticiranom sepsom (144). Iznenađujuće, koncentracije CRP-a u serumu nisu se značajno razlikovale između ove tri skupine. Osjetljivost, specifičnost, PPV i NPV za CD64 i CRP u skupini s mikrobiološki dokumentiranom sepsom određene su korištenjem skupine s klinički postavljenom dijagnozom sepse kao referentnom skupinom. Za CD64 i CRP utvrđena je osjetljivost od 91% i 9%, specifičnost od 83% i 83%, PPV od 83% i 33% te NPV od 91% i 50%. AUC za CD64 indeks i CRP bili su 0.955 i 0.527, što se statistički značajno razlikovalo. Optimalna granična vrijednost za CD64 indeks bila je 3.0, a za CRP 1.0 mg/dl. Kombiniranim korištenjem ova dva biomarkera (CD64+CRP) postignuta je osjetljivost od 100%, ali uz nižu specifičnost od 66%. Granična vrijednost CD64 indeksa od 3.0 određena je u ovom istraživanju kao optimalna jer su za tu graničnu vrijednost dobivene osjetljivost, specifičnost, PPV i NPV > 80%. Ova granična vrijednost bliska je graničnoj vrijednosti CD64 indeksa u istraživanju koje su proveli Bhandari i sur. četiri godine ranije (129). U tom istraživanju CD64 indeks imao je najviši AUC od svih ispitivanih prediktora od 0.852 uz osjetljivost od 80%, specifičnost od 79%, a s graničnom vrijednosti od 4.02 u novorođenčadi u kojih je sepsa bila potvrđena pozitivnim nalazom mikrobiološke kulture. U sveobuhvatnoj skupini novorođenčadi sa sepsom, CD64 indeks imao je AUC od 0.74 uz optimalnu graničnu vrijednost od 2.3. Kombinacijom CD64 i apsolutnog broja neutrofila dobivena je najviša NPV od 93% za isključenje sepse, a osjetljivost u dijagnosticiranju sepse bila je 95%.

Posebno zanimanje za ispitivanje učinkovitosti CD64 kao dijagnostičkog biomarkera u jedinici intenzivnog liječenja novorođenčadi i djece pokazala je skupina istraživača Groselj-Grenc i sur. Oni su u svom radu pokazali da je u kritično bolesne novorođenčadi i djece koja zahtijevaju intenzivno liječenje, u trenutku postavljanja sumnje na sepsu te 24 sata kasnije, učinkovitost i dijagnostička vrijednost CD64 indeksa bila veća od učinkovitosti uobičajeno korištenih laboratorijskih biomarkera kao što su PCT i CRP (132). Groselj-Grenc i sur. definirali su u svom

istraživanju optimalnu graničnu vrijednost za srednji intenzitet fluorescencije CD64 na staničnoj površini neutrofila od 72.0. Za tu optimalnu vrijednost, AUC je bio 0.85 uz osjetljivost od 65.5% i specifičnost od 92.6%. Za CD64 indeks izračunata optimalna granična vrijednost za postavljanje dijagnoze sepse bila je 2.45 uz AUC od 0.83 te osjetljivost od 65.5% i specifičnost od 88.9% (128).

U djece koja dolaze na pregled u hitne pedijatrijske ambulante zbog vrućice, Rudensky i sur. istraživali su učinkovitost određivanja ekspresije CD64 u dijagnostici etiološke podloge njihove bolesti (145). Povećana ekspresija CD64 na neutrofilima nađena je u pacijenata s bakterijskom i virusnom infekcijom, ali je ta vrijednost bila signifikantno veća u onih ispitanika u kojih je na temelju kliničkog pregleda i drugih dijagnostičkih pretraga postavljena dijagnoza bakterijske infekcije. Autori su istodobno utvrdili da je u većeg broja ispitanika iz skupine s virusnom infekcijom bila je dijagnosticirana infekcija s respiracijskim sincicijskim virusom (RSV). Stoga su zaključili da najvjerojatnije upravo RSV infekcija dovodi i do pojačane ekspresije CD64 na razinu sličnu onoj koja se zapaža u ispitanika s bakterijskom infekcijom. Unatoč vrlo dobroj osjetljivosti, autori nisu utvrdili da određivanje ekspresije CD64 ima dovoljnu specifičnost za dijagnozu bakterijske infekcije unatoč analizi koja je rađena korištenjem nekoliko različitih graničnih vrijednosti.

Slične rezultate u bolesnika koji su pregledani u bolničkoj hitnoj ambulanti dobili su Davis i sur. (124). Autori su zaključili da je CD64 bolji dijagnostički prediktor infekcije i/ili sepse u populaciji bolesnika koji dolaze na pregled u hitne ambulante, u usporedbi s ostalim biomarkerima koji se najčešće kod takvih pregleda traže (CRP, brzina sedimentacije eritrocita, broj štapićastih leukocita te ABN). Za graničnu vrijednost CD64 indeksa > 2, utvrđena je osjetljivost od 87.9%, specifičnost od 71.2%, PPV od 60.4% i NPV od 92.2%.

Suprotno od prijašnjeg, lošiju učinkovitost određivanja CD64 indeksa na neutrofilima pokazalo je nedavno veliko istraživanje u ispitanika koji dolaze na pregled u ambulante hitne službe. Rezultati su pokazali da je CD64 indeks kao biomarker u dijagnostici sepse imao osjetljivost koja je bila 65.8%, a specifičnost 64.9% (146).

Važno obilježje učinkovitog biomarkera je njegova biokemijska stabilnost zbog toga što analiza ponekad neće biti moguća odmah nakon uzimanja uzorka. Za dobiti što pouzdaniji nalazi, neki autori preporučuju obradu uzoraka krvi za analizu staničnih površinskih markera odmah nakon uzimanja uzorka, a s ciljem izbjegavanja stanične apoptoze (29). Međutim, u drugim

istraživanjima utvrdilo se da je ekspresija CD64 na neutrofilima bila stabilna i do 30 sati nakon uzimanja uzorka krvi ako se on do analize držao na sobnoj temperaturi, a do 72 sata kada je uzorak bio pohranjen u hladnjaku (112). Isto su potvrdili i autori koji su mjerili i uspoređivali vrijednosti ekspresije CD64 u trenutku uzimanja uzorka krvi, nakon 24, 48 i 72 sata. Tom analizom nisu nađene značajne razlike u ekspresiji CD64 između pohranjenih uzoraka krvi na 4 °C, a u usporedbi s početnom vrijednosti neposredno nakon uzorkovanja krvi (130). Niti Groselj-Grenc i sur. nisu našli značajne razlike u vrijednostima CD64 na neutrofilima i monocitima unutar prvih 36 sati nakon uzimanja uzorka krvi (132).

1.3.4.3. Biomarkeri na staničnoj površini leukocita: CD11b

Integrini su velika obitelj staničnih površinskih αβ heterodimera koji su uključeni u interakcije koje se zbivaju između stanica te stanice i njenog okružja. β2 integrini, koji imaju zajedničku β-podjedinicu (β2, CD18), ali različite α-podjedinice (CD11a, CD11b, CD11c i CD11d), važni su leukocitni receptori ne samo za funkciju leukocita već i za razvoj upalnog odgovora *in vivo* (147). Geni koji kodiraju četiri α-podjedinice nalaze se na kraćem kraku kromosoma 16 (148).

Integrin CD11b/CD18 (αMβ2) poznat je i pod nazivima Mac-1 i komplement receptor tip 3 (CR3). On je dominantni β2 integrinski receptor na neutrofilima, makrofagima i monocitima (149). Nije eksprimiran na blastima i promijelocitima. Istraživanja u CD11b–/– miševa pokazala su da ovaj integrin ima posebnu ulogu u upalnom procesu, dijelom zajedno s integrinom CD11a (150). Njegovu biološku važnost za normalno funkcioniranje imunološkog procesa dodatno potvrđuje činjenica da postoje različita patološka stanja gdje su integrini defektni ili nedostaju i u tih osoba nedostatak funkcijskih β2 integrina uzrokuje životno ugrožavajuće infekcije. Kod te bolesti, nazvane Leukocitna adhezijska deficijencija tip 1, cirkulirajući neutrofili ne mogu ispravno adherirati ili migrirati preko endotela pa su bolesnici podložni ponavljajućim, životno ugrožavajućim bakterijskim infekcijama (151-153). Slično tome, neprikladno pojačana aktivacija leukocitnih integrina također dovodi do štetnih posljedica po zdravlje jer pojačana aktivacija β2 integrina doprinosi održavanju i stalnom poticanju upale, nastanku ishemijske reperfuzijske ozljede (uključujući akutno zatajenje bubrega, aterosklerozu, autoimune poremećaje i oštećenje tkiva (153-155)) i razvoju različitih autoimunih bolesti (156).

Molekularna težina CD11b je otprilike 170 kDa. Unutarstanične zalihe CD11b nađene su u membranama sekretornih i specifičnih granula (157). Novorođenčad, starije osobe te trudnice imaju pojačanu ekspresiju CD11b na staničnoj površini granulocita u perifernoj krvi (158-160). U mirujućim neutrofilima odraslih osoba, 95% ukupnog staničnog sadržaja CD11b/CD18 kompleksa pohranjeno je i nalazi se uklopljeno u membrane specifičnih granula i sekretornih vezikula, a samo 5% eksprimirano je na samoj staničnoj površini (161). Sekretorne vezikule se formiraju tijekom kasnog stadija neutrofilnog sazrijevanja (157). Nakon što proupalni podražaj dovede do stimulacije neutrofila, dolazi do pojačane ekspresije CD11b na njihovoj površini (161).

Upravo stoga, uočavanje pojačane ekspresije CD11b može poslužiti kao pokazatelj da je nastupila aktivacija neutrofila (162-164). U dosadašnjim istraživanjima, utvrđena je povećana ekspresija u odraslih bolesnika s infekcijom i sepsom (165-170) ili s neinfektivnim poremećajima (171-173) te je utvrđena povezanost između veće razine ekspresije s težinom SIRS-a u akutno bolesnih odraslih osoba (174). Isto tako, temeljem različitih vrijednosti ekspresije CD11b na staničnoj površini neutrofila, može se predvidjeti razvoj organskog zatajenja u bolesnika s cirozom jetre i septičkim šokom i/ili očekivati lošiji krajnji ishod liječenja (165, 168, 175). Iznenađujuće, u nekim istraživanjima rezultati su bili suprotni prije navedenima pa su tako nađene i normalne vrijednosti CD11b (176, 177), ali čak i snižene (178).

Različiti rezultati dobiveni su i u istraživanjima koja su kao ispitanike imala novorođenčad.
Weirich i sur. (179) i Nupponen i sur. (180) utvrdili su da je povećanje ekspresije CD11b na neutrofilima visoko učinkoviti i obećavajući biomarker u dijagnostici rano nastale novorođenačke infekcije. Istraživanje koje su proveli Nupponen i sur. (180) obuhvaćalo je 39 novorođenčadi u kojih je postavljena sumnja na postojanje infekcije tijekom prvih 48 sati života. U sklopu dijagnostičke obrade koja se prema protokolu bolnice u kojoj su bili liječeni morala provesti, u 35 ispitanika određivala se dodatno i ekspresija CD11b na površini neutrofila pomoću metoda protočne citometrije. Ispitanici su podijeljeni u tri skupine: u prvoj su bili ispitanici sa sepsom, druga je bila skupina ispitanika s mogućom infekcijom, a treća je bila kontrolna skupina. Utvrđena je razlika u ekspresiji CD11b između skupina: ekspresija CD11b bila je najveća u prvoj skupini, nešto manja u drugoj, a u trećoj su vrijednosti bile najmanje.

Genel i sur. (143) su 2012. godine objavili da je ekspresija CD11b na neutrofilima i monocitima značajno veća u novorođenčadi s infekcijom, a u usporedbi s novorođenčadi kod koje nije utvrđeno postojanje infekcije ili sa zdravom novorođenčadi iz kontrolne skupine. Autori su

pokazali da je CD11b na neutrofilima, kao ispitivani biomarker za detekciju i dijagnostiku novorođenačke infekcije, imao osjetljivost od 66%, specifičnost od 71% te NPV od 61%. Slično je dobiveno i za CD11b na monocitima: osjetljivost je bila 70%, specifičnost 62%, a NPV 61%.

Suprotne rezultate u odnosu na prije navedena istraživanja pokazali su Ng i sur. (108) u svom radu iz 2002. godine. Autori nisu uspjeli razlučiti nedonoščad s kasno nastalom infekcijom od onih bez infekcije na temelju određivanja razine ekspresije CD11b na staničnoj površini neutrofila. Ova se dijagnostička neučinkovitost CD11b ne može opravdati kao moguća posljedica nezrelosti neutrofila i zbog toga poremećene ekspresije CD11b na njima. Naime, u drugom istraživanju, utvrđena je povećana ekspresija CD11b usporedivih vrijednosti u prijevremeno rođene i terminski rođene novorođenčadi, a nakon što se ona inducirala pomoću neutrofilnih agonista (181). Kao mogući razlog zbog čega su Ng i sur. dobili ovakve rezultate, mogla bi biti metoda koju su autori koristili pri određivanju ekspresije CD11b. Naime, uzorci krvi bili su izloženi promjenama temperature *in vitro* za što je pokazano da utječe na ekspresiju CD11b. Također, u istraživanju je korišten EDTA kao antikoagulans, a pokazano je da on ima negativan učinak na optimalno vezanje protu-CD11b protutijela na njihove epitope (182).

Layseca-Espinosa i sur. pokazali su da, nakon neutrofilne aktivacije, postoji pojačana ekspresija CD11b/CD18 na neutrofilima, a smanjena ekspresija CD43, CD50 i CD62L, ali da se niti jedan od ovih biljega ne može smatrati korisnim i učinkovitim biomarkerom u dijagnostici novorođenačke sepse, barem ne samo temeljem jednog određivanja (109).

I u slučaju ovog biomarkera, bilo je važno istražiti i utvrditi njegovu biokemijsku stabilnost.

Turunen i sur. (183) istraživali su moguće promjene u ekspresiji CD11b unutar razdoblja od 24 sata nakon uzimanja uzorka krvi. S ciljem izbjegavanja fagocitne aktivacije *in vitro*, uzorak krvi je odmah nakon uzimanja ohlađen na ledu i nakon toga pohranjen u hladnjaku na temperaturi od 4°C. Razina ekspresije CD11b na neutrofilima određivana je u novorođenčeta bez infekcije neposredno nakon uzimanja uzorka krvi te 24 sata kasnije od ostatka istog uzorka krvi. Koeficijenti reproduktibilnosti za ekspresiju CD11b na neutrofilima, u uzorku od 6 ispitanika, bili su 27 relativnih fluorescentnih jedinica (RFU, engl. *relative fluorescence units*) što znači da postoji očekivanje od 95% da će razlika u utvrđenoj ekspresiji CD11b na neutrofilima, između uzoraka koji se održavaju na 4°C do 24 sata, biti manja od 27 RFU, a što autori smatraju nebitnim. Turunen i sur. objavili su da je na Dan 0 (dan kada je uziman uzorak krvi za hemokulturu zbog klinički postavljene sumnje na infekciju) medijan ekspresije CD11b na

neutrofilima bio značajno viši u skupini ispitanika s infekcijom u odnosu na kontrolnu skupinu. ROC analizom određena je optimalna granična vrijednost za ispitanike koji su imali infekciju (n = 7) u odnosu na ispitanike koji su bili bez infekcije (n = 16). Za CD11b na neutrofilima, kod optimalne granične vrijednosti od 139 RFU, utvrđena je osjetljivost od 100%, specifičnost od 56%, PPV od 50% te NPV od 100%, a AUC je bio 0.83. U skupini ispitanika kod kojih je postojala tek moguća infekcija, ekspresija CD11b bila je slična kao i u kontrolnoj skupini. Ovo istraživanje pokazalo je da je određivanje CD11b ekspresije koristan dijagnostički postupak u ranoj dijagnostici novorođenčadi s kasno nastalom sepsom (183). Rezultati ovog istraživanja također su pokazali i da postoji povećana ekspresija CD11b u neke od novorođenčadi iz skupine s infekcijom čak i do 3 dana prije početka simptoma i pojave znakova infekcije. Stoga su autori predložili da bi bilo korisno prospektivno mjeriti ekspresiju CD11b jer bi to moglo, barem u dijela novorođenčadi, omogućiti značajno ranije postavljanje dijagnoze infekcije te stoga i ranije započinjanje prikladnog antibiotskog liječenja. Loša specifičnost koja je dobivena u ovom radu dodatno potvrđuje potrebu za uzimanjem hemokulture tj. uzorka krvi za mikrobiološku analizu u onih bolesnika u kojih se sumnja na bakterijsku infekciju i /ili sepsu. Zaključno je istaknuto da su ispitanici iz kontrolne skupine imali stalno niske razine CD11b ekspresije te da je metoda kao takva stabilna i da su rezultati reproducibilni. Istodobno je istaknuto i da invazivno liječenje poput postavljanja središnjih venskih katetera te parenteralna prehrane ili strojna ventilacija ne dovode do povećanja ekspresije CD11b (183).

Na temelju svih prije navedenih rezultata istraživanja koja su istraživala učinkovitost određivanja CD11b i CD64 na neutrofilima, vidljivo je da niti jedan od ovih biomarkera na staničnoj površini leukocita, samostalno ili u kombinaciji, nije dovoljno osjetljiv ili specifičan da omogući liječniku da prekine ili uopće ne započne antibiotsko liječenje u novorođenčeta, dojenčeta ili djeteta koje ima kliničke znakove koji upućuju na razvoj bakterijske infekcije. Štoviše, analiza ovih biomarkera u kliničkom okružju zahtjeva specijaliziranu opremu i stručno osoblje, a uzorke krvi treba što prije obraditi i analizirati. Ovo ograničava praktičnu primjenu u kliničkom okružju pa je istraživanje novih i moguće boljih biomarkera na staničnoj površini leukocita i dalje u tijeku.

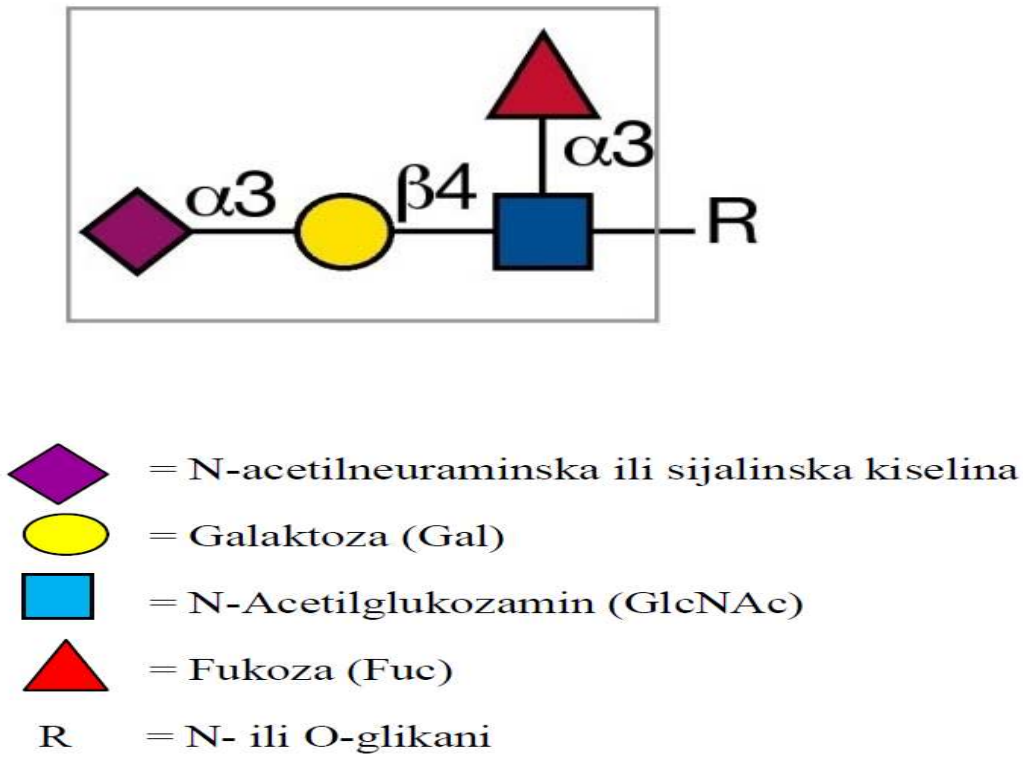
1.3.4.4. Biomarkeri na staničnoj površini leukocita: CD15s

Više puta ponovljeno je da je prvi korak u nakupljanju leukocita u područje upale njihovo priljubljivanje uz zid krvne žile te kotrljanje niz njega (184). Tijekom kotrljanja, adhezivna

kontaktna zona između stanice i endotela krvne žile brzo se prenosi niz zid krvne žile. Ovo zahtijeva brzo razaranje i stvaranje novih adhezivnih veza, a da bi proces tekao neometano neophodno je da brzina stvaranja tih veza bude jednaka brzini njihova razaranja. Selektini i neki integrini aktivno sudjeluju u ovim procesima (184).

Za potpuno razumijevanje uloge selektina u reguliranju ekstravazacije leukocita u upalna područja, potrebno je točno utvrditi za koju se kemijsku strukturu na staničnoj površini leukocita veže E-selektin. Biokemijska ispitivanja pokazala su da različiti glikoproteini prepoznaju E-selektin, a među njima su PSGL-1, L-selektin, ESL-1, CD43, CD44 te β2 integrini (185).

Zajednička poveznica i sličnost svih istaknutih liganada je da svi na sebi eksprimiraju glikane tipa sijalil Lewis x. Dakle, sijalil Lewis x (Slika 2.) i srodne skupine imaju veliku i važnu ulogu u inicijalnim zbivanjima koja prethode ekstravazaciji leukocita u upalno tkivo i smatra se da one služe kao ugljikohidratni ligandi za E i P-selektin (186-190).



Slika 2. Kemijska struktura Sijalil Lewis x (102)

Sijalil Lewis x (sLe^x, CD15s) je tetrasaharid i najmanji je poznati ligand za selektine. On je prvo identificiran kao humani tumor-vezujući antigen i nađen je na svim visoko malignim tipovima stanica raka. CD15s je eksprimiran na staničnoj površini cirkulirajućih granulocita i monocita te, nakon što ih prepoznaju endotelni selektini, posreduju u inicijalnim interakcijama između leukocita i endotelnih stanica.

Chen i sur. (191) identificirali su mAb, koja su sva bila IgM klase, na ugljikohidratne antigene CD15 i CD15s. Protu-CD15 protutijela reagirat će s CD15s samo onda kada se s njega odstrani sijalinska kiselina (192). Ovo je potvrđeno i u istraživanjima koja su rađena u slično vrijeme kao i prethodno. I u njima je nađeno, a u analizi su korišteni monociti na čijoj je površini CD15s dominantan oblik, da monociti reagiraju s protu-CD15 protutijelima tek nakon digestije s neuraminidazom koja je enzim koji cijepa glikozidnu vezu sa sijalinskom kiselinom (193, 194).

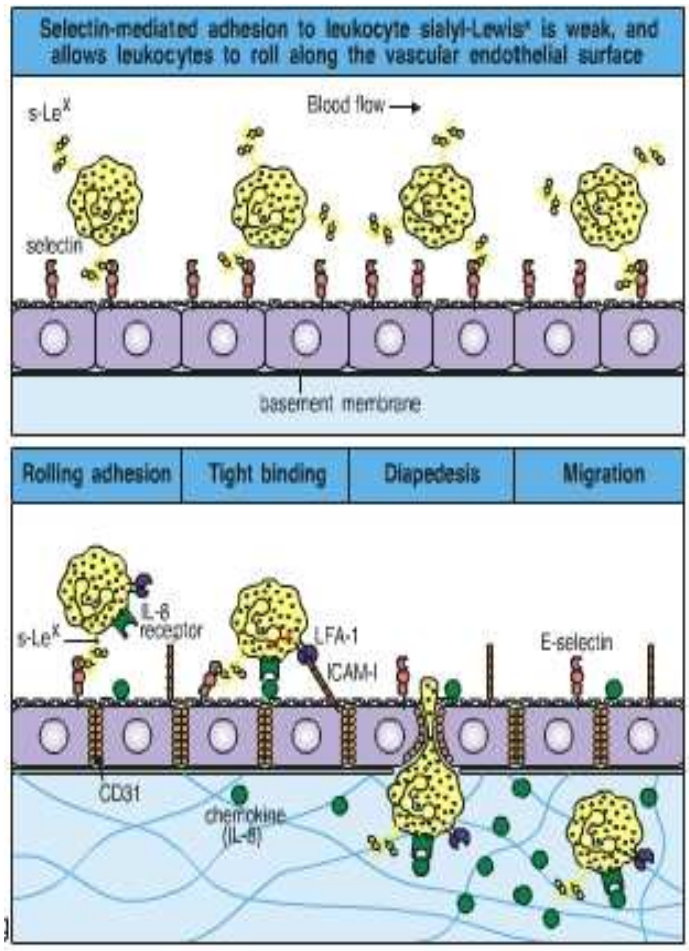
CD15s nastaje sijalizacijom distalne laktozaminske jedinice prije njene fukozilacije (195). U istraživanjima s leukemijskim blastima nađeno je da su blasti bili negativni za CD15 i slabo pozitivni za CD15s te da je ekspresija obje CD15 forme značajno porasla s nastavkom procesa sazrijevanja od promijelocita do segmentiranih neutrofila s tim da je u fazi segmentacije došlo do laganog smanjenja (196-198). Slično istraživanje normalne koštane srži potvrdilo je ekspresiju CD15s na CD34+ stanicama (199). Nađeno je i da se ekspresija CD15s na neutrofilima iz periferne krvi poveća nakon primjene G-CSF (200).

Više različitih skupina istraživača željelo je u svojim radovima podrobnije objasniti ulogu CD15s.

Brunk i sur. (201) te Alon i sur. (202) pokazali su, a što je prije navedeno, da tijekom vezanja i kotrljanja leukocita postoji interakcija između E-selektina i liganda koji na sebi imaju glikolipide koji eksprimiraju glikane tipa sLe^x. (Slika 3.) Isto je potvrđeno i u istraživanju kod štakora (203).

β2 integrini su visoko glikozilirani proteini (205, 206), a ugljikohidratne skupine na obje podjedinice CD11b/CD18 nađene su iznimno bitnima za njihovu urednu funkciju uključujući vezanje liganda (205). I Zen i sur. su također u svom radu iznijeli direktne dokaze da su obje podjedinice, a nakon što su izdvojene s normalnih ljudskih neutrofila obložene sa sLe^x (207). Naime, i CD11b i CD18 prepoznaju protu-sLe^x protutijela što je dokaz da oba na sebi eksprimiraju sLe^x skupine. Dodatni dokaz je dobiven i nakon što su isti autori izveli imunofluorescentno označavanje te fluorescentno-aktivirano stanično skeniranje s ciljem

utvrđivanja dijele li sLe^x skupine i CD11b/CD18 isti lokalizacijski obrazac na neutrofilima i imaju li sličan sekrecijski put nakon stimulacije. I jedno i drugo je potvrđeno, odnosno nađena je podudarnost u njihovom položaju na staničnoj površini leukocita i u sekundarnim granulama neutrofila.



Slika 3. Uloga sLe^x (CD15s) u vezanju i kotrljanju leukocita. Gornji dio slike prikazuje reverzibilno vezanje leukocita za endotel posredstvom veza koje se stvaraju između selektina (ovdje je prikazan E-selektin) i njihovih ugljikohidratnih liganada na leukocitima (ovdje je prikazan sijalil-Lewis^x – sLe^x). Kako ta veza nije dovoljno jaka da se suprotstavi sili strujanja krvi i tako zaustavi leukocit, on se nastavi kotrljati niz endotel neprestano stvarajući i razbijajući kontaktnu vezu selektina sa svojim ligandom. Nakon upalnog podražaja (donji dio slike) dolazi do indukcije i drugih molekula na površini leukocita i endotela (poput ICAM-1 ili CD11b/CD18 koji nije prikazan na slici), a jače veze između njih zatim dovedu do zaustavljanja leukocita i njegove ekstravazacije (204).

Zen i sur. su također stimulirali neutrofile s N-formil-metionin-leucin-fenilalaninom (fMLP). fMLP je peptidni lanac kojeg proizvode neke bakterije, a djeluje kao jaki kemoatraktant koji, između ostalog, inducira adheziju, degranulaciju i proizvodnju slobodnih radikala kisika u fagocitnim stanicama. U eksperimentalnim istraživanjima, fMLP se koristi za poticanje stanične aktivacije granulocita. Autori su nakon stimulacije neutrofila primijetili povećanu ekspresiju sLe^x skupina na njihovoj staničnoj površini (207). Iznimno je važna činjenica da je povećanu ekspresiju sLe^x na staničnoj površini neutrofila istodobno pratila i povećana ekspresija CD11b/CD18. Isti učinak na ekspresiju sLe^x na neutrofilima nakon njihove stimulacije utvrdili su također i Misugi i sur. (203).

Zen i sur. su izveli i test kojim su željeli utvrditi učinak protu-sLe^x monoklonskog protutijela na kemotaksiju neutrofila preko acelularnih filtera obloženih kolagenom. Autori su pokazali da vezanje specifičnog protutijela za sLe^x skupine na CD11b/CD18 značajno remeti funkciju neutrofila uključujući indukciju njihove agregacije i indukciju oslobađanja neutrofilnih sekundarnih granula. Istodobno bila je poremećena migracija neutrofila preko filtera i to tijekom perioda od 3 sata. Za razliku od toga, neutrofili na koje se nije djelovalo s protu-sLe^x monoklonskim protutijelom pokazali su snažnu migraciju te ih je više od 50% migriralo nakon 1 sat. Zaključak istraživanja je bio da je integrin CD11b/CD18 važan glikoprotein čije je vezanje za E-selektin posredovano sLe^x skupinama i da su one iznimno bitne za normalno funkcioniranje ovih procesa. U ovom istraživanju, protu-CD11b protutijelo OKM-1 je korišteno kao pozitivna kontrola inhibicije. OKM-1 je doveo do potpune blokade neutrofilne migracije, što je također uputilo na to da migracija neutrofila ovisi o ovom integrinu (207).

U dosadašnjim istraživanjima nađeno je da određivanje ekspresije CD64 na staničnoj površini neutrofila ima visoku osjetljivost i specifičnost u dijagnostici bakterijske infekcije i sepse u novorođenčadi (118, 129). Također, značajno povećana ekspresija CD64 nađena je i u djece s vrućicom koja je bila uzrokovana bakterijskom infekcijom (145). Tijekom bakterijske infekcije, utvrđena je i povećana ekspresija CD11b na staničnoj površini neutrofila (143, 180). Iako CD11b na sebi sadrži iznimno važne kemijske strukture CD15s te se, temeljem dosadašnjih istraživanja, može očekivati značajno povećanje njihove ekspresije tijekom bakterijske infekcije, nisu do sada provedena istraživanja u kojima bi se analizirala moguća učinkovitost njegovog određivanja kao dijagnostičkog biomarkera infekcije u djece.

2. CILJEVI I HIPOTEZE

Glavni cilj istraživanja je:

- usporediti učinkovitost i dijagnostičku vrijednost različitih biomarkera za rano postavljanje dijagnoze OBI u dojenčadi mlađe od 6 mjeseci koja su nakon pregleda u hitnoj pedijatrijskoj ambulanti zbog vrućice nepoznatog uzroka zaprimljena na bolničko liječenje s kliničkom sumnjom na OBI.

Sporedni cilj je, temeljem multivarijatne analize:

- odrediti kombinaciju biomarkera pomoću koje se bolje može dijagnosticirati OBI nego što je to moguće korištenjem pojedinačnih biomarkera.

Hipoteza istraživanja je da će se ispitivani biljezi na staničnoj površini neutrofila pokazati učinkovitim dijagnostičkim biomarkerima OBI te da će određivanje ekspresije CD64, CD11b i CD15s na površini neutrofila značajno pridonijeti ranoj i ispravnoj dijagnostici OBI.

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Ustroj istraživanja

Istraživanje je s obzirom na pristup bilo eksperimentalno, a s obzirom na namjenu primijenjeno. Glede načina dobivanja podataka riječ je o opažajnom istraživanju, dok je vremenska orijentacija bila prospektivna budući da je konačna dijagnoza bolesti u ispitanika bila postavljena nakon završnog liječničkog pregleda i na temelju nalaza zatraženih laboratorijskih i drugih dijagnostičkih pretraga. Specifični ustroj koji se koristio je kohortno istraživanje.

3.2. Ishod istraživanja i njegova mjera

Primarni ishod je učinkovitost različitih biomarkera u dijagnostici OBI i u diferencijaciji bakterijske od virusne infekcije mjerena površinom ispod ROC krivulje. Uz pomoć ROC krivulje , učinkovitost će se utvrditi pojedinačno za svaki biomarker mjerenjem ukupne površine ispod ROC krivulje.

Mjera primarnog ishoda je metrička varijabla koja predstavlja vjerojatnost da će kod slučajno odabranog ispitanika iz skupine s OBI u odnosu na slučajno odabranog ispitanika iz skupine s virusnom infekcijom, vrijednost biomarkera biti viša od izračunate optimalne granične vrijednosti.

Primarni biomarkeri su:

- geometrijski srednji intenzitet fluorescencije (GMI) CD15s na staničnoj površini neutrofila (CD15s),
- postotak CD15s pozitivnih neutrofila (%CD15s+),
- apsolutni broj CD15s pozitivnih neutrofila (AC-CD15s+),
- geometrijski srednji intenzitet fluorescencije (GMI) CD11b na staničnoj površini neutrofila (CD11b),
- geometrijski srednji intenzitet fluorescencije (GMI) na staničnoj površini neutrofila (CD64),

- broj leukocita (L),
- apsolutni broj neutrofila (ABN),
- koncentracija C-reaktivnog proteina u serumu (CRP) i
- koncentracija prokalcitonina u serumu (PCT).

Sekundarni ishodi uključuju:

a) ostale parametre točnosti dijagnostičkoga testa (osjetljivost, specifičnost, prediktivne vrijednosti). Navedeno se određuju za optimalnu graničnu vrijednost prema ROC krivulji, sve su metričke i služe za usporedbu dijagnostičke i kliničke vrijednosti testova.
b) mjere prikladnosti regresijskih modela (pseudo R2) te omjere izgleda za OBI u modelima logističke regresije s dijagnozom kao zavisnom varijablom te različitim biomarkerima kao prediktorima. Cilj je određivanje kombinacije biomarkera s većom dijagnostičkom vrijednošću za OBI od pojedinačnih biomarkera.

3.3. Etička načela

Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra (KBC) Split odobrilo je provođenje istraživanja. Da bi dojenče moglo biti uključeno u ispitivanje, roditelji ili zakonski skrbnici ispitanika trebali su pristati na uključivanje u istraživanje, a što su potvrdili potpisom na Obrazac informiranog pristanka.

3.4. Ispitanici

3.4.1. Kriteriji odabira ispitanika i razvrstavanja u skupine

Uključivanje ispitanika u istraživanje vršilo se po principu sljedbenih ispitanika u hitnoj pedijatrijskoj ambulanti Klinike za dječje bolesti KBC Split. Uzorkovanu populaciju činila su dojenčad mlađa od 6 mjeseci koju su roditelji ili zakonski skrbnici doveli na pregled u ambulantu

zbog vrućice te koju je nakon pregleda neovisni i slučajno odabrani liječnik, koji ne sudjeluje aktivno u ovom istraživanju, odlučio zaprimiti na bolničko liječenje zbog sumnje na OBI kao uzročnika vrućice čije porijeklo nije mogao utvrditi pregledom.

Ostali uključni kriteriji bili su:

- gestacijska dob ≥ 37 tjedana
- rektalno izmjerena tjelesna temperature ≥ 38ºC tijekom posljednjih najmanje 24 sata, a na temelju izjave roditelja / skrbnika

Isključni kriteriji bili su:

- započeto antibiotsko liječenje tijekom posljednjih 48 sati pred prijem u bolnicu
- od ranije poznata imunodeficijencija (prirođena ili stečena)
- cijepljenje tijekom posljednjih 5 dana
- prijem u pedijatrijsku hitnu ambulantu i hospitalizacija tijekom vikenda ili praznika

Za vrijeme prijema dojenčeta u bolnicu ili neposredno nakon toga, uzeti su uzroci krvi ili drugih tjelesnih tekućina čiji su se nalazi analize koristili u istraživanju te su izvršene sve potrebne dijagnostičke pretrage. Zdravstveno osoblje u suradnim službama (laboratorijska dijagnostika, mikrobiološki laboratorij i radiološka dijagnostika) nije bilo upoznato s kliničkim stanjem dojenčeta ili nalazima drugih pretraga. Temeljem nalaza zatraženih i obavljenih pretraga, anamneze i ponavljanih kliničkih pregleda, na dan otpusta dojenčeta iz bolnice, dva pedijatra, ista za sve ispitanike, zajednički su postavila konačnu dijagnozu. Navedeni pedijatri nisu sudjelovali aktivno u ovom istraživanju i nisu imali pristup niti su bili upoznati s nalazima protočne citometrije.

Ovisno o postavljenoj konačnoj dijagnozi, ispitanici su razvrstani u skupine:

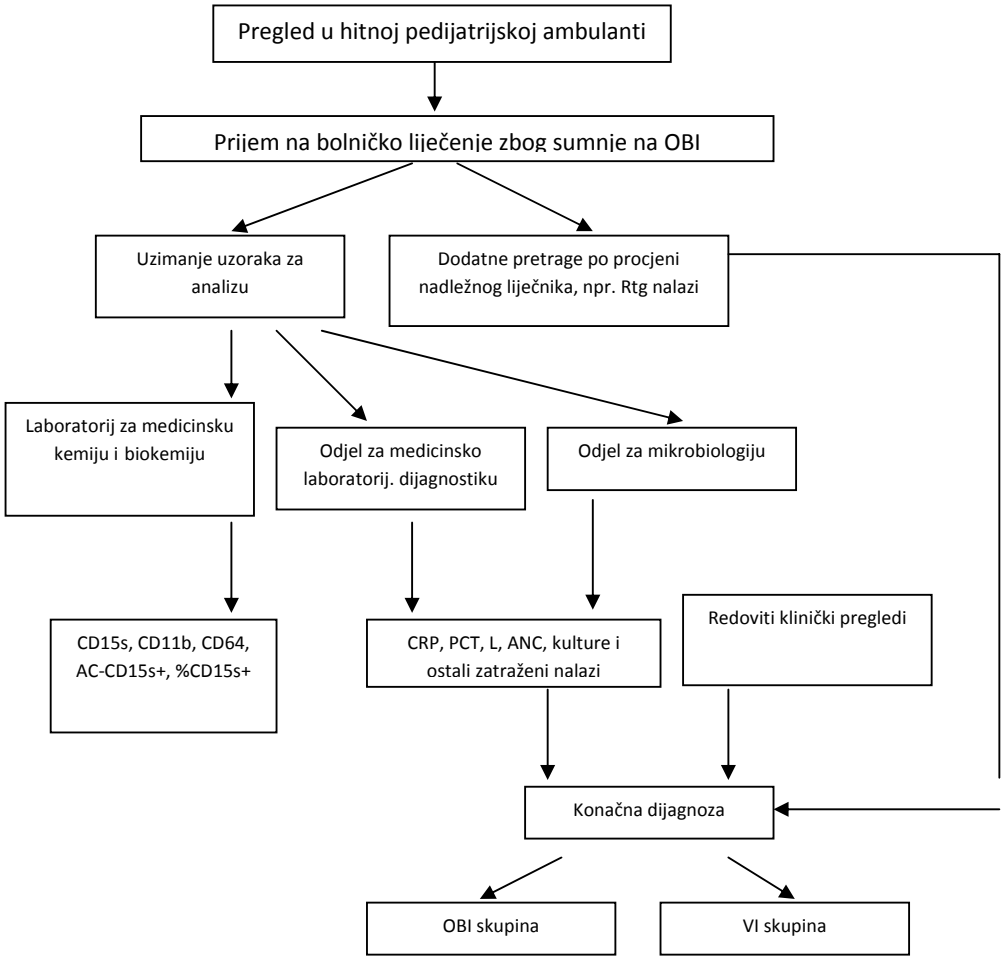
1) skupina bolesnika s OBI,
2) skupina bolesnika s virusnom infekcijom (VI).

Zdrava dojenčad, kod kojih nije postojala ikakva sumnja na infekciju i koja su bila bez poznate kronične bolesti, a čiji je uzorak krvi morao biti uzet u ambulanti Klinike za dječje bolesti iz različitih razloga, uključena su u ispitivanje kao kontrolna skupina.

U skupinu s OBI razvrstani su ispitanici u kojih je: (11)
- postavljena konačna dijagnoza sepse ili bakterijemije, potvrđena i temeljem pozitivnog mikrobiološkog nalaza hemokulture
- postavljena konačna dijagnoza bakterijskog meningitisa, potvrđena i temeljem pozitivnog mikrobiološkog nalaza kulture cerebrospinalnog likvora
- postavljena konačna dijagnoza infekcije mokraćnog sustava, potvrđena temeljem pozitivnog mikrobiološkog nalaza urinokulture ($>10^5$ kolonija/ml jednog patogenog mikroorganizma u uzorku dobivenim sterilnim načinom)
- na radiološkoj snimci pluća nađen nalaz koji je u skladu s konačnom dijagnozom pneumonije (lobarna konsolidacija ili infiltrat), a što je potvrdio radiolog s iskustvom iz pedijatrijske radiologije
- postavljena konačna dijagnoza bakterijskog gastroenteritisa, potvrđena i temeljem pozitivnog mikrobiološkog nalaza koprokulture
- postavljena konačna dijagnoza celulitisa

U skupinu s VI razvrstani su ispitanici u kojih je:
- dobiven pozitivan nalaz izolacije virusnog antigena iz uzorka krvi, ispirka nazofarinksa ili uzorka stolice
- postavljena konačna dijagnoza virusne infekcije temeljem klasičnog i očekivanog razvoja virusne bolesti (npr. exanthema subitum)
- tijekom hospitalizacije došlo do spontanog oporavka bez potrebe za primjenu antibiotskog liječenja, a unutar 48 sati od trenutka hospitalizacije

3.4.2. Hodogram odabira ispitanika i razvrstavanja u skupine



3.4.3. Snaga istraživanja

Istraživanje se provodilo do zadovoljenja uvjeta minimalne veličine uzorka u svakoj od ispitivanih skupina (OBI skupina, VI skupina). Kako se pridruživanje ispitanika u skupine vršilo na temelju neovisnog, završnog liječničkog pregleda zatajivanje pridruživanja i maskiranje se nije provodilo. Zatajivanje skupina analitičaru nije bilo moguće zbog specifičnog zahtjeva da se nađu biomarkeri koji dobro predviđaju OBI i učinkoviti su u diferenciranju bakterijske od virusne infekcije.

Post hoc analiza snage provedena je za sve biomarkere korištene u ROC analizi (PASS 12. NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA). Postojeća veličina uzorka (39 ispitanika koji su pridruženi u OBI skupina i 30 ispitanika koji su pridruženi u VI skupinu) dovoljna je da se postigne snaga veća od 80% za detekciju razlika između AUC od 0.50 pod ništičnom hipotezom i AUC od minimalno 0.71 pod alternativnom hipotezom, koristeći dvostrani z-test uz razinu značajnosti

0.05. Izuzetak je jedino %CD15s za kojeg je postignuta snaga iznosila 75%. Neovisno od toga %CD15s pokazao se kao značajan prediktor bakterijske infekcije.

3.5. Metode

3.5.1. Određivanje koncentracije CRP i PCT u serumu

Nakon uzimanja uzorka krvi u Vacutainer tubu bez antikoagulansa (Becton Dickinson, Plymouth, Velika Britanija), određivanje vrijednosti koncentracije CRP-a i PCT-a u serumu vršilo se u Odjelu za medicinsku laboratorijsku dijagnostiku KBC Split. Za određivanje CRP-a koristio se reagens Multigent CRP Vario na aparatu ARCHITECT ci8200 (Abbot, Wiesbaden, Njemačka), a prema priloženim uputama proizvođača. Određivanje PCT-a izvršeno je na aparatu mini-VIDAS (Biomerieux, Lyon, Francuska) korištenjem reagensa Vidas B-R-A-H-M-S PCT, a prema priloženim uputama proizvođača.

3.5.2. Određivanje CD64, CD11b i CD15s na staničnoj površini neutrofila

Iako postoje mnogi testovi koji koriste protočnu citometriju za analizu staničnih obilježja i/ili funkcija, protočna citometrija se ponajviše rabi u cilju imunofenotipizacije, tj. obilježavanja specifičnih staničnih biljega. Protočni citometar se sastoji od 3 međusobno povezana sustava: protočnog, optičkog i elektronskog. Protočni sustav čine pokretačka tekućina, koja je nosač suspenzije stanica, suspenzija stanica i zračni potisak. On omogućuje da stanice iz suspenzije pojedinačno laminarnom protokom kroz sustav uske kapilare dolaze do snopa laserskog svjetla. Lasersko svjetlo, leće, filtri i osjetnici čine optički sustav. Nakon što se stanice obasjaju svjetlom, stupanj raspršenja svjetlosti iste valne duljine pokazatelj je fizičkih osobina stanica - veličine i zrnatosti. Dodatno obilježavanje stanica slobodnim ili za monoklonska protutijela vezanim fluorescentnim bojama (fluorokromima) rabi se za dodatno obilježavanje specifičnih staničnih struktura. Fluorokromi obasjani laserskom svjetlošću emitiraju svjetlost veće valne duljine od ulazne svjetlosti, a hvataju je specifični osjetnici protočnog citometra. Elektronski

sustav pretvara svjetlosne signale u digitalne signale koji se prenose u elektroničko računalo i služe za analizu.
Za definiciju staničnih populacija najčešće se koristi točkasti dijagram veličine i zrnatosti stanica (FSC×SSC) na kojem se postavlja regija (R) analize oko ciljnih stanica iz kojih će se analizirati specifični fluorescentni signali.

U ovom istraživanju, uzorak krvi skupljao se u Vacutainer tubu s K_3EDTA antikoagulansom (Becton Dickinson, Plymouth, Velika Britanija). Nakon dopreme uzorka u laboratorij Katedre za medicinsku kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta u Splitu, puna krv (100 µl) tretirala se s FcR reagensom za blokiranje nespecifičnog vezanja (FcR blocking reagent, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Njemačka), a zatim inkubirala s protu-CD15-fluorescein izotiocijanat (FITC) protutijelom (Invitrogen, Carlsbad, SAD), protu-CD11b-fikoeritrin (PE) i protu-CD64-fikoeritrin-cijanin 5 (Pc5) protutijelima (IQ Test, Beckman Coulter, Marseille, Francuska) u jednoj tubi te protu-CD15s protutijelom (BD Pharmingen, San Diego, SAD) u drugoj tubi 30 minuta na ledu. U drugu tubu se zatim dodalo sekundarno protumišje protutijelo konjugirano s FITC-om (BD Pharmingen, San Diego, SAD) i inkubiralo 30 minuta na ledu. Nakon hemolize eritrocita otopinom za liziranje (Red Blood Cell Lysis Solution (10x), Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Njemačka), 10^5 događaja bilježilo se na Coulter Epics XL protočnom citometru (Beckman Coulter Corporation, Miami, SAD). Izotipske kontrole (mišji IgM obilježen s FITC-om i neobilježeni mišji IgM (Caltag, Burlingame, SAD), štakorski IgG1 obilježen s PE-om (CellLab, Beckman Coulter, Marseille, Francuska) i mišji IgG1 obilježen s Pc5 (IQ Test, Beckman Coulter, Marseille, Francuska)) kao i neobojeni uzorci stanica koristili su se kao negativne kontrole. Nespecifično vezanje sekundarnog protutijela bilo je isključeno korištenjem stanica obojenih samo protumišjim IgM protutijelom, proizvedenim u štakoru, konjugiranim s FITC-om (BD Pharmingen, San Diego, SAD). Postotak pozitivnih stanica i geometrijski srednji intenzitet fluorescencije (GMI) analizirao se FloJo računalnim programom.

3.5.3. Statistički postupci

ROC analiza koristila se za procjenu dijagnostičke vrijednosti pojedinog biomarkera. Optimalni prag utvrđen je Youdenovim indeksom. Usporedba biomarkera vršila se na temelju parametra AUC-a, ali i ostalih mjera točnosti testa: specifičnosti, osjetljivosti te prediktivnih vrijednosti. Univarijatna i multivarijatna logistička regresija s dijagnozom kao zavisnom varijablom te

biomarkerima kao prediktorima koristila se za direktnu usporedbu kvalitete biomarkera (omjer izgleda) te za pronalaženje kombinacije prediktora koja predviđa OBI bolje od pojedinačnih biomarkera (usporedba mjera prikladnosti regresijskih modela).
Uz navedeno, u analizi su se koristile metode opisne i inferencijske statistike. Vrijednosti kategorijskih varijabli između skupina uspoređivale su se $\chi 2$-testom. Usporedba srednjih vrijednosti (kvantitativne varijable) ispitala se t-testom ili Mann–Whitney testom ovisno o normalnosti razdiobe. Rezultati su se interpretirali na razini značajnosti $p \leq 0.05$ uz korištenje statističkog paketa Statistica 7.0 (StatSoft, Tulsa, SAD).

Kada se određeni test procjenjuje na kontinuiranoj varijabli, osjetljivost i specifičnost ovisit će o tome na kojem mjestu između pozitivnih i negativnih rezultata je postavljena granična vrijednost. Odnos između osjetljivosti i specifičnosti može biti grafički prikazan korištenjem ROC krivulje. Pomaknutost krivulje proksimalno tj. bliže gornjem lijevom kutu grafa je pokazatelj bolje točnosti ispitivanog testa. Naime, u tom slučaju će učestalost točno pozitivnih nalaza biti bliža broju 1 (100%), a učestalost lažno pozitivnih nalaza će biti bliža broju 0 (0%). Sveukupna točnost testa se može prikazati i kao AUC tj. površina ispod ROC krivulje. AUC od 0.5 znači da postoji jednaka vjerojatnost da će rezultat tog testa biti ili pozitivan ili negativan, a što je test bolji vrijednost AUC-a je sve bliža broju 1. U idealnom testu, AUC bi bilo 1.

Nakon što se odabere optimalna granična vrijednost, izračuna se osjetljivost i specifičnost. Osjetljivost i specifičnost su pokazatelji vrijednosti određenog testa. Osjetljivost je udio bolesnih ispitanika u kojih je test dao pozitivan nalaz. Specifičnost je udio zdravih ispitanika u kojih je test dao negativan nalaz.

Interval pouzdanosti je mjera preciznosti nekog testa i što je on uži test je pouzdaniji. Obično se izražava interval pouzdanosti od 95%. Intervali pouzdanosti se izražavaju za AUC. Kada se interpretira AUC kod kojeg interval pouzdanosti uključuje i vrijednost 0.5, navedeno znači da za ispitivani test postoji jednaka mogućnost da će dati ili pozitivan ili negativan nalaz.

4. REZULTATI

Ovo istraživanje provedeno je u razdoblju od 01. srpnja 2011. do 31. prosinca 2011. Tijekom tog šestomjesečnog razdoblja, 6720 djece mlađe od 18 godina roditelji ili zakonski skrbnici doveli su na pregled u pedijatrijsku hitnu ambulantu zbog različitih razloga, a 726 od njih (10.8%) bila su dojenčad mlađa od 6 mjeseci. Nakon pregleda koji je obavio, liječnik u ambulanti donio je odluku da od pregledanih 726 dojenčadi hospitalizira 149 (20.5%) zbog osnovane sumnje da je OBI uzrokom vrućice i da bi upućivanje takve djece kući uz eventualno propisivanje peroralnih antibiotika predstavljalo rizik po zdravlje.

Hospitalizirana dojenčad koja su zadovoljila uključne kriterije za ovo istraživanje, a nisu zadovoljavala niti jedan od isključnih kriterija uključena su u istraživanje (n=105). Ispitanici hospitalizirani tijekom prvih 5 mjeseci provođenja ovog istraživanja tvorili su skupinu koja je služila za ishodišno istraživanje – ispitivana skupina (n=69), a ispitanici hospitalizirani tijekom posljednjeg mjeseca ovog istraživanja (prosinac 2011.) tvorila su skupinu kojom se željela procijeniti valjanost dobivenih rezultata – validacijska skupina (n=36).

Temeljem postavljene konačne dijagnoze, ispitanici iz ispitivane skupine raspoređeni su u dvije skupine: OBI skupina (n = 39) i VI skupina (n = 30).
Zdravi ispitanici u kontrolnoj skupini činili su treću skupinu (n = 38).

Skupine u ishodišnom istraživanju (dvije ispitivane + kontrolna) bile su usporedive po svojim demografskih karakteristikama, osim što je nađena statistički značajna razlika u tjelesnoj masi ispitanika između OBI i VI skupine (Tablica 6).

Tablica 6. Demografske karakteristike ispitanika po skupinama

	OBI *(n = 39)*	*VI* *(n = 30)*	*C* *(n = 38)*
	Broj (postotak); srednja vrijednost ili medijan (95% CI)		
Muški spol (%)	26 (66.7%)	18 (60%)	17 (44.7%)
Dob (dana), srednja vrijednost	114 (96-131)	92 (71-115)	101 (82-119)
Tjelesna masa (g), srednja vrijednost	6390 (5913-6877)	5404 (4899-5985)	5759 (5317-6214)
Gestacijska dob (tjedni), medijan	39 (39-40)	39 (37-40)	40 (39-40)
Rodna masa (g), srednja vrijednost	3415 (3256-3580)	3208 (2928-3502)	3487 (3294-3666)
Rodna duljina (cm), srednja vrijednost	50 (49-51)	49 (48-50)	50 (49-50)

OBI – ozbiljna bakterijska infekcija, VI – virusna infekcija, C – kontrolna skupina.

Postavljene konačne dijagnoze u OBI skupini bile su:

- infekcija mokraćnog sustava u 22 ispitanika uz uzročnike:
    - *Escherichia coli* (18 ispitanika)
    - *Klebsiella pneumoniae* (3)
    - *Enterococcus* (1)
- pneumonija u 13 ispitanika,
- sepsa u 2 ispitanika uz uzročnike:
    - *E. coli* (1 ispitanik)
    - *Streptococcus grupe B* (1)
- bakterijski gastroenteritis (*Salmonella group D*) u 1 ispitanika
- cellulitis u 1 ispitanika.

Konačne dijagnoze u VI skupini postavljene su temeljem:

- pozitivnog testa detekcije virusnog antigena u 18 ispitanika uz uzročnike:
    - *Respiratorni sincicijski virus* (13 ispitanika)
    - *Rota virus* (5).

- spontanog oporavka bez potrebe za primjenu antibiotskog liječenja u 10 ispitanika
- klasičnog i očekivanog razvoja virusne bolesti, dijagnoza exanthema subitum postavljena je u 2 ispitanika.

Niti jedan ispitanik nije ostao neraspoređen ili je njegova raspodjela u pripadajuću skupinu izazvala prijepor između dva pedijatra koja su donosila konačnu dijagnozu. Također, niti jednom od ispitanika nije postavljena dijagnoza fokalne (*„non serious"*) bakterijske ili gljivične infekciju. Niti jedan od ispitanika nije primio cjepivo protiv pneumokoka (*Streptococcus pneumoniae*) ili meningokokno konjugirano cjepivo, među ostalim i stoga jer ova cjepiva nisu uključena u zakonom propisani kalendar obveznog cijepljenja u Republici Hrvatskoj.
Nalazi primarnih biomarkera iz ispitivanih skupina te kontrolne skupine prikazani su u Tablici 7.

U usporedbi s kontrolnom skupinom, broj leukocita bio je značajno viši u OBI i VI skupini ($p<0.05$). Geometrijski srednji intenzitet fluorescencije CD11b na staničnoj površini neutrofila bio je značajno viša u OBI skupini, a u usporedbi s kontrolnom ($p<0.05$), ali značajna statistička razlika između OBI I VI skupine nije utvrđena. Geometrijski srednji intenzitet fluorescencije CD15s nije se statistički značajno razlikovao između skupina.

Svi ostali ispitivani biomarkeri (ABN, CRP, PCT, CD64, %CD15s+, i AC-CD15s+) bili su statistički značajno različiti između svih ispitivanih skupina.

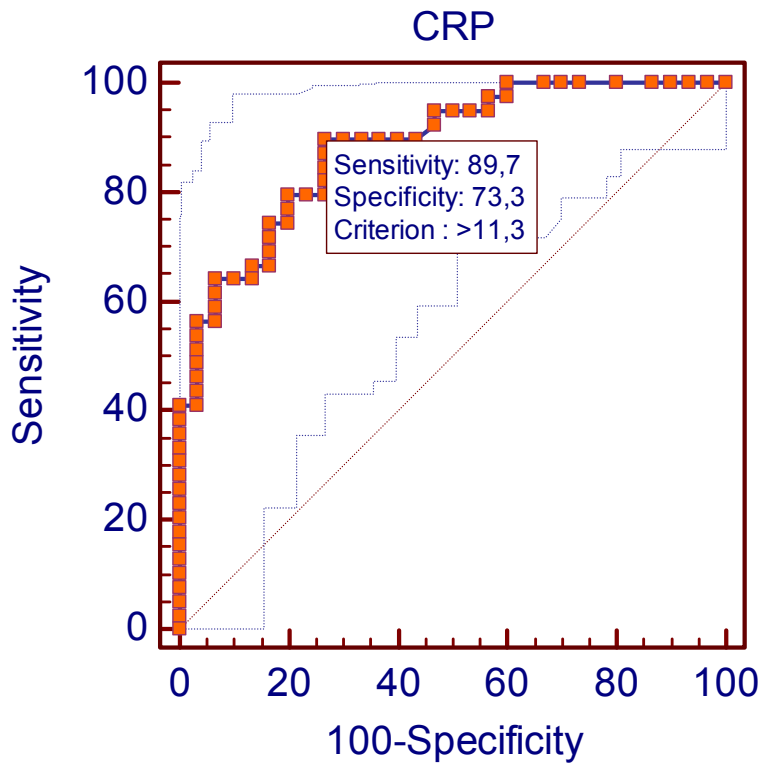
Tablica 7. Nalazi primarnih biomarkera u ispitanika

	OBI (n = 39)	*VI (n = 30)*	*C (n = 38)*	*Statistika**	*Post hocs†*
	Broj (postotak); srednja vrijednost ili medijan (95% CI)				
Broj leukocita ($x10^9$/l), srednja vrijednost	15.3 (13.5-17.1)	12.7 (11.0-14.4)	10.1 (8.9-11.3)	P<0.001	(OBI,C), (VI,C)
ABN ($x10^9$/l), srednja vrijednost	7.95 (6.7-9.25)	4.77 (3.55-5.97)	2.48 (2.07-2.95)	P<0.001	svi
CRP (mg/l), medijan	48.6 (33.3 – 82.3)	4.5 (1.1 – 9.7)	0.3 (0.2 – 0.3)	P<0.001	svi
PCT (ng/ml), medijan	0.7 (0.4-1.2)	0.11 (0.1-0.2)	0.04 (0.03-0.07)	P<0.001	svi
CD11b (GMI), medijan	1.81 (1.74-1.95)	1.74 (1.47-1.90)	1.44 (1.32-1.70)	P=0.007	(OBI,C)
CD64 (GMI), medijan	2.70 (2.37-3.03)	2.31 (2.08-2.40)	1.74 (1.49-2.04)	P<0.001	svi
CD15s (GMI), medijan	2.99 (2.63-3.49)	3.17 (2.69-3.99)	2.87(2.36-3.46)	P=0.514	
%CD15s+, medijan	93.5 (92.3 – 96.9)	87.0 (81.4 – 93.4)	77.1 (73.2 – 84.5)	P<0.001	svi
AC- CD15s+ ($x10^9$/l), srednja vrijednost	7.40 (6.25-8.66)	4.18 (3.15-5.36)	1.91 (1.60-2.24)	P<0.001	svi

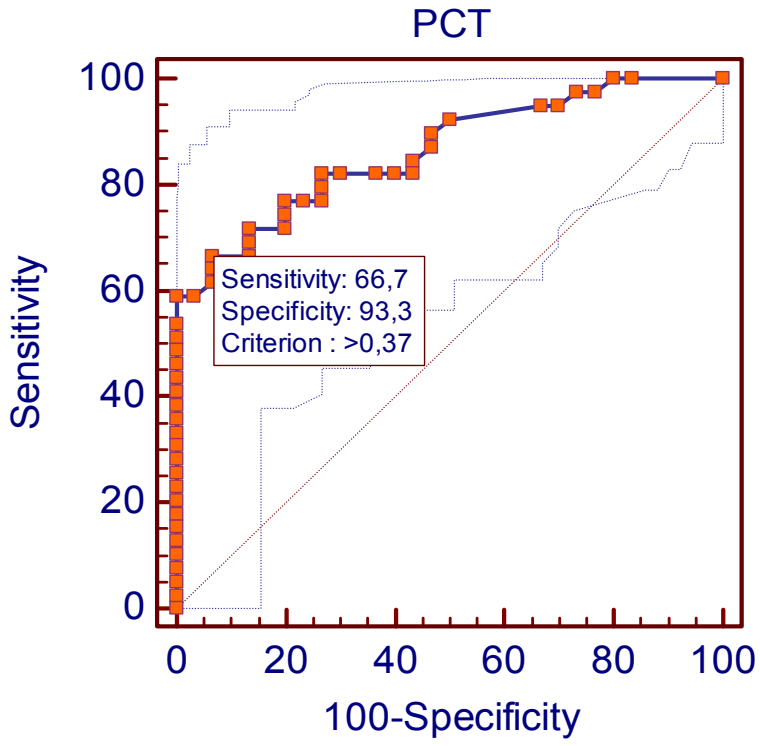
OBI – ozbiljna bakterijska infekcija, VI – virusna infekcija, C – kontrolna skupina, ABN – Apsolutni broj neutrofila, CRP – C-reaktivni protein, PCT – prokalcitonin, GMI- geometrijski srednji intenzitet fluorescencije, %CD15s+ - postotak CD15s+ neutrofila, AC-CD15s+ - apsolutni broj CD15s+ neutrofila. * Različiti statistički testovi korišteni su ovisno o vrsti podataka i distribuciji: Kruskal-Wallis (CRP, PCT, sve varijable intenziteta fluorescencije i postotak CD15s+ neutrofila) i ANOVA (ostale varijable). †*Post hocs* – samo parovi skupina između kojih je utvrđena značajna razlika u vrijednosti biomarkera ($p<0.05$) su navedeni u zagradama; svi - statistički značajna razlika postoji između svih parova skupina.

Na temelju ovih rezultata, odabrani su potencijalno učinkoviti biomarkeri za diferencijaciju između bakterijske i virusne infekcije te su određene njihove AUC vrijednosti. Isto tako, s ciljem odabiranja optimalne granične vrijednosti za istraživani biomarker, za različite razmatrane vrijednosti određene su osjetljivost, specifičnost te omjeri vjerojatnosti.

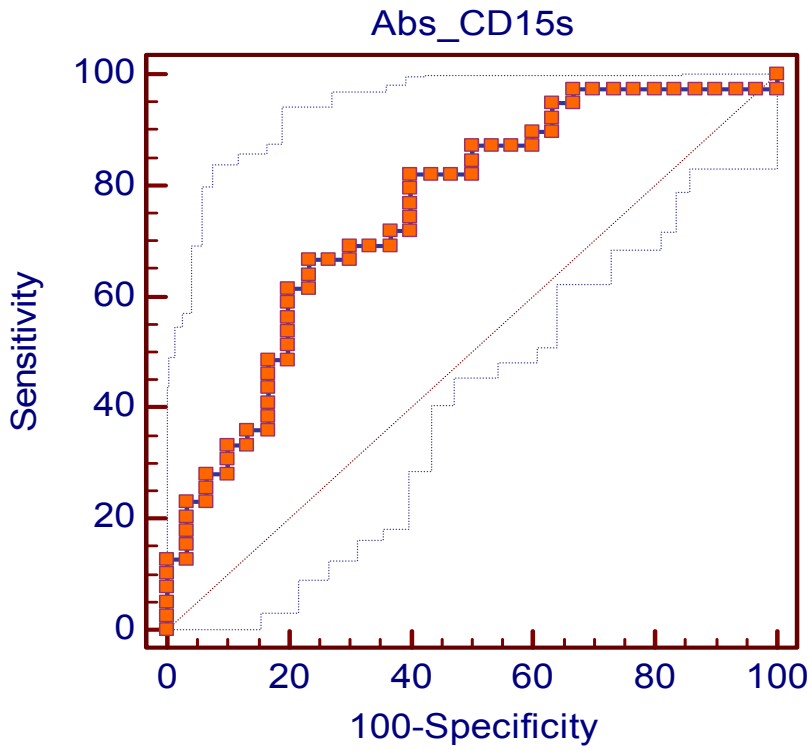
Rezultati analize prikazani su na slijedećim slikama, a detaljna statistička obrada je u dodatku.



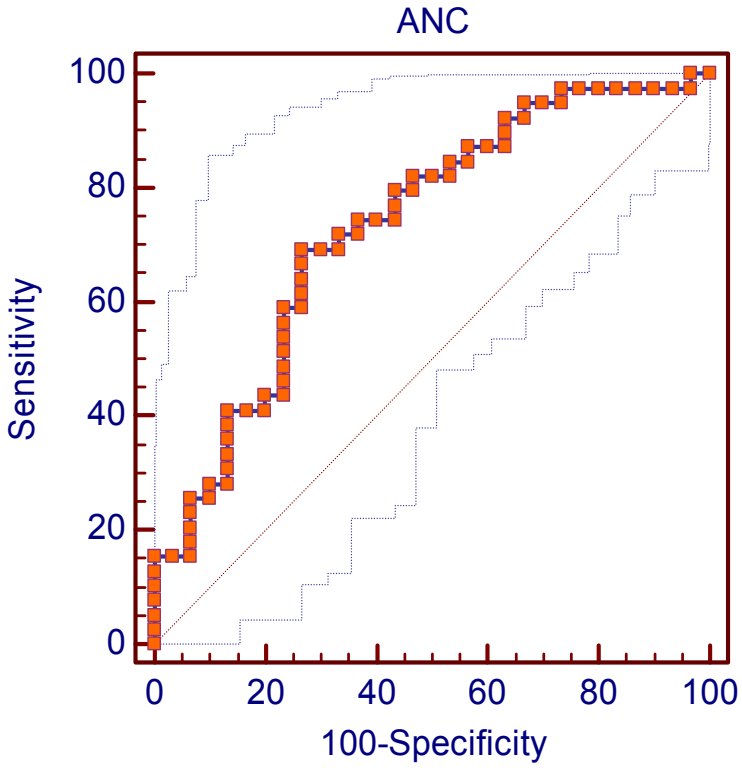
Slika4. ROC krivulja za C-reaktivni protein (CRP) s prikazanim 95% intervalima pouzdanosti



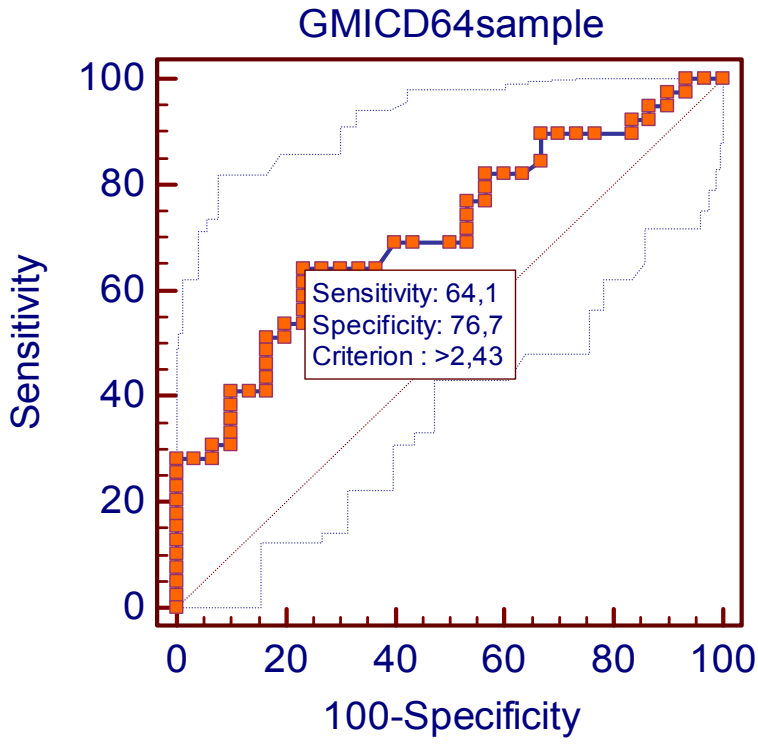
Slika 5. ROC krivulja za prokalcitonin (PCT) s prikazanim 95% intervalima pouzdanosti



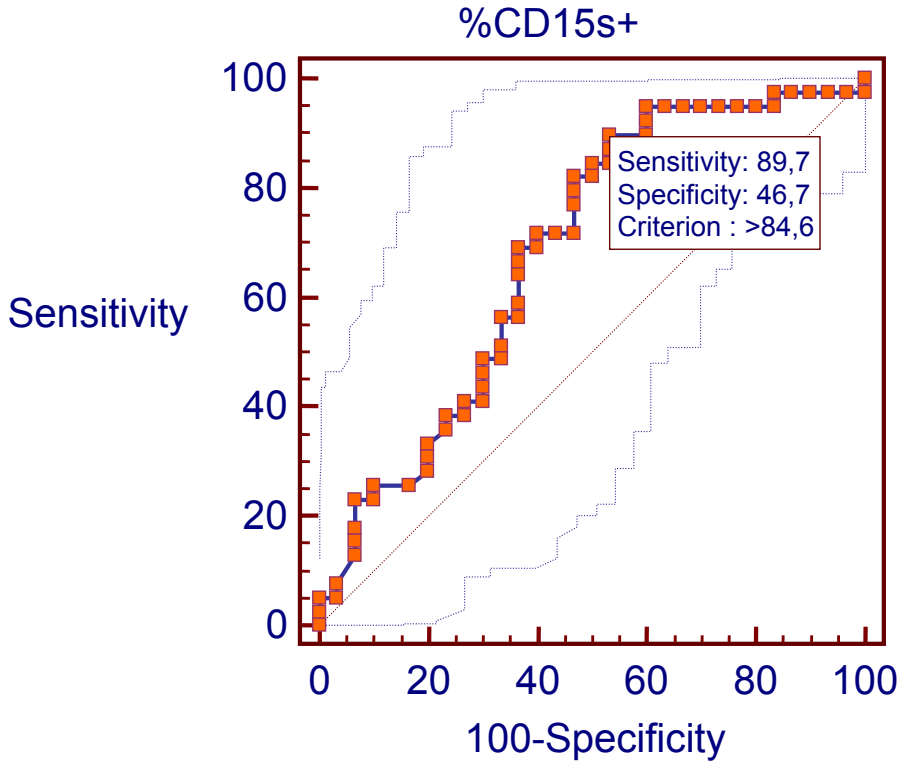
Slika 6. ROC krivulja za apsolutni broj CD15s pozitivnih neutrofila (AC-CD15s+) s prikazanim 95% intervalima pouzdanosti



Slika 7. ROC krivulja za apsolutni broj neutrofila s prikazanim 95% intervalima pouzdanosti



Slika 8. ROC krivulja za CD64 (GMI) s prikazanim 95% intervalima pouzdanosti



Slika 8. ROC krivulja za postotak CD15s pozitivnih neutrofila (%CD15s+) s prikazanim 95% intervalima pouzdanosti

ROC analizom potvrđeno je da su odabrani biomarkeri korisni za diferencijaciju bakterijske od virusne infekcije (AUC>0.6 i p<0.05 za sve). Tablica 8. skupno pokazuje izračunate osjetljivosti, specifičnosti i omjere vjerojatnosti za odabrane primarne biomarkere koji se koriste u diferencijaciji bakterijske od virusne infekcije, a korištenjem izračunate optimalne granične vrijednosti za određeni biomarker.

Tablica 8. Karakteristike biomarkera u diferencijaciji između bakterijske i virusne infekcije korištenjem izračunate optimalne granične vrijednosti

Biomarker	**AUC**	**95% CI**	**P**	**Optimalna granična vrijednost**	**Osjetljivost (%)**	**Specifičnost (%)**	**Pozitivni omjer vjerojatnosti**	**Negativni omjer vjerojatnosti**
CRP (mg/l)	0.88	0.806 - 0.959	<0.001	> 11.3	90	73	3.37	0.14
PCT (ng/ml)	0.86	0.781 - 0.947	<0.001	> 0.37	67	93	10.00	0.36
AC-CD15s+ ($x10^9$/l)	0.75	0.633 - 0.848	<0.001	> 5.47	67	77	2.86	0.43
ABN ($x10^9$/l)	0.73	0.611 - 0.852	<0.001	≥ 5.69	69	73	3.03	0.4
CD64 (GMI)	0.71	0.590 - 0.831	0.003	> 2.43	64	77	2.75	0.47
%CD15s+	0.68	0.551– 0.814	0.01	> 84.6	90	47	1.68	0.22

CRP – C-reaktivni protein, PCT – prokalcitonin, AC-CD15s+ - apsolutni broj CD15s+ neutrofila, ABN – apsolutni broj neutrofila, GMI – geometrijski srednji intenzitet fluorescencije, %CD15s+ - postotak CD15s+ neutrofila.

Potencijalni biomarkeri su dodatno analizirani i međusobno kombinirani te su kao prediktori uključeni u različite višestruke logističke regresijske modele (MLR) za predikciju postojanja OBI ili VI. Varijable koju su bile identificirane u različitim modelima kao signifikantni neovisni prediktori bile su CRP, PCT, ABN, CD64 te AC-CD15s+ i %CD15s+ neutrofila.

The-best-fit model, s kategorijskim varijablama CRP, PCT, i %CD15s+ kao signifikantnim prediktorima, odabran je između različitih modela (Tablica 9). U usporedbi sa slijedećim najboljim modelom koji je uključivao samo kombinaciju CRP-a i PCT-a kao prediktora, dodatno uključivanje %CD15s+ u model povećalo je R^2 za 5% i poboljšalo sveukupnu točnost

klasifikacije, odnosno diferencijacije bakterijske od virusne infekcije, za 4.3%. U konačnom modelu najviši omjer izgleda za OBI nađen je s %CD15s+.

Predikcijska jednadžba za postavljanje dijagnoze bakterijske ili virusne infekcije u dojenčeta mlađeg od 6 mjeseci s vrućicom nepoznatog uzroka glasi:
Logit (SBI)= -3.549+2.355*categorical %CD15+2.234*categorical PCT+2.243*categorical CRP,
s kategorijom biomarkera (SBI=0) kao referentnom (vidi Tablicu 9).

Tablica 9. Signifikantni kategorijski prediktori u konačnom (finalnom) modelu

Prediktor (granična vrijednost)	**Omjer izgleda za OBI (95% CI)***	**p**
CRP (≤11.3 mg/l)	9.4 (1.83-48.54)	0.007
PCT (≤0.37 ng/l)	9.3 (1.29-67.62)	0.027
%CD15s+ (≤84.6%)	10.5 (1.72-64.53)	0.011

CRP – C-reaktivni protein, PCT – prokalcitonin, %CD15s+ - postotak CD15s+ neutrofila, OBI – ozbiljna bakterijska infekcija. *Kategorija s vrijednostima ispod ROC granične vrijednosti je dana kao referentna.

Vrijednost konačnog modela bila je vrlo dobra sa čak 85.5% slučajeva ispravno klasificiranih kao OBI ili VI (Tablica 10). Osjetljivost modela bila je 87%, specifičnost 83%, dok su pozitivni i negativni omjeri vjerojatnosti bili 5.11 i 0.16.

Tablica 10. Učinak predloženog optimalnog modela za predviđanje ozbiljne bakterijske infekcije

Nađeno	Predviđeno		
	Virusna infekcija, n	Ozbiljna bakterijska infekcija, n	Postotak točnoga, %
Virusna infekcija	25	5	83.3
Ozbiljna bakterijska infekcija	5	34	87.2
Ukupni postotak			85.5

S ciljem potvrđivanja vrijednosti predloženog modela, model je testiran na 36 ispitanika koji su tvorili validacijsku skupinu. Ovi ispitanici bili su usporedivi s ispitanicima iz ispitivane skupine u većini svojih demografskih karakteristika (Tablica 11.) osim tjelesne mase u OBI skupini.

Tablica 11. Demografske karakteristike ispitanika u validacijskoj skupini

	OBI *(n = 21)*	*VI* *(n = 15)*
	Broj (postotak); medijan (95% CI)	
Muški spol (%)	7 (47%)	11 (52%)
Dob (dana)	64 (52-105)	108 (51-148)
Tjelesna masa (g)	5010 (4652-5743)	6000 (5153-7023)
Gestacijska dob (tjedni)	39 (38-40)	40 (39-40)
Rodna masa (g)	3400 (2930-3605)	3500 (3455 -3850)
Rodna duljina (cm)	49 (47-51)	51 (49-52)

OBI – ozbiljna bakterijska infekcija, VI – virusna infekcija.

Točnost modela bila je još viša, te je njegovim korištenjem čak 89% dojenčadi bilo točno klasificirano. Osjetljivost je bila 86%, specifičnost 93%, a pozitivni i negativni omjer vjerojatnosti bili su 12.86 i 0.15.

Model za predikciju dijagnoze dostupan je na web stranici:
http://genom.mefst.hr/~ajeronci/SBI/Predict_SBI_or_VI.xls

5. RASPRAVA

Tijekom pregleda dojenčeta kojeg se dovodi u pedijatrijsku hitnu ambulantu zbog vrućice nepoznatog porijekla, potrebno je uzeti detaljne heteroanamnestičke podatke od roditelja ili zakonskih skrbnika, temeljito pregledati dojenče (somatski i neurološki status) i učiniti sve potrebne dijagnostičke pretrage. Ako se na temelju svega navedenoga ne može sa sigurnošću postaviti dijagnoza bolesti, potrebno je dojenče zaprimiti na bolničko liječenje zbog dodatnog i detaljnijeg promatranja, a ponekad će biti potrebno i empirijski započeti liječenje antibioticima. Antibiotsko liječenje će biti poglavito potrebno ako se nađu klinički znakovi koji upućuju na OBI.

Cilj ovog istraživanja bilo je prospektivno istražiti učinkovitost, dijagnostičku vrijednost i prediktivnu snagu različitih biomarkera u dijagnostici OBI u dojenčadi s vrućicom nepoznatog porijekla. Neophodni preduvjet za odabir biomarkera bilo je određivanje njihove učinkovitosti i dijagnostičke vrijednosti u prepoznavanju infekcije u cjelini bez obzira na uzročnika bolesti. Zbog toga je u istraživanje uključena kontrolna skupina zdravih ispitanika. Zatim su odabrani potencijalno učinkoviti biomarkeri za detekciju OBI te za diferencijaciju između bakterijske i virusne infekcije kod hospitalizirane dojenčadi s vrućicom nepoznatog porijekla.

Predložen je optimalni model za predikciju OBI u kojem su kao prediktori korišteni CRP, PCT i %CD15s+, a pomoću njega je 85.5% dojenčadi ispravno klasificirano u OBI ili VI skupinu. Osjetljivost modela bila je 87%, a specifičnost modela 83%. Kada je predloženi model validiran, njegova točnost bila je još viša pa je pomoću njega 89% dojenčadi ispravno klasificirano. Uz CRP i PCT, %CD15s+ neutrofila pokazan je kao snažan prediktor s visokom osjetljivošću i omjerom vjerojatnosti za SBI (u logističkom modelu). Iznenađujuće, %CD15s+ je imao najviši omjer vjerojatnosti za OBI pa je tako u ispitanika s OBI vrijednost %CD15s+ bila skoro 11 puta vjerojatnije veća od granične vrijednosti, a što je više nego što je za široko korištene CRP i PCT. Ostali ispitivani biomarkeri: CD15s, CD64, CD11b, broj leukocita te ABN nisu se pokazali kao signifikantni prediktori u kombiniranom optimalnom modelu.

Uloga biomarkera je od iznimne važnosti u procesu postavljanja dijagnoze infekcije, posebno u procesu diferenciranja bakterijske infekcije od virusne ili gljivične jer pravovremeni početak ispravnog liječenja smanjuje mogućnost komplikacija i povezan je s boljim ishodom liječenja. Upravo zbog toga, mnogi dijagnostički pokazatelji, uključivo i različiti bodovni sustavi, razvijeni su s ciljem prepoznavanja pacijenata s visokim ili niskim rizikom za postojanje bakterijske

infekcije, naročito OBI. Široko prihvaćeni pristup za postavljanje dijagnoze u ovih bolesnika je kombinacija kliničkog pregleda i laboratorijskih nalaza s drugim dijagnostičkim postupcima. Međutim, niti jedan model tj. pristup nije se pokazao dovoljno osjetljivim ili specifičnim da bi se uz pomoć njega s apsolutnom sigurnošću mogla postaviti ili odbaciti dijagnoza infekcije (1, 28, 59).

Manji broj znanstvenika istraživao je dijagnostičku ulogu i učinkovitost određivanja CRP i PCT u dijagnostici OBI kod djece s vrućicom koja se javljaju na preglede u hitne ambulante (21-23, 50, 53, 73, 74). Rezultati ovog istraživanja pokazali su statistički značajnu razliku u vrijednostima CRP i PCT između hospitalizirane dojenčadi s vrućicom i kontrolne skupine ispitanika te su potvrdili njihovu vrijednost kao učinkovitih biomarkera infekcije. Također, i CRP i PCT su imali skoro sličnu učinkovitost u dijagnostici OBI te u mogućnosti diferenciranja bakterijske infekcije od virusne infekcije u bolesnika koji su dovedeni na pregled u hitnu ambulantu. Međutim, zbog niže osjetljivosti, ponekad ih je ipak potrebno koristiti u kombinaciji s drugim biomarkerima (11).

Optimalna granična vrijednost koncentracije CRP-a u serumu od 11.3 mg/l, izračunata u ovom istraživanju, niža je od većine predloženih graničnih vrijednosti u ranije objavljenim istraživanjima, ali je u skladu s graničnom vrijednosti u istraživanju Gendrela i sur. (53) Korištenjem samo CRP-a, čija je optimalna granična vrijednost bila 10 mg/l, autori su pokazali osjetljivost od 98% za razlikovanje bakterijske od virusne infekcije. Upravo zbog ovako niske vrijednosti CRP-a, koja je bila i niža od srednje vrijednosti CRP-a u ispitanika s virusnom infekcijom, očekivano je dobivena niska specifičnost (50%). U našem istraživanju, optimalna granična vrijednost je viša od srednje vrijednosti CRP-a u ispitanika iz skupine s virusnom infekcijom (4.5 mg/l), specifičnost je bolja (73%), ali je osjetljivost niža (90%).

U prije spomenutom istraživanju Gendrela i sur. određivana je i učinkovitost PCT-a. Nađeno je da PCT ima vrlo visoku osjetljivost (96%) i specifičnost (87%) u dijagnostici invazivne bakterijske infekcije i da je statistički značajno učinkovitiji biomarker nego što je CRP na više različitih graničnih vrijednosti (AUC od 0.94 za PCT, AUC od 0.89 za CRP). Za diferenciranje bakterijske od virusne infekcije, za graničnu vrijednost PCT-a od 1 μg/l, utvrđena je osjetljivost od 83%, a specifičnost od 93% (53). Taj rezultat je u suprotnosti s rezultatima ovog istraživanja gdje je učinkovitost PCT-a bila lošija od učinkovitosti CRP-a u diferenciranju bakterijske od virusne infekcije. Lošija učinkovitost PCT-a dijelom može biti uzrokovana i povezana s činjenicom da su u skupini ispitanika s OBI samo dva ispitanika imala dijagnosticiranu

invazivnu infekciju (sepsu). Za izračunatu optimalnu graničnu vrijednost PCT-a od 0.37 mg/ml, utvrđena je dobra specifičnost (93%), ali niža osjetljivost (67%).

Ostala istraživanja koja su provedena u djece s vrućicom koja su pregledana u hitnim ambulantama, iznijela su slične rezultate te je većina njih istaknula određivanje koncentracije PCT-a u serumu kao pojedinačno najosjetljiviji test. U istraživanju koje su proveli Galetto-Lacour i sur., oboje, CRP i PCT nađeni su kao visoko osjetljivi biomarkeri. Očekivano, autori su ih odlučili kombinirati, što je dovelo do još više osjetljivosti (96%), ali je došlo do smanjenja specifičnosti na 67% (21). Isti su autori slične rezultate našli i u istraživanju dvije godine kasnije.(22) Analizirani su laboratorijski nalazi djece mlađe od 3 godine sa sličnim uključnim kriterijima kao i u ovom istraživanju. Za graničnu vrijednost PCT-a od 0.5 ng/ml utvrđena je osjetljivost od 93%, a specifičnost od 74%, dok je CRP nađen kao manje osjetljiv i specifičan biomarker nego što je bio u prethodnom istraživanju.

Nešto viša specifičnost PCT-a i bolja osjetljivost CRP-a u dijagnostici OBI, utvrđena za njihove optimalne granične vrijednosti, nađena je u nedavnom istraživanju koje su proveli Andreola i sur. (23). Ispitanici su bili heterogena skupina djece mlađa od 3 godine koja je dovedena na pregled u pedijatrijske hitne ambulante. Za sličnu skupinu ispitanika, najniža osjetljivost CRP-a utvrđena je u istraživanju koje je provedeno u djece s vrućicom iz Španjolske (50). CRP kao pojedinačni biomarker bio je slabije osjetljiv i specifičan nego PCT za koji je utvrđeno da je najbolji prediktor bakterijske infekcije, s visokom specifičnošću od 94.3%, ali umjerenom osjetljivošću od 65.5% uz graničnu vrijednost od 0.53 ng/ml.

Izneseni rezultati podupiru činjenicu da se konačna dijagnoza OBI ne može donijeti samo na temelju vrijednosti CRP-a i PCT-a te da su neophodni učinkovitiji i pouzdaniji biomarkeri.

Nađeno je da, tijekom infekcije, dolazi do poticanja ekspresije CD11b i CD64 na staničnoj površini neutrofila. Upravo stoga, određivanje ekspresije ovih leukocitnih antigena pomoću protočne citometrije može se pokazati brzom i učinkovitom metodom u dijagnostici bakterijske infekcije ili sepse, a koja pri tome zahtjeva minimalnu količinu uzorka krvi.

U ambulantama hitne službe, CD64 se pokazao učinkovitim biomarkerom u dijagnostici sepse (osjetljivost 87.9%, specifičnost 71.2%) i izdvojen je kao bolji prediktor infekcije u usporedbi sa CRP-om, brojem nesegmentiranih neutrofila i apsolutnim brojem neutrofila (124). U ovom istraživanju, potvrđena je učinkovitost određivanja ekspresije CD64 na staničnoj površini

neutrofila kao biomarkera infekcije. Ekspresija CD64 je značajno bila viša u OBI i VI skupini, a u usporedbi s kontrolnom skupinom. Potvrđena je i njegova učinkovitost u diferenciranju bakterijske od virusne infekcije jer su značajno više vrijednosti ekspresije CD64 nađene u OBI skupini, a u usporedbi s VI skupinom. Ipak, njegova učinkovitost i vrijednost pokazala se manjom u usporedbi s učinkovitosti PCT-a i CRP-a. Za optimalnu graničnu vrijednost, osjetljivost CD64 je bila niska (64%), ali je specifičnost (77%) bila viša nego što je bila specifičnost CRP-a (73%).

Rezultati u ovom istraživanju slični su rezultatima koje su objavili Rudensky i sur. (145). Oni su također istraživali učinkovitost određivanja ekspresije CD64 na neutrofilima u mlađe djece s vrućicom koja su dovedena na pregled u hitnu pedijatrijsku ambulantu. Autori su našli povećanu ekspresiju CD64 u djece s bakterijskom i virusnom infekcijom, ali značajno više u onih s bakterijskom infekcijom. Unatoč vrlo dobroj osjetljivosti, CD64 se ipak nije pokazao dovoljno specifičnim za postavljanje dijagnoze bakterijske infekcije na nekoliko razmatranih različitih graničnih vrijednosti. I u tom istraživanju, kao i ovom, većina virusnih infekcija bila je uzrokovana RSV-om za koji su pretpostavili da povećava ekspresiju CD64 na razinu kao i kod bakterijske infekcije.

Rezultati dosadašnjih istraživanja pokazali su da je ekspresija CD11b na neutrofilima tijekom bakterijske infekcije povećana (179, 180), smanjena (178) pa čak i normalna (176, 177). U istraživanjima u kojima je ekspresija CD11b bila povećana, ovaj se biomarker pokazao visoko učinkovitim i obećavajućim dijagnostičkim biomarkerom rano nastale novorođenačke infekcije, a pokazao se i korisnim biomarkerom u diferenciranju bolesnika sa sepsom od onih sa sumnjom na infekciju. Zbog toga je u ovom istraživanju očekivana značajno povećana ekspresija CD11b na površini neutrofila u skupini ispitanika koji su primljeni na bolničko liječene u odnosu na zdrave ispitanike iz kontrolne skupine. Također, očekivala se značajna razlika u ekspresiji CD11b između OBI i VI skupine te da će ovo istraživanje potvrditi učinkovitost CD11b u diferenciranju bakterijske od virusne infekcije. Iznenađujuće, utvrđena je samo značajna razlika između OBI skupine i kontrolnih ispitanika uz AUC od samo 0.59 za dijagnostiku OBI. Imajući sve ovo u vidu, određivanje ekspresije CD11b na staničnoj površini neutrofila i njegova učinkovitost u dijagnostici infekcije i dalje ostaju kontroverznim što zahtjeva nastavak istraživanja.

U istraživanjima kojima je u centru pozornosti bio proces kotrljanja leukocita niz zid krvne žile i njihova adhezija, pokazano je da CD15s i njemu slične skupine koje su eksprimirane na staničnoj

površini leukocita imaju važnu ulogu u inicijalnim zbivanjima ekstravazacije leukocita u tkivo (188, 190). Značajna uloga ovih skupina je i dodatno potvrđena rezultatom istraživanja u kojem njihova ligacija specifičnim protutijelom značajno utječe na funkciju neutrofila. U istom istraživanju, nakon stimulacije s tripeptidom fMLP, nađena je njihova povišena ekspresija na površini neutrofila (207).

Imajući u vidu činjenice da je proizvodnja E-selektina značajno povišena zbog djelovanja upalnih medijatora, činjenicu da je u nekim prijašnjim istraživanjima utvrđena povećana ekspresija CD11b tijekom infekcije, kao i pokazanu povećanu ekspresiju CD15s nakon stimulacije s fMLP, hipoteza ovog istraživanja bila je da će i ekspresija CD15s biti značajno povećana na površini neutrofila tijekom infekcije i da se on može pokazati učinkovitim dijagnostičkim biomarkerom OBI.

Rezultati ovog istraživanja pokazali su statistički značajnu razliku u vrijednostima %CD15s+ i AC-CD15s+ između OBI, VI i kontrolne skupine ($p<0.001$), ali razlika nije utvrđena za intenzitet fluorescencije CD15s. Oboje, i AC-CD15s+ i %CD15s+ pokazali su se učinkovitim biomarkerima za diferencijaciju između bakterijske i virusne infekcije s utvrđenim AUC od 0.75 i AUC od 0.68. Jedan od njih, %CD15s+, čak je pokazan kao značajan prediktor OBI nakon što je napravljen optimalni model za predviđanje OBI. Točnost predloženog modela, koja je kasnije testirana na usporedivoj skupini pacijenata, bila je vrlo dobra i potvrdila je hipotezu da CD15s može imati ulogu učinkovitog biomarkera u detekciji OBI te u diferencijaciji bakterijske od virusne infekcije.

Relativno mali broj ispitanika uključenih u ovo istraživanje usporediv je s drugim sličnim istraživanjima (208). U dijelu ranijih istraživanja preporučeno je da se analiza i određivanje ekspresije biomarkera na staničnoj površini neutrofila učini neposredno nakon uzimanja uzorka krvi, a s ciljem izbjegavanja apoptoze (29). Obzirom da ova analiza zahtjeva specijalne uređaje i stručno osoblje, u ovom trenutku je redovita svakodnevna primjena u kliničkom okružju teško provediva zbog organizacijskih i financijskih poteškoća. Ipak, važno je također istaknuti da su drugi autori utvrdili da je ekspresija CD64 na neutrofilima stabilna više od 30 sati nakon uzimanja uzorka krvi koji će tijekom tog vremena biti pohranjen na sobnoj temperaturi (132, 209, 210), odnosno do 72 sata ako je uzorak krvi pohranjen u hladnjaku (112, 130). Za razliku od stabilne ekspresije CD64, nestabilna ekspresija CD11b je nađena u nekim istraživanjima (209, 210). Upravo zbog toga, a s ciljem izbjegavanja stanične apoptoze što je više moguće, analiza svih uzoraka krvi u ovom istraživanju urađena je unutar 16 sati od uzimanja uzorka krvi. Svi

postupci bili su u skladu s ranije objavljenim protokolom iz istraživanja koje je pokazalo da je određivanje ekspresije CD11b unutar 24 sata od uzimanja uzorka krvi pouzdana metoda čiji su rezultati ponovljivi i provjerljivi (183).

6. ZAKLJUČAK

Najbolji utvrđeni višestruki logistički regresijski model za predikciju postojanja OBI ili VI utvrđen je korištenjem kombinacije %CD15s+, CRP i PCT kao snažnih prediktora i najučinkovitijih biomarkera u dijagnostici OBI u dojenčadi mlađe od 6 mjeseci koja su dovedena na pregled u hitnu pedijatrijsku ambulantu zbog vrućice nepoznatog uzroka.

Osim njih, ABN, CD64 i AC-CD15s+ također su nađeni kao korisni biomarkeri za diferencijaciju bakterijske od virusne infekcije.

Rezultati ovog istraživanja pokazali su po prvi puta da je CD15s učinkoviti biomarker u dijagnostici OBI i u diferenciranju bakterijske od virusne infekcije.

7. SAŽETAK

Rano prepoznavanje ozbiljne bakterijske infekcije (OBI) u djece neophodno je za bolji ishod liječenja. Analiza molekula na staničnoj površini neutrofila protočnom citometrijom se sve češće koristi kao dijagnostička metoda. Cilj istraživanja je bio usporediti učinkovitost i dijagnostičku vrijednost različitih biomarkera u ranoj dijagnostici OBI. Ispitanici su bila dojenčad (n=105) mlađa od 6 mjeseci s vrućicom nepoznatog uzroka koja su hospitalizirana zbog sumnje na OBI te zatim raspodijeljena, temeljem konačne dijagnoze, u skupinu s bakterijskom ili virusnom infekcijom. Šezdestdevetero dojenčadi je uključeno u ishodišnu ispitivanu skupinu, a 36 u validacijsku skupinu. Glavni ishodi istraživanja su bile učinkovitosti različitih biomarkera u dijagnostici OBI te karakteristike modela za diferencijaciju bakterijske od virusne infekcije. Istraživani biomarkeri su bili broj leukocita, apsolutni broj neutrofila (ABN), koncentracija C-reaktivnog proteina (CRP) i prokalcitonina u serumu (CRP), ekspresija CD11b, CD15s i CD64, postotak CD15s pozitivnih neutrofila (%CD15s+) i apsolutni broj CD15 pozitivnih neutrofila (AC-CD15s+). U dojenčadi s OBI, vrijednost %CD15s+ bila je 10.5 puta vjerojatnije veća od granične vrijednosti. ABN, CRP, PCT, CD64 i AC-CD15s+ su također nađeni kao korisni biomarkeri za diferencijaciju bakterijske od virusne infekcije. Najbolji utvrđeni višestruki logistički regresijski model za predikciju postojanja OBI ili VI utvrđen je korištenjem CRP, PCT i %CD15s+ kao značajnih prediktora OBI. Osjetljivost modela (87%), specifičnost (83%), pozitivni (5.11) i negativni (0.16) omjer vjerojatnosti potvrdili su njegovu veliku točnost. Nakon što je model validiran, točnost je ostala velikom: osjetljivost 86%, specifičnost 93% ut pozitivni omjer vjerojatnosti od 12.86, a negativni od 0.15.

THE UTILITY OF LEUCOCYTE CD15s, CD11b AND CD64 ANTIGEN DETERMINATION IN DIAGNOSIS OF SERIOUS BACTERIAL INFECTION IN FEBRILE INFANTS

ABSTRACT

Early recognition of serious bacterial infections (SBI) in children is essential for better treatment outcomes. Flow cytometry analysis of neutrophil surface molecules has been more frequently utilized as a tool for diagnosis of infection. The aim of this study was to compare the diagnostic performance of various biomarkers in early detection of SBI. Infants (n=105) under 6 months of age presenting with fever without apparent source who were hospitalized with suspicion of having SBI, and classified into bacterial or viral infection group based on the final diagnosis. Sixty-nine infants were included into the training and 36 in the validation set. Main outcome measures were predictive model's performance indicators: sensitivity and specificity of differentiation between bacterial and viral infection. Input measures were white blood cells count, absolute neutrophil count (ANC), C-reactive protein (CRP), procalcitonin (PCT), neutrophil CD11b, CD15s and CD64 expression level, percentage (%CD15s+) and the absolute count (AC-CD15s+) of CD15s+ neutrophils. In the infants with SBI, %CD15s+ was 10.5 times more likely to be higher than the cut-off value. ANC, CRP, PCT, CD64, and AC-CD15s+ were also found as useful biomarkers for differentiation between bacterial and viral infection. The-best-fit multivariate logistic regression model included CRP, PCT, and %CD15s+ as significant predictors of SBI. The model's sensitivity (87%), specificity (83%), positive (5.11) and negative (0.16) likelihood ratios indicated high model's accuracy. After model's validation its accuracy maintained high: 86% sensitivity and 93% specificity, while positive and negative likelihood ratios were 12.86 and 0.15, respectively.

8. DODATAK

Detaljniji prikaz statističke analize ispitivanih biomarkera

C-REAKTIVNI PROTEIN

Sample size		69
Positive group :	SKUPINA=1 = 1	39
Area under the ROC curve (AUC)		0,882
Standard Error[a]		0,0391
95% Confidence interval[b]		0,782 to 0,948
z statistic		9,794
Significance level P (Area=0.5)		<0,0001

[a] DeLong i sur., 1988. (211); [b] Binomial exact

Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	95% CI	-LR	95% CI
>=0,1	100,00	91,0 - 100,0	0,00	0,0 - 11,6	1,00			
>1,2	100,00	91,0 - 100,0	40,00	22,7 - 59,4	1,67	1,1 - 2,6	0,00	
>1,5	97,44	86,5 - 99,9	40,00	22,7 - 59,4	1,62	1,0 - 2,5	0,064	0,009 - 0,5
>2,2	97,44	86,5 - 99,9	43,33	25,5 - 62,6	1,72	1,1 - 2,6	0,059	0,008 - 0,4
>2,9	94,87	82,7 - 99,4	43,33	25,5 - 62,6	1,67	1,1 - 2,5	0,12	0,03 - 0,5
>4,7	94,87	82,7 - 99,4	53,33	34,3 - 71,7	2,03	1,4 - 2,9	0,096	0,02 - 0,4
>5,4	92,31	79,1 - 98,4	53,33	34,3 - 71,7	1,98	1,4 - 2,8	0,14	0,05 - 0,5
>7,2	89,74	75,8 - 97,1	56,67	37,4 - 74,5	2,07	1,5 - 2,9	0,18	0,07 - 0,5
>11,3 *	89,74	75,8 - 97,1	73,33	54,1 - 87,7	3,37	2,6 - 4,3	0,14	0,05 - 0,4
>18,2	79,49	63,5 - 90,7	73,33	54,1 - 87,7	2,98	2,3 - 3,9	0,28	0,1 - 0,7
>20,4	79,49	63,5 - 90,7	80,00	61,4 - 92,3	3,97	3,1 - 5,1	0,26	0,10 - 0,7
>21,6	74,36	57,9 - 87,0	80,00	61,4 - 92,3	3,72	2,9 - 4,8	0,32	0,1 - 0,8
>25,1	74,36	57,9 - 87,0	83,33	65,3 - 94,4	4,46	3,5 - 5,7	0,31	0,1 - 0,8
>32,7	66,67	49,8 - 80,9	83,33	65,3 - 94,4	4,00	3,0 - 5,3	0,40	0,2 - 1,0
>32,9	66,67	49,8 - 80,9	86,67	69,3 - 96,2	5,00	3,8 - 6,5	0,38	0,1 - 1,1
>33,4	64,10	47,2 - 78,8	86,67	69,3 - 96,2	4,81	3,7 - 6,3	0,41	0,2 - 1,1
>33,8	64,10	47,2 - 78,8	93,33	77,9 - 99,2	9,62	7,5 - 12,4	0,38	0,09 - 1,6
>39,7	56,41	39,6 - 72,2	93,33	77,9 - 99,2	8,46	6,3 - 11,3	0,47	0,1 - 1,9
>40,1	56,41	39,6 - 72,2	96,67	82,8 - 99,9	16,92	12,7 - 22,5	0,45	0,06 - 3,2
>54,8	41,03	25,6 - 57,9	96,67	82,8 - 99,9	12,31	8,4 - 18,0	0,61	0,09 - 4,3
>57,5	41,03	25,6 - 57,9	100,00	88,4 - 100,0			0,59	
>232,5	0,00	0,0 - 9,0	100,00	88,4 - 100,0			1,00	

* Criterion corresponding with highest Youden index

PROKALCITONIN

Sample size		69
Positive group :	SKUPINA=1 = 1	39
Area under the ROC curve (AUC)		0,864
Standard Error[a]		0,0424
95% Confidence interval[b]		0,760 to 0,935
z statistic		8,584
Significance level P (Area=0.5)		<0,0001

[a] DeLong i sur., 1988. (211); [b] Binomial exact

Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	95% CI	-LR	95% CI
>=0,03	100,00	91,0 - 100,0	0,00	0,0 - 11,6	1,00			
>0,05	100,00	91,0 - 100,0	20,00	7,7 - 38,6	1,25	0,6 - 2,6	0,00	
>0,06	97,44	86,5 - 99,9	23,33	9,9 - 42,3	1,27	0,7 - 2,4	0,11	0,02 - 0,8
>0,07	97,44	86,5 - 99,9	26,67	12,3 - 45,9	1,33	0,7 - 2,4	0,096	0,01 - 0,7
>0,08	94,87	82,7 - 99,4	30,00	14,7 - 49,4	1,36	0,8 - 2,4	0,17	0,04 - 0,7
>0,09	94,87	82,7 - 99,4	33,33	17,3 - 52,8	1,42	0,9 - 2,4	0,15	0,04 - 0,6
>0,1	92,31	79,1 - 98,4	50,00	31,3 - 68,7	1,85	1,3 - 2,7	0,15	0,05 - 0,5
>0,11	89,74	75,8 - 97,1	53,33	34,3 - 71,7	1,92	1,4 - 2,7	0,19	0,07 - 0,5
>0,12	87,18	72,6 - 95,7	53,33	34,3 - 71,7	1,87	1,3 - 2,7	0,24	0,10 - 0,6
>0,13	84,62	69,5 - 94,1	56,67	37,4 - 74,5	1,95	1,4 - 2,7	0,27	0,1 - 0,6
>0,14	82,05	66,5 - 92,5	56,67	37,4 - 74,5	1,89	1,3 - 2,7	0,32	0,1 - 0,7
>0,19	82,05	66,5 - 92,5	73,33	54,1 - 87,7	3,08	2,4 - 4,0	0,24	0,10 - 0,6
>0,22	76,92	60,7 - 88,9	73,33	54,1 - 87,7	2,88	2,2 - 3,8	0,31	0,1 - 0,7
>0,25	76,92	60,7 - 88,9	80,00	61,4 - 92,3	3,85	3,0 - 4,9	0,29	0,1 - 0,7
>0,28	71,79	55,1 - 85,0	80,00	61,4 - 92,3	3,59	2,8 - 4,7	0,35	0,1 - 0,8
>0,29	71,79	55,1 - 85,0	86,67	69,3 - 96,2	5,38	4,2 - 6,9	0,33	0,1 - 0,9
>0,36	66,67	49,8 - 80,9	86,67	69,3 - 96,2	5,00	3,8 - 6,5	0,38	0,1 - 1,1
>0,37 *	66,67	49,8 - 80,9	93,33	77,9 - 99,2	10,00	7,9 - 12,7	0,36	0,09 - 1,5
>0,39	61,54	44,6 - 76,6	93,33	77,9 - 99,2	9,23	7,1 - 12,0	0,41	0,1 - 1,7
>0,55	58,97	42,1 - 74,4	96,67	82,8 - 99,9	17,69	13,5 - 23,2	0,42	0,06 - 3,0
>0,59	58,97	42,1 - 74,4	100,00	88,4 - 100,0			0,41	
>25,68	0,00	0,0 - 9,0	100,00	88,4 - 100,0			1,00	

* Criterion corresponding with highest Youden index

Apsolutni broj CD15s pozitivnih neutrofila

Sample size	69
Positive group : SKUPINA = 1	39
Area under the ROC curve (AUC)	0,751
Standard Error[a]	0,0601
95% Confidence interval[b]	0,633 to 0,848
z statistic	4,181
Significance level P (Area=0.5)	<0,0001

[a] DeLong i sur., 1988. (211); [b] Binomial exact

Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	95% CI	-LR	95% CI
>=0,1484	100,00	91,0 - 100,0	0,00	0,0 - 11,6	1,00			
>0,1484	97,44	86,5 - 99,9	0,00	0,0 - 11,6	0,97			
>1,866	97,44	86,5 - 99,9	33,33	17,3 - 52,8	1,46	0,9 - 2,4	0,077	0,01 - 0,5
>2,0113	94,87	82,7 - 99,4	33,33	17,3 - 52,8	1,42	0,9 - 2,4	0,15	0,04 - 0,6
>2,1655	94,87	82,7 - 99,4	36,67	19,9 - 56,1	1,50	0,9 - 2,4	0,14	0,04 - 0,6
>2,9138	89,74	75,8 - 97,1	36,67	19,9 - 56,1	1,42	0,9 - 2,3	0,28	0,1 - 0,7
>2,9342	89,74	75,8 - 97,1	40,00	22,7 - 59,4	1,50	1,0 - 2,3	0,26	0,10 - 0,7
>3,0613	87,18	72,6 - 95,7	40,00	22,7 - 59,4	1,45	0,9 - 2,3	0,32	0,1 - 0,8
>3,2254	87,18	72,6 - 95,7	50,00	31,3 - 68,7	1,74	1,2 - 2,5	0,26	0,1 - 0,6
>3,7624	82,05	66,5 - 92,5	50,00	31,3 - 68,7	1,64	1,1 - 2,4	0,36	0,2 - 0,8
>4,2995	82,05	66,5 - 92,5	60,00	40,6 - 77,3	2,05	1,5 - 2,8	0,30	0,1 - 0,7
>4,5504	71,79	55,1 - 85,0	60,00	40,6 - 77,3	1,79	1,3 - 2,6	0,47	0,2 - 0,9
>4,6182	71,79	55,1 - 85,0	63,33	43,9 - 80,1	1,96	1,4 - 2,7	0,45	0,2 - 0,9
>4,6797	69,23	52,4 - 83,0	63,33	43,9 - 80,1	1,89	1,3 - 2,7	0,49	0,2 - 0,9
>5,1761	69,23	52,4 - 83,0	70,00	50,6 - 85,3	2,31	1,7 - 3,2	0,44	0,2 - 0,9
>5,3911	66,67	49,8 - 80,9	70,00	50,6 - 85,3	2,22	1,6 - 3,1	0,48	0,2 - 1,0
>5,4735 *	66,67	49,8 - 80,9	76,67	57,7 - 90,1	2,86	2,1 - 3,8	0,43	0,2 - 1,0
>5,6786	61,54	44,6 - 76,6	76,67	57,7 - 90,1	2,64	1,9 - 3,6	0,50	0,2 - 1,1
>5,7782	61,54	44,6 - 76,6	80,00	61,4 - 92,3	3,08	2,3 - 4,2	0,48	0,2 - 1,1
>6,2809	48,72	32,4 - 65,2	80,00	61,4 - 92,3	2,44	1,7 - 3,5	0,64	0,3 - 1,4
>6,4409	48,72	32,4 - 65,2	83,33	65,3 - 94,4	2,92	2,0 - 4,2	0,62	0,3 - 1,4
>8,2739	35,90	21,2 - 52,8	83,33	65,3 - 94,4	2,15	1,4 - 3,4	0,77	0,3 - 1,8
>8,2955	35,90	21,2 - 52,8	86,67	69,3 - 96,2	2,69	1,7 - 4,2	0,74	0,3 - 1,9
>8,3125	33,33	19,1 - 50,2	86,67	69,3 - 96,2	2,50	1,6 - 4,0	0,77	0,3 - 2,0
>8,501	33,33	19,1 - 50,2	90,00	73,5 - 97,9	3,33	2,1 - 5,3	0,74	0,2 - 2,2
>9,4088	28,21	15,0 - 44,9	90,00	73,5 - 97,9	2,82	1,7 - 4,7	0,80	0,3 - 2,4
>9,6226	28,21	15,0 - 44,9	93,33	77,9 - 99,2	4,23	2,5 - 7,0	0,77	0,2 - 3,0
>9,7685	23,08	11,1 - 39,3	93,33	77,9 - 99,2	3,46	1,9 - 6,2	0,82	0,2 - 3,2
>9,8585	23,08	11,1 - 39,3	96,67	82,8 - 99,9	6,92	3,9 - 12,3	0,80	0,1 - 5,5
>11,7903	12,82	4,3 - 27,4	96,67	82,8 - 99,9	3,85	1,7 - 8,7	0,90	0,1 - 6,2
>11,9396	12,82	4,3 - 27,4	100,00	88,4 - 100,0			0,87	
>18,5711	0,00	0,0 - 9,0	100,00	88,4 - 100,0			1,00	

* Criterion corresponding with highest Youden index

Apsolutni broj neutrofila

Sample size	69
Positive group : SKUPINA = 1	39
Area under the ROC curve (AUC)	0,732
Standard Error[a]	0,0620
95% Confidence interval[b]	0,611 to 0,831
z statistic	3,735
Significance level P (Area=0.5)	0,0002

[a] DeLong i sur., 1988. (211); [b] Binomial exact

Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	95% CI	-LR	95% CI
>=29,28	100,00	91,0 - 100,0	0,00	0,0 - 11,6	1,00			
>29,28	100,00	91,0 - 100,0	3,33	0,08 - 17,2	1,03	0,2 - 7,1	0,00	
>38,16	97,44	86,5 - 99,9	3,33	0,08 - 17,2	1,01	0,1 - 6,9	0,77	0,1 - 5,3
>180,48	97,44	86,5 - 99,9	26,67	12,3 - 45,9	1,33	0,7 - 2,4	0,096	0,01 - 0,7
>204,82	94,87	82,7 - 99,4	26,67	12,3 - 45,9	1,29	0,7 - 2,4	0,19	0,05 - 0,8
>262,8	94,87	82,7 - 99,4	33,33	17,3 - 52,8	1,42	0,9 - 2,4	0,15	0,04 - 0,6
>291,2	92,31	79,1 - 98,4	33,33	17,3 - 52,8	1,38	0,8 - 2,3	0,23	0,08 - 0,7
>295,2	92,31	79,1 - 98,4	36,67	19,9 - 56,1	1,46	0,9 - 2,4	0,21	0,07 - 0,6
>327,41	87,18	72,6 - 95,7	36,67	19,9 - 56,1	1,38	0,8 - 2,2	0,35	0,1 - 0,8
>359,58	87,18	72,6 - 95,7	43,33	25,5 - 62,6	1,54	1,0 - 2,4	0,30	0,1 - 0,7
>361,92	84,62	69,5 - 94,1	43,33	25,5 - 62,6	1,49	1,0 - 2,3	0,36	0,2 - 0,8
>366,25	84,62	69,5 - 94,1	46,67	28,3 - 65,7	1,59	1,1 - 2,4	0,33	0,1 - 0,7
>377,75	82,05	66,5 - 92,5	46,67	28,3 - 65,7	1,54	1,0 - 2,3	0,38	0,2 - 0,8
>419,07	82,05	66,5 - 92,5	53,33	34,3 - 71,7	1,76	1,2 - 2,5	0,34	0,2 - 0,7
>441,48	79,49	63,5 - 90,7	53,33	34,3 - 71,7	1,70	1,2 - 2,5	0,38	0,2 - 0,8
>443,7	79,49	63,5 - 90,7	56,67	37,4 - 74,5	1,83	1,3 - 2,6	0,36	0,2 - 0,8
>475,52	74,36	57,9 - 87,0	56,67	37,4 - 74,5	1,72	1,2 - 2,5	0,45	0,2 - 0,9
>492,87	74,36	57,9 - 87,0	63,33	43,9 - 80,1	2,03	1,5 - 2,8	0,40	0,2 - 0,8
>493	71,79	55,1 - 85,0	63,33	43,9 - 80,1	1,96	1,4 - 2,7	0,45	0,2 - 0,9
>520,26	71,79	55,1 - 85,0	66,67	47,2 - 82,7	2,15	1,6 - 3,0	0,42	0,2 - 0,9
>526,4	69,23	52,4 - 83,0	66,67	47,2 - 82,7	2,08	1,5 - 2,9	0,46	0,2 - 0,9
>561,6 *	69,23	52,4 - 83,0	73,33	54,1 - 87,7	2,60	1,9 - 3,5	0,42	0,2 - 0,9
>644,15	58,97	42,1 - 74,4	73,33	54,1 - 87,7	2,21	1,6 - 3,1	0,56	0,3 - 1,1
>646,98	58,97	42,1 - 74,4	76,67	57,7 - 90,1	2,53	1,8 - 3,5	0,54	0,3 - 1,1
>717	43,59	27,8 - 60,4	76,67	57,7 - 90,1	1,87	1,2 - 2,8	0,74	0,4 - 1,5
>736,95	43,59	27,8 - 60,4	80,00	61,4 - 92,3	2,18	1,5 - 3,2	0,71	0,3 - 1,5
>786,1	41,03	25,6 - 57,9	80,00	61,4 - 92,3	2,05	1,4 - 3,1	0,74	0,3 - 1,6
>837,08	41,03	25,6 - 57,9	86,67	69,3 - 96,2	3,08	2,1 - 4,6	0,68	0,3 - 1,8
>965,58	28,21	15,0 - 44,9	86,67	69,3 - 96,2	2,12	1,3 - 3,6	0,83	0,3 - 2,1
>985,92	28,21	15,0 - 44,9	90,00	73,5 - 97,9	2,82	1,7 - 4,7	0,80	0,3 - 2,4
>990,72	25,64	13,0 - 42,1	90,00	73,5 - 97,9	2,56	1,5 - 4,4	0,83	0,3 - 2,5
>992,8	25,64	13,0 - 42,1	93,33	77,9 - 99,2	3,85	2,2 - 6,6	0,80	0,2 - 3,1
>1174,8	15,38	5,9 - 30,5	93,33	77,9 - 99,2	2,31	1,1 - 4,8	0,91	0,2 - 3,5
>1263,15	15,38	5,9 - 30,5	100,00	88,4 - 100,0			0,85	
>1872,09	0,00	0,0 - 9,0	100,00	88,4 - 100,0			1,00	

* Criterion corresponding with highest Youden indeks

CD64

Sample size		69
Positive group :	SKUPINA=1 = 1	39
Area under the ROC curve (AUC)		0,711
Standard Error[a]		0,0620
95% Confidence interval[b]		0,589 to 0,814
z statistic		3,400
Significance level P (Area=0.5)		0,0007

[a] DeLong i sur., 1988. (211); [b] Binomial exact

Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	95% CI	-LR	95% CI
>=1,2	100,00	91,0 - 100,0	0,00	0,0 - 11,6	1,00			
>1,28	100,00	91,0 - 100,0	6,67	0,8 - 22,1	1,07	0,3 - 4,1	0,00	
>1,43	97,44	86,5 - 99,9	6,67	0,8 - 22,1	1,04	0,3 - 4,0	0,38	0,06 - 2,7
>1,45	97,44	86,5 - 99,9	10,00	2,1 - 26,5	1,08	0,4 - 3,2	0,26	0,04 - 1,8
>1,47	94,87	82,7 - 99,4	10,00	2,1 - 26,5	1,05	0,4 - 3,1	0,51	0,1 - 2,0
>1,5	94,87	82,7 - 99,4	13,33	3,8 - 30,7	1,09	0,4 - 2,7	0,38	0,10 - 1,5
>1,51	92,31	79,1 - 98,4	13,33	3,8 - 30,7	1,07	0,4 - 2,7	0,58	0,2 - 1,7
>1,61	92,31	79,1 - 98,4	16,67	5,6 - 34,7	1,11	0,5 - 2,5	0,46	0,2 - 1,4
>1,73	89,74	75,8 - 97,1	16,67	5,6 - 34,7	1,08	0,5 - 2,4	0,62	0,2 - 1,6
>1,99	89,74	75,8 - 97,1	33,33	17,3 - 52,8	1,35	0,8 - 2,3	0,31	0,1 - 0,8
>2,12	84,62	69,5 - 94,1	33,33	17,3 - 52,8	1,27	0,8 - 2,1	0,46	0,2 - 1,0
>2,13	82,05	66,5 - 92,5	36,67	19,9 - 56,1	1,30	0,8 - 2,1	0,49	0,2 - 1,0
>2,22	82,05	66,5 - 92,5	43,33	25,5 - 62,6	1,45	0,9 - 2,2	0,41	0,2 - 0,9
>2,24	76,92	60,7 - 88,9	43,33	25,5 - 62,6	1,36	0,9 - 2,1	0,53	0,3 - 1,0
>2,25	76,92	60,7 - 88,9	46,67	28,3 - 65,7	1,44	0,9 - 2,2	0,49	0,3 - 1,0
>2,28	69,23	52,4 - 83,0	46,67	28,3 - 65,7	1,30	0,8 - 2,0	0,66	0,4 - 1,2
>2,33	69,23	52,4 - 83,0	60,00	40,6 - 77,3	1,73	1,2 - 2,5	0,51	0,3 - 1,0
>2,37	64,10	47,2 - 78,8	63,33	43,9 - 80,1	1,75	1,2 - 2,5	0,57	0,3 - 1,1
>2,43 *	64,10	47,2 - 78,8	76,67	57,7 - 90,1	2,75	2,0 - 3,7	0,47	0,2 - 1,0
>2,64	53,85	37,2 - 69,9	76,67	57,7 - 90,1	2,31	1,6 - 3,3	0,60	0,3 - 1,3
>2,65	53,85	37,2 - 69,9	80,00	61,4 - 92,3	2,69	1,9 - 3,8	0,58	0,3 - 1,3
>2,66	51,28	34,8 - 67,6	80,00	61,4 - 92,3	2,56	1,8 - 3,7	0,61	0,3 - 1,3
>2,68	51,28	34,8 - 67,6	83,33	65,3 - 94,4	3,08	2,2 - 4,3	0,58	0,2 - 1,4
>2,83	41,03	25,6 - 57,9	83,33	65,3 - 94,4	2,46	1,6 - 3,7	0,71	0,3 - 1,6
>2,92	41,03	25,6 - 57,9	90,00	73,5 - 97,9	4,10	2,8 - 6,1	0,66	0,2 - 2,0
>3,05	30,77	17,0 - 47,6	90,00	73,5 - 97,9	3,08	1,9 - 5,0	0,77	0,3 - 2,3
>3,19	30,77	17,0 - 47,6	93,33	77,9 - 99,2	4,62	2,9 - 7,5	0,74	0,2 - 2,9
>3,32	28,21	15,0 - 44,9	93,33	77,9 - 99,2	4,23	2,5 - 7,0	0,77	0,2 - 3,0
>3,48	28,21	15,0 - 44,9	100,00	88,4 - 100,0			0,72	
>8,25	0,00	0,0 - 9,0	100,00	88,4 - 100,0			1,00	

* Criterion corresponding with highest Youden index

Postotak CD15s pozitivnih neutrofila

Sample size		69
Positive group :	SKUPINA=1 = 1	39
Area under the ROC curve (AUC)		0,682
Standard Error[a]		0,0677
95% Confidence interval[b]		0,559 to 0,789
z statistic		2,688
Significance level P (Area=0.5)		0,0072

[a] DeLong i sur., 1988. (211); [b] Binomial exact

Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	95% CI	-LR	95% CI
>=38,9	100,00	91,0 - 100,0	0,00	0,0 - 11,6	1,00			
>38,9	97,44	86,5 - 99,9	0,00	0,0 - 11,6	0,97			
>71,8	97,44	86,5 - 99,9	16,67	5,6 - 34,7	1,17	0,5 - 2,6	0,15	0,02 - 1,1
>75,2	94,87	82,7 - 99,4	16,67	5,6 - 34,7	1,14	0,5 - 2,5	0,31	0,08 - 1,2
>82,4	94,87	82,7 - 99,4	40,00	22,7 - 59,4	1,58	1,0 - 2,5	0,13	0,03 - 0,5
>84,4	89,74	75,8 - 97,1	40,00	22,7 - 59,4	1,50	1,0 - 2,3	0,26	0,10 - 0,7
>84,6 *	89,74	75,8 - 97,1	46,67	28,3 - 65,7	1,68	1,1 - 2,5	0,22	0,08 - 0,6
>85,8	84,62	69,5 - 94,1	46,67	28,3 - 65,7	1,59	1,1 - 2,4	0,33	0,1 - 0,7
>86,5	84,62	69,5 - 94,1	50,00	31,3 - 68,7	1,69	1,2 - 2,5	0,31	0,1 - 0,7
>87,1	82,05	66,5 - 92,5	50,00	31,3 - 68,7	1,64	1,1 - 2,4	0,36	0,2 - 0,8
>87,4	82,05	66,5 - 92,5	53,33	34,3 - 71,7	1,76	1,2 - 2,5	0,34	0,2 - 0,7
>89,2	71,79	55,1 - 85,0	53,33	34,3 - 71,7	1,54	1,0 - 2,3	0,53	0,3 - 1,0
>90,5	71,79	55,1 - 85,0	60,00	40,6 - 77,3	1,79	1,3 - 2,6	0,47	0,2 - 0,9
>91,6	69,23	52,4 - 83,0	60,00	40,6 - 77,3	1,73	1,2 - 2,5	0,51	0,3 - 1,0
>92	69,23	52,4 - 83,0	63,33	43,9 - 80,1	1,89	1,3 - 2,7	0,49	0,2 - 0,9
>93	56,41	39,6 - 72,2	63,33	43,9 - 80,1	1,54	1,0 - 2,3	0,69	0,4 - 1,2
>93,1	56,41	39,6 - 72,2	66,67	47,2 - 82,7	1,69	1,2 - 2,5	0,65	0,4 - 1,2
>93,5	48,72	32,4 - 65,2	66,67	47,2 - 82,7	1,46	1,0 - 2,2	0,77	0,4 - 1,4
>93,6	48,72	32,4 - 65,2	70,00	50,6 - 85,3	1,62	1,1 - 2,4	0,73	0,4 - 1,4
>94,5	41,03	25,6 - 57,9	70,00	50,6 - 85,3	1,37	0,9 - 2,1	0,84	0,5 - 1,5
>94,6	41,03	25,6 - 57,9	73,33	54,1 - 87,7	1,54	1,0 - 2,4	0,80	0,4 - 1,5
>95,5	38,46	23,4 - 55,4	73,33	54,1 - 87,7	1,44	0,9 - 2,3	0,84	0,4 - 1,6
>95,6	38,46	23,4 - 55,4	76,67	57,7 - 90,1	1,65	1,1 - 2,6	0,80	0,4 - 1,6
>96,4	35,90	21,2 - 52,8	76,67	57,7 - 90,1	1,54	1,0 - 2,4	0,84	0,4 - 1,7
>96,9	33,33	19,1 - 50,2	80,00	61,4 - 92,3	1,67	1,0 - 2,7	0,83	0,4 - 1,8
>97,3	28,21	15,0 - 44,9	80,00	61,4 - 92,3	1,41	0,8 - 2,4	0,90	0,4 - 1,9
>97,4	25,64	13,0 - 42,1	83,33	65,3 - 94,4	1,54	0,9 - 2,7	0,89	0,4 - 2,0
>97,6	25,64	13,0 - 42,1	90,00	73,5 - 97,9	2,56	1,5 - 4,4	0,83	0,3 - 2,5
>97,7	23,08	11,1 - 39,3	90,00	73,5 - 97,9	2,31	1,3 - 4,1	0,85	0,3 - 2,5
>97,9	23,08	11,1 - 39,3	93,33	77,9 - 99,2	3,46	1,9 - 6,2	0,82	0,2 - 3,2
>99	12,82	4,3 - 27,4	93,33	77,9 - 99,2	1,92	0,8 - 4,4	0,93	0,2 - 3,6
>99,1	7,69	1,6 - 20,9	96,67	82,8 - 99,9	2,31	0,8 - 6,9	0,95	0,1 - 6,6
>99,2	5,13	0,6 - 17,3	96,67	82,8 - 99,9	1,54	0,4 - 5,9	0,98	0,1 - 6,8
>99,3	5,13	0,6 - 17,3	100,00	88,4 - 100,0			0,95	
>99,8	0,00	0,0 - 9,0	100,00	88,4 - 100,0			1,00	

* Criterion corresponding with highest Youden index

.

CD11b

Sample size		69
Positive group :	SKUPINA=1 = 1	39
Area under the ROC curve (AUC)		0,592
Standard Error[a]		0,0717
95% Confidence interval[b]		0,467 to 0,709
z statistic		1,287
Significance level P (Area=0.5)		0,1981

[a] DeLong i sur., 1988. (211); [b] Binomial exact

Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	95% CI	-LR	95% CI
>=0,926	100,00	91,0 - 100,0	0,00	0,0 - 11,6	1,00			
>0,926	97,44	86,5 - 99,9	0,00	0,0 - 11,6	0,97			
>1,17	97,44	86,5 - 99,9	13,33	3,8 - 30,7	1,12	0,5 - 2,8	0,19	0,03 - 1,3
>1,23	92,31	79,1 - 98,4	13,33	3,8 - 30,7	1,07	0,4 - 2,7	0,58	0,2 - 1,7
>1,39 *	92,31	79,1 - 98,4	33,33	17,3 - 52,8	1,38	0,8 - 2,3	0,23	0,08 - 0,7
>1,56	84,62	69,5 - 94,1	33,33	17,3 - 52,8	1,27	0,8 - 2,1	0,46	0,2 - 1,0
>1,57	84,62	69,5 - 94,1	40,00	22,7 - 59,4	1,41	0,9 - 2,2	0,38	0,2 - 0,8
>1,69	69,23	52,4 - 83,0	40,00	22,7 - 59,4	1,15	0,7 - 1,9	0,77	0,4 - 1,3
>1,7	69,23	52,4 - 83,0	43,33	25,5 - 62,6	1,22	0,8 - 1,9	0,71	0,4 - 1,2
>1,72	66,67	49,8 - 80,9	43,33	25,5 - 62,6	1,18	0,7 - 1,9	0,77	0,4 - 1,3
>1,74	64,10	47,2 - 78,8	50,00	31,3 - 68,7	1,28	0,8 - 2,0	0,72	0,4 - 1,2
>1,75	61,54	44,6 - 76,6	53,33	34,3 - 71,7	1,32	0,9 - 2,0	0,72	0,4 - 1,3
>1,76	58,97	42,1 - 74,4	53,33	34,3 - 71,7	1,26	0,8 - 1,9	0,77	0,4 - 1,3
>1,78	56,41	39,6 - 72,2	56,67	37,4 - 74,5	1,30	0,9 - 2,0	0,77	0,4 - 1,3
>1,79	53,85	37,2 - 69,9	56,67	37,4 - 74,5	1,24	0,8 - 1,9	0,81	0,5 - 1,4
>1,8	51,28	34,8 - 67,6	60,00	40,6 - 77,3	1,28	0,8 - 2,0	0,81	0,5 - 1,4
>1,86	35,90	21,2 - 52,8	60,00	40,6 - 77,3	0,90	0,5 - 1,5	1,07	0,6 - 1,8
>1,9	35,90	21,2 - 52,8	70,00	50,6 - 85,3	1,20	0,7 - 1,9	0,92	0,5 - 1,7
>1,95	33,33	19,1 - 50,2	70,00	50,6 - 85,3	1,11	0,7 - 1,8	0,95	0,5 - 1,7
>1,98	33,33	19,1 - 50,2	76,67	57,7 - 90,1	1,43	0,9 - 2,3	0,87	0,4 - 1,7
>2,03	30,77	17,0 - 47,6	76,67	57,7 - 90,1	1,32	0,8 - 2,2	0,90	0,5 - 1,8
>2,07	28,21	15,0 - 44,9	80,00	61,4 - 92,3	1,41	0,8 - 2,4	0,90	0,4 - 1,9
>2,09	28,21	15,0 - 44,9	83,33	65,3 - 94,4	1,69	1,0 - 2,9	0,86	0,4 - 2,0
>2,1	25,64	13,0 - 42,1	83,33	65,3 - 94,4	1,54	0,9 - 2,7	0,89	0,4 - 2,0
>2,15	25,64	13,0 - 42,1	90,00	73,5 - 97,9	2,56	1,5 - 4,4	0,83	0,3 - 2,5
>2,56	7,69	1,6 - 20,9	90,00	73,5 - 97,9	0,77	0,3 - 2,3	1,03	0,3 - 3,0
>2,57	7,69	1,6 - 20,9	93,33	77,9 - 99,2	1,15	0,4 - 3,4	0,99	0,3 - 3,8
>2,66	0,00	0,0 - 9,0	93,33	77,9 - 99,2	0,00		1,07	0,3 - 4,1
>3,13	0,00	0,0 - 9,0	100,00	88,4 - 100,0			1,00	

* Criterion corresponding with highest Youden index

CD15s

Sample size		69
Positive group :	SKUPINA=1 = 1	39
Area under the ROC curve (AUC)		0,535
Standard Error[a]		0,0713
95% Confidence interval[b]		0,410 to 0,656
z statistic		0,486
Significance level P (Area=0.5)		0,6271

[a] DeLong i sur., 1988.(211); [b] Binomial exact

Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	95% CI	-LR	95% CI
< 1	0,00	0,0 - 9,0	100,00	88,4 - 100,0			1,00	
<=1	2,56	0,06 - 13,5	100,00	88,4 - 100,0			0,97	
<=1,02	2,56	0,06 - 13,5	96,67	82,8 - 99,9	0,77	0,1 - 5,3	1,01	0,1 - 6,9
<=1,48	10,26	2,9 - 24,2	96,67	82,8 - 99,9	3,08	1,2 - 7,8	0,93	0,1 - 6,4
<=1,64	10,26	2,9 - 24,2	93,33	77,9 - 99,2	1,54	0,6 - 3,9	0,96	0,3 - 3,7
<=1,66	12,82	4,3 - 27,4	93,33	77,9 - 99,2	1,92	0,8 - 4,4	0,93	0,2 - 3,6
<=1,71	15,38	5,9 - 30,5	90,00	73,5 - 97,9	1,54	0,7 - 3,2	0,94	0,3 - 2,8
<=1,87	20,51	9,3 - 36,5	90,00	73,5 - 97,9	2,05	1,1 - 3,8	0,88	0,3 - 2,6
<=1,97	20,51	9,3 - 36,5	86,67	69,3 - 96,2	1,54	0,8 - 2,9	0,92	0,4 - 2,3
<=2,08	23,08	11,1 - 39,3	86,67	69,3 - 96,2	1,73	1,0 - 3,1	0,89	0,4 - 2,2
<=2,22	23,08	11,1 - 39,3	80,00	61,4 - 92,3	1,15	0,6 - 2,1	0,96	0,5 - 2,0
<=2,26	25,64	13,0 - 42,1	80,00	61,4 - 92,3	1,28	0,7 - 2,3	0,93	0,4 - 1,9
<=2,29	28,21	15,0 - 44,9	76,67	57,7 - 90,1	1,21	0,7 - 2,1	0,94	0,5 - 1,8
<=2,43	28,21	15,0 - 44,9	73,33	54,1 - 87,7	1,06	0,6 - 1,8	0,98	0,5 - 1,8
<=2,53	33,33	19,1 - 50,2	73,33	54,1 - 87,7	1,25	0,8 - 2,0	0,91	0,5 - 1,7
<=2,59	33,33	19,1 - 50,2	70,00	50,6 - 85,3	1,11	0,7 - 1,8	0,95	0,5 - 1,7
<=2,63	35,90	21,2 - 52,8	70,00	50,6 - 85,3	1,20	0,7 - 1,9	0,92	0,5 - 1,7
<=2,78	35,90	21,2 - 52,8	60,00	40,6 - 77,3	0,90	0,5 - 1,5	1,07	0,6 - 1,8
<=2,81	38,46	23,4 - 55,4	56,67	37,4 - 74,5	0,89	0,5 - 1,5	1,09	0,7 - 1,8
<=2,86	38,46	23,4 - 55,4	53,33	34,3 - 71,7	0,82	0,5 - 1,4	1,15	0,7 - 1,8
<=2,94	43,59	27,8 - 60,4	53,33	34,3 - 71,7	0,93	0,6 - 1,5	1,06	0,7 - 1,7
<=2,96	43,59	27,8 - 60,4	50,00	31,3 - 68,7	0,87	0,5 - 1,4	1,13	0,7 - 1,8
<=3,2	64,10	47,2 - 78,8	50,00	31,3 - 68,7	1,28	0,8 - 2,0	0,72	0,4 - 1,2
<=3,37	64,10	47,2 - 78,8	46,67	28,3 - 65,7	1,20	0,8 - 1,9	0,77	0,4 - 1,3
<=3,49	66,67	49,8 - 80,9	46,67	28,3 - 65,7	1,25	0,8 - 1,9	0,71	0,4 - 1,2
<=3,51	66,67	49,8 - 80,9	43,33	25,5 - 62,6	1,18	0,7 - 1,9	0,77	0,4 - 1,3
<=3,53	69,23	52,4 - 83,0	43,33	25,5 - 62,6	1,22	0,8 - 1,9	0,71	0,4 - 1,2
<=3,61	69,23	52,4 - 83,0	40,00	22,7 - 59,4	1,15	0,7 - 1,9	0,77	0,4 - 1,3
<=3,66 *	74,36	57,9 - 87,0	40,00	22,7 - 59,4	1,24	0,8 - 2,0	0,64	0,3 - 1,2
<=4,17	74,36	57,9 - 87,0	26,67	12,3 - 45,9	1,01	0,5 - 1,9	0,96	0,5 - 1,7
<=4,22	76,92	60,7 - 88,9	26,67	12,3 - 45,9	1,05	0,6 - 1,9	0,87	0,5 - 1,6
<=4,69	76,92	60,7 - 88,9	20,00	7,7 - 38,6	0,96	0,5 - 2,0	1,15	0,6 - 2,1
<=4,89	87,18	72,6 - 95,7	20,00	7,7 - 38,6	1,09	0,5 - 2,3	0,64	0,3 - 1,5
<=5,77	87,18	72,6 - 95,7	10,00	2,1 - 26,5	0,97	0,3 - 2,9	1,28	0,6 - 2,9
<=5,97	92,31	79,1 - 98,4	10,00	2,1 - 26,5	1,03	0,3 - 3,0	0,77	0,3 - 2,3
<=6,46	92,31	79,1 - 98,4	3,33	0,08 - 17,2	0,95	0,1 - 6,6	2,31	0,8 - 6,9
<=6,97	97,44	86,5 - 99,9	3,33	0,08 - 17,2	1,01	0,1 - 6,9	0,77	0,1 - 5,3
<=7,17	97,44	86,5 - 99,9	0,00	0,0 - 11,6	0,97			
<=14,4	100,00	91,0 - 100,0	0,00	0,0 - 11,6	1,00			

* Criterion corresponding with highest Youden index

Broj leukocita

Sample size		69
Positive group :	SKUPINA=1 = 1	39

Area under the ROC curve (AUC)	0,620
Standard Error[a]	0,0683
95% Confidence interval[b]	0,495 to 0,734
z statistic	1,758
Significance level P (Area=0.5)	0,0788

[a] DeLong i sur., 1988.(211); [b] Binomial exact

Criterion values and coordinates of the ROC curve

Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	95% CI	-LR	95% CI
>=3,61	100,00	91,0 - 100,0	0,00	0,0 - 11,6	1,00			
>4,31	100,00	91,0 - 100,0	10,00	2,1 - 26,5	1,11	0,4 - 3,3	0,00	
>4,77	97,44	86,5 - 99,9	10,00	2,1 - 26,5	1,08	0,4 - 3,2	0,26	0,04 - 1,8
>6,87	97,44	86,5 - 99,9	13,33	3,8 - 30,7	1,12	0,5 - 2,8	0,19	0,03 - 1,3
>7,54	92,31	79,1 - 98,4	13,33	3,8 - 30,7	1,07	0,4 - 2,7	0,58	0,2 - 1,7
>8,45	92,31	79,1 - 98,4	20,00	7,7 - 38,6	1,15	0,6 - 2,4	0,38	0,1 - 1,2
>8,49	89,74	75,8 - 97,1	20,00	7,7 - 38,6	1,12	0,5 - 2,3	0,51	0,2 - 1,3
>8,76	89,74	75,8 - 97,1	23,33	9,9 - 42,3	1,17	0,6 - 2,3	0,44	0,2 - 1,1
>9,31	87,18	72,6 - 95,7	23,33	9,9 - 42,3	1,14	0,6 - 2,2	0,55	0,2 - 1,3
>9,36	87,18	72,6 - 95,7	26,67	12,3 - 45,9	1,19	0,6 - 2,2	0,48	0,2 - 1,1
>9,91	79,49	63,5 - 90,7	26,67	12,3 - 45,9	1,08	0,6 - 2,0	0,77	0,4 - 1,5
>10,46	79,49	63,5 - 90,7	33,33	17,3 - 52,8	1,19	0,7 - 2,0	0,62	0,3 - 1,2
>11,23	69,23	52,4 - 83,0	33,33	17,3 - 52,8	1,04	0,6 - 1,8	0,92	0,5 - 1,6
>11,28	69,23	52,4 - 83,0	36,67	19,9 - 56,1	1,09	0,7 - 1,8	0,84	0,5 - 1,4
>11,95	61,54	44,6 - 76,6	36,67	19,9 - 56,1	0,97	0,6 - 1,7	1,05	0,6 - 1,7
>14,11	61,54	44,6 - 76,6	63,33	43,9 - 80,1	1,68	1,2 - 2,4	0,61	0,3 - 1,1
>14,27	58,97	42,1 - 74,4	63,33	43,9 - 80,1	1,61	1,1 - 2,3	0,65	0,4 - 1,2
>14,45 *	58,97	42,1 - 74,4	66,67	47,2 - 82,7	1,77	1,2 - 2,5	0,62	0,3 - 1,2
>14,51	51,28	34,8 - 67,6	66,67	47,2 - 82,7	1,54	1,0 - 2,3	0,73	0,4 - 1,3
>14,65	48,72	32,4 - 65,2	70,00	50,6 - 85,3	1,62	1,1 - 2,4	0,73	0,4 - 1,4
>14,76	48,72	32,4 - 65,2	73,33	54,1 - 87,7	1,83	1,2 - 2,7	0,70	0,4 - 1,4
>15,11	46,15	30,1 - 62,8	73,33	54,1 - 87,7	1,73	1,2 - 2,6	0,73	0,4 - 1,4
>15,43	46,15	30,1 - 62,8	76,67	57,7 - 90,1	1,98	1,3 - 2,9	0,70	0,3 - 1,4
>15,7	38,46	23,4 - 55,4	76,67	57,7 - 90,1	1,65	1,1 - 2,6	0,80	0,4 - 1,6
>15,8	38,46	23,4 - 55,4	83,33	65,3 - 94,4	2,31	1,5 - 3,5	0,74	0,3 - 1,7
>17,8	28,21	15,0 - 44,9	83,33	65,3 - 94,4	1,69	1,0 - 2,9	0,86	0,4 - 2,0
>17,99	28,21	15,0 - 44,9	86,67	69,3 - 96,2	2,12	1,3 - 3,6	0,83	0,3 - 2,1
>18,32	23,08	11,1 - 39,3	86,67	69,3 - 96,2	1,73	1,0 - 3,1	0,89	0,4 - 2,2
>18,58	23,08	11,1 - 39,3	90,00	73,5 - 97,9	2,31	1,3 - 4,1	0,85	0,3 - 2,5
>18,76	20,51	9,3 - 36,5	90,00	73,5 - 97,9	2,05	1,1 - 3,8	0,88	0,3 - 2,6
>20,05	20,51	9,3 - 36,5	96,67	82,8 - 99,9	6,15	3,3 - 11,5	0,82	0,1 - 5,7
>23,02	7,69	1,6 - 20,9	96,67	82,8 - 99,9	2,31	0,8 - 6,9	0,95	0,1 - 6,6
>23,47	7,69	1,6 - 20,9	100,00	88,4 - 100,0			0,92	
>30,69	0,00	0,0 - 9,0	100,00	88,4 - 100,0			1,00	

* Criterion corresponding with highest Youden index

9. POPIS LITERATURE

1 Baraff L, Bass J, Fleisher G*, et al.* Practice Guideline For The Management Of Infants And Children 0 To 36 Months Of Age With Fever Without Source. *Pediatrics*. 1993; **92**: 1-12.

2 Soman M. Characteristics and management of febrile young-children seen in a University family-practice. *Journal of Family Practice*. 1985; **21**: 117-22.

3 Vorwerk C, Manias K, Davies F, Coats T. Prediction of severe bacterial infection in children with an emergency department diagnosis of infection. *Emergency Medicine Journal*. 2011; **28**: 948-51.

4 Bachur R, Harper M. Predictive model for serious bacterial infections among infants younger than 3 months of age. *Pediatrics*. 2001; **108**: 311-16.

5 Trautner B, Caviness A, Gerlacher G, Demmler G, Macias C. Prospective evaluation of the risk of serious bacterial infection in children who present to the emergency department with hyperpyrexia (temperature of 106 degrees F or higher). *Pediatrics*. 2006; **118**: 34-40.

6 Kumar A, Roberts D, Wood K*, et al.* Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Critical Care Medicine*. 2006; **34**: 1589-96.

7 Dellinger R, Levy M, Carlet J*, et al.* Surviving Sepsis Campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Critical Care Medicine*. 2008; **36**: 296-327.

8 Hoffmann J. Neutrophil CD64: a diagnostic marker for infection and sepsis. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2009; **47**: 903-16.

9 Stocker M, Hop W, van Rossum A. Neonatal Procalcitonin Intervention Study (NeoPInS): 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**.

10 Levy M, Fink M, Marshall J*, et al.* 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Critical Care Medicine*. 2003; **31**: 1250-56.

11 Olaciregui I, Hernandez U, Munoz J, Emparanza J, Landa J. Markers that predict serious bacterial infection in infants under 3 months of age presenting with fever of unknown origin. *Archives of Disease in Childhood*. 2009; **94**: 501-05.

12 Brent A, Lakhanpaul M, Thompson M*, et al.* Risk score to stratify children with suspected serious bacterial infection: observational cohort study. *Archives of Disease in Childhood*. 2011; **96**: 361-U182.

13 Berkley J, Lowe B, Mwangi I*, et al.* Bacteremia among children admitted to a rural hospital in Kenya. *New England Journal of Medicine*. 2005; **352**: 39-47.

14 Pearson G (ed). *Why Children Die: A Pilot Study 2006; England (South West, North East and West Midlands), Wales and Northern Ireland.* London: CEMACH 2008.

15 Thompson M, Ninis N, Perera R*, et al.* Clinical recognition of meningococcal disease in children and adolescents. *Lancet*. 2006; **367**: 397-403.

16 Angus D, Linde-Zwirble W, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky M. Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Critical Care Medicine*. 2001; **29**: 1303-10.

17 Bilavsky E, Yarden-Bilavsky H, Ashkenazi S, Amir J. C-reactive protein as a marker of serious bacterial infections in hospitalized febrile infants. *Acta Paediatrica*. 2009; **98**: 1776-80.

18 Huppler AR, Eickhoff JC, Wald ER. Performance of low-risk criteria in the evaluation of young infants with fever: review of the literature. *Pediatrics*. 2010; **125**: 228-33.

19 Ashkenazi-Hoffnung L, Livni G, Amir J, Bilavsky E. Serious bacterial infections in hospitalized febrile infants aged 90 days or younger: The traditional combination of ampicillin and gentamicin is still appropriate. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 2011; **43**: 489-94.

20 Gajdos V, L'Helias L, Mollet-Boudjemline A, Perreaux E, Trioche P, Labrune P. Factors predicting serious bacterial infections in febrile infants less than three months old: multivariate analysis. *Archives De Pediatrie*. 2005; **12**: 397-403.

21 Lacour A, Gervaix A, Zamora S*, et al.* Procalcitonin, IL-6, IL-8, IL-1 receptor antagonist and C-reactive protein as identificators of serious bacterial infections in children with fever without localising signs. *European Journal of Pediatrics*. 2001; **160**: 95-100.

22 Galetto-Lacour A, Zamora S, Gervaix A. Bedside procalcitonin and C-reactive protein tests in children with fever without localizing signs of infection seen in a referral center. *Pediatrics*. 2003; **112**: 1054-60.

23 Andreola B, Bressan S, Callegaro S, Liverani A, Plebani M, Da Dalt L. Procalcitonin and C-reactive protein as diagnostic markers of severe bacterial infections in febrile infants and children in the emergency department. *Pediatr Infect Dis J*. 2007; **26**: 672-7.

24 Isaacman D, Burke B. Utility of the serum C-reactive protein for detection of occult bacterial infection in children. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*. 2002; **156**: 905-09.

25 Brauner M, Goldman M, Kozer E. Extreme leucocytosis and the risk of serious bacterial infections in febrile children. *Archives of Disease in Childhood*. 2010; **95**: 209-13.

26 Girodias JB, Bailey B. Approach to the febrile child: A challenge bridging the gap between the literature and clinical practice. *Paediatr Child Health*. 2003; **8**: 76-82.

27 Baraff L. Management of fever without source in infants and children. *Annals of Emergency Medicine*. 2000; **36**: 602-14.

28 Committee ACoEPCP, Fever. ACoEPCPSoP. Clinical policy for children younger than three years presenting to the emergency department with fever. *Annals of Emergency Medicine*. 2003; **42**: 530-45.

29 Ng P, Lam H. Diagnostic markers for neonatal sepsis. *Current Opinion in Pediatrics*. 2006; **18**: 125-31.

30 Giamarellos-Bourboulis E, Giannopoulou P, Grecka P, Voros D, Mandragos K, Giamarellou H. Should procalcitonin be introduced in the diagnostic criteria for the systemic inflammatory response syndrome and sepsis? *Journal of Critical Care*. 2004; **19**: 152-57.

31 Atkinson A, Colburn W, DeGruttola V*, et al.* Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2001; **69**: 89-95.

32 Standage S, Wong H. Biomarkers for pediatric sepsis and septic shock. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 2011; **9**: 71-79.

33 Marshall J, Reinhart K, Forum IS. Biomarkers of sepsis. *Critical Care Medicine*. 2009; **37**: 2290-98.

34 Kaplan J, Wong H. Biomarker discovery and development in pediatric critical care medicine. *Pediatric Critical Care Medicine*. 2011; **12**: 165-73.

35 Manzano S, Bailey B, Gervaix A, Cousineau J, Delvin E, Girodias J. Markers for bacterial infection in children with fever without source. *Archives of Disease in Childhood*. 2011; **96**: 440-46.

36 Caspe W, Chamudes O, Louie B. The Evaluation And Treatment Of The Febrile Infant. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 1983; **2**: 131-35.

37 Isaacman D, Shults J, Gross T, Davis P, Harper M. Predictors of bacteremia in febrile children 3 to 36 months of age. *Pediatrics*. 2000; **106**: 977-82.

38 Bass J, Steele R, Wittler R*, et al.* Antimicrobial Treatment of Occult Bacteremia - A Multicenter Cooperative Study. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 1993; **12**: 466-73.

39 Jaffe D, Fleisher G. Temperature And Total White Blood-Cell Count As Indicators Of Bacteremia. *Pediatrics*. 1991; **87**: 670-74.

40 McCarthy P, Sharpe M, Spiesel S*, et al.* Observation Scales to Identify Serious Illness in Febrile Children. *Pediatrics*. 1982; **70**: 802-09.

41 Ersoy B, Nehir H, Altinoz S, Yilmaz O, Dundar P, Aydogan A. Prognostic value of initial antithrombin levels in neonatal sepsis. *Indian Pediatrics*. 2007; **44**: 581-84.

42 Baskin M, Orourke E, Fleisher G. Outpatient Treatment of Febrile Infants 28 to 89 Days of Age with Intramuscular Administration of Ceftriaxone. *Journal Of Pediatrics*. 1992; **120**: 22-27.

43 Baker M, Bell L, Avner J. Outpatient Management Without Antibiotics of Fever in Selected Infants. *New England Journal of Medicine*. 1993; **329**: 1437-41.

44 Baker M, Bell L. Unpredictability of serious bacterial illness in febrile infants from birth to 1 month of age. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*. 1999; **153**: 508-11.

45 Rudinsky S, Carstairs K, Reardon J, Simon L, Riffenburgh R, Tanen D. Serious Bacterial Infections in Febrile Infants in the Post-Pneumococcal Conjugate Vaccine Era. *Academic Emergency Medicine*. 2009; **16**: 585-90.

46 Bonsu B, Harper M. Identifying febrile young infants with bacteremia: Is the peripheral white blood cell count an accurate screen? *Annals of Emergency Medicine*. 2003; **42**: 216-25.

47 Carrol E, Newland P, Riordan F, Thomson A, Curtis N, Hart C. Procalcitonin as a diagnostic marker of meningococcal disease in children presenting with fever and a rash. *Archives of Disease in Childhood*. 2002; **86**: 282-85.

48 Brown L, Shaw T, Wittlake W. Does leucocytosis identify bacterial infections in febrile neonates presenting to the emergency department? *Emergency Medicine Journal*. 2005; **22**: 256-59.

49 Pulliam PN, Attia MW, Cronan KM. C-reactive protein in febrile children 1 to 36 months of age with clinically undetectable serious bacterial infection. *Pediatrics*. 2001; **108**: 1275-9.

50 Lopez A, Cubells C, Garcia J, Pou J, Emergencies SSP. Procalcitonin in pediatric emergency departments for the early diagnosis of invasive bacterial infections in febrile infants: results of a multicenter study and utility of a rapid qualitative test for this marker. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 2003; **22**: 895-903.

51 Mazur L, Kline M, Lorin M. Extreme leucocytosis in patients presenting to a pediatric emergency department. *Pediatr Emerg Care*. 1991; **7**: 215-18.

52 Shah S, Shofer F, Seidel J, Baren J. Significance of extreme leukocytosis in the evaluation of febrile children. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 2005; **24**: 627-30.

53 Gendrel D, Raymond J, Coste J*, et al.* Comparison of procalcitonin with C-reactive protein, interleukin 6 and interferon-alpha for differentiation of bacterial vs. viral infections. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 1999; **18**: 875-81.

54 Thayyil S, Shenoy M, Hamaluba M, Gupta A, Frater J, Verber I. Is procalcitonin useful in early diagnosis of serious bacterial infections in children? *Acta Paediatrica*. 2005; **94**: 155-58.

55 Jaye D, Waites K. Clinical applications of C-reactive protein in pediatrics. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 1997; **16**: 735-47.

56 Du Clos T. Function of C-reactive protein. *Annals of Medicine*. 2000; **32**: 274-78.

57 Haque K. Defining common infections in children and neonates. *Journal of Hospital Infection*. 2007; **65**: 110-14.

58 Franz A, Kron M, Pohlandt F, Steinbach G. Comparison of procalcitonin with interleukin 8, C-reactive protein and differential white blood cell count for the early diagnosis of bacterial infections in newborn infants. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 1999; **18**: 666-71.

59 Berger R, Berger M, vanSteenselMoll H, DzoljicDanilovic G, DerksenLubsen G. A predictive model to estimate the risk of serious bacterial infections in febrile infants. *European Journal of Pediatrics*. 1996; **155**: 468-73.

60 Philip A, Mills P. Use of C-reactive protein in minimizing antibiotic exposure: Experience with infants initially admitted to a well-baby nursery. *Pediatrics*. 2000; **106**:e4.

61 Franz A, Steinbach G, Kron M, Pohlandt F. Reduction of unnecessary antibiotic therapy in newborn infants using interleukin-8 and C-reactive protein as markers of bacterial infections. *Pediatrics*. 1999; **104**: 447-53.

62 Sanders S, Barnett A, Correa-Velez I, Coulthard M, Doust J. Systematic Review of the Diagnostic Accuracy of C-Reactive Protein to Detect Bacterial Infection in Nonhospitalized Infants and Children with Fever. *Journal of Pediatrics*. 2008; **153**: 570-74.

63 Assicot M, Gendrel D, Carsin H, Raymond J, Guilbaud J, Bohuon C. High Serum Procalcitonin Concentrations in Patients With Sepsis and Infection. *Lancet*. 1993; **341**: 515-18.

64 Muller B, Becker K, Schachinger H*, et al.* Calcitonin precursors are reliable markers of sepsis in a medical intensive care unit. *Critical Care Medicine*. 2000; **28**: 977-83.

65 Nylen E, O'Neill W, Jordan M*, et al.* Serum Procalcitonin As An Index Of Inhalation Injury In Burns. *Hormone and Metabolic Research*. 1992; **24**: 439-42.

66 Whang K, Steinwald P, White J*, et al.* Serum calcitonin precursors in sepsis and systemic inflammation. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1998; **83**: 3296-301.

67 Tang B, Eslick G, Craig J, McLean A. Accuracy of procalcitonin for sepsis diagnosis in critically ill patients: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infectious Diseases*. 2007; **7**: 210-17.

68 Nakamura A, Wada H, Ikejiri M*, et al.* Efficacy Of Procalcitonin In The Early Diagnosis Of Bacterial Infections In A Critical Care Unit. *Shock*. 2009; **31**: 586-91.

69 Luzzani A, Polati E, Dorizzi R, Rungatscher A, Pavan R, Merlini A. Comparison of procalcitonin and C-reactive protein as markers of sepsis. *Critical Care Medicine*. 2003; **31**: 1737-41.

70 Enguix A, Rey C, Concha A, Medina A, Coto D, Dieguez M. Comparison of procalcitonin with C-reactive protein and serum amyloid for the early diagnosis of bacterial sepsis in critically ill neonates and children. *Intensive Care Medicine*. 2001; **27**: 211-15.

71 Prat C, Dominguez J, Rodrigo C*, et al.* Use of quantitative and semiquantitative procalcitonin measurements to identify children with sepsis and meningitis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2004; **23**: 136-38.

72 Hatherill M, Tibby S, Sykes K, Turner C, Murdoch I. Diagnostic markers of infection: comparison of procalcitonin with C reactive protein and leucocyte count. *Archives of Disease in Childhood*. 1999; **81**: 417-21.

73 Maniaci V, Dauber A, Weiss S, Nylen E, Becker K, Bachur R. Procalcitonin in young febrile infants for the detection of serious bacterial infections. *Pediatrics*. 2008; **122**: 701-10.

74 Hsiao A, Chen L, Baker M. Incidence and predictors of serious bacterial infections among 57-to 180-day-old infants. *Pediatrics*. 2006; **117**: 1695-701.

75 Baraff L, Bass J, Fleisher G*, et al.* Practice Guideline For The Management Of Infants And Children 0 To 36 Months Of Age With Fever Without Source. *Annals of Emergency Medicine*. 1993; **22**: 1198-210.

76 Baker M, Avner J, Bell L. Failure Of Infant Observation Scales In Detecting Serious Illness In Febrile, 4-Week-Old To 8-Week-Old Infants. *Pediatrics*. 1990; **85**: 1040-43.

77 Dagan R, Powell K, Hall C, Menegus M. Identification Of Infants Unlikely To Have Serious Bacterial-Infection Although Hospitalized For Suspected Sepsis. *Journal of Pediatrics*. 1985; **107**: 855-60.

78 Dagan R, Sofer S, Phillip M, Shachak E. Ambulatory Care Of Febrile Infants Younger Than 2 Months Of Age Classified As Being At Low-Risk For Having Serious Bacterial-Infections. *Journal of Pediatrics*. 1988; **112**: 355-60.

79 Anbar R, Richardsondecorral V, Omalley P. Difficulties In Universal Application Of Criteria Identifying Infants At Low-Risk For Serious Bacterial-Infection. *Journal of Pediatrics*. 1986; **109**: 483-85.

80 Jaskiewicz J, Mccarthy C, Richardson A*, et al.* Febrile Infants At Low-Risk For Serious Bacterial-Infection - An Appraisal Of The Rochester Criteria And Implications For Management. *Pediatrics*. 1994; **94**: 390-96.

81 Byington C, Enriquez F, Hoff C*, et al.* Serious bacterial infections in febrile infants 1 to 90 days old with and without viral infections. *Pediatrics*. 2004; **113**: 1662-66.

82 Baraff L, Oslund S, Schriger D, Stephen M. Probability Of Bacterial-Infections In Febrile Infants Less Than 3 Months Of Age - A Metaanalysis .1. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 1992; **11**: 257-65.

83 Lacour A, Zamora S, Gervaix A. A score identifying serious bacterial infections in children with fever without source. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 2008; **27**: 654-56.

84 Hsiao A, Baker M. Fever in the new millennium: a review of recent studies of markers of serious bacterial infection in febrile children. *Current Opinion in Pediatrics*. 2005; **17**: 56-61.

85 Zola H. Medical applications of leukocyte surface molecules - the CD molecules. *Molecular Medicine*. 2006; **12**: 312-16.

86 Zola H, Swart B. The human leucocyte differentiation antigens (HLDA) workshops: the evolving role of antibodies in research, diagnosis and therapy. *Cell Research*. 2005; **15**: 691-94.

87 Diamond M, Springer T. The Dynamic Regulation Of Integrin Adhesiveness. *Current Biology*. 1994; **4**: 506-17.

88 Liu Y, Shaw S, Ma S, Yang L, Luscinskas F, Parkos C. Regulation of leukocyte transmigration: Cell surface interactions and signaling events. *Journal of Immunology*. 2004; **172**: 7-13.

89 Zen K, Parkos C. Leukocyte-epithelial interactions. *Current Opinion in Cell Biology*. 2003; **15**: 557-64.

90 Brown K, Brain S, D Pearson J, D Edgeworth J, Lewis S, Treacher D. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet*. 2006; **368**: 157-69.

91 Gonzalez-Amaro R, Sanchez-Madrid F. Cell adhesion molecules: Selectins and integrins. *Critical Reviews in Immunology*. 1999; **19**: 389-429.

92 Lasky L. Selectins - Interpreters Of Cell-Specific Carbohydrate Information During Inflammation. *Science*. 1992; **258**: 964-69.

93 Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra DJ. T-Cell Mediated Immunity. In: Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra DJ (eds.). *Immunobiology*. 4th. edn. London, New York: Elsevier Science Ltd/Garland Publishing 1999; 263-305.

94 Tedder T, Steeber D, Chen A, Engel P. The Selectins - Vascular Adhesion Molecules. *Faseb Journal*. 1995; **9**: 866-73.

95 Gallatin W, Weissman I, Butcher E. A Cell-Surface Molecule Involved In Organ-Specific Homing Of Lymphocytes. *Nature*. 1983; **304**: 30-34.

96 Mcever R, Beckstead J, Moore K, Marshallcarlson L, Bainton D. Gmp-140, A Platelet Alpha-Granule Membrane-Protein, Is Also Synthesized By Vascular Endothelial-Cells And Is Localized In Weibel-Palade Bodies. *Journal of Clinical Investigation*. 1989; **84**: 92-99.

97 Dore M, Korthuis R, Granger D, Entman M, Smith C. P-Selectin Mediates Spontaneous Leukocyte Rolling In-Vivo. *Blood*. 1993; **82**: 1308-16.

98 Mayadas TN, Johnson RC, Rayburn H, Hynes RO, Wagner DD. Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice. *Cell*. 1993; **74**: 541-54.

99 Kiely J, Hu Y, Garcia-Cardena G, Gimbrone M. Lipid raft localization of cell surface E-selectin is required for ligation-induced activation of phospholipase c gamma. *Journal of Immunology*. 2003; **171**: 3216-24.

100 Bevilacqua M, Pober J, Mendrick D, Cotran R, Gimbrone M. Identification Of An Inducible Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987; **84**: 9238-42.

101 Crutchfield K, Patil V, Campbell C, Parkos C, Allport J, Goetz D. CD11b/CD18-coated microspheres attach to E-selectin under flow. *Journal of Leukocyte Biology*. 2000; **67**: 196-205.

102 Cummings RD, McEver RP. C-type Lectins. In: Varki A CR, Esko JD, et al., editors. (ed.). *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor (NY): : Cold Spring Harbor Laboratory Press 2009.

103 Gonzalez-Amaro R, Diaz-Gonzalez F, Sanchez-Madrid F. Adhesion molecules in inflammatory diseases. *Drugs*. 1998; **56**: 977-88.

104 Ravetch J, Kinet J. Fc-Receptors. *Annual Review of Immunology*. 1991; **9**: 457-92.

105 Kerst J, Vandewinkel J, Evans A*, et al.* Granulocyte Colony-Stimulating Factor Induces Hfc-Gamma-Ri (CD64 Antigen)-Positive Neutrophils Via An Effect On Myeloid Precursor Cells. *Blood*. 1993; **81**: 1457-64.

106 Kolackova M, Kudlova M, Kunes P*, et al.* Early expression of Fc gamma RI (CD64) on monocytes of cardiac surgical patients and higher density of monocyte anti-inflammatory scavenger CD163 receptor in "On-Pump" patients. *Mediators of Inflammation*. 2008.

107 Fjaertoft G, Hakansson L, Ewald U, Foucard T, Venge P. Neutrophils from term and preterm newborn infants express the high affinity Fc gamma-receptor I (CD64) during bacterial infections. *Pediatric Research*. 1999; **45**: 871-76.

108 Ng P, Li K, Wong R, Chui K, Wong E, Fok T. Neutrophil CD64 expression: A sensitive diagnostic marker for late-onset nosocomial infection in very low birthweight infants. *Pediatric Research*. 2002; **51**: 296-303.

109 Layseca-Espinosa E, Perez-Gonzalez L, Torres-Montes A*, et al.* Expression of CD64 as a potential marker of neonatal sepsis. *Pediatric Allergy and Immunology*. 2002; **13**: 319-27.

110 Schiff D, Rae J, Martin T, Davis B, Curnutte J. Increased phagocyte Fc gamma RI expression and improved Fc gamma-receptor-mediated phagocytosis after in vivo recombinant human interferon-gamma treatment of normal human subjects. *Blood*. 1997; **90**: 3187-94.

111 Hoffmeyer F, Witte K, Schmidt R. The high-affinity Fc gamma RI on PMN: regulation of expression and signal transduction. *Immunology*. 1997; **92**: 544-52.

112 Davis B. Improved diagnostic approaches to infection/sepsis detection. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2005; **5**: 193-207.

113 Qureshi S, Lewis S, Gant V, Treacher D, Davis B, Brown K. Increased distribution and expression of CD64 on blood polymorphonuclear cells from patients with the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). *Clinical and Experimental Immunology*. 2001; **125**: 258-65.

114 Simms H, Frank M, Quinn T, Holland S, Gaither T. Studies On Phagocytosis In Patients With Acute Bacterial-Infections. *Journal of Clinical Investigation*. 1989; **83**: 252-60.

115 Guyre P, Campbell A, Kniffin W, Fanger M. Monocytes And Polymorphonuclear Neutrophils Of Patients With Streptococcal Pharyngitis Express Increased Numbers Of Type-I Igg Fc-Receptors. *Journal of Clinical Investigation*. 1990; **86**: 1892-96.

116 Herra C, Keane C, Whelan A. Increased expression of Fc gamma receptors on neutrophils and monocytes may reflect ongoing bacterial infection. *Journal of Medical Microbiology*. 1996; **44**: 135-40.

117 Leino L, Sorvajarvi K, Katajisto J*, et al.* Febrile infection changes the expression of IgG Fc receptors and complement receptors in human neutrophils in vivo. *Clinical and Experimental Immunology*. 1997; **107**: 37-43.

118 Ng P, Li G, Chui K*, et al.* Neutrophil CD64 is a sensitive diagnostic marker for early-onset neonatal infection. *Pediatric Research*. 2004; **56**: 796-803.

119 Wagner C, Deppisch R, Denefleh B, Hug F, Andrassy K, Hansch G. Expression patterns of the lipopolysaccharide receptor CD14, and the FC gamma receptors CD16 and CD64 on polymorphonuclear neutrophils: Data from patients with severe bacterial infections and lipopolysaccharide-exposed cells. *Shock*. 2003; **19**: 5-12.

120 Allen E, Bakke A, Purtzer M, Deodhar A. Neutrophil CD64 expression: distinguishing acute inflammatory autoimmune disease from systemic infections. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2002; **61**: 522-25.

121 Moallem H, Kalayci O, Homel P*, et al.* Expression of Fc gamma r1 (CD64) on polymorphonuclear leucocytes during progression to acquired immunodeficiency syndrome in perinatally human immunodeficiency virus-infected children. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2000; **52**: 184-89.

122 Livaditi O, Kotanidou A, Psarra A*, et al.* Neutrophil CD64 expression and serum IL-8: Sensitive early markers of severity and outcome in sepsis. *Cytokine*. 2006; **36**: 283-90.

123 Cardelli P, Ferraironi M, Amode R*, et al.* Evaluation of neutrophil CD64 expression and procalcitonin as useful markers in early diagnosis of sepsis. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. 2008; **21**: 43-49.

124 Davis B, Olsen S, Ahmad E, Bigelow N. Neutrophil CD64 is an improved indicator of infection or sepsis in emergency department patients. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2006; **130**: 654-61.

125 Cid J, Aguinaco R, Sanchez R, Garcia-Pardo G, Llorente A. Neutrophil CD64 expression as marker of bacterial infection: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Infection*. 2010; **60**: 313-19.

126 Ng P, Li G, Chui K*, et al.* Quantitative measurement of monocyte HLA-DR expression in the identification of early-onset neonatal infection. *Biology of the Neonate*. 2006; **89**: 75-81.

127 Matsui T, Ohsumi K, Ozawa N*, et al.* CD64 on neutrophils is a sensitive and specific marker for detection of infection in patients with rheumatoid arthritis. *Journal of Rheumatology*. 2006; **33**: 2416-24.

128 Groselj-Grenc M, Ihan A, Derganc A. Neutrophil and monocyte CD64 and CD163 expression in critically ill neonates and children with sepsis: Comparison of fluorescence intensities and calculated indexes. *Mediators of Inflammation*. 2008.

129 Bhandari V, Wang C, Rinder C, Rinder H. Hematologic profile of sepsis in neonates: Neutrophil CD64 as a diagnostic marker. *Pediatrics*. 2008; **121**: 129-34.

130 Tillinger W, Jilch R, Jilma B*, et al.* Expression of the High-Affinity IgG Receptor FcRI (CD64) in Patients With Inflammatory Bowel Disease: A New Biomarker for Gastroenterologic Diagnostics. *American Journal of Gastroenterology*. 2009; **104**: 102-09.

131 Tanaka S, Nishino J, Matsui T, Komiya A, Nishimura K, Tohma S. Neutrophil CD64 expression in the diagnosis of local musculoskeletal infection and the impact of antibiotics. *Journal of Bone and Joint Surgery-British Volume*. 2009; **91B**: 1237-42.

132 Groselj-Grenc M, Ihan A, Pavcnik-Arnol M, Kopitar A, Gmeiner-Stopar T, Derganc M. Neutrophil and monocyte CD64 indexes, lipopolysaccharide-binding protein, procalcitonin and C-reactive protein in sepsis of critically ill neonates and children. *Intensive Care Medicine*. 2009; **35**: 1950-58.

133 Hsu K, Chan M, Wang J, Lin L, Wu C. Comparison of Fc gamma receptor expression on neutrophils with procalcitonin for the diagnosis of sepsis in critically ill patients. *Respirology*. 2011; **16**: 152-60.

134 Gros A, Roussel M, Sauvadet E*, et al.* The sensitivity of neutrophil CD64 expression as a biomarker of bacterial infection is low in critically ill patients. *Intensive Care Med*. 2012; **38**: 445-52.

135 Nuutila J. The novel applications of the quantitative analysis of neutrophil cell surface FcgammaRI (CD64) to the diagnosis of infectious and inflammatory diseases. *Curr Opin Infect Dis*. 2010; **23**: 268-74.

136 Icardi M, Erickson Y, Kilborn S, Stewart B, Grief B, Scharnweber G. CD64 Index Provides Simple and Predictive Testing for Detection and Monitoring of Sepsis and Bacterial Infection in Hospital Patients. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009; **47**: 3914-19.

137 Cid J, Garcia-Pardo G, Aguinaco R, Sanchez R, Llorente A. Neutrophil CD64: diagnostic accuracy and prognostic value in patients presenting to the emergency department. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2011; **30**: 845-52.

138 Lam H, Wong S, Cheung H*, et al.* Early Diagnosis of Intra-Abdominal Inflammation and Sepsis by Neutrophil CD64 Expression in Newborns. *Neonatology*. 2011; **99**: 118-24.

139 Fjaertoft G, Hakansson L, Foucard T, Ewald U, Venge P. CD64 (Fc gamma receptor I) cell surface expression on maturing neutrophils from preterm and term newborn infants. *Acta Paediatrica*. 2005; **94**: 295-302.

140 Dilli D, Oguz S, Dilmen U, Koker M, Kizilgun M. Predictive Values of Neutrophil CD64 Expression Compared with Interleukin-6 and C-Reactive Protein in Early Diagnosis of Neonatal Sepsis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2010; **24**: 363-70.

141 Dehaas M, Vossebeld P, Vondemborne A, Roos D. Fc-Gamma Receptors Of Phagocytes. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 1995; **126**: 330-41.

142 Ng P, Cheng S, Chui K*, 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*. 1997; **77**: F221-F27.

143 Genel F, Atlihan F, Gulez N*, et al.* Evaluation of adhesion molecules CD64, CD11b and CD62L in neutrophils and monocytes of peripheral blood for early diagnosis of neonatal infection. *World Journal of Pediatrics*. 2012; **8**: 72-75.

144 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**: 11-7.

145 Rudensky B, Sirota G, Erlichman M, Yinnon A, Schlesinger Y. Neutrophil CD64 Expression as a Diagnostic Marker of Bacterial Infection in Febrile Children Presenting to a Hospital Emergency Department. *Pediatric Emergency Care*. 2008; **24**: 745-48.

146 Gámez-Díaz LY, Enriquez LE, Matute JD*, et al.* Diagnostic accuracy of HMGB-1, sTREM-1, and CD64 as markers of sepsis in patients recently admitted to the emergency department. *Acad Emerg Med*. 2011; **18**: 807-15.

147 Simon D, Chen Z, Seifert P, Edelman E, Ballantyne C, Rogers C. Decreased neointimal formation in Mac-1(-/-) mice reveals a role for inflammation in vascular repair after angioplasty. *Journal of Clinical Investigation*. 2000; **105**: 293-300.

148 Wong D, Davis E, LeBeau M, Springer T. Cloning and chromosomal localization of a novel gene-encoding a human beta(2)-integrin alpha subunit. *Gene*. 1996; **171**: 291-94.

149 Arnaout M, Todd R, Dana N, Melamed J, Schlossman S, Colten H. Inhibition Of Phagocytosis Of Complement-C3-Coated Or Immunoglobulin-G-Coated Particles And Of C3bi Binding By Monoclonal-Antibodies To A Monocyte-Granulocyte Membrane Glycoprotein (MOL). *Journal of Clinical Investigation*. 1983; **72**: 171-79.

150 Dunne J, Collins R, Beaudet A, Ballantyne C, Ley K. Mac-1, but not LFA-1, uses intercellular adhesion molecule-1 to mediate slow leukocyte rolling in TNF-alpha-induced inflammation. *Journal of Immunology*. 2003; **171**: 6105-11.

151 Horwitz A. Integrins and health. *Scientific American*. 1997; **276**: 68-75.

152 McDowall A, Inwald D, Leitinger B*, et al.* A novel form of integrin dysfunction involving beta 1, beta 2, and beta 3 integrins. *Journal of Clinical Investigation*. 2003; **111**: 51-60.

153 Arnaout M. Leukocyte adhesion molecules deficiency: Its structural basis, pathophysiology and implications for modulating the inflammatory response. *Immunological Reviews*. 1990; **114**: 145-80.

154 Hynes R. Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*. 2002; **110**: 673-87.

155 Plow E, Haas T, Zhang L, Loftus J, Smith J. Ligand binding to integrins. *Journal of Biological Chemistry*. 2000; **275**: 21785-88.

156 Tang T, Rosenkranz A, Assmann K*, et al.* A role for Mac-1 (CDIIb/CD18) in immune complex-stimulated neutrophil function in vivo: Mac-1 deficiency abrogates sustained Fc gamma receptor-dependent neutrophil adhesion and complement-dependent proteinuria in acute glomerulonephritis. *Journal of Experimental Medicine*. 1997; **186**: 1853-63.

157 Borregaard N, Cowland J. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*. 1997; **89**: 3503-21.

158 Macgregor R, Shalit M. Neutrophil Function In Healthy Elderly Subjects. *Journals of Gerontology*. 1990; **45**: M55-M60.

159 Rebuck N, Gibson A, Finn A. Neutrophil Adhesion Molecules In Term And Premature-Infants - Normal Or Enhanced Leukocyte Integrins But Defective L-Selectin Expression And Shedding. *Clinical and Experimental Immunology*. 1995; **101**: 183-89.

160 Sacks G, Studena K, Sargent I, Redman C. Normal pregnancy and preeclampsia both produce inflammatory changes in peripheral blood leukocytes akin to those of sepsis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1998; **179**: 80-86.

161 Sengelov H, Kjeldsen L, Diamond M, Springer T, Borregaard N. Subcellular-Localization And Dynamics Of MAC-1 (alpha(M)beta(2)) In Human Neutrophils. *Journal of Clinical Investigation*. 1993; **92**: 1467-76.

162 Calafat J, Kuijpers T, Janssen H, Borregaard N, Verhoeven A, Roos D. Evidence For Small Intracellular Vesicles In Human Blood Phagocytes Containing Cytochrome-B(558) And The Adhesion Molecule CD11b/CD18. *Blood*. 1993; **81**: 3122-29.

163 Repo H, Rochon Y, Schwartz B, Sharar S, Winn R, Harlan J. Binding of human peripheral blood polymorphonuclear leukocytes to E-selectin (CD62E) does not promote their activation. *Journal of Immunology*. 1997; **159**: 943-51.

164 Vuorte J, Lindsberg P, Kaste M*, et al.* Anti-ICAM-1 monoclonal antibody R6.5 (Enlimomab) promotes activation of neutrophils in whole blood. *Journal of Immunology*. 1999; **162**: 2353-57.

165 Takala A, Jousela I, Jansson S*, et al.* Markers of systemic inflammation predicting organ failure in community-acquired septic shock. *Clinical Science*. 1999; **97**: 529-38.

166 Lin R, Astiz M, Saxon J, Rackow E. Altered Leukocyte Immunophenotypes In Septic Shock - Studies Of HLA-DR, CD11b, CD14, and IL-2R Expression. *Chest*. 1993; **104**: 847-53.

167 Takala A, Lahdevirta J, Jansson S*, et al.* Systemic inflammation in hemorrhagic fever with renal syndrome correlates with hypotension and thrombocytopenia but not with renal injury. *Journal of Infectious Diseases*. 2000; **181**: 1964-70.

168 Kobold A, Tulleken J, Zijlstra J*, et al.* Leukocyte activation in sepsis; correlations with disease state and mortality. *Intensive Care Medicine*. 2000; **26**: 883-92.

169 Russwurm S, Vickers J, Meier-Hellmann A*, et al.* Platelet and leukocyte activation correlate with the severity of septic organ dysfunction. *Shock*. 2002; **17**: 263-68.

170 Chishti A, Shenton B, Kirby J, Baudouin S. Neutrophil chemotaxis and receptor expression in clinical septic shock. *Intensive Care Medicine*. 2004; **30**: 605-11.

171 Nelson R, Hasslen S, Ahrenholz D, Haus E, Solem L. Influence Of Minor Thermal-Injury On Expression Of Complement Receptor CR3 On Human-Neutrophils. *American Journal of Pathology*. 1986; **125**: 563-70.

172 Botha A, Moore F, Moore E, Sauaia A, Banerjee A, Peterson V. Early Neutrophil Sequestration After Injury - A Pathogenic Mechanism For Multiple Organ Failure. *Journal of Trauma-Injury Infection and Critical Care*. 1995; **39**: 411-17.

173 Rinder C, Bonan J, Rinder H, Mathew J, Hines R, Smith B. Cardiopulmonary Bypass Induces Leukocyte-Platelet Adhesion. *Blood*. 1992; **79**: 1201-05.

174 Takala A, Jousela I, Olkkola K*, et al.* Systemic inflammatory response syndrome without systemic inflammation in acutely ill patients admitted to hospital in a medical emergency. *Clinical Science*. 1999; **96**: 287-95.

175 Rosenbloom A, Pinsky M, Bryant J, Shin A, Tran T, Whiteside T. Leukocyte Activation In The Peripheral-Blood Of Patients With Cirrhosis Of The Liver And SIRS - Correlation With Serum Interleukin-6 Levels And Organ Dysfunction. *Jama-Journal of the American Medical Association*. 1995; **274**: 58-65.

176 McGill S, Ahmed N, Hu F, Michel R, Christou N. Shedding of L-selectin as a mechanism for reduced polymorphonuclear neutrophil exudation in patients with the systemic inflammatory response syndrome. *Archives of Surgery*. 1996; **131**: 1141-46.

177 Brom J, Koller M, Schluter B, Mullerlange P, Steinau H, Konig W. Expression Of The Adhesion Molecule Cd11b And Polymerization Of Actin By Polymorphonuclear Granulocytes Of Patients Endangered By Sepsis. *Burns*. 1995; **21**: 427-31.

178 Nakae H, Endo S, Inada K, Takakuwa T, Kasai T. Changes in adhesion molecule levels in sepsis. *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology*. 1996; **91**: 329-38.

179 Weirich E, Rabin R, Maldonado Y, Benitz W, Modler S, Herzenberg L. Neutrophil CD11b expression as a diagnostic marker for early-onset neonatal infection. *Journal of Pediatrics*. 1998; **132**: 445-51.

180 Nupponen I, Andersson S, Järvenpää AL, Kautiainen H, Repo H. Neutrophil CD11b expression and circulating interleukin-8 as diagnostic markers for early-onset neonatal sepsis. *Pediatrics*. 2001; **108**: E12.

181 Nupponen I, Pesonen E, Andersson S*, et al.* Neutrophil activation in preterm infants who have respiratory distress syndrome. *Pediatrics*. 2002; **110**: 36-41.

182 Repo H, Jansson S, Leirisalorepo M. Anticoagulant Selection Influences Flow Cytometric Determination Of CD11b Up-Regulation In-Vivo And Ex-Vivo. *Journal of Immunological Methods*. 1995; **185**: 65-79.

183 Turunen R, Andersson S, Nupponen I, Kautiainen H, Siitonen S, Repo H. Increased CD11b-density on circulating phagocytes as an early sign of late-onset sepsis in extremely low-birth-weight infants. *Pediatric Research*. 2005; **57**: 270-75.

184 Springer T. Traffic Signals On Endothelium For Lymphocyte Recirculation And Leukocyte Emigration. *Annual Review of Physiology*. 1995; **57**: 827-72.

185 Kotovuori P, Tontti E, Pigott R*, et al.* The Vascular E-Selectin Binds To The Leukocyte Integrins CD11/CD18. *Glycobiology*. 1993; **3**: 131-36.

186 Walz G, Aruffo A, Kolanus W, Bevilacqua M, Seed B. Recognition By ELAM-1 Of The Sialyl-Lex Determinant On Myeloid And Tumor-Cells. *Science*. 1990; **250**: 1132-35.

187 Berg E, Robinson M, Mansson O, Butcher E, Magnani J. A Carbohydrate Domain Common To Both Sialyl Le(A) And Sialyl Le(X) Is Recognized By The Endothelial-Cell Leukocyte Adhesion Molecule ELAM-1. *Journal of Biological Chemistry*. 1991; **266**: 14869-72.

188 Lawrence M, Springer T. Neutrophils Roll On E-Selectin. *Journal of Immunology*. 1993; **151**: 6338-46.

189 Abbassi O, Kishimoto T, Mcintire L, Anderson D, Smith C. E-Selectin Supports Neutrophil Rolling In-Vitro Under Conditions Of Flow. *Journal of Clinical Investigation*. 1993; **92**: 2719-30.

190 Mulligan M, Warner R, Rittershaus C*, et al.* Endothelial targeting and enhanced antiinflammatory effects of complement inhibitors possessing sialyl Lewis(x) moieties. *Journal of Immunology*. 1999; **162**: 4952-59.

191 Chen S, Alon R, Fuhlbrigge R, Springer T. Rolling and transient tethering of leukocytes on antibodies reveal specializations of selectins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997; **94**: 3172-77.

192 Kerr M, Stocks S. The Role Of CD15-(Lex)-Related Carbohydrates In Neutrophil Adhesion. *Histochemical Journal*. 1992; **24**: 811-26.

193 Ball E, Schwarz L, Bloomfield C. Expression Of The CD15 Antigen On Normal And Leukemic Myeloid Cells - Effects Of Neuraminidase And Variable Detection With A Panel Of Monoclonal-Antibodies. *Molecular Immunology*. 1991; **28**: 951-58.

194 Tetteroo P, Vankessel A. Expression Of CD15 (FAL) On Myeloid Cells And Chromosomal Localization Of The Gene. *Histochemical Journal*. 1992; **24**: 777-82.

195 Nakayama F, Nishihara S, Iwasaki H*, et al.* CD15 expression in mature granulocytes is determined by alpha 1,3-fucosyltransferase IX,but in promyelocytes and monocytes by alpha 1,3-fucosyltransferase IV. *Journal of Biological Chemistry*. 2001; **276**: 16100-06.

196 Clarke J, Watkins W. alpha 1,3-L-Fucosyltransferase expression in developing human myeloid cells Antigenic, enzymatic, and mRNA analyses. *Journal of Biological Chemistry*. 1996; **271**: 10317-28.

197 Skacel P, Edwards A, Harrison C, Watkins W. Enzymatic Control Of The Expression Of The X-Determinant (CD15) In Human Myeloid Cells During Maturation - The Regulatory Role Of 6'-Sialyltransferase. *Blood*. 1991; **78**: 1452-60.

198 Terstappen L, Safford M, Loken M. Flow Cytometric Analysis Of Human Bone-Marrow .3. Neutrophil Maturation. *Leukemia*. 1990; **4**: 657-63.

199 Lundjohansen F, Terstappen L. Differential Surface Expression Of Cell-Adhesion Molecules During Granulocyte Maturation. *Journal of Leukocyte Biology*. 1993; **54**: 47-55.

200 Ohsaka A, Saionji K. In vivo administration of granulocyte colony-stimulating factor increases the surface expression of sialyl-Lewis(X) on neutrophils in healthy volunteers. *Acta Haematologica*. 1998; **100**: 187-90.

201 Brunk D, Goetz D, Hammer D. Sialyl Lewis(x)/E-selectin-mediate rolling in a cell-free system. *Biophysical Journal*. 1996; **71**: 2902-07.

202 Alon R, Feizi T, Yuen C, Fuhlbrigge R, Springer T. Glycolipid Ligands For Selectins Support Leukocyte Tethering And Rolling Under Physiological Flow Conditions. *Journal of Immunology*. 1995; **154**: 5356-66.

203 Misugi E, Kawamura N, Imanishi N, Tojo S, Morooka S. Sialyl-Lewis-X Moiety On Rat Polymorphonuclear Leukocytes Responsible For Binding To Rat E-Selectin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1995; **215**: 547-54.

204 Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra DJ. Host Defence Against Infection. In: Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra DJ (eds.). *Immunobiology*. 4th. edn. London, New York: Elsevier Science Ltd/Garland Publishing 1999; 363-415.

205 Diamond M, Staunton D, Marlin S, Springer T. Binding Of The Integrin MAC-1 (CD11b/CD18) To The 3rd Immunoglobulin-Like Domain Of ICAM-1 (CD54) And Its Regulation By Glycosylation. *Cell*. 1991; **65**: 961-71.

206 Sastre L, Kishimoto T, Gee C, Roberts T, Springer T. The Mouse Leukocyte Adhesion Proteins MAC-1 And LFA-1 - Studies On Messenger-RNA Translation And Protein Glycosylation With Emphasis On MAC-1. *Journal of Immunology*. 1986; **137**: 1060-65.

207 Zen K, Cui L, Zhang C, Liu Y. Critical role of Mac-1 sialyl Lewis x moieties in regulating neutrophil degranulation and transmigration. *Journal of Molecular Biology*. 2007; **374**: 54-63.

208 Soni S, Wadhwa N, Kumar R*, et al.* Evaluation of CD64 Expression on Neutrophils as an Early Indicator of Neonatal Sepsis. *Pediatr Infect Dis J*. 2012.

209 Elghetany M, Lacombe F. Physiologic variations in granulocytic surface antigen expression: impact of age, gender, pregnancy, race, and stress. *Journal of Leukocyte Biology*. 2004; **75**: 157-62.

210 Elghetany M, Davis B. Impact of preanalytical variables on granulocytic surface antigen expression: A review. *Cytometry Part B-Clinical Cytometry*. 2005; **65B**: 1-5.

211 Delong E, Delong D, Clarkepearson D. Comparing the areas under 2 or more correlated receiver operating characteristic curves - A nonparametric approach. *Biometrics*. 1988; **44**: 837-45.

10. ŽIVOTOPIS

a) Osobni podaci:

Ime i prezime:	**Joško Markić**
Mjesto i datum rođenja:	Split, 10.04.1973.
Kućna adresa:	Šoltanska 32, Split
Adresa na poslu:	KBC Split, Spinčićeva 1, Split
Telefon posao:	021 – 556-686
e-mail:	jmarkic@mefst.hr
Obitelj:	oženjen, dvoje djece

b) Obrazovanje:

1991 – 1997.	Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Studij u Splitu
2000 – 2004. studij	Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Znanstveni poslijediplomski – Temeljne i kliničke medicinske znanosti, Smjer Klinička medicina
2005 – 2006.	Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Specijalistički poslijediplomski studij - Klinička pedijatrija

c) Zaposlenje:

1997 – 1998.	Dom zdravlja Kaštela, pripravnički staž za doktore medicine
1999 – 2003.	Dom zdravlja Široki Brijeg i Omiš, liječnik u Službi hitne medicinske pomoći
2003 – 2004.	Ustanova za HMP Splitsko-dalmatinske županije, liječnik
2004 – 2008.	KBC Split, Klinika za dječje bolesti, liječnik – specijalizant pedijatrije
2008 -	KBC Split, Klinika za dječje bolesti, Jedinica intenzivnog liječenja, pedijatar

d) Akademski stupanj:

2004. Magistar znanosti; Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet; Naziv rada: Učestalost nasljednog nedostatka enzima glukoze-6-fosfat dehidrogenaze u stanovnika Komiže na otoku Visu, mentor: prof. dr. sc. Vjekoslav Krželj, dr. med.

e) Znanstveno i stručno usavršavanje:

1999.	Položen Državni ispit; odobrenje za samostalan rad
2004 – 2008.	KBC Split, KBC Zagreb; Specijalizacija iz pedijatrije
2011 –	KBC Split; Subspecijalizacija iz intenzivne medicine

1997 - 2005. više od 50-tak raznih tečaja stručnog usavršavanja; za izdvojiti: *1 tjedan*; Newcastle, V. Britanija, Advance Life Support Group, Tečaj za instruktore na tečajevima iz Naprednog održavanja života djece (Advance Pediatric Life Support)

2006. *1 tjedan*; Salzburg, Austrija, American Austrian Foundation & Children's Hospital of Philadelphia, Edukacija iz područja pedijatrijske hitne medicine

2006. *1 tjedan*; Genova, Italija, Instituto G. Gaslini, Edukacija iz područja neonatalne intenzivne medicine

2008. *3 dana*; Zagreb, SLE & University Hospital of Geneva, Edukacija iz područja neonatalne i pedijatrijske strojne ventilacije

2010. *1 mjesec*; Beč, Austrija, Medical University of Vienna, Austria – General Hospital Vienna (AKH), Edukacija iz područja pedijatrijske intenzivne medicine

2011. *1 mjesec*; Graz, Austrija, Medical University of Graz, Austria – University Hospital (LKH), Edukacija iz područja neonatalne intenzivne medicine

2011. *2 dana*; Zagreb, Medicinski fakultet Zagreb i KBC Zagreb, Edukacija iz područja dobre kliničke prakse i provođenja kliničkih ispitivanja

ZNANSTVENA I STRUČNA DJELATNOST

KVALIFIKACIJSKI RADOVI

Učestalost nasljednog nedostatka enzima glukoze-6-fosfat dehidrogenaze u stanovnika Komiže na otoku Visu [magisterij]. Split: Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet; 2004.

OBJAVLJENI ZNANSTVENI I STRUČNI RADOVI

a) Radovi objavljeni u časopisima koji se indeksiraju u Current Contentsu

1. **Markić J**, Krželj V, Markotić A, Marušić E, Stričević L, Zanchi J, Bošnjak N, Sapunar A. High incidence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Croatian island isolate: example from Vis island, Croatia. Croat Med J. 2006;47(4):556-70.
2. Mestrović J, Kardum G, Polić B, Mestrović M, **Markić J**, Sustić A, Krzelj V. The influence of chronic health conditions on susceptibility to severe acute illness of children treated in PICU. Eur J Pediatr. 2006;165(8):526-9.
3. Zanchi J, Karaman K, Lakos V, Plestina-Borjan I, **Markic J**, Krzelj V. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and idiopathic presenile cataract in Dalmatia, Croatia. Can J

Ophthalmol. 2007;42(6):852-3.

4. **Markić J**, Mestrović M, Valić I, Sapunar A, Bosnjak N. Frequency of anticardiolipin, antinuclear and anti-beta2 glycoprotein I antibodies in children with epilepsy. Coll Antropol. 2007;31(3): 739-42.
5. Mestrovic J, Kardum G, Sustic A, Polic B, Mestrovic M, **Markic J**, Zanchi J. Neurodevelopmental disabilities and quality of life after intensive care treatment. J Paediatr Child Health. 2007;43(10):673-6.
6. Sardelic S, Karanovic J, Rubic Z, Polic B, Ledenko V, **Markic J**, Mestrovic J. Late ventriculo-peritoneal shunt infection caused by Shewanella algae. Pediatr Infect Dis J. 2010;29(5):475-7.
7. Polic B, Mestrovic J, **Markic J**, Mestrovic M, Capkun V, Utrobicic I, Jukica M, Radonic M. Long-term quality of life of patients treated in paediatric intensive care unit. Eur J Pediatr. 2013;172(1):85-90.
8. **Markic J**, Jeroncic A, Polancec D, Bosnjak N, Markotic A, Mestrovic J, Cikes Culic V. CD15s is a potential biomarker of serious bacterial infection in infants admitted to hospital. Eur J Pediatr. (2013) (prihvaćen).
9. Meštrović J, Polić B, **Markić J**, Meštrović M, Kardum G, Gunjača G, Matas A, Čatipović T, Radonić Marija. Clinical scoring systems in predicted health-related quality of life of children with injuries. Coll Antropol. (2013) (prihvaćen).

b) Radovi u časopisima indeksiranim u drugim međunarodnim indeksnim publikacijama

SCI – EXPANDED

1. Martinac M, **Markic J**, Karlovic D, Mestrovic J. Identification and treatment of synthetic ("club") drug intoxications. Paediatr Croat. 2007;51(1):5-10.
2. Mestrović J, Filipović T, Polić B, Stricević L, Omazić A, Kuzmanić-Samija R, **Markić J**. Life-threatening valproate overdose successfully treated with haemodialysis. Arh Hig Rada Toksikol. 2008;59(4):295-8.
3. Polic B, Mestrovic J, **Markic J**, Stricevic L, Juric I, Radonic M. Conservative management of idiopathic chylothorax and chylopericardium in preterm neonate. Paediatr Croat. 2010;54:205-7.
4. **Markic J**, Ridge AL. Promethazine in the treatment of postoperative nausea and vomiting: a systematic review. Signa Vitae. 2011;6(2):9-16.

MEDLINE / PUBMED/EMBASE

1. Karlović D, Martinac M, Gale R, **Markić J**, Marcinko D. Assessment of Attention Deficit/ Hyperactivity Disorder among children in families and schools in Mediterranean and continental Croatian towns. Psychiatr Danub. 2005;17(1-2):19-29.
2. Meštrović J, Polić B, Radonić M, Stričević L, Omazić A, Baraka K, **Markić J**, Stipančević H, Krželj V, Balarin L. "Two way transport" of neonates to the Pediatric intensive care unit of the University hospital Split. Paediatr Croat. 2005;49(1):25-9.
3. Meštrović J, Čatipović T, Polić B, **Markić J**, Kardum G. Standardized mortality rate in groups of patients treated in a pediatric intensive care unit. Infektološki glasnik. 2009;29(3):121-4.
4. **Markic J**, Polic B, Kuzmanic-Samija R, Marusic E, Stricevic L, Metlicic V, Mestrovic J. Immune Modulation Therapy in a CRIM-Positive and IgG Antibody-Positive Infant with Pompe Disease Treated with Alglucosidase Alfa: A Case Report. JIMD Rep. 2012;2:11-5.

c) Ostali radovi

1. Polić B, Meštrović J, **Markić J**, Marušić E. Organophosphorus insecticide poisoning by absorption through the skin of the head: Report of two patients. Pedijatrija danas. 2009;5(2):178-83.

d) Broj citata: 26 (Prema ISI Web of Knowledge)

e) Poglavlja u knjizi

1. Rudan I, Rudan D, Saftić V, Musić Milanović S, Stevanović R, Vuletić G, Baklja Konsuo A, **Markić J**, Krželj V, Pucarin J, Biloglav Z, Ivanković D. Zdravstveno stanje, specifične bolesti i očekivano trajanje života stanovništva hrvatskih otoka. U: Smoljanović M, Smoljanović A, Rudan I, urednici. Stanovništvo Hrvatskih otoka 2001. Zagreb:Laser plus; 2008. Str. 69-85.
2. Polić B, Meštrović J, **Markić J**. Akutni epiglotitis. U: Pavlov N, Čulić S, Miše K, urednici. Akutna stanja u pulmologiji. Split:KBC Split; 2011. Str. 25-31.
3. Grmec Š, **Markić J**, Kupnik D. Lijekovi u hitnim stanjima. U: Meštrović J, urednik. Hitna stanja u pedijatriji. Zagreb: Medicinska naklada, 2011. Str. 704-724.
4. **Markić J,** Marušić E. Kašalj. U: Meštrović J, urednik. Hitna stanja u pedijatriji. Zagreb: Medicinska naklada, 2011. Str. 109-115.
5. **Markić J**, Meštrović J, Polić B. Sedacija i analgezija u intenzivnom liječenju djece. U: Pavlov N, Čulić S, Miše K, urednici. Tumori dišnog sutava ; Bol. Split: KBC Split, 2012. Str. 225-232.

6. Meštrović J, Polić B, **Markić J**. Oživljavanje djeteta i novorođenčeta. U: Jukić M, Husedžinović I i dr., urednici. Klinička anesteziologija. Zagreb : Medicinska naklada, 2013. Str. 407-417.

7. Kovačević T, Meštrović J, Polić B, **Markić J**. Infekcije dišnih puteva u endotrahealno intubirane i djece s traheostomom. U: Pavlov N, Čulić S, Miše K, urednici. Prevencija i liječenje infekcija dišnog sustava. Split: KBC Split, 2013. Str. 231-242.

f) Kongresna priopćenja

1. Krželj V, Terzić J, Petrić B, Marušić E, Markić J, Meštrović J. Glucose-6-phosphate dehydrogenase gene mutations in Dalmatia // Acta Pediatrica Espanola (Vol.60 No 8.): 27th Congress of the Union of Middle Eastern and Mediterranean Pediatric Societies / Villa Elizaga I. (ur.). Madrid, Španjolska, 2002. 475-475.

2. Markić J, Krželj V, Markotić A, Marušić E, Bošnjak N, Sapunar A. Učestalost nasljednog nedos-tatka aktivnosti enzima glukoza-6-fosfat dehidrogenaze u stanovnika Komiže na otoku Visu // Pae-diatria Croatica (48. Suppl 2) / Barišić I. (ur.). Zagreb: Klinika za dječje bolesti, 2004. 34-34.

3. Sapunar A, Markić J, Krželj V, Bošnjak N. Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Deficiency Among the Population of Komiza on the Island of Vis // Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (Vol. 42 No. 9) / Siest G. (ur.). Berlin, New York : Walter de Gruyter, 2004. A87-A88.

4. Krželj V, Terzić J, Korać J, Pavlinac I, Markić J, Marušić E, Vulliamy T. Nova mutacija gena glukoza-6-fosfat dehidrogenaze (G6PD Split) // Paediatria Croatica (Vol. 50 Suppl. 2) / Barišić I. (ur.). Zagreb, 2006. 57-57.

5. Markić J, Meštrović M, Valić I, Sapunar A, Bošnjak N. Učestalost antikardiolipinskih, antinukle-arnih i anti-beta2 glikoproteinskih I protutijela u djece s epilepsijom // Neurologia Croatica (Vol. 55 Suppl. 1) / Hodoba DD.; Cvitanović-Šojat Lj. (ur.). Zagreb: Klinika za neurologiju KBC Zagreb, 2006. 89-89.

6. Kuzmanić-Šamija R, Markić J, Polić B, Meštrović J. Antibodies to Recombinant Enzyme in Pompe's Disease // European Journal of Paediatric Neurology / Lagae L. (ur.). Amsterdam: Elsevier, 2009. S112-S112.

7. Ćurin K, Krželj V, Markić J, Karaman K, Pavlov N, Terzić J, Stoini E, Radonić M. Public health aspects of early detection of Glucose-6-Phosphate–Dehydrogenase enzyme deficiency in the Republic of Croatia // Paediatria Croatica / Barišić I. (ur.). Zagreb, 2009. 50-50.

8. Krželj V, Jakšić J, Unić I, Markić J, Radonić M, Pavlov N, Marušić E, Karaman K, Terzić J. The prevalence and genetic analysis of the glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in a

southern Croatia // Paediatria Croatica / Barišić I. (ur.). Zagreb: Klinika za dječje bolesti Zagreb, 2009. 4-4.
9. Pavlov N, Dragisic-Ivulic S, Mestrovic J, Markic J, Polic B. Flexibile fiberoptic bronchoscopy and airway foreign body extraction in children // European Respiratory Journal / Abstracts / 20th European Respiratory Society Annual Congress. Barcelona: European Respiratory Society, 2010. 488s-488s.
10. Krželj V, Kovačević T, Markić J, Polić B, Glunčić I, Gabrić K. Propranolol in the treatment for severe haemangiomas of infancy - a case report // The 26th IPA Congress of Pediatrics Abstracts CD. Johannesburg, 2010. 1213-1213.
11. Krželj V, Markić J, Karaman K, Ćurin K, Unić I, Marušić E, Terzić J. The study of the glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Croatia // The 26th IPA Congress of Pediatrics Abstracts CD. Johannesburg, 2010. 1094-1094.
12. Domljan A, Katić S, Šolić S, Markić J, Polić B, Meštrović J. Zdravstvena skrb o djetetu otrovanom valproatom // Paediatria Croatica / Barišić I. (ur.). Zagreb: Klinika za dječje bolesti Zagreb, 2010. 162-162.
13. Markić J, Polić B, Marušić E, Todorić D, Furlan D, Meštrović J. Idiopatski kongenitalni hiloto-raks kao uzročnik fetalnog hidropsa - prikaz konzervativnog liječenja // Gynaecologia et Perinatolo-gia / Đelmiš J. (ur.). Zagreb: Croatian Society of Gynaecology and Obstetrics, 2010. 168-168.
14. Polić B, Meštrović J, Markić J, Furlan D, Jurić I, Budimir D, Šušnjar T, Todorić J, Biočić M. Kongenitalne malformacije u novorođenčadi liječene u Jedinici intenzivnog liječenaj djece u Splitu // Gynaecologia et Perinatologia / Đelmiš J. (ur.). Zagreb : Croatian Society of Gynaecology and Obstetrics, 2010. 167-167.
15. Polić B, Meštrović J, Markić J, Meštrović M, Utrobičić I, Jukica M. Dugoročna kakvoća života bolesnika liječenih u Jedinici intenzivnog liječenja djece // Paediatria Croatica / Barišić I. (ur.). Zagreb : Klinika za dječje bolesti zagreb, 2010. 118-118.
16. Mestrovic M, Mestrovic J, Polic B, Markic J, Kardum G, Gunjaca G, Matas A, Catipovic T, Radonic M. Functional outcome of children with severe brain injuries // European Journal of Paediatric Neurology / Lagae L. (ur.). 2011. S113-S113.
17. Sapunar A, Markic J, Culic S, Unic I, Bosnjak N, Rodin Kurtovic A. Cytokines IL-2 and IL-6 in children with type 1 diabetes melitus // IFCC-Worldlab Berlin 2011 Abstract book / Plebani M. (ur.). Berlin : Walter de Gruyter GmbH & Co., 2011. S391-S391.
18. Polić B, Tešović G, Markić J, Kovačević T, Meštrović J. Sindrom stečene imunodeficijencije u dojenčeta–prikaz bolesnika // Liječnički vjesnik / Anić B. (ur.). Zagreb : Hrvatski liječnički Zbor, 2012. 113-113.

19. Mestrovic J, Polic B, Markic J, Kovacevic T. Analysis of Severity of Diseases in Intensive Care Unit // Makedonski medicinski pregled - 5th Congress of Pediatric Association of Macedonia / Sajkovski A. (ur.). Skopje: Macedonian Medical Association, 2011. 71-71.
20. Markic J, Jeroncic A, Polancec D, Bosnjak N, Markotic A, Mestrovic J, Cikes Culic V. Neutrophil CD15s is a potentially useful biomarker of serious bacterial infection // 24th Annual Meeting of the European Society of Paediatric and Neonatal Intensive Care. Rotterdam, 2013.

ZNANSTVENI PROJEKTI Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa RH:

1. Istraživanje nasljedne nedostatne aktivnosti glukoza-6-fosfat dehidrogenaze, broj: 0216010, Voditelj: Vjekoslav Krželj - Istraživač u razdoblju 2002 – 2006.
2. Genske, kliničke i populacijske osobitosti deficita G-6-PD u Hrvatskoj, broj: 216-0000000-3464, Voditelj: Vjekoslav Krželj - Istraživač u razdoblju od 01.03.2008. do 30.03.2011.
3. Djeca s posebnim zdravstvenim potrebama, broj: 216-0000000-3391, Voditelj: Julije Meštrović - Istraživač od 01.03.2008.
4. Patobiokemija glikosfingolipidnih antigena, broj: 216-2160133-0066, Voditelj: Anita Markotić - Istraživač od 01.04.2011.

OSTALE ZNANSTVENE AKTIVNOSTI

a) Predavanja na stručnim skupovima / Kongresima

1. Učestalost nasljednog nedostatka aktivnosti enzima glukoza-6-fosfat dehidrogenaze u stanovnika Komiže na otoku Visu; 6. kongres Hrvatskog pedijatrijskog društva; Zagreb, 23-26.06.2004.
2. Immune-modulation therapy in a Pompe disease patient; 6th Pompe Disease Expert Day; Rotterdam, Nizozemska, 10-11.06.2009.
3. Transport životno ugroženog djeteta; 34. Simpozij intenzivne medicine; Zagreb: 03-04.12.2010.

b) Članstva i funkcije u znanstvenim i strukovnim organizacijama

1997 - Hrvatski liječnički zbor
2011 - Član Skupštine HLZ kao izaslanik Podružnice Split
1998 - Hrvatska liječnička komora

2004 - Hrvatsko pedijatrijsko društvo

c) Znanstvene i stručne nagrade

2006. Nagrada Hrvatskog pedijatrijskog društva „Radovan Marković“

d) Organizacija znanstvenih skupova

2005 - Član Organizacijskog odbora Hrvatske proljetne pedijatrijske škole

2009 - Tajnik Organizacijskog odbora Signa Vitae International Conference in Pediatric / Neonatal Intensive Care and Anesthesiology

e) Ostalo

2006 - Tajnik i pomoćnik u Uredničkom odboru časopisa Signa Vitae

2009. Ad-hoc recenzent u časopisu Journal of Pediatric Neurology

2010. Suradnik Svjetske zdravstvene organizacije,
priprema Preglednog rada za sastanak Ekspertne skupine

2011. OTR3001: An Open-label, Multicenter Study of the Safety of Twice Daily Oxycodone Hydrochloride Controlled-release Tablets in Opiod Experienced Children from Ages 6 to 16 Old, Inclusive, with Moderate to Severe Malignant and/or Nonmalignant Pain Requiring Opiod Anagesics – Glavni istraživač na ispitnom mjestu Jedinica intenzivnog liječenja djece Split

2012 - vanjski nestalni član Povjerenstva za lijekove Hrvatske agencije za lijekove i medicinske proizvode (HALMED)

2012 - član Povjerenstva za nastavu Medicinskog fakulteta u Splitu

2013 - 9463-CL-2303: A Phase 3, Randomized, Double-Blind, Multi-Center Study to Compare the Efficacy and Safety of Micafungin Versus Amphotericin B Deoxycholate for the Treatment of Neonatal Candidiasis - Glavni istraživač na ispitnom mjestu Jedinica intenzivnog liječenja djece Split

NASTAVNA DJELATNOST

2011. Izabran u suradničko zvanje naslovnog asistenta - područje biomedicine i zdravstva, polje kliničke medicinske znanosti, grana pedijatrija u katedri Pedijatrija Medicinskog fakulteta Split

SUDJELOVANJE U NASTAVI

a) Dodiplomska nastava

Medicinski fakultet u Splitu:

Ljetni semestar 2009/10.	Bolesti krvarenja i zgrušavanja
Zimski semestar 2010/11.	Pedijatrija
Zimski semestar 2011/12.	Pedijatrija
Ljetni semestar 2010/11.	Odabrana poglavlja iz pedijatrije
Zimski semestar 2012/13.	Pedijatrija
	Kliničke vještine (Hitna stanja u medicini)

Filozofski fakultet u Splitu:

Ljetni semestar 2011/12.	Zaštita zdravlja i njega predškolske djece

Odjel zdravstvenih studija Sveučilišta u Splitu:

Zimski semestar 2012/13.	Pedijatrija s neonatologijom I

b) Poslijediplomska nastava

Medicinski fakultet u Splitu; Doktorski studij Klinička medicina utemeljena na dokazima

Zimski semestar 2009/10.	Pedijatrija utemeljena na dokazima
Ljetni semestar 2011/12.	Pedijatrija utemeljena na dokazima
Ljetni semestar 2012/13.	Metode istraživanja u glikomedicini

c) Poslijediplomski tečajevi trajne edukacije

2005 - Predavač na redovitim godišnjim tečajevima trajnog medicinskog usavršavanja I. kategorije Advance Pediatric Life Support u organizaciji KBC Split