

Institut za zdravstvenu zaštitu majke i deteta
Srbije "Dr Vukan Čupić", Beograd

Pregledni članak
Review article
UDK 616.94-053.31-07
DOI 10.2298/MPNS0612545J

C-REAKTIVNI PROTEIN I CITOKINI U DIJAGNOSTICI NEONATALNE SEPSE

C-REACTIVE PROTEIN AND CYTOKINES IN THE DIAGNOSIS OF NEONATAL SEPSIS

**Borisav JANKOVIĆ, Dobrila VELJKOVIĆ, Srđan PAŠIĆ, Zorica RAKONJAC, Dragana JEVTIĆ i
Jelena MARTIĆ**

Sažetak - Pravovremena "nebakteriološka" dijagnoza neonatalne sepsa u znatnoj meri se oslanja na merenje serumske koncentracije C-reaktivnog proteina. U radu se daje pregled novijih saznanja o mehanizmima sinteze i biološkim ulogama C-reaktivnog proteina i razmatra se dijagnostička pouzdanost ovog glavnog reaktanta akutne faze zapaljenja s posebnim osvrtom na rezultate sopstvenih istraživanja. Izdvojene su i nove mogućnosti dijagnostike zasnovane na merenju serumskih koncentracija prokalcitonina, interleukina 6 i interleukina 8 s prikazom dinamike odvijanja tzv. citokinske kaskade i aktivacionih vremena pomenutih medijatora sistemskog inflamacijskog odgovora i reaktanata akutne faze zapaljenja. Na osnovu toga, kao i na iskustvima koja se mogu naći u medicinskoj literaturi novijeg datuma, daje se značaj ponavljanom, serijskom merenju koncentracije C-reaktivnog proteina za pouzdanu i pravovremenu dijagnozu neonatalne sepsa. Takođe se ističe mogućnost istovremenog merenja serumskih nivoa C-reaktivnog proteina i još nekog od markera zapaljenjske reakcije s isticanjem prednosti koje u tom slučaju ima kombinacija sa prokalcitoninom.

Ključne reči: C-reaktivni protein + dijagnostička primena; Citokini; Sepsa; Bolesti novorođenčeta; Dijagnoza

I u savremenim uslovima neonatalna sepsa izaziva visoku smrtnost, a rizik nepovoljnog ishoda uglavnom zavisi od vremena koje protekne od nastanka infekcije do započinjanja terapije. Međutim, početna klinička ispoljavanja neonatalne sepsa se teško razlikuju od brojnih patoloških stanja neinfektivne etiologije. Osim toga, pouzdanije informacije iz bakteriološke laboratorije mogu se očekivati tek posle 48 h, a rezultat hemokultura neretko daje lažno negativan rezultat i kod postojanja sepsa. Zato bojazan od previda dovodi do "terapijske inercije" kada znatan broj novorođenčadi i u odsustvu sistemске bakterijske infekcije dobija antibiotike u trajanju od 7 do 10 dana [1-3]. Time se u odeljenjima neonatalne intenzivne nege uvećava rizik od intrahospitalnih infekcija multirezistentnim bakterijskim sojevima [4].

Radi prevazilaženja navedenih problema nameće se potreba "nebakteriološkog" dijagnostičkog postupka koji bez rizika racionalizuje ukupan terapijski pristup. Primenljivost takve metode takođe podrazumeva kontinuiranu dostupnost, brzo očitavanje (za 2-4 h) standardizovanih rezultata dobijenih iz srazmerno malog uzorka krvi (do 0,5 ml), kao i prihvatljivu cenu [5].

Cilj ovog rada je da pregledom literature novijeg datuma i osvrtom na sopstvena iskustva razmotri mogućnosti "nebakteriološke" dijagnostike neonatalne sepsa koje su dostupne u svakodnevnom kliničkom radu.

Infekcija (ali i patološka stanja druge prirode) dovodi do aktivacije "citokinske kaskade" i sinteze strukturno raznorodnih proteina poznatih kao reaktanti akutne faze zapaljenja (AFZ). U odnosu na mogućnost povišenja serumskih nivoa i biološke

uloge, glavni reaktant AFZ kod ljudi je C-reaktivni protein (CRP) [6,7].

Sinteza i biološke uloge CRP

CRP je složeni molekul sastavljen od pet istovetnih polipeptidnih lanaca međusobno vezanih u obliku prstena [8]. Sintezi CRP prethodi značajan porast nivoa TNF-alfa (*tumor necrosis factor*) i interleukina 1 (IL-1) već 90 minuta od izlaganja endotoksinu ili drugim sastojcima bakterijske kapsule. Ovi "proksimalni" citokini podstiču sintezu interleukina 6 (IL-6) i interleukina 8 (IL-8), a najviše serumske koncentracije "distalnih" citokina postižu se tri do četiri sata od inicijalne stimulacije [9].

IL-8 je snažan aktivator i hemotraktant granulocita, dok je IL-6 glavni induktor sinteze CRP (i ostalih reaktanata AFZ) [7,9,10].

Sinteza CRP započinje u hepatocitima posle latencije od približno 6 h, potom se serumski nivoi udvostručuju na svakih 8 h, a najviše koncentracije (1 000 do 10 000 puta više od bazalnih) dostižu se između 36 i 48 h trajanja zapaljenjskog procesa. Delotvorna terapija ili spontana rezolucija inflamacije već posle 4-7 h dovode do progresivnog sniženja nivoa CRP u serumu [9,11].

Strukturni homolozi CRP postoje i kod nekih beskičmenjaka, a ta svojevrsna "filogenetska konzervacija" merena milionima godina ukazuje da je tokom evolucije CRP "značajan za preživljavanje" [8]. Danas se zna da zaštitna uloga CRP počiva na opsonizaciji bakterijske kapsule i/ili nekrotičnih ćelija zapaljenjskog žarišta i aktivaciji klasičnog puta komplementa sve do citolitičkog kompleksa (C5-C9) [8,10].

Skraćenice

AFZ	- akutna faza zapaljenja
CRP	- C-reaktivni protein
IL-1	- interleukin 1
IL-6	- interleukin 6
IL-8	- interleukin 8
KONS	- koagulaza-negativni stafilokokus
PCT	- prokalcitonin
SIRS	- systemic inflammatory response syndrome
TNF	- tumor necrosis factor

Izvesno je da se puna funkcionalnost proinlamske citokinske kaskade uspostavlja znatno pre kraja gestacije. Aktivacija fetusnog sistemskog inflamacijskog odgovora ima ulogu u nastanku niza patoloških stanja svojstvenih novorođenačkom periodu (periventrikularna leukomalacija, hipoksično ishemična encefalopatija, nekrotizirajući enterokolitis, bronhopulmonalna displazija) [12]. Slično ranije utvrđenoj mogućnosti pune sinteze TNF, IL-6 i IL-8 već od polovine gestacije, nedavno je pokazano da intrauterusna bakterijska infekcija između 20. i 35. nedelje gestacije dovodi do povišenja nivoa CRP u krvi pupčanika [13]. Uprkos dokazanoj sposobnosti "klinički relevantnog" porasta serumske koncentracije CRP (>10 mg/l) kod dece rođene znatno pre termina (između 24. i 27. gestacijske nedelje), ipak se mora uzeti u obzir zapažanje o ograničenoj mogućnosti da se u navedenoj fazi gestacije "značajno" povećaju nivo CRP u serumu (>60 mg/l) [14].

Nasuprot izvesnih kontroverzi u odnosu na gestaciju, potencijal za sintezu CRP ne zavisi od uzrota novorođenačeta [13,14].

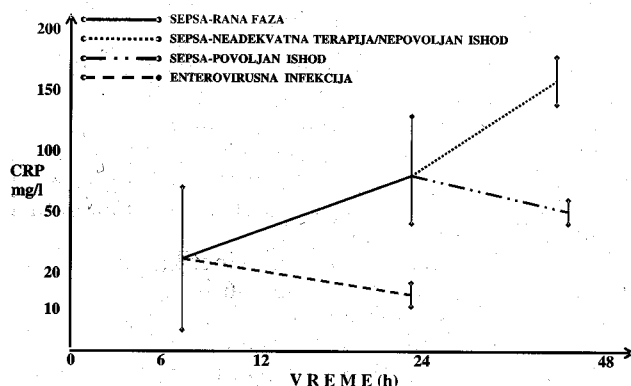
CRP u dijagnostici i proceni toka neonatalne sepe

Mada je CRP otkriven još 1930. godine, šira primena merenja serumskih nivoa CRP u kliničkoj praksi započela je u drugoj polovini sedamdesetih godina prošlog veka zahvaljujući jednostavnim i ekonomičnim kvantitativnim metodama laserske nefelometrije i imunoturbidimetrije. Pažljiva analiza prvih, neretko obeshrabrujućih rezultata pokazala je da su lažno negativni nalazi po pravilu beleženi kada su uzorci uzimani u početnim stadijumima sistemske infekcije [10,15,16]. Na drugoj strani, lažno pozitivni rezultati uglavnom su dobijani neposredno posle porođaja komplikovanog prevremenim prsnućem ovojnice, horioamnionitisom, mekonijumom u amnionskoj tečnosti ili perinatalnom asfiksijom [17].

Na osnovu prvih saznanja o dinamici odvijanja citokinske kaskade nagovešteno je da se u cilju prevazilaženja nedovoljne senzitivnosti, merenje serumske koncentracije CRP u slučaju sumnje na sepsu treba ponoviti sa razmakom 12-24 h [15,16,19,20]. Doslednom primenom ovakvog pristupa, odnosno uzimanjem parnih uzoraka seruma (prvi unutar 12 h od pojave kliničkih znakova infekcije i 12-24 h kasnije) dokazali smo da i pored odgovara-

jućeg izbora antibiotika, u ranoj fazi sistemske infekcije dolazi do značajnog porasta nivoa CRP u serumu sa dostizanjem senzitivnosti testa od 96% [18,20]. Takođe prema sopstvenim rezultatima, dalji progresivni porast serumske koncentracije CRP tokom drugog dana lečenja predstavlja znak nepovoljnog toka i ishoda sepe. Razlog može da bude i primena neodgovarajuće inicijalne antibiotske terapije u intrahospitalnoj sepsi uzrokovanoj multirezistentnim bakterijskim sojevima, kao i naknadno zahvatanje pojedinih organa ili tkiva (CNS, kost i dr.) infekcijskim procesom [21]. Neophodnost "serijskog" merenja koncentracije CRP dokazana je u nizu studija i danas je opšte prihvaćen postupak "nebakteriološke" dijagnoze, procene toka i ishoda neonatalne sepe [1,3,4,11,16,19].

I neke virusne infekcije u ranijom stadijumu mogu snažno stimulisati sintezu CRP. U tom slučaju, međutim, izostaje dalji porast serumskih nivoa CRP zabeležen tokom prva 24 h lečenja bakterijske sepe [18,20-22] (Grafikon 1). Ovakva dinamike serumskih nivoa CRP, u znatoj meri je doprinela sprečavanju težih kliničkih oblika enterovirusne bolesti tokom dve velike epidemije u porodilištu u našoj sredini [23,24].



Grafikon 1. Dinamika serumskih koncentracija CRP u sepsi i enterovirusnoj infekciji

Graph 1. The dynamics of serum CRP concentration in sepsis and enterovirus infections

Inače, vredi napomenuti da se zbog novih saznanja o povezanosti sa procesom arterioskleroze, period posle 2000. godine označava "renesansom CRP", tako da je realno očekivati dalje obogaćivanje saznanja i od šireg interesa [10].

Nove mogućnosti dijagnostike neonatalne sepe

U sagledavanju dijagnostičke pouzdanosti merenja koncentracije CRP ne mogu se zanemariti određene rezerve vezane za nedovoljnu senzitivnost u ranoj fazi sepe, zatim kod dece rođene znatno pre termina, kao i u slučaju sve češćih intrahospitalnih infekcija koagulaza-negativnim stafilokokusom (KONS) [25].

Od brojnih pokušaja da se različitim laboratorijskim postupcima prevaziđu ovi problemi, u kliničkoj praksi primenu su našla merenja serumskih nivoa prokalcitonina, IL-6 i IL-8.

Prokalcitonin (PCT) se kao prekursor kalcitonina u fiziološkim uslovima sintetisuje u "C" ćelijama tiroideje. Polovinom devedesetih godina povišene koncentracije PCT utvrđene su i kod novorođene dece sa sepsom. Tada ne dolazi do izmena u metaboličko-endokrinoj regulaciji, a PCT se sintetisuje izvan tiroideje, najverovatnije u mononuklearnim leukocitima, plućima i jetri. Mada uloga PCT u inflamcijskoj reakciji nije razjašnjena, postoje pretpostavke o imunomodulatornom dejstvu zasnovanom na potenciranju sinteze NO [26].

Značajno povišenje serumске koncentracije PCT beleži se 4 h od izlaganja endotoksinu, najviši nivoi dostižu se posle 6-8 h i održavaju se najmanje 24 h nezavisno od gestacije i uzrasta novorođenog deteta. Zahvaljujući tome, PCT može biti senzitivna dijagnostička pokazatelj rane neonatalne sepsa (< 72 h od rođenja). U tumačenju nalaza treba uzeti u obzir umerena, "fiziološka" povišenja nivoa PCT u serumu tokom prvih 24-48 h života čiji uzrok još uvek nije u potpunosti objašnjen [17,26-28].

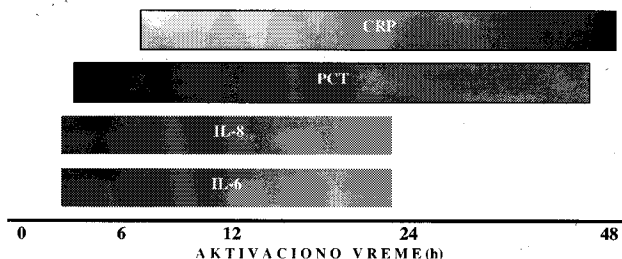
Izgleda da je PCT pogodniji od CRP u diferenciranju bakterijske od virusne etiologije infekcije, kao i u razlikovanju infekcijskih od neinfekcijskih uzroka tzv. sindroma sistemskog inflamcijskog odgovora (SIRS od eng. *systemic inflammatory response syndrome*). Zato merenje serumskih koncentracija PCT nalazi sve širu primenu i u intenzivnoj terapiji dece kasnijeg uzrasta, transplantacionoj medicini i nekim oblastima hirurgije [26].

IL-6 i IL-8 imaju istovetnu kinetiku sa dostizanjem najviših nivoa u serumu 4-6 h od stimulacije. S obzirom da se njihova proinflamcijska dejstva blokiraju delovanjem antiinflamcijskih citokina, koncentracije IL-6 i IL-8 se mogu normalizovati već posle 24 h uprkos aktivnosti infekcije i odvijanja SIRS [5-7,9]. Time se vremenski ograničava inače visoka senzitivnost IL-6 i IL-8 u detekciji veoma rane, "prekliničke" faze sepsa. Takođe treba uzeti u obzir mogućnost smanjene produkcije proinflamcijskih citokina u sepsi uzrokovanoj KONS. Dijagnostičku pouzdanost IL-6 i IL-8 umanjuje i mogućnost lažno pozitivnih nalaza neposredno po rođenju, a laboratorijski rezultati mogu zavisiti od načina uzimanja uzorka krvi (periferna ili umbilikalna vena). Praktična primena ograničena je i još uvek visokom cenom laboratorijskog postupka [13, 17,27,28].

Praktični aspekti nebakteriološke dijagnostike neonatalne sepsa

U svakodnevnom kliničkom radu po pravilu nije moguća potpuna procena trajanja infekcije pre

uzimanja uzorka za laboratorijsku analizu. Zato normalni nivoi "ranih", ali istovremeno "kratkotrajnih" IL-6 i IL-8 (u izvesnoj meri i PCT) mogu da ukazuju na odsustvo infekcije (stvarno negativan nalaz), ali se mogu naći i u odmaklijoj fazi neonatalne sepsa (lažno negativan nalaz). Nasuprot tome, u skladu sa odloženijim aktivacionim vremenom, povišenje serumskih nivoa CRP će omogućiti pouzdanu detekciju sistemске infekcije posle 6-12 h [9,11] (Grafikon 2).



Grafikon 2. Citokinska kaskada - uporedni prikaz aktivacionih vremena

Graph 2. Cytokine cascade - comparison of activation intervals

U cilju svodenja mogućih propusta u dijagnostici neonatalne sepsa na najmanju meru, izložena je ideja istovremenog merenja nivoa IL-6, ili IL-8 kao "rano senzitivnih", i CRP kao "odloženo senzitivnog" pokazatelja odvijanja SIRS [29]. Grupa nemačkih autora je dokazala značajno povećanje dijagnostičke pouzdanosti u intrahospitalnoj sepsi prouzrokovanoj KONS, uz racionalizaciju primene antibiotika ukoliko se istovremeno mere nivoi IL-8 i CRP. Nedavno je na osnovu rezultata opsežne multicentrične studije predložen algoritam za primenu kombinacije IL-8/CRP i u sve češćoj situaciji asimptomskog rizika neonatalne sepsa [30-32]. Inače, pre svega u pedijatrijskim bolnicama sa raznorodnim zahtevima (intenzivna nega dece posle neonatalnog perioda, kardiohirurgija, transplantacija organa i dr.), prednost se daje kombinaciji istovremenog merenja CRP i PCT [26-28].

U zaključku se može istaći da ponavljano merenje serumске koncentracije CRP (dva, po potrebi i tri puta sa razmakom 12-24 h) i dalje predstavlja standard nebakteriološke dijagnoze, procene izbora antibiotika i prognoze neonatalne sepsa.

Prema sadašnjim saznanjima i iskustvima, prihvatljiva, ali i skuplja alternativa može da bude istovremeno merenje CRP i jednog od markera koji se stvaraju u ranijim fazama infekcije.

Svi laboratorijski testovi o kojima je bilo reči moraju se prihvatiti i tumačiti samo kao dopuna detaljnoj anamnezi i savesnom kliničkom pregledu, a svaka terapijska odluka mora da podrazumeva i određeno iskustvo.

Literatura

1. Gerdes JS. Diagnosis and management of bacterial infections in the neonate. *Pediatr Clin N Am* 2004;51:939-59.
2. Chiesa C, Panero A, Osborn JF, Simonetti AF, Pacifico L. Diagnosis of neonatal sepsis: a clinical and laboratory challenge. *Clin Chem* 2004;50:279-87.
3. Bomela HN, Ballot DA, Cory BJ, Cooper PA. Use of C-reactive protein to guide duration of empiric antibiotic therapy in suspected early neonatal sepsis. *Pediatr Infect Dis J* 2000;19:531-6.
4. Polin RA. The "Ins and outs" of neonatal sepsis. *J Pediatr* 2003;143:3-4.
5. Ng PC. Diagnostic markers of infection in neonates. *Arch Dis Child Fetal Neonat Ed* 2004;89:F229-35.
6. Mitaka C. Clinical laboratory differentiation of infectious versus non-infectious systemic inflammatory response syndrome. *Clin Chim Acta* 2005;351:17-29.
7. Mehr S. Cytokines as markers of bacterial sepsis in newborn infants: a review. *Pediatr Infect Dis J* 2000;19:879-87.
8. Du Clos TW. Function of C-reactive protein. *Ann Med* 2000;32:274-8.
9. Blackwell TS, Christman JW. Sepsis and cytokines: current status. *Br J Anaesth* 1996;77:110-7.
10. Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest* 2003;111:1805-12.
11. Jaye DI, Waites KB. Clinical applications of C-reactive protein in pediatrics. *Pediatr Infect Dis J* 1997;16:735-47.
12. Nesin M, Cunningham-Rundkles S. Cytokines and neonates. *Am J Perinatol* 2000;17:393-404.
13. Yoon BH, Romero R, Shim JY, Shim SS, Kim CJ, Jun JK. C-reactive protein in umbilical cord blood: a simple and widely available clinical method to assess the risk of amniotic fluid infection and funisitis. *J Mat Fet Neon Med* 2003;14:85-90.
14. Turner MA, Power S, Emmerson AJB. Gestational age and the C-reactive response. *Arch Dis Child Fetal Neonat Ed* 2004;89:F272.
15. Kawamura M, Nishida H. The usefulness of serial C-reactive protein measurement in managing neonatal infection. *Acta Paediatr* 1995;84:10-3.
16. Benitz WE, Han MY, Madan A, Ramachandra P. Serial serum C-reactive protein levels in the diagnosis of neonatal infection. *Pediatrics* 1998;102:e41.
17. Chiesa C, Pellegrini G, Panero A, Osborn JF, Signore F, Assummo M, et al. C-reactive protein, interleukin-6 and procalcitonin in the immediate postnatal period: Influence of illness severity, risk status, antenatal and perinatal complications, and infection. *Clin Chem* 2003;49:60-8.
18. Janković B. Značaj određivanja koncentracije C-reaktivnog proteina u serumu novorođenčadi sa teškim bakterijskom i enterovirusnim infekcijama (doktorska disertacija). Beograd: Medicinski fakultet; 1993.
19. Philip GSA, 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.
20. Janković B, Ignjatović M, Marković M, Veljković D, Marinković J, Cvetanović G. Pouzdanost C-reaktivnog proteina u dijagnostici teških bakterijskih infekcija novorođenčeta. *Acta Med Medianae* 1996;4:51-9.
21. Janković B, Ignjatović M, Veljković D, Marinković J, Cvetanović G, Sarjanović Lj. C-reaktivni protein i prognoza neposrednog ishoda neonatalne sepsse. *Acta Med Median* 1997;3:35-42.
22. Janković B, Ignjatović M, Veljković D, Cvetanović G, Marković M, Kanjuh B, et al. C-reaktivni protein u serumu novorođenčadi s teškim bakterijskom i enterovirusnim infekcijama. *Acta Infectol Iugosl* 1997;2:93-8.
23. Pasic S, Jankovic B, Abinun M, Kanjuh B, Djordjevic M. Intravenous immunoglobulin prophylaxis in an echovirus 6 and echovirus 4 nursery outbreak. *Pediatr Infect Dis J* 1997;16:718-9.
24. Jankovic B, Pasic S, Kanjuh B, Bukumirovic K, Todorovic N. Severe neonatal echovirus 17 infection during a nursery outbreak. *Pediatr Infect Dis J* 1999;1:393-4.
25. Ronnestad A, Abrahamsen TG, Gaustad P, Finne PH. C-reactive protein (CRP) response patterns in neonatal septicemia. *APMIS* 1999;107:593-600.
26. Whicher J, Bienvenu J, Monnaret G. Procalcitonin as an acute phase marker. *Ann Clin Biochem* 2001;38:483-93.
27. Cusack RJ, Rhodes A, Newman PJ, Grounds RM, Bennett ED. Pros, cons and potential benefits of the procalcitonin assay for intensive care. *Br J Int Care* 2000;14:17-21.
28. Mehr S, Doyle L. Interleukin-6 concentrations in neonatal sepsis. *Lancet* 1999;353:1798.
29. Chiesa C, Signore F, Assuma M, Buffone E, Tramonozzi P, Osborn FJ, et al. Serial measurement of C-reactive protein and interleukin-6 in the immediate postnatal period: Reference intervals and analysis of maternal and perinatal confounders. *Clin Chem* 2001;47:1016-22.
30. Frantz RA, 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.
31. Frantz RA, Steinbach G, Kron M, Pohlandt F. Interleukin-8: a valuable tool to restrict antibiotic therapy in newborn infants. *Acta Paediatr* 2001;90:1025-32.
32. Frantz RA, Bauer K, Schalk A, Garland MS, Bowman DE, Rex K, et al. Measurement of interleukin 8 in combination with C-reactive protein reduced unnecessary antibiotic therapy in newborn infants: A multicenter, randomized, controlled trial. *Pediatrics* 2004;114:1-8.

Summary

Introduction

Accurate evaluation and correct treatment of neonates for possible sepsis still represent the most challenging clinical tasks. Early diagnosis of neonatal sepsis is largely based on the measurement of serum concentrations of different mediators of systemic inflammation, as well as, on a group of proteins named acute phase reactants. Among acute phase reactants, C-reactive protein (CRP) has been the most extensively used and investigated so far.

Synthesis and biological role of CRP

This article reviews current knowledge on the synthesis, structure and biologic roles of CRP. Also, we present our original results in regard to the kinetics of serum CRP concentration during the first 24 hours of systemic infection, as well as different patterns of CRP dynamics associated with the initial choice

of antibiotics, complications and the final outcome of systemic infection.

Interleukins and procalcitonin in diagnosis of sepsis

Because CRP is specific, but somewhat late marker of neonatal sepsis, possible diagnostic use of other indicators of inflammation, i.e. interleukins 6 and 8, and procalcitonin during neonatal sepsis is also considered. The theoretical advantage of these early indicators is discussed in comparative analysis of the time of their activation after initial infectious stimuli.

Conclusion

In conclusion, we point to the diagnostic accuracy of serial measurements of serum CRP levels. As an alternative, simultaneous measurement of CRP and serum levels using a faster marker, such as procalcitonin, is recommended.

Key words: C-Reactive Protein + diagnostic use; Cytokines; Sepsis; Infant, Newborn, Diseases; Diagnosis

Rad je primljen 11. V 2005.

Prihvaćen za štampu 28. VI 2005.

BIBLID.0025-8105:(2006):LIX:11-12:545-549.