Serumski kalprotektin kao rani biljeg bakterijske infekcije mokraćnog sustava u djece

Lamot, Mirta

Doctoral thesis / Disertacija

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:361859

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Mirta Lamot

Serumski kalprotektin kao rani biljeg bakterijske infekcije mokraćnog sustava u djece

DISERTACIJA

Zagreb, 2022.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Mirta Lamot

Serumski kalprotektin kao rani biljeg bakterijske infekcije mokraćnog sustava u djece

DISERTACIJA

Zagreb, 2022.

Disertacija je izrađena u Klinici za pedijatriju te u Kliničkom zavodu za kemiju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice u Zagrebu.

Voditelji rada:
Prof. dr. sc. Miroslav Harjaček, dr. med.
Dr. sc. Slaven Abdović, dr. med., znanstveni suradnik

Ovaj rad nastao je uz svesrdnu, neprestanu i neiscrpnu potporu mojih mentora, kolegica i kolega, prijatelja, roditelja i supruga, zbog čega im svima dugujem zahvalnost.
Osobitu pak zahvalnost dugujem mojim sinovima, Andriji i Juranu, bez kojih bi rad ugledao svjetlo dana mnogo ranije, ali bi ostao bez smisla.
Rad stoga posvećujem njima.

SADRŽAJ

POPIS OZNAKA I KRATICA ..... *I*

1. UVOD I SVRHA RADA *1*

1.1. Uvod **1**

1.2. Kalprotektin **3**

1.2.1. Terminologija 3

1.2.2. Struktura 5

1.2.3. Distribucija 7

1.2.4. Fiziologija 7

1.2.5. Dosadašnja istraživanja kliničke primjenjivosti 12

1.2.5.1. Kalprotektin kao dijagnostički biljeg 12

1.2.5.1.1. Kalprotektin u stolici 12

1.2.5.1.2. Kalprotektin u serumu/plazmi 14

1.2.5.2. Kalprotektin kao terapijski biljeg 17

1.3. Infekcije mokraćnog sustava dječje dobi **18**

1.3.1. Epidemiologija 18

1.3.3. Klinička prezentacija 21

1.3.4. Dijagnostička obrada 22

1.3.5. Liječenje 26

1.4. Svrha rada **29**

2. HIPOTEZA *30*

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA *31*

3.1. Opći cilj **31**

3.2. Specifični ciljevi **31**

4. METODE I ISPITANICI *32*

4.1. Sudionici **32**

4.2. Provedba istraživanja **34**

4.3. Metodologija i definicije **36**

4.3.1. Mjerenje tjelesne temperature i vrućica 36
4.3.2. Prikupljanje urina, patološki urin, dijagnoza IMS-a 36
4.3.3. Dokazivanje virusne infekcije 37
4.3.4. Konvencionalni biljezi akutne faze upale iz krvi 38
4.3.5. Serumski kalprotektin 38
4.4. Statistička analiza 39
5. REZULTATI 42
5.1. Osnovni podaci o sudionicima 42
5.2. Usporedba proučavanih parametara između ispitanika s bakterijskom infekcijom i kontrola 45
5.3. Analiza koncentracije sCal-a u pojedinim podskupinama ispitanika s bakterijskom infekcijom 47
5.4. Korelacija (povezanost) serumskog kalprotektina s konvencionalnim biljezima akutne faze upale 51
5.5. ROC analiza vrijednosti određivanja sCal-a i ostalih konvencionalih biljega akutne faze upale 53
5.6. Binarna logistička regresijska analiza predviđanja bakterijske infekcije u djece s vrućicom 56
6. RASPRAVA 59
6.1. Usporedba dobivenih rezultata s dosad objavljenim istraživanjima 61
6.2. Preporuke za korištenje sCal-a u kliničkoj praksi 66
6.3. Daljnja istraživanja 67
6.4. Prednosti i nedostaci provedenog istraživanja 68
7. ZAKLJUČCI 71
8. SAŽETAK 72
9. SUMMARY 73
10. POPIS LITERATURE 74
11. ŽIVOTOPIS 90

POPIS OZNAKA I KRATICA

AAP	Američko pedijatrijsko društvo (engl. *American Academy of Pediatrics*)
ABN	Apsolutni broj neutrofila
AUC	Vrijednost ispod ROC krivulje (engl. *area under ROC curve*)
BHSB	Beta hemolitički streptokok skupine B
ceVUS	Mikcijska urosonografija pojačana kontrastom (engl. *contrast enhanced voiding urosonography*)
CFA	Antigen cistične fibroze (engl. *cytsic fibrosis antigen*)
CFU	Jedinice koje stvaraju kolonije (engl. *colony-forming units*)
CPS	Kanadsko pedijatrijsko društvo (engl. *Canadian Paediatric Society*)
CRP	C-reaktivni protein
DAMP	Molekularni obrasci povezani s ozljedom tkiva (engl. *damage associated molecular pattern*)
DFA	Direktna imunofluoerescenca (engl. *direct immunofluoresecnce antibody*)
DSCF	Dwass-Steel-Critchlow-Fligner test
EDTA	Etilendiamintetraoctena kiselina (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*)
ESPGHAN	Europsko društvo za pedijatrijsku gastroenterologiju, hepatologiju i nutriciju (engl. *European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition)*
IBD	Kronična upalna bolest crijeva (engl. *inflammatory bowel disease*)
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IMS	Infekcija mokraćnog sustava, uroinfekcija
IRAK	Kinaza povezana s unutarstaničnim receptorom interleukina 1 (engl. *intracellular IL-1 receptor associated kinase 1*)
IQR	Interkvartni raspon (engl. *interquartile range*)
IRF	Faktor regulacije interferona (engl. *interferon regulatory factor*)
ISPN	Talijansko društvo za pedijatrijsku nefrologiju (engl. *The Italian Society for Pediatric Nephrology*)
JIA	Juvenilni idiopatski artritis
L	Broj leukocita
LE	Leukocitna esteraza
LPS	Lipopolisaharid
MAPK	Mitogen-aktivirana protein kinaza (engl. *mitogen-activated protein kinase)*
MCUG	Mikcijska cistouretrografija
MRP	Proteini povezani s mijeloidnim stanicama (engl. *myeloid-related proteins*)
MyD	Mijeloidna diferencijacija (engl. *myeloid differentiation)*
NEC	Nekrotizirajući enterokolitis
NET	Neutrofilna izvanstanična zamka (*engl. neutrophil extracellular trap*)
NF-kB	Jezgrin čimbenik kappa B *(engl. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)*
NICE	Britanski nacionalni institut za izvrsnost u zdravstvu (engl. *National Institute for Health and Care Excellence*)
N%	Udio neutrofila među leukocitima
PCT	Prokalcitonin
PKC	Protein kinaza C
PSGL	P-selektin glikoprotein ligand (engl. *P-selectin glycoprotein ligand*)

RA	Reumatoidni artritis
RAGE	Receptor za krajnje produkte uznapredovale glikacije (engl. *receptor for advanced glycation end products*)
RAP	(engl. *ras-related protein*)
ROC	engl. *Receiver operating charactristic curve*
RSV	Respiratorni sincicijski virus
sCal	Serumski kalprotektin
SE	Sedimentacija eritrocita
SLE	Sistemski eritemski lupus
SLEDAI	Indeks aktivnosti bolesti sistemskog eritemskog lupusa (engl. *systemic lupus erythematosus disease activity index*)
TF	Transkripcijski faktor
TGF	Transformirajući čimbenik rasta (engl. *transforming growth factor*)
TLR	Receptor sličan tollu (engl. *toll-like receptor*)
TNF	Čimbenik tumorske nekroze (engl. *tumor necrosis factor*)
TRAF	Čimbenik povezan s receptorom za TNF (engl. *tumor necrosis factor receptor associated factor*)
TRIF	engl. *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β*
UPEC	Uropatogena Escherichia coli
VUR	Vezikouretralni refluks

Ουκ ένι ιατρικήν είδέναι, όστις μη οίδεν ό τι εστίν άνθρωπος.
(Ouk éni iatrikín eídénai, óstis mi oíden ó ti estín ánthropos.)[*]

[*] Nije moguće znati medicinu bez da se zna što je čovjek. Hipokrat, 460. – 370. pr. Kr., grčki liječnik i „otac medicine“.

1. UVOD I SVRHA RADA

1.1. Uvod

Dijete koje se prezentira u hitnoj ambulanti s vrućicom bez vodećeg simptoma liječnicima još uvijek predstavlja dijagnostički i terapijski problem, unatoč sve dostupnijim i često korištenim krvnim biljezima (engl. *biomarker*) akutne upale poput broja leukocita (L), udjela neutrofila među leukocitima (N%), apsolutnog broja neutrofila (ABN), C-reaktivnog proteina (CRP) i prokalcitonina (PCT) (1). Iako su virusne bolesti samoizlječiva tijeka daleko najčešći uzrok vrućice u djece, značajan dio ih ipak boluje od bakterijske infekcije (2). Zlatni standard dijagnoze bakterijske infekcije je mikrobiološka izolacija uzročnika što je ponekad teško izvediva, a uvijek vremenski zahtjevna metoda, te se tijekom čekanja nalaza djeca nerijetko nepotrebno izlažu antibiotskoj terapiji. Navedeno nije u skladu s načelima racionalne farmakoterapije, a opravdava se prevencijom posljedica mogućeg zakašnjelog liječenja. Problem naglašavaju novija istraživanja koja su dokazala povezanost između prekomjerne izloženosti antibioticima u najranijem djetinjstvu i kasnijeg oboljenja od neke autoimune bolesti, poput kronične upalne bolesti crijeva i juvenilnog idiopatskog artritisa, što se objašnjava nepovoljnim učinkom antibiotika na crijevnu mikrobiotu, odgovornu za regulaciju i razvoj imunološkog sustava (3-6).

Samorazumljivo, potrebno je mnogo studija, kako opservacijskih tako i intervencijskih, da bi se spoznao čitav spektar kliničkih mogućnosti određenog biljega (7). Glavni cilj je prepoznati prednosti određivanja novog biljega u nekoj bolesti u usporedbi s konvencionalnim biljezima iste, za što je neophodna usporedba s dijagnostičkim zlatnim standardom. Potrebna je jasna ideja kakvu će implikaciju na liječenje imati nalazi istraživanog biljega kako bi se poboljšali ishodi bolesti. Drugim riječima, važno je znati planiramo li na temelju novoga biljega ranije postaviti dovoljno značajnu sumnju na neku bolest, odnosno odbaciti istu, da (ne) započnemo liječenje, ili predvidjeti tijek bolesti kako bismo na vrijeme modificirali terapiju.

Infekcije mokraćnog sustava (IMS, uroinfekcije) su među najčešćim bakterijskim infekcijskim bolestima u dječjoj dobi, a kod onih mlađih od tri godine čine otprilike 7% uzroka febrilnog stanja (8-10). Sumnja na IMS postavlja se na temelju kliničke slike i patološkog nalaza urina, a zlatni standard za postavljanje dijagnoze je iz urinokulture izolirani mikrobiološki uzročnik u

signifikantnom broju, što IMS čini etiološki najjednostavnije i najpreciznije dokazivim entitetom unutar bakterijskih infekcija dječje dobi. Lako ostvariv dijagnostički zlatni standard, visoka prevalencija među febrilnom djecom najmlađe životne dobi i želja za homogenom grupom ispitanika, razlozi su zašto je upravo IMS u ovom istraživanju izabran za model bakterijske infekcije u djece mlađe od tri godine.

Kako bi se ispitala hipoteza da su vrijednosti serumskog kalprotektina (sCal) u febrilne djece mlađe od tri godine s bakterijskom infekcijom više nego u febrilne djece iste dobi koja nemaju bakterijsku infekciju, u kontrolnoj skupini valja obuhvatiti djecu s vrućicom uslijed dokazane virusne infekcije. Etiološka dijagnoza virusne infekcije u mnogim ustanovama, uključujući i ustanovu u kojoj je provedeno prikazano istraživanje, u eri prije COVID-19 pandemije nije se postavljala rutinski. Od navedenog nepisanog pravila odstupalo se uglavnom u slučaju kliničke sumnje na infekciju respiratornim sincicijskim virusom (RSV) ili virusom influence tipa A/B, zbog čega su se samo navedeni virusi dokazivali u brisevima nosa/nazofarinksa. Jedan od razloga za određivanje etiološke dijagnoze pri sumnji na upravo ove virusne bolesti zasigurno leži u činjenici kako je RSV u djece mlađe od tri godine najčešći virusni uzročnik febrilne bolesti koja zahtijeva hospitalno liječenje, dok je influenca značajni uzročnik virusne respiratorne bolesti u djece, koja također često može zahtijevati hospitalizaciju (11-14).

1.2. Kalprotektin

1.2.1. Terminologija

Kada se u Pubmed/Medline bazu podataka unese pojam „*calprotectin*“ dobije se preko 5800 rezultata, a stvaran broj zasigurno je i veći s obzirom na to da se navedeni protein u starijoj literaturi pojavljivao pod raznim drugim imenima. Budući da se radovi vezani uz kalprotektin intenzivnije objavljuju od 1990. godine, može se zaključiti da se radi o proteinu koji je unatrag 30 godina od vrlo velikog interesa kako za bazične znanstvenike, tako i za kliničare. Usprkos tome, još je puno karakteristika ovog „popularnog“ proteina neistraženo i nepoznato, posebice njegova klinička primjenjivost u pedijatriji.

Za kalprotektin vrijedi stara latinska poslovica *nomen est omen* jer njegova najvažnija svojstva možemo saznati proučavajući imena pod kojima je opisan u literaturi (tablica 1). U radu iz 1983. godine prvi put se pojavio pod imenom L1 antigen (engl. *major leukocyte protein*), a opisan je kao glavni antimikrobni protein citoplazme neutrofila (15). Tri godine kasnije kreirano je antitijelo koje je detektiralo 27E10 antigen, protein tada najbolje vidljiv u *in vitro* monocitima/makrofazima stimuliranim upalnim procesom (16). Iduće godine zamijećen je serumski protein čija je koncentracija povišena u pacijenata s cističnom fibrozom te je sukladno tome nazvan antigenom cistične fibroze (engl. *cytsic fibrosis antigen*, CFA) (17). Tek je kasnije otkriveno da se radilo o istom proteinu, heterodimeru koji se sastoji od dva proteina iz S100 obitelji, S100A8 i S100A9, s izraženom sposobnošću vezanja dvovalentnih iona kalcija. Poznato je da su proteini iz navedene obitelji molekularni obrasci povezani s oštećenjem tkiva (engl. *damage associated molecular pattern*, DAMP), odnosno alarmini, koji upravljaju upalnim odgovorom i privlače upalne stanice na mjesto oštećenja tkiva (18, 19). Sinonimi za S100A8 i S100A9 su MRP8 i MRP14, odnosno proteini 8 i 14 povezani s mijeloidnim stanicama (engl. *myeloid-related proteins 8 and 14*), jer se primarno nalaze u nezrelim stanicama mijeloidne loze, iako stupnjem njihove diferencijacije količina spomenutih proteina opada (20). Prvotno je opisani protein pod istom kraticom MRP 8/14 nazvan *macrophage migration inhibitory factor related protein* 8/14, prema načinu na koji je izoliran iz periferne krvi, a koji je uključivao monoklonsko protutijelo na inhibicijski faktor migracije makrofaga (21, 22). Pod utjecajem proupalnih citokina (TNFα, IL1β) i lipopolisaharida (LPS) dolazi do pojačane proizvodnje S100A8 i S100A9 prvenstveno u aktiviranim granulocitima. Budući da navedeni proteini tvore heterodimere uz pomoć kalcija, nazivaju se još i kalgranulin A

(S100A8) i kalgranulin B (S100A9) (19, 23, 24). Konačno, naziv kalprotektin koji se koristi u ovoj disertaciji, ime duguje svojim protektivnim, antimikrobnim svojstvima (25).

Tablica 1. Različiti nazivi koji se u literaturi koriste za kalprotektin.

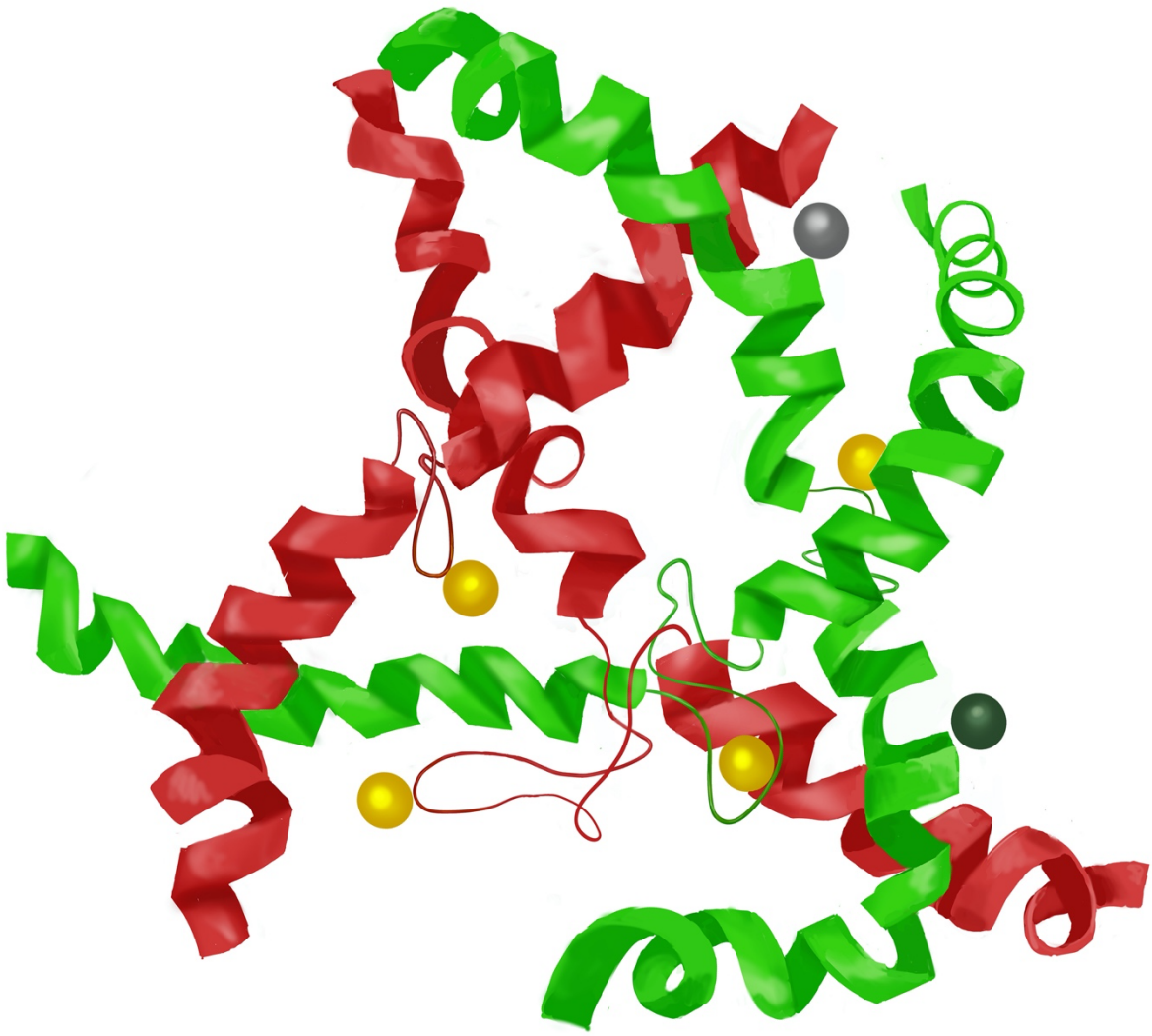
L1 antigen (*major leukocyte protein*)	Dale I i sur., 1983. (9)
27E10 antigen	Zwadlo G i sur., 1986. (10)
CFA (*cystic fibrosis related antigen)*	Dorin JR i sur., 1987. (11)
MRP 8/14 (*macrophage migration inhibitory factor related protein 8/14*)	Odink K i sur., 1987. (16)
S100A8/S100A9	Kligman D i Hilt DC, 1988. (12)
Kalgranulin A/B	Wilkinson M i sur., 1988. (21)
KALPROTEKTIN	Steinbakk M i sur., 1990. (20)
MRP 8/14 (*myeloid related protein 8/14*)	Guignard F i sur., 1995. (22)

1.2.2. Struktura

Geni koji kodiraju kalprotektin i većinu drugih S100 proteina nalaze se na dugom kraku kromosoma 1, locirani na mjestu označenom 1q21 (26).

Kao što je naznačeno u prethodnom poglavlju, kalprotektin pripada obitelji S100 proteina koji imaju sposobnost vezanja dvovalentnog iona kalcija (Ca^{2+}) i tendenciju dimerizaciji. S100 proteini su glavni predstavnici šire obitelji proteina sa strukturnom domenom EF-ruka (engl. *EF-hand Ca^{2+} binding proteins*) koju karakterizira motiv zavojnica-petlja-zavojnica (engl. *helix-loop-helix*) odgovorna za vezanje kalcija i stvaranje dimera (23). Molekularna masa kalprotektina iznosi 24 kDa, a strukturno se radi o heterodimeru građenom od lakog lanca (S100A8 ili MRP 8 ili kalgranulin A ili $L1_l$) mase 10.8 kDa i teškog lanca (S100A9 ili MRP14 ili kalgranulin B ili $L1_h$) mase 13.2 kDa (27). S100A8 i S100A9 imaju u sebi dvije EF-ruka domene povezane fleksibilnom spojnicom što znači da kalprotektin može vezati četiri Ca^{2+}.

Također, S100A8/S100A9 heterodimer ima dva mjesta za vezanje prijelaznih metala. Prvo vezno mjesto se sastoji od šest aminokiselina histidina (dva na lancu S100A8, četiri na lancu S100A9), a drugo od tri aminokiseline histidina (dva na lancu S100A8, jedan na lancu S100A9) i jedne aminokiseline aspartata (na lancu S100A9). Na oba mjesta može se vezati ion cinka (Zn^{2+}) visokim afinitetom, dok se na prvom mjestu umjesto cinka može vezati i ion mangana (Mn^{2+}) (28). Opisano je da se na oba mjesta mogu vezati i drugi prijelazni metali poput bakra (Cu), željeza (Fe) ili nikla (Ni). Međutim, smatra se da je upravo sposobnost kelacije cinka i mangana odgovorna za baktericidni učinak kalprotektina jer time bakterije ostaju bez bivalentnih kationa neophodnih za njihovo preživljavanje i rast (28). Shema kristalne strukture kalprotektina, koji na sebe veže četiri Ca^{2+}, jedan Zn^{2+} i jedan Mn^{2+}, prikazana je na slici 1. Heterodimer se može povezati u tetramer za što je potrebna prisutnost Ca^{2+} i/ili Zn^{2+}, a novonastali heterotetramer $(S100A8/S100A9)_2$ ima važnu ulogu u migraciji fagocita (29).



SLIKA 1. Shematski prikaz strukture kalprotektina. Po uzoru na Pruenster i sur., 2016. (19). Legenda: Crveni lanac, S100A8; zeleni lanac, S100A9; žute kuglice, Ca^{2+}; siva kuglica, Mn^{2+}; tamno zelena kuglica, Zn^{2+}.

1.2.3. Distribucija

Kalprotektin se primarno nalazi u nezrelim stanicama mijeloidne loze, a stupnjem njihove diferencijacije količina tog proteina opada (20). Kad je ljudski organizam u homeostazi, kalprotektin se gotovo isključivo nalazi u neutrofilima u kojima čini otprilike 45% citoplazmatskih proteina. U citoplazmi cirkulirajućih monocita čini 1% proteina, a konstitucijski uopće nije prisutan u tkivnim makrofazima (30).

Međutim, tijekom akutne upale *in vitro*, kalprotektin se osim u neutrofilima, imunohistokemijski značajno detektirao na membranama monocita/makrofaga u upalnom tkivu i u epidermisu bolesne kože, varijabilno je nađen u stanicama bubrežnih kanalića, a zamijećen je i u mnogoslojnom pločastom neoroženom epitelu vlažnih šupljina koji nije pogođen patološkim procesom (16, 31). U posebnim eksperimentalnim uvjetima još neke stanice mogu sadržavati i lučiti kalprotektin, poput epidermalnih keratinocita, osteoklasta, hondrocita i sinoviocita (32, 33).

1.2.4. Fiziologija

Neutrofili su najažurnije stanice nespecifične imunosti, što znači da se prve pojave na mjestu oštećenja tkiva. Kalprotektin djeluje kemotaktički za neutrofile i potiče njihov prelazak iz koštane srži u cirkulaciju, što je dokazano u mišjem modelu gdje je intravenska aplikacija kalprotektina uzrokovala neutrofiliju (34).

Zbog dovoljne ekspresije kalprotektina u neutrofilima i u uvjetima homeostaze, nema prijeke potrebe za brzom aktivacijom transkripcije gena za S100A8 i S100A9 proteine tijekom upale. Poznato je da sintezu kalprotektina potiču, između ostalih, proupalni citokini TNFα i IL1β putem transkripcijskog faktora (TF) C/EBPα, kojeg antagonizira TF myb, izrazito aktivan u diferenciranim mijeloidnim stanicama, posebice makrofazima. Time se može objasniti zašto konstitucijski ne nalazimo kalprotektin u citoplazmi tkivnih makrofaga (35). Pojačanu ekspresiju kalprotektina uzrokuju i bakterijski endotoksini/lipopolisaharidi (LPS) koji se vežu na TLR4 (engl. *Toll-like receptor*) na površini neutrofila, što pak aktivira unutarstanične kaskadne reakcije koje rezultiraju ulaskom TF Stat3 i NF-κB u jezgru te pokreće transkripciju gena za proteine S100A8 i S100A9. Posttranslacijski se S100A8 i S100A9 spajaju u

heterodimere (kalprotektin), dok je za postizanje forme heterotetramera $(S100A8/S100A9)_2$ nužna prisutnost kalcija i/ili cinka (36).

Iako je forma heterodimera biološki najznačajnija, smatra se da bez heterotetramera nema migracije neutrofila jer $(S100A8/S100A9)_2$ potiče polimerizaciju tubulina kod neaktivnih fagocita. Tijekom upalnog procesa dolazi do fosforilacije S100A9 proteina putem MAP kinaze p38 i Ca^{2+} signalnog puta što uzrokuje prekid polimerizacije tubulina, reorganizaciju mikrotubula i u konačnici kemotaktično kretanje neutrofila (29, 37).

Opisano je da kalprotektin djeluje i kao endogeni koaktivator TLR4 koji pospješuje upalnu reakciju nakon što se na TLR4 veže LPS (38). Paradoksalno, u dendritičkim stanicama kože proizvodnju kalprotektina potiču i protuupalni citokini poput IL10 (39).

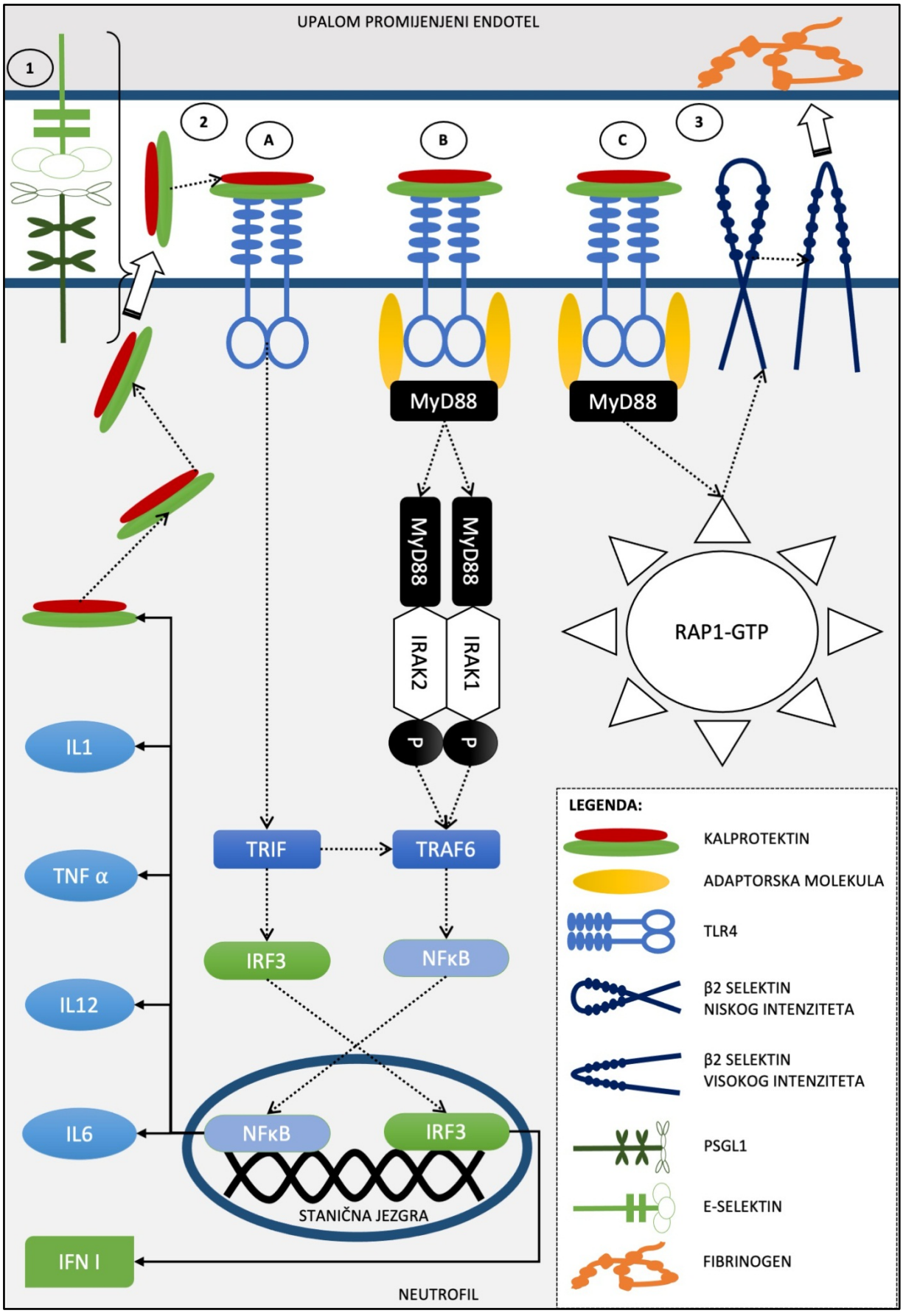
Do pasivne sekrecije kalprotektina iz aktiviranih neutrofila dolazi tijekom njihovog propadanja uslijed stanične nekroze i/ili prilikom formiranja neutrofilne izvanstanične zamke (engl. *neutrophil extracellular trap*, NET) (40, 41). S druge strane, ne zna se točno kako kalprotektin aktivno prelazi iz citoplazme do stanične membrane, osim da je proces posredovan protein kinazom C (PKC) kojoj je potreban kalcij i da se ne radi o klasičnoj sekreciji proteina putem Golgijeva tijela (20). Tijekom upale endotelne stanice krvnih žila se promijene kako bi lakše usmjeravale kretanje leukocita te ih privukle na mjesto infekcije. Prvi korak te definirane kaskadne reakcije je ekspresija kemokina na površini endotela (E-selektin) na koji se veže receptor za kemokin na površini neutrofila ($PSGL_1$), a ta interakcija se pokazala važnom za brzu aktivnu sekreciju kalprotektina (42).

Na koji god način da je izlučen, kalprotektin izvan stanice ima ulogu alarmina, odnosno DAMP proteina, jer daje signal organizmu da je narušena homeostaza i da je započela upalna reakcija u kojoj on sam ima ključnu ulogu, neovisno radi li se o infekciji ili oštećenju tkiva uslijed sterilne upale (43). Kalprotektin kao DAMP upravlja upalnim odgovorom i privlači upalne stanice na mjesto infekcije, a svoj učinak postiže vežući se na receptore koji prepoznaju molekularne obrasce (engl. *pattern recognition receptors*) poput TLR4 i RAGE (engl. *receptor for advanced glycation end products*) na stanicama nespecifičnog (prirođenog) imunološkog sustava (23).

Nakon što se kalprotektin veže na TLR4 mogu se aktivirati tri različita signalna puta koja su shematski prikazana na slici 2. TRIF (engl. *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β*) signalni put daje poticaj za aktivaciju faktora regulacije interferona 3 (*interferon regulatory factor*, IRF3) i njegov ulazak u jezgru gdje potiče transkripciju gena za interferone tipa 1 (IFN1), važne u borbi protiv virusa. TRIF-ov signal aktivira i adapterski protein povezan s receptorom za TNF (*tumor necrosis factor receptor associated factor 6*, TRAF6) koji potiče ulazak TF NF-κB u jezgru i proizvodnju proupalnih citokina poput IL1, IL6, IL12, TNFα, ali i samog kalprotektina. Drugi signalni put uključuje MyD88 (*myeloid differentiation primary response)* protein te kinaze IRAK (*intracellular IL-1 receptor asscoiated kinase*)1 i IRAK2 koje također djeluju na TRAF6 i NF-κB i uzrokuju transkripciju gena za prouplane citokine, uključujući kalprotektin (44). U trećem se signalnom putu posredstvom MyD88 proteina aktivira GTPaza Rap1 što dovodi do aktivacije integrina β_2 na površini neutrofila. Integrin β_2 je ključan za sporije kretanje neutrofila duž oštećenog endotela te čvrstu adheziju leukocita za fibrinogen, što pak olakšava njihovu migraciju do mjesta oštećenja, kao i privlačenje novih upalnih stanica (42).

Vezanje kalprotektina za RAGE aktivira signalne puteve ovisne o MAPK što također rezultira stvaranjem proupalnih citokina pomoću TF NF-κB (45).

Zaključno, može se reći da je kalprotektin protein „s mnogo lica“ te da je vrlo važan medijator sterilne i infektivne upale. U nekim stanicama prisutan je konstitucijski dok je u drugima potrebna indukcija njegove ekspresije. Ima proupalne, protuupalne i direktne baktericidne karakteristike, djeluje parakrino i autokrino, a sve navedeno ovisi o okolini u kojoj se nalazi.



SLIKA 2. Shematski prikaz različitih funkcija kalprotektina u upalnom procesu.

Objašnjenje slike 2: 1) Na površini upalom promijenjenog endotela prezentira se kemokin E-selektin koji privlači leukocite i veže se s receptorom za kemokin PSGL1 na površini leukocita, što dovodi do aktivne sekrecije kalprotektina iz stanice. 2) Kalprotektin otpušten u izvanstanični prostor veže se na površinski receptor TLR4, čime se aktiviraju tri signalna puta. A) TRIF signalni put aktivira IRF3 i potiče njegov ulazak u jezgru, čime započinje transkripcija gena za IFN1, važnog u upalnom odgovoru protiv virusa. K tome, TRIF signalni put aktivira i signalnu molekulu TRAF6. 3) Signalni put ovisan o MyD88 proteinima djeluje na kinaze IRAK1 i IRAK2 koje same sebe fosforiliraju te aktiviraju signalnu molekulu TRAF6, koja pak potiče ulazak transkripcijskog čimbenika NF-kB u staničnu jezgru te transkripciju gena za važne proupalne citokine, među kojima je i kaprotektin. C) Signalni put ovisan o MyD88 proteinima i RAP1 aktivira RAP1 GTPazu te dovodi do promjene konformacije i povećanja afiniteta β2 selektina. 3) β2 selektin visokog afiniteta pospješuje vezanje leukocita na fibrinogen te posljedično i akumulaciju leukocita na mjestu upale.

Skraćenice: IFN1, interferon 1; IRAK1, Interleukin 1 Receptor Associated Kinase 1; IRAK2, Interleukin 1 Receptor Associated Kinase 2; MyD88, Myeloid differentiation primary response 88; NF-kB, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; PSGL1, P-selectin glycoprotein ligand; RAP1, Ras-related protein 1; TLR4, toll-like receptor 4; TRAF6, TNF Receptor Associated Factor 6; TRIF, TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β.

1.2.5. Dosadašnja istraživanja kliničke primjenjivosti

Kalprotektin se kao klinički biljeg može koristiti u svrhu dijagnoze i/ili kao terapijski putokaz, stoga se u nastavku piše o kalprotektinu kao dijagnostičkom i terapijskom biljegu.

Nekoliko karakteristika kalprotektina čine ga idealnim biljegom raznih akutnih i kroničnih upalnih stanja. Radi se o sveprisutnom proteinu kako sterilne upale, tako i infekcije, izlučuju ga aktivirani neutrofili i monociti/makrofagi na mjestu oštećenja tkiva, otporan je na razgradnju bakterija i enzima, a za razliku od IL6, IL1β i TNFα, stabilan je pri sobnoj temperaturi (46). Zbog svoje male veličine, difuzijom lagano prelazi iz krvi u tkiva i obratno te je do sada izmjeren u mnogim tjelesnim tekućinama poput cerebrospinalnog likvora (47), sline (48), urina (49), mekonija (50), sinovijalne tekućine (51), fecesa te seruma/plazme.

1.2.5.1. Kalprotektin kao dijagnostički biljeg

Broj dostupnih radova vezanih za kliničku primjenjivost kalprotektina značajno se povećao u proteklih 20-ak godina, pri čemu je u većini radova ispitivan fekalni i serumski/plazmatski kalprotektin kao potencijalni biljeg određene akutne/kronične upalne bolesti. U nastavku su izložena dosadašnja saznanja o toj temi, s posebnim naglaskom na pedijatrijsku populaciju.

1.2.5.1.1. Kalprotektin u stolici

Klinička uporaba kalprotektina u djece i odraslih do sada se najviše istraživala u bolesnika s upalnom bolesti crijeva (engl. *Inflammatory bowel disease*, IBD) (52). Upravo zahvaljujući brojnim istraživanjima pokazalo se da je kalprotektin u stolici važan biljeg aktivnosti bolesti u ovih bolesnika (53-57). Osim toga, od 2014. godine se sukladno smjernicama Europskog društva za pedijatrijsku gastroenterologiju, hepatologiju i nutriciju (engl. *The European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition*, ESPGHAN) njegova vrijednost određuje u djece i adolescenata s kliničkom sumnjom na IBD u svrhu probira onih kojima je potrebno raditi daljnje endoskopske pretrage (58). U laboratorijskoj dijagnostici IBD-a u djece, osjetljivost fekalnog kalprotektina doseže izuzetno visokih 98%, dok mu je specifičnost znatno nižih 68%, s obzirom na to da je povišen i u drugim crijevnim bolestima poput infekcije ili alergije, ali i u sklopu nekih bolesti i stanja izvan probavnoga sustava (59).

Recentna istraživanja pokazala su da vrijednost fekalnog kalprotektina u pacijenata s akutnim proljevom može pomoći u razlikovanju bakterijske od virusne etiologije crijevne infekcije (60).

Kalprotektin u stolici pokazao se korisnim biljegom za otkrivanje subkliničke upale crijeva te aktivnosti bolesti u djece s reumatskim bolestima (61, 62), a povišen je i kod djece s prekomjernom tjelesnom masom i debljinom (63). Također je utvrđeno da bi u manjem opsegu na njegove vrijednosti mogla utjecati i konzumacija nesteroidnih antiupalnih lijekova i inhibitora protonske pumpe (64).

Kontroverzna je korist fekalnog kalprotektina u dijagnostici celijakije i praćenju upale crijevne sluznice prije i poslije uvođenja bezglutenske prehrane. U radu o toj temi iz 2007. godine nije pronađena povezanost između visokih vrijednosti kalprotektina u stolici i neliječene celijakije u odraslih (65). Suprotno tome, dva istraživanja provedena tijekom narednih godina u kojima su sudjelovali ispitanici pedijatrijske dobi pokazala su da djeca u trenutku postavljanja dijagnoze celijakije imaju više vrijednosti kalprotektina u odnosu na zdravu populaciju. Provođenjem dijetetskih mjera te vrijednosti padaju, a nakon jednogodišnjeg izbjegavanja konzumiranja namirnica koje sadrže gluten koncentracije kalprotektina u stolici su iste kao u zdravoj populaciji (66, 67). Ipak, najrecentniji rad s najvećim brojem odraslih ispitanika podupire zaključak prvog spomenutog rada da fekalni kalprotektin nije koristan biljeg u bolesnika s celijakijom (68).

U neonatologiji su se polagale velike nade u fekalni kalprotektin kao rani biljeg nekrotizirajućeg enterokolitsa (NEC) koji zahtijeva kirurško liječenje, s obzirom na to da se radi o dijagnozi s još uvijek visokim mortalitetom koja se postavlja prvenstveno kod nedonoščadi i koja usprkos razvoju sve boljih slikovnih i laboratorijskih pretraga i dalje predstavlja dijagnostički izazov. Nekoliko studija istraživalo je stolicu nedonoščadi s postavljenom kliničkom sumnjom na NEC te su nađene više vrijednosti kalprotektina u stolici nedonoščadi s potvrđenom dijagnozom NEC-a u odnosu na nedonoščad s drugim konačnim dijagnozama (69-71). Međutim, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se utvrdila primjenjivost fekalnog kalprotektina u ovoj skupini bolesnika, s obzirom na to da gotovo polovina nedonoščadi sa sumnjom na NEC uopće nema stolicu, a zbog opaženih razlika u vrijednostima fekalnog kalprotektina u odnosu na ostale dobne skupine nisu još poznate niti granične vrijednosti fekalnog kalprotektina u nedonoščadi.

Vrijednosti kalprotektina u stolici do četvrte godine života povišene su i izrazito varijabilne u odnosu na stariju djecu i odrasle (72). To osobito vrijedi za prvih šest mjeseci života, kada su najviše vrijednosti zabilježene kod novorođenčadi koja su rođena vaginalnim putem i hrane se dojenjem (73). Visoke vrijednosti kalprotektina u najmlađe djece objašnjene su povećanom propusnosti nezrele crijevne sluznice što olakšava prelazak neutrofila kroz epitel u lumen crijeva (74). Aktivne tvari majčinog mlijeka pospješuju sazrijevanje crijevne sluznice djeteta, ali također stimuliraju fiziološki razvoj imunološkog sustava, što se odražava visokom koncentracijom kalprotektina u stolici isključivo dojene djece (75). Isto tako, pozitivan učinak na razvoj imunološkog sustava djece ima prvi kontakt novorođenčeta s majčinim mikrobiomom tijekom vaginalnog poroda (76).

Smatra se da granična vrijednost kalprotektina koja razlikuje fiziološko od patološkog stanja crijevne sluznice u djece starije od četiri godine i odraslih iznosi 50 μg/g stolice (77).

1.2.5.1.2. Kalprotektin u serumu/plazmi

Nakon što se fekalni kalprotektin pokazao kao vrijedan biljeg IBD-a, sve više radova je istraživalo potencijalnu ulogu serumskog biljega u spomenutoj bolesti, te se pokazalo da koncentracije kalprotektina u krvi mogu predvidjeti relaps, procijeniti prognozu te odrediti težinu bolesti (78-82). Vrijednosti serumskog kalprotektina su korelirale s CRP-om, ali ne i fekalnim kalprotektinom na temelju čega se zaključilo da je serumski kalprotektin pokazatelj sistemske upale te je inferioran biljeg za IBD u odnosu na fekalni kalprotektin (78).

Klinička korist kalprotektina izmjerenog u krvi prema dostupnoj literaturi najviše se proučavala u reumatskim bolestima (83-87). Tako se pokazalo da dobivene vrijednosti kalprotektina odražavaju aktivnost fagocita te posredno i aktivnost same bolesti, što često ima više prednosti od određivanja serumskih koncentracija konvencionalno korištenih biljega upale, CRP-a i sedimentacije eritrocita (SE) (88). K tome, u djece s juvenilnim idiopatskim artritisom (JIA) serumski kalprotektin može biti prvi prediktor sistemskog oblika bolesti, a porast njegove koncentracije vrlo rano može anticipirati egzacerbaciju već liječene bolesti (89, 90). Bazalne serumske vrijednosti kalprotektina u djece s JIA-om mogu predvidjeti tko će dobro reagirati na terapiju metotreksatom, a u bolesnika s aktivnim reumatoidnim artritisom (RA) na biološku terapiju (88, 91). Unutar grupe bolesnika s dijagnozom psorijaze, više vrijednosti kalprotektina iz krvi ukazuju na one s upalom kože i zglobova (92). Iznenađujući su rezultati jednog istraživanja bolesnika sa sklerodermijom, gdje su visoke vrijednosti kalprotektina nađene kod

bolesnika s ograničenom kožnom manifestacijom bolesti, ali izraženom plućnom fibrozom (93). Nadalje, vrijednosti kalprotektina u bolesnika sa sistemskim eritematoznim lupusom (SLE) koreliraju s težinom kliničke slike, odnosno globalnim indeksom aktivnosti bolesti SLEDAI (engl. *systemic lupus erythematosus disease activity index*), a u odnosu na zdravu populaciju više su i kod bolesnika u remisiji bolesti (94, 95).

Zanimljiva je i povezanost visokih vrijednosti kalprotektina u serumu s kliničkim i radiološkim pogoršanjem kronične reumatološke bolesti te nastankom erozivnih oštećenja zahvaćenih zglobova (96, 97). Plazmatska koncentracija kalprotektina je povišena u djece i odraslih koji kao posljedicu preboljene Kawasakijeve bolesti imaju velike aneurizme koronarnih arterija, što čini kalprotektin potencijalnim biljegom za predviđanje koronarnih oštećenja u navedenoj bolesti (98).

Vrijednosti serumskog kalprotektina ispitivane se i u drugim bolestima i/ili stanjima u kojima dolazi do aktivacije imunološkog odgovora, poput astme i akutnog odbacivanja presatka nakon transplantacije (99, 100). Tako se pokazalo da je serumski kalprotektin vrlo rani biljeg pogodan za praćenje akutnog odbacivanja nakon transplantacije bubrega (101). U bolesnika s astmom serumski se pak kalprotektin pokazao kao dobar biljeg težine bolesti (102).

Potrebno je također spomenuti kako su vrijednosti serumskog kalprotektina povišene u djece s prekomjernom tjelesnom masom i debljinom u odnosu na djecu s normalnom tjelesnom masom te pozitivno koreliraju s pojavom metaboličkih komplikacija navedenih poremećaja, povišenom vrijednosti glukoze natašte i inzulinskom rezistencijom (103).

Od posebnog su interesa za ovu disertaciju istraživanja koja su proučavala kretanja vrijednosti kalprotektina iz krvi pod utjecajem infektivnih agensa. Prije dvadesetak godina primijećeno je da vrijednosti kalprotektina u krvi transplantiranog bolesnika rastu uslijed akutnog odbacivanja alogeničnog transplantata, posebice ako je došlo do infekcije (99). Također, vrijednosti serumskog kalprotektina u bolesnika sa simptomima i znakovima poveznim s dišnim sustavom pokazale su se korisnima za razlikovanje sterilne plućne sarkoidoze od infektivne plućne tuberkuloze, tako da su više vrijednosti opažene u potonjoj skupini bolesnika (104).

Budući da je kalprotektin biljeg aktivacije neutrofila i njihov glavni baktericidni protein, logična je ideja mjerenja njegove koncentracije u serumu ili plazmi u svrhu razlikovanja

bakterijske od virusnih infekcija. Ne čude stoga rezultati istraživanja iz „davne“ 1984. godine koji su pokazali kako su vrijednosti plazmatskog kalprotektina (tada označenog kao L1 protein) u febrilnih bolesnika u dobi od 1 do 101 godine s različitim bakterijskim infekcijama više u odnosu na bolesnike zaražene različitim virusima (105). Već tada je uočena slaba korelacija vrijednosti plazmatskog kalprotektina s vrijednostima drugih upalnih biljega poput CRP-a, L-a i SE-a, te je zaključeno kako navedeni biljezi vjerojatno odražavaju različite aspekte odgovora na oštećenje tkiva i upalu.

Od 1993. kada je prvi puta opisan kao marker bakterijske infekcije, PCT privlači pozornost kliničara i istraživača te se u zadnje vrijeme naširoko prihvaća kao pouzdan biljeg ozbiljne bakterijske infekcije (106, 107). Međutim, serumski kalprotektin se u nekim istraživanjima istaknuo kao bolji prediktor bakterijske sepse od PCT-a (108). Shodno tome, plazmatski kalprotektin je nedavno pokazao veću osjetljivost i specifičnost od PCT-a u razlikovanju odraslih bolesnika s bakterijskom pneumonijom od bolesnika s potvrđenim virusnim respiratornim infekcijama (109). U nedonoščadi vrlo niske rodne mase, najmlađoj dobnoj skupini koja je ujedno i najosjetljivija na sepsu, serumski kalprotektin je ostvario bolju osjetljivost i specifičnost kao rani biljeg sepse od konvencionalnih markera infekcija CRP-a, L-a i N%-a (110). Rezultati su bili slični i u terminske novorođenčadi sa sumnjom na sepsu (111).

Krvni uzorak iz kojeg se određivao kalprotektin u ranije spomenutim istraživanjima bio je serum ili plazma u otprilike jednakom omjeru. Serum se dobiva nakon koagulacije krvi pa ne sadrži fibrinogen niti većinu čimbenika zgrušavanja, za razliku od plazme koja je antikoagulirana krv, najčešće uz pomoć EDTA-e (*eng. ethylenediaminetetraacetic acid*). Prema službenim uputama proizvođača komercijalno dostupnog testa za određivanje koncentracije kalprotektina koji je korišten u našem istraživanju (Quantum Blue® sCal test i Quantum Blue® Reader aparat, Bühlmann, Švicarska[†]), serumski uzorci su jednako pouzdani kao i plazmatski za određivanje koncentracije kalprotektina u krvi. U našem istraživanju odlučili smo koristiti serumski uzorak za određivanje koncentracije kalprotektina kako bismo mogli iskoristiti već izvađene uzorke krvi za mjerenje konvencionalnih biljega infekcije i time poštedjeti malu djecu traume dodatnog vađenja krvi.

[†] https://buhlmannlabs.com/products-solutions/autoimmunity/mrp814/#downloadIFU

Na temelju saznanja iz do sada objavljenih radova može se zaključiti da su normalne serumske koncentracije kalprotektina u zdravih pojedinaca <1 μg/ml, dok za vrijeme upale mogu narasti i do 100x (112).

1.2.5.2. Kalprotektin kao terapijski biljeg

Istraživanja na temu postizanja potencijalnih terapeutskih učinaka blokiranjem kalprotektina su oskudna i većinom u eksperimentalnoj fazi. U najdalju kliničku fazu ispitivanja, konkretno za SLE i multiplu sklerozu, došli su kinolin-3-karboksamidi koji se vežu na ciljni S100A9 protein, čime se blokira njegova interakcija s proupalnim receptorima TLR4 i RAGE (113). Takvo vezanje isključivo je usmjereno na homodimerni S100A9, dok je za heterodimer S100A8/A9 (kalprotektin) uočeno samo slabo vezanje (113). Međutim, činjenice govore da je kalprotektin sveprisutni DAMP s važnom ulogom u razvoju brojnih akutnih i kroničnih upalnih bolesti te bi selektivno blokiranje tog proteina neminovno moduliralo lokalni tijek upalne reakcije, uz izbjegavanje sistemskih nuspojava biološke terapije (19).

1.3. Infekcije mokraćnog sustava dječje dobi

Kao što je prethodno objašnjeno u uvodu, infekcije mokraćnog sustava (IMS, uroinfekcije) su jedne od najčešćih bakterijskih infekcija dječje dobi te u ovom istraživanju predstavljaju model bakterijske infekcije u djece mlađe od tri godine.

IMS je heterogena skupina bolesti u odnosu na dob bolesnika, mikrobiološki izolat iz urinokulture, lokalizaciju upale, kliničku prezentaciju te prisutne anomalije urotrakta. IMS se u normalnom mokraćnom sustavu naziva nekompliciranom ili primarnom, dok se ona u mokraćnom sustavu s anatomskim abnormalnostima i funkcionalnim poremećajima označava kao komplicirana ili sekundarna (10). U spomenute anatomske/funkcijske anomalije spadaju vezikoureteralni refluks (VUR), opstrukcijske anomalije, neurogeni mjehur i idiopatski poremećaj funkcije donjeg urotrakta, poput prekomjerno aktivnog mokraćnog mjehura ili Hinmanovog sindroma (114, 115). Atipičan IMS, prema nacionalnim smjernicama Velike Britanije (engl. *National Institute for Health and Care Excellence,* NICE), prati ozbiljno bolesno/septično dijete, neodgovarajući klinički odgovor unutar 48 sati na antibiotsku terapiju, oslabljen mlaz urina, tvorba u abdomenu, porast kreatinina u serumu ili mikrobiološki uzročnik koji nije *Escherichia coli* (116). Prema lokalizaciji infekcije, IMS dijelimo na infekcije donjeg dijela mokraćnog sustava, odnosno infekcije mokraćnog mjehura i uretre (cistitis i uretritis) te infekcije gornjeg dijela mokraćnog sustava, odnosno infekcije bubrega i njegovog kanalnog sustava (pijelonefritis) (10). Mlađa djeca imaju sklonost da se akutna infekcija proširi na cijeli mokraćni sustav gdje god da je započela, stoga se neovisno o simptomima u većini slučajeva radi o akutnom cistopijelonefritisu (117).

1.3.1. Epidemiologija

Iako prava incidencija IMS-a nije u potpunosti poznata, procijenjeno je da od svih posjeta u pedijatrijsku hitnu ambulantu 5-14% otpada na djecu kojoj se postavila dijagnoza IMS-a (118). U našem podneblju, vjerojatnost da dijete koje potraži liječničku pomoć zbog vrućice bez vodećeg simptoma boluje od IMS-a najviše ovisi o dobi djeteta i spolu, pa je tako najveća prevalencija IMS-a kod muške djece mlađe od tri mjeseca, a zatim ženske djece mlađe od 12 mjeseci (8, 10). Prema istraživanju iz 2008. godine, 7% djece mlađe od dvije godine s naglo nastalom vrućicom u ordinaciji primarnog pedijatra ili hitnoj pedijatrijskoj ambulanti ima IMS (9). Odmah po rođenju, IMS se češće javlja u nedonoščadi nego u novorođenčadi (119). Unutar

prva tri mjeseca života dječaci imaju skoro tri puta veću vjerojatnost da će dobiti IMS od djevojčica iste dobi, dok kasnije djevojčice dominiraju među oboljelima sa stalnom tendencijom porasta do odrasle dobi (120). Smatra se da će otprilike 7.8% djevojčica i 1.7% dječaka preboljeti barem jednu epizodu IMS-a prije sedme godine života, odnosno 11.3% djevojčica i 3.6% dječaka do 16. godine života, kada već polako počinju napuštati pedijatrijsku populaciju (121). Recidiviranje IMS-a je više pravilo nego iznimka te se očekuje u čak 75% djevojčica školske dobi (122). Recidiv IMS-a najčešće se javlja unutar tri mjeseca od prve epizode, neovisno o postojanju anomalija mokraćnog sustava, iako je jasno da su VUR i funkcionalne bolesti crijeva i mokraćnog mjehura predisponirajući čimbenici (122, 123). Kod dječaka iz opće populacije recidiviranja IMS-a su ipak rjeđa te se javljaju u otprilike 30% slučajeva (123).

Najčešći uzročnici nekompliciranih, primarnih i rekurentnih IMS-a u djece iz opće populacije su enterobakterije (122). Uropatogena *Escherichia coli* (UPEC) je uzročnik u 70-90% mikrobiološki potvrđenih slučajeva, a za njom slijede pripadnici rodova *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter* i *Citrobacter*. *Klebsiella spp* uzrokuje oko 12% svih IMS-a u djece, a *Proteus spp* oko 8% uz napomenu da se je *Proteus mirabilis* češće izoliran kod dječaka starijih od godinu dana (119, 124). Osim enterobakterija i druge gram-negativne bakterije mogu sporadično uzrokovati IMS, s naglaskom na rod *Pseudomonas*, s obzirom na to da *Pseudomonas auerginosa* uzrokuje otprilike 9% svih IMS-a u djece. Od gram-pozitivnih uzročnika IMS-a u djece, najučestaliji su pripadnici roda *Enterococcus.* Kod adolescentica oko 15% IMS-a je uzrokovano koagulaza negativnim stafilokokom *Staphylococcus saprophyticus*, koji se izuzetno rijetko izolira iz urinokulture manje djece iz opće populacije (122). S druge strane, betahemolitički streptokok serološke grupe B (BHSB) je mogući uzročnik IMS-a kod novorođenčadi. Kada se iz dječje urinokulture izoliraju bakterije u signifikantnom broju koje nisu *Escherichia coli*, to je upozorenje da bi u podlozi infekcije mogla biti anomalija mokraćnog sustava (125). Od nebakterijskih uzročnika IMS-a u djece najvažniji je adenovirus koji uzrokuje hemoragijski cistitis (122).

Značajan rizični čimbenik za nastanak nozokomijalne infekcije mokraćnog sustava je urinarna kateterizacija koja traje dulje od tri dana (122). Glavni uzročnici i u tom slučaju su već navedene gram-negativne bakterije, a mogući uzročnici su i koagulaza negativni stafilokoki i gljive roda *Candida (119, 122)*.

1.3.2. Patogeneza

IMS nastaju gotovo isključivo ascenzijom bakterija iz uretre u više dijelove mokraćnog sustava, osim u novorođenačkoj i ranoj dojenačkoj dobi (prvih 8-12 tjedana života) kada je realno očekivati i infekciju mokraćnog sustava uslijed hematogenog rasapa bakterija (119).

Nekoliko događaja prethodi uspješnoj ascenziji UPEC-a ili drugih uropatogenih bakterija u više dijelove mokraćnog sustava (126-128). UPEC iz rektuma prvo kolonizira perineum i vanjsko ušće uretre, pa se putem uretre popne u mokraćni mjehur gdje uzrokuje cistitis, a može i preko uretera doći do bubrežnog parenhima i uzrokovati pijelonferitis. Valja naglasiti da periuretralna bakterijska kolonizacija u većini slučajeva ne znači početak IMS-a, već samo preduvjet za njezin razvoj.

Za razliku od komenzalne *Escherichie coli,* UPEC ima gene koji kodiraju njegove virulencijske čimbenike od kojih se ističu adhezini smješteni na fimbrijama kojima bakterije prianjaju na glikokonjugate uroepitela (127, 128). Treba istaknuti fimbrije tipa 1, P fimbrije i Dr fimbrije. Najprisutniji adhezini na uropatogenim E.coli su fimbrije tipa 1, dok su P fimbrije nađene na 80% UPEC-a koji su uzrokovali pijelonefritis (129-131). P fimbrije su važan medijator za aktivaciju uroepitelnih TLR4, čime se između ostalog aktivira TF IRF3 koji ulazi u jezgru stanice i potiče stvaranje raznih proupalnih citokina, poput IL6 i IL8. IL6 djeluje kao endogeni pirogen, potiče stvaranje CRP-a u jetri i IgA-a iz mukoznih limfocita B. IL8 djeluje kemotaktički na neutrofile, privlačeći tako glavne stanice nespecifične imunosti u borbi protiv bakterija te glavne stanice koje izlučuju kalprotektin na mjesto infekcije. Navedeno se klinički manifestira vrućicom i leukociturijom, glavnim simptomom i znakom pijelonefritisa (132). UPEC-i koji sadrže Dr fimbrije u djece uglavnom uzrokuju cistitis (133). Ostali značajni virulencijski čimbenici UPEC-a su njegovi toksini alfa hemolizini koji stvaraju pore na membrani eritrocita te citotoksični nekrotizirajući čimbenik (engl. *citotoxic necrotizing factor*) koji uzrokuje direktnu smrt stanice omogućujući invaziju bakterija kroz mukozu u dublje slojeve tkiva, a ponekad i u sistemsku cirkulaciju. Nadalje, endotoksin LPS koji se nalazi na vanjskoj membrani gram-negativnih bakterija veže se na TLR4 fagocita, što pospješuje sistemsku upalnu reakciju. Navedeno dovodi do izlučivanja raznih citokina, kemokina i proupalnih medijatora, poput IL1, TNFα, IFNβ (131) te između ostalog i kalprotektina (36). LPS k tome štiti UPEC od fagocitoze i lize posredovane komplementom (134, 135). Naposljetku, UPEC svoje patogeno djelovanje ostvaruje i preko proteina enterobaktina i

aerobaktina kojima veže željezo visokim intenzitetom čime troši domaćinu taj vrijedni nutrijent (136).

Odgovor domaćina na prianjanje bakterija na uroepitelne stanice i lučenje toksina je upalna reakcija tijekom koje, osim već opisanog, dolazi do ljuštenja zaraženih stanica i njihovog odstranjivanja iz organizma pomoću mokrenja (122, 128, 133). To objašnjava činjenicu da je među važnijim oružjem u borbi protiv IMS-a upravo nesmetani jednosmjerni tijek mokraće koji mehanički čisti mokraćni sustav. Postoji još čitav niz obrambenih sposobnosti domaćina koji sprečavaju nastanak IMS-a, od kojih se mogu izdvojiti antimikrobni proteini u mukoznom sloju mokraćnog sustava, fizikalne karakteristike mokraće (nizak pH, visoka osmolalnost) koje smanjuju bakterijama preživljenje te stvaranje sekretornih IgA koji otežavaju prianjanje bakterija za uroepitel uretre i mokraćnog mjehura (133, 137).

1.3.3. Klinička prezentacija

Klinička slika IMS-a u dječjoj dobi varira od asimptomatske bakteriurije koja ne zahtijeva liječenje do teške sistemske infekcije, a što je dijete mlađe, simptomi su nespecifičniji (115). U novorođenačkoj i ranoj dojenačkoj dobi djeca s IMS-om mogu imati vrućicu ili biti pothlađena (a moguća je i normalna tjelesna temperatura), biti razdražljiva, inapetentna, žuta, povraćati, a urin može tek iznimno zaudarati ili u sebi imati eritrocite. Djeci između tri mjeseca i dvije godine najkonstantniji i nerijetko jedini simptom bolesti je vrućica, a tek ponekad se primijeti urin neugodna mirisa (122). U toj dobi, uz infekciju dišnog ili probavnog sustava često je prisutna i konkomitantna uroinfekcija, te se procjenjuje da otprilike 5% febrilne dojenčadi kod kojih se izolirao RSV ima i IMS (138). Djeca u dobi od dvije do pet godina s dijagnozom IMS-a najčešće se prezentiraju vrućicom i bolovima u trbuhu, a indikativan simptom može biti sekundarna enureza (122). Tek djeca starija od 5 godina u pravilu razvijaju simptome specifične za uroinfekciju, a to su učestalo i često bolno mokrenje, bol u donjem dijelu trbuha i/ili donjem dijelu leđa, hematurija i zamućen urin (122). Zbog navedenog se prema važećim nacionalnim smjernicama Britanskog nacionalnog instituta za izvrsnost u zdravstvu (NICE) (116), Američke akademije za pedijatriju (engl. *American Academy of Pediatrics*, AAP) (139), Kanadskog pedijatrijskog društva (engl. *Canadian Pediatric Society*, CPS) (135) te Talijanskog društva za pedijatrijsku nefrologiju (engl. *Italian Society of Pediatric Nephrology,* ISPN) (140), ističe pretraga urina u sve novorođenčadi, dojenčadi i djece mlađe od tri godine s vrućicom, kao

sastavni dio dijagnostičkog algoritma febrilnog stanja bez vodećeg simptoma. K tome, AAP preporuča pretragu urina i kod evaluacije konjugirane žutice u djece mlađe od osam tjedana (141) te u sklopu obrade dojenčadi koja ne napreduju u tjelesnoj masi (142).

Kod djece s infekcijom donjeg dijela mokraćnog sustava najizraženiji simptomi su učestalo i bolno mokrenje, vrućica, ako je i prisutna, nije visoka, dok je urin često zamućen i neugodna mirisa (2, 8, 10, 115, 120). S druge strane, glavni simptom infekcije gornjeg dijela mokraćnog sustava je visoka tjelesna temperatura praćena tresavicom, bolovi u trbuhu i donjem dijelu leđa, te loše opće stanje. Međutim, u male djece je klinički nemoguće razlučiti cistitis od pijelonferitisa, a najčešće se infekcija brzo proširi duž cijelog urotrakta pa se zapravo radi o akutnom cistopijelonefritisu. Čak ni kod starije djece nije sigurno na temelju kliničke prezentacije zaključiti o sijelu infekcije s obzirom na to da je dokazana upala bubrega u 25% onih sa simptomima cistitisa (122, 143). Mnogi autori stoga smatraju kako svako dijete mlađe od pet godina s vrućicom u sklopu IMS-a treba shvatiti i liječiti kao da boluje od pijelonefritisa, dok se daljnjom obradom, ako je uopće potrebna, ne utvrdi drugačije (115, 122, 143-145). Takvo je mišljenje prihvaćeno i u ovoj disertaciji, što je razlog zašto se ispitanci istraživanja, a radi se o djeci mlađoj od tri godine s febrilnom uroinfekcijom, nisu dijelili prema sijelu IMS-a.

1.3.4. Dijagnostička obrada

Prema važećim NICE smjernicama, svoj febrilnoj djeci mlađoj od tri mjeseca, djeci mlađoj od tri godine s vrućicom bez vodećeg simptoma, svoj djeci sa simptomima koji upućuju na uroinfekciju te djeci s infekcijom drugog sijela koja se klinički ne oporavljaju očekivanom brzinom potrebno je učiniti pretrage urina (116, 146). Kod novorođenčadi i mlađe dojenčadi urin se odmah analizira mikroskopski i mikrobiološki. U djece dobi između tri mjeseca i tri godine, detekcija leukocitne esteraze (LE) i nitrita u urinu pomoću kemijske test-trake (engl. *dipstick test*) jednako je pouzdana kao i mikroskopija mokraće. U slučaju pozitivnog nalaza LE i/ili nitrita radi se bakterijska kultura urina, a prije dobivenog nalaza započne se antibiotska terapija. Kemijska test-traka pouzdano se koristi i u djece starije od tri godine, a daljnji postupak se razlikuje samo u slučaju pozitivne LE uz negativne nitrite, kad se s obzirom na određenu vjerojatnost sterilne leukociturije uslijed infekcije drugog sijela, u većini slučajeva preporuča pričekati s antibiotskom terapijom do nalaza mikroskopske i mikrobiološke analize urina. Zlatni standard dijagnoze IMS-a je izolacija $\geq 10^5$ CFU (engl. *colony forming units*) bakterija jedne vrste u 1 ml urina dobivenog metodom srednjeg mlaza, odnosno $\geq 5x10^4$ CFU u urinu

dobivenog kateterizacijom mokraćnog mjehura. Prema nekim autorima dovoljna je granična vrijednost $\geq 10^4$ CFU (147) te bilo koji broj bakterija u urinu dobivenom suprapubičnom punkcijom (148).

Na prvi pogled dijagnostički algoritam IMS-a djeluje jasno i jednostavno, no činjenica je da se stalno pokušavaju naći alati pomoću kojih bi se preciznije, brže, jeftinije, jednostavnije i uz što manje invazivnih postupaka identificirala djeca s uroinfekcijom. Najbolji primjer za to je UTICalc, aplikacija opisana u radu objavljenom 2018. godine (149). Navedena aplikacija na temelju unesenih kliničkih a zatim i laboratorijskih nalaza izračunava vjerojatnost dijagnoze uroinfekcije u djece dobi od dva mjeseca do dvije godine. Činjenica da se pristupilo razvoju takve aplikacije upućuje na to da dijagnostička obrada IMS-a još uvijek nije jednoznačno određena te da pravovremeno postavljanje točne dijagnoze IMS-a predstavlja svojevrsnu neispunjenu kliničku potrebu, posebice u bolesnika najmlađe dobi.

Prvi izazov s kojim se kliničar susreće prilikom obrade djeteta sa sumnjom na IMS je metoda prikupljanja uzorka urina. U djece koja kontroliraju mokrenje urin se za kemijsku i mikrobiološku analizu preporuča uzeti metodom čistog srednjeg mlaza (116). Ako se radi o manjoj djeci kod koje to nije moguće izvesti, od neinvazivnih metoda prihvatljivi su posebni ulošci za prikupljanje urina (engl. *urine collection pads*), ali samo kada se precizno slijede proizvođačeve upute. Na našim prostorima korištenje takvih uložaka je uglavnom nedostupno te nam od neinvazivnih metoda preostaju samo sterilni plastični sakupljači (vrećice) za prikupljanje urina (8). Navedena metoda prihvatljiva je za kemijsku analizu urina, no mokraća u njima je u visokom postotku kontaminirana bakterijama perineuma. Stoga prema novim smjernicama za urinokulturu treba koristiti novi uzorak urina dobiven kateterizacijom mokraćnog mjehura ili suprapubičnom punkcijom, što su vrlo invazivne metode koje i roditelji i kliničari žele izbjeći kad god je moguće (116).

Daljnje nejasnoće može izazvati interpretacija kemijske i mikroskopske analize urina (115, 120, 148, 150-152). LE i nitriti mogu biti samo blago povišeni (jedan +), osobito u slučaju razrijeđene mokraće sa niskom specifičnom težinom pa liječnik ordinarius ponekad nije siguran što dalje treba raditi s takvim graničnim nalazom (150). Bakterijama iz urina potrebno je četiri sata da nitrate iz hrane prerade u nitrite (151), koji tako mogu biti lažno negativni u slučaju učestalog pražnjenja mokraćnog mjehura, što je čest slučaj posebno u male djece koja ne kontroliraju sfinktere (148). Nadalje, neke bakterije, uključujući sve gram pozitivne, ne

metaboliziraju nitrate, pa su nitriti negativni i u IMS-u uzrokovanom takvim bakterijama (115). Pozitivni nitriti su visoko indikativni da se radi o uroinfektu. S druge strane, LE je indirektni pokazatelj prisutnosti leukocita u urinu (piurije) i može biti lažno negativan u slučaju malog broja leukocita, dok s druge strane piurija može biti prisutna i u nizu drugih stanja koja nisu IMS poput Kawasakijeve bolesti, hiperkalciurije, apendicitisa, glomerulonefritisa, pa čak i intenzivnog vježbanja. Tijekom mikroskopske analize dokazuje se prisutnost bakteriurije, koja je doduše često odraz kontaminacije, te piurije, koja se najprecizinije definira kao prisustvo najmanje 10 leukocita u 1 mm^3 necentrifugiranog urina (148). Jedno relevantno istraživanje na velikom broju ispitanika je pokazalo da u 13% IMS-a nije prisutna piurija, većinom kada su uzročnici bakterije koje nisu *E.coli* (153). Osjetljivost i specifičnost spomenutih probirnih testova u pretragama urina u djece dobi dva mjeseca do dvije godine, te njihove kombinacije, prema izvješću AAP-a iz 2011. godine, navedeni su u tablici 2 (148).

Tablica 2. Osjetljivost i specifičnost kemijskih i mikroskopskih postupaka analize urina u dijagnostici IMS-a (148).

TEST	**Osjetljivost (raspon) %**	**Specifičnost (raspon) %**
LE	83 (67-94)	78 (64-92)
Nitriti	53 (15-82)	98 (90-100)
LE ili nitriti	93 (90-100)	72 (58-91)
Piurija (mikroskopski dokazana)	73 (32-100)	81 (45-98)
Bakteriurija (mikroskopski dokazana)	81 (16-99)	83 (11-100)
LE, nitriti, piurija ili bakteriurija	99.8 (99-100)	70 (60-92)

Osim pretraga iz urina koje su ključne za postavljanje sumnje na IMS, u konačnici i dijagnozu uroinfekcije, za procjenu težine i lokalizaciju bolesti često se koriste serumski biljezi upale poput L, ABN, N%, CRP i PCT (154-159). Povišene vrijednosti tih konvencionalnih upalnih biljega iz krvi indirektni su znak da je upala zahvatila gornji dio mokraćnog sustava te da prijeti opasnost od urosepse, no specifičnost navedenih pretraga je preniska da bi postale sastavni dio službenih dijagnostičkih algoritama. U NICE smjernicama jasno je naglašeno da izolirano povišeni CRP nije dovoljan za lokalizaciju infekcije (116). Meta analizom više studija s velikim

brojem djece u koje je dokazana lokalizacija IMS-a, pokazano je da serumske vrijednosti CRP-a > 20 mg/L sugeriraju pijelonefritis osjetljivošću i specifičnošću 94% i 39%, na temelju čega možemo zaključiti da je korisnije upotrijebiti koncentraciju CRP-a < 20 mg/L kako bi se isključio pijelonefritis (157, 158). Vrijednosti PCT > 0,5 ng/mL upućuju na to da se radi o upali gornjeg dijela mokraćnog sustava uz osjetljivost 86%, a specifičnost 74%. Drugo istraživanje je pokazalo visoku pozitivnu prediktivnu vrijednost PCT-a za nastanak ožiljaka bubrežnog parenhima nakon preboljenog pijelonefritisa (159). Do sada još nije objavljeno istraživanje koje bi analiziralo potencijal serumskog kalprotektina kao biljega IMS-a.

Sljedeći izazov prilikom zbrinjavanja djece s IMS-om je odlučiti kome i kada napraviti koju slikovnu pretragu mokraćnog sustava kako bi na vrijeme otkrili anatomske abnormalnosti, prevenirali ponovni nastanak uroinfekcije te spriječili nastanak trajnog bubrežnog oštećenja (115, 120). Važeći stav službenih američkih (AAP) (139), britanskih (NICE) (116), kanadskih (CPS) (135) i talijanskih (ISPN) (140) smjernica za zbrinjavanje IMS-a u djece je da slikovne pretrage treba ograničiti, odnosno provoditi ih racionalno, a odabir pretraga ovisi o dobnoj skupini u kojoj se provode. Prema NICE smjernicama, nakon prvog nekompliciranog IMS-a, djeci mlađoj od šest mjeseci treba se učiniti samo ultrazvuk bubrega, dok djeci starijoj od šest mjeseci nije potrebno niti to. Stav AAP-a i ISPN-a je da sva djeca koja su preboljela nekompliciranu uroinfekciju u dobi između dva mjeseca i dvije godine trebaju napraviti ultrazvuk bubrega i mokraćnog mjehura kojim se pouzdano može vidjeti hidronefroza, bubrežno ožiljčenje ili neki treći pokazatelj VUR-a visokog stupnja odnosno kompliciranog IMS-a, uz pretpostavku da pretragu izvodi kompetentan liječnik na ispravnom aparatu. Pretraga mikcijska cistouretrografija (MCUG) zlatni je standard za dijagnozu VUR-a, a DMSA scintigrafija najpreciznije prikazuje oštećenje bubrega (160, 161). Međutim, radi se o invazivnim pretragama s visokom dozom zračenja, stoga se preporučuju tek ako je ultrazvučni nalaz patološki, ako je dijete razvilo tešku kliničku sliku ili nije uspješno odgovorilo na ispravnu antibiotsku terapiju, odnosno u svim dobnim skupinama ako se radi o rekurentnom IMS-u (137). Od 1994. godine kada je prvi puta upotrijebljena, za dijagnostiku i praćenje VUR-a sve češće se rabi mikcijska urosonografija pojačana kontrastom (engl. *contrast enhanced voiding urosonography*, ceVUS), pouzdana pretraga tijekom koje se dijete ne izlaže ionizirajućem zračenju (162). Od strane udruženja europskih pedijatrijskih radiologa ceVUS je proglašen superiornijom metodom detekcije i stupnjevanja VUR-a u odnosu na MCUG te je uvršten u službene protokole rutinske slikovne dijagnostike VUR-a (163, 164).

1.3.5. Liječenje

Misao vodilja u liječenju IMS-a u novorođenčadi i male dojenčadi koja još nemaju razvijen imunološki sustav je velika mogućnost prisutne konkomitantne sepse i meningitisa (165, 166). Navedena hitna stanja valja zbrinuti odmah u bolničkim uvjetima parenteralnim antibioticima širokog spektra, i prije pristiglih mikrobioloških nalaza iz krvi, likvora i urina (146, 167). U sve ostale djece, glavni cilj je također što ranije posumnjati na IMS i započeti antimikrobno liječenje kako bi se postigla rezolucija akutnih simptoma i preveniralo bubrežno ožiljčenje (145). Potrebno je na vrijeme otkriti anatomske i funkcijske abnormalnosti mokraćnog sustava kako bi se spriječile rekurentne infekcije te u konačnici trajno oštećenje bubrežnog parenhima (122). S druge strane, potreban je oprez u vezi mogućeg prekomjernog dijagnosticiranja IMS-a te nekritičkog propisivanja antibiotika koji osim što stvaraju rezistentne sojeve (168), nepovoljno interferiraju s crijevnom mikrobiotom povećavajući djeci rizik za oboljenje od imunološki posredovanih bolesti (3-6).

Kako se liječenje IMS-a često započinje prije mikrobiološke izolacije uzročnika, u empirijskom odabiru antibiotika ordinarius se vodi prema dobi pacijenta, težini kliničke slike, procijenjenoj lokalizaciji infekcije te, najvažnije, lokalnoj epidemiološkoj situaciji, odnosno učestalosti pojedinih uzročnika na pojedinom terenu, kao i njihovoj lokalnoj rezistenciji (8, 139, 145). U Hrvatskoj je najčešći uzročnik nekompliciranog IMS-a iz opće populacije *E.coli* koja je u našem podneblju već neko vrijeme visoko rezistentna na amoksicilin (oko 50%) i kotrimoksazol (oko 26%), dok cefalosporini treće generacije i gentamicin imaju zadnje objavljenu (iz 2020.godine) rezistenciju oko 8% (169). Interdisciplinarna sekcija za kontrolu rezistencije na antibiotike (ISKRA) Ministarstva zdravstva Republike Hrvatske inicirala je razvoj nacionalnih smjernica za dijagnozu, antimikrobno liječenje i profilaksu IMS-a (170), međutim preporuke se odnose samo za djecu stariju od 12 godina i odrasle, što je izvan teme ove disertacije. Hrvatsko društvo za pedijatrijsku nefrologiju, osnovano u sklopu Hrvatskog liječničkog zbora, izdalo je postupnik za liječenje IMS-a u djece ovisno o dobi i težini bolesti (171). U sve dojenčadi s težom kliničkom slikom pijelonefritisa (febrilitet $\geq$ 38,5˚C, CRP $\geq$ 50 mg/L, L $\geq$ 20 x 10^9/L) prvi lijek izbora empirijske terapije je parenteralni cefalosporin treće generacije ceftriakson. Ako se radi o djetetu dobrog općeg stanja, posebno ako je starije od godinu dana, liječenje se može odmah započeti peroralnim cefalosporinom treće generacije, najčešće cefiksimom. U slučaju novorođenčadi preporuka je započeti empirijsko liječenje dvojnom antibiotskom terapijom, ampicilinom i gentamicinom, kako bi se pokrili i gram pozitivni i gram negativni

uzročnici IMS-a, a izbjegli kernikterus i pseudokolelitijaza uzrokovani ceftriaksonom. Ako se radi o novorođenčetu starijem od sedam dana, posebice ako postoji sumnja na razvoj meningitisa u sklopu urosepse, umjesto gentamicina je opravdano dati cefotaksim (172).

Nakon prispijeća urinokulture s antibiogramom, započeta antibiotska terapija se modificira ili nastavlja ako je zadovoljavajuća (8, 120). Također, parenteralna terapija se po kliničkom poboljšanju, obično 24 do 48 sati nakon započinjanja, može zamijeniti ekvivalentnom peroralnom (148). Ukupno trajanje liječenja varira između različitih smjernica, ali je prevladavajući stav da se infekcije gornjeg dijela mokraćnog sustava trebaju liječiti sedam do četrnaest dana, a infekcije donjeg dijela mokraćnog sustava do sedam dana (116, 135, 139, 140). K tome, u novorođenčadi s IMS-om liječenje ne bi trebalo trajati kraće od deset dana (173). U tablici 3 nabrojani su najčešće korišteni intravenski i peroralni antibiotici i njihovo doziranje (koje ovisi o dobi djeteta) za empirijsko liječenje nekompliciranog IMS-a u djece u našem podneblju (8, 135).

Tablica 3. Pregled najkorištenijih antibiotika i njihova primjena za empirijsko liječenje nekompliciranih IMS-a u djece iz opće populacije, prema Tešović G., 2006. i Robinson 2014. (8, 135)

Antibiotik	**Doziranje i način primjene**
Ceftriakson	50-75 mg/kg iv./im. u jednoj dnevnoj dozi
Cefotaksim	100-150 mg/kg iv. u dvije ili tri dnevne doze
Gentamicin	3-7,5 mg/kg iv./im. u jednoj dnevnoj dozi
Ampicilin	200 mg/kg iv. u četiri dnevne doze uz gentamicin
Koamoksiklav	30-40 mg/kg amoksicilina po. u dvije dnevne doze
Cefuroksimaksetil	30 mg/kg po. u dvije dnevne doze
Ceftibuten	9 mg/kg po. u jednoj dnevnoj dozi
Cefiksim	8 mg/kg po. u jednoj dnevnoj dozi

Kako bi se spriječili recidivirajući IMS-i koji mogu uzrokovati trajno oštećenje bubrega, dugo godina je bila uobičajena praksa davati antibiotsku profilaksu svoj djeci nakon preboljenja prvog IMS-a, a do kompletiranja slikovne obrade, zatim djeci s dokazanim VUR-om ili drugom opstrukcijskom anomalijom urotrakta te onima koji su u šest mjeseci imali barem tri recidiva IMS-a (8, 119). Za profilaksu se najčešće koristi nitrofurantoin, kotrimoksazol ili uobičajen antibiotik za liječenje IMS-a, ali u dva do četiri puta manjoj dozi. Međutim, sve je više istraživanja koja naglašavaju nepotrebnost takvog postupanja ili čak njegovu štetnost, s obzirom na to da su djeca pod kontinuiranom antibiotskom profilaksom sklonija razviti IMS uzrokovan multirezistentnim uzročnikom (174). U važećim NICE smjernicama stoji preporuka iz 2007. godine o izbjegavanju rutinske antibiotske profilakse nakon prvog IMS-a te kritičke primjene u djece s rekurentnim uroinfekcijama (116). Prema nekim autorima, antibiotska profilaksa nije opravdana niti u djece s VUR-om I do III stupnja, što se objašnjava činjenicom da se provođenjem antibiotske profilakse tijekom jedne godine u više od desetero djece s tom dijagnozom eventualno prevenira jedan IMS, dok učinak na smanjenje bubrežnog ožiljčenja nije dokazan (175). Ipak, zbog još uvijek premalo dokaza koji bi upućivali na suprotno, AAP preporuča antibiotsku profilaksu nakon preboljenog IMS-a svoj djeci mlađoj od godine dana kojoj je vizualiziran VUR, dok u djece starije od godinu dana odluka o antibiotskoj profilaksi ovisi o stupnju VUR-a, bubrežnom ožiljčenju i željama roditelja (148). S druge strane, rezultati poznate RIVUR (engl. *randomized intervention for children with VUR*) studije sugeriraju davanje antibiotske profilakse svoj djeci s VUR-om neovisno o njegovom stupnju ili njihovoj dobi (176). Naposljetku, valja spomenuti kako je švicarska studija objavljena prije pet godina pokazala da vjerojatnost postojanja VUR-a visokog stupnja (≥ III) u djeteta koje je preboljelo prvu epizodu IMS-a uzrokovanu *E.coli*, a ima normalan nalaz ultrazvuka mokraćnog sustava, iznosi samo 1% (177). Ako je uzročnik IMS-a bila bakterija koja nije *E.coli*, vjerojatnost za VUR visokog stupnja raste na 26%, a ako postoji i abnormalan nalaz ultrazvučnog pregleda urotrakta, vjerojatnost iznosi visokih 55%.

1.4. Svrha rada

Na temelju svega ranije iznesenog može se zaključiti da je kalprotektin:

- heterodimer koji se sastoji od S100A8 i S100A9 proteina s izraženom sposobnošću vezanja dvovalentnih iona kalcija, mangana i cinka;
- DAMP protein koji upravlja upalnim odgovorom i privlači upalne stanice na mjesto oštećenja tkiva;
- najbrojniji protein citoplazme neutrofila od kuda se aktivno ili pasivno luči u okolinu;
- do sada najviše analiziran u stolici bolesnika s kroničnom upalnom bolesti crijeva u kojih se koristi kao fekalni biljeg aktivnosti bolesti i kao dio dijagnostičkog algoritma;
- uspješno istraživan u reumatologiji kao serumski biljeg aktivnosti bolesti, a pokazao je potencijal i kao serumski biljeg bakterijske infekcije.

U ovoj disertaciji će se ispitivati serumski kalprotektin kao biljeg bakterijskog IMS-a u djece mlađe od tri godine iz sljedećih razloga:

- dijete s vrućicom mlađe od tri godine predstavlja dijagnostički izazov na svim razinama zdravstvene zaštite, usprkos korištenju konvencionalnih biljega akutne upale;
- IMS je rijedak primjer bakterijske infekcije gdje je izolacija mikrobiološkog uzročnika iz kulture urina dijagnostički zlatni standard koji je lako ostvariv;
- IMS je među najčešćim bakterijskim infekcijama dječje dobi, a kod mlađih od tri godine čini otprilike 7% uzroka febrilnog stanja;
- usprkos lako dostupnoj i jednostavnoj kemijskoj i mikroskopskoj analizi urina febrilnog djeteta te korisnim postojećim serumskim biljezima akutne upale, ponekad rana dijagnoza IMS-a nije jasna, već je potrebno čekati mikrobiološki nalaz;
- kalprotektin je stabilan pri sobnoj temperaturi i otporan na razgradnju bakterija i enzima te se u nekim istraživanjima već pokazao kao precizan biljeg bakterijske infekcije drugih sijela izvan urotrakta.

Svrha ovog rada je ispitivanje i prikazivanje karakteristika serumskog kalprotektina kao ranog biljega bakterijske infekcije u male djece s vrućicom.

2. HIPOTEZA

Serumski kalprotektin je osjetljiv i specifičan rani biljeg akutne bakterijske infekcije mokraćnog sustava u djece.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

3.1. Opći cilj

Opći cilj ovog istraživanja je usporedba koncentracije serumskog kalprotektina u djece mlađe od tri godine s vrućicom uzrokovanom bakterijskom infekcijom mokraćnog sustava te koncentracije serumskog kalprotektina u djece mlađe od tri godine s vrućicom u koje nije dokazana bakterijska infekcija.

3.2. Specifični ciljevi

U specifične ciljeve istraživanja spadaju usporedbe koncentracije serumskog kalprotektina sa sljedećim varijablama:

1. L-om, N%-om, ABN-om, CRP-om i PCT-om u krvi ispitanika i kontrola;
2. kliničkim znakovima i simptomima ispitanika;
3. atipičnom prezentacijom IMS-a;
4. brojem leukocita u 1 mm^3 necentrifugiranog urina;
5. mikrobiološkim izolatom;
6. pojavom vezikouretralnog refluksa;
7. dobi djeteta (novorođenčad do 28 dana starosti, dojenčad 1 - 3 mjeseca starosti, dojenčad 4 - 12 mjeseci starosti, djeca 13 - 36 mjeseci starosti).

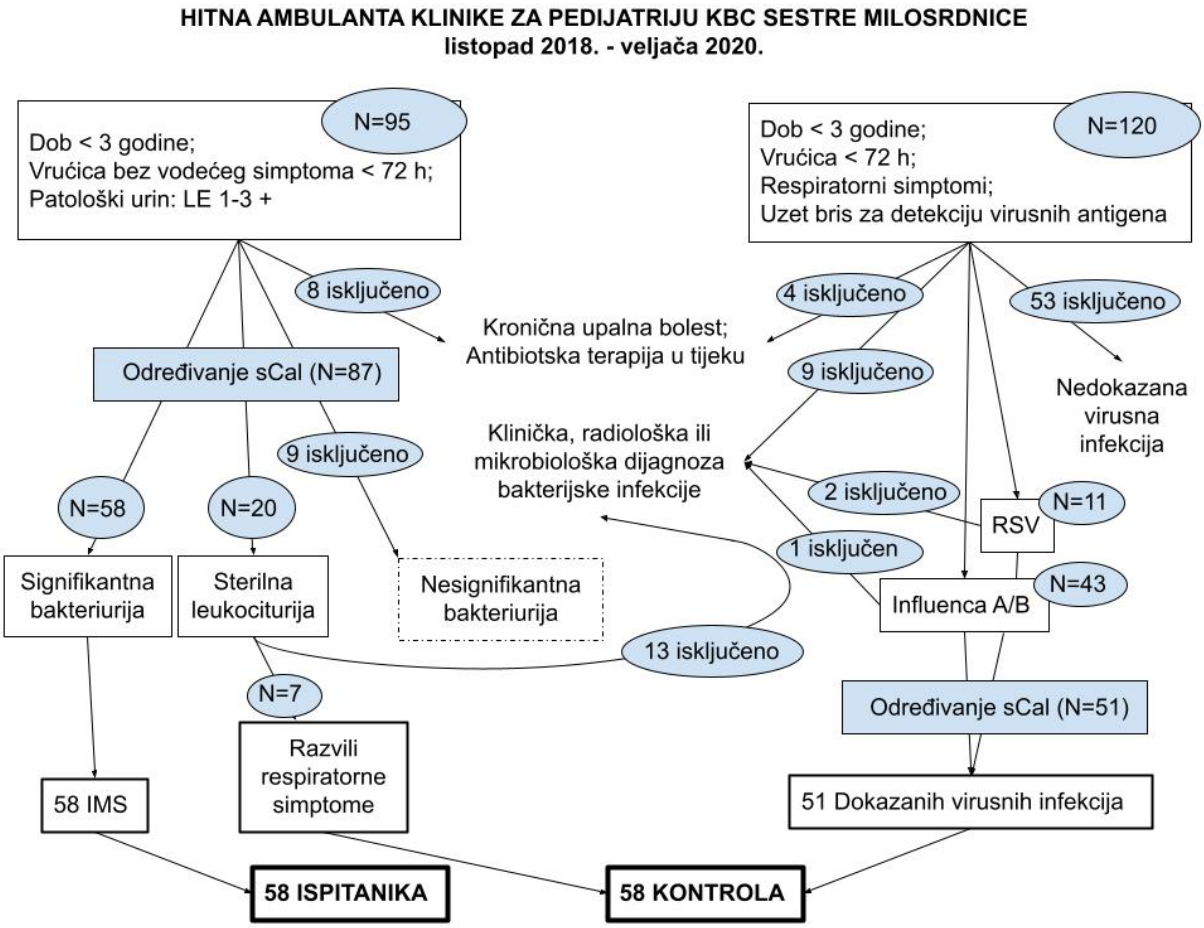
4. METODE I ISPITANICI

4.1. Sudionici

Sudionici ovog istraživanja su bila djeca dobi 0 – 36 mjeseci koja su se javila u Hitnu ambulantu (HA) Klinike za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice (KBCSM) u razdoblju od listopada 2018. do veljače 2020. godine (prije prvog detektiranog slučaja SARS-CoV-2 infekcije u Hrvatskoj) zbog vrućice ≥ 38˚C koja je trajala kraće od 72 sata, te su primljena u Dnevnu bolnicu, Pedijatrijski odjel za nefrologiju i hipertenziju, Pedijatrijski odjel za pulmologiju i alergologiju ili Odjel za opću pedijatriju Klinike radi dijagnosticiranja, praćenja i liječenja suspektne infekcije mokraćnog sustava (na temelju patološkog nalaza urina) ili respiratorne infekcije (na temelju kliničkih simptoma). Sažeto, uključujući kriteriji su bili dob 0 – 36 mjeseci, vrućica ≥ 38˚C koja traje kraće od 72 sata te patološki nalaz urina ili simptomi infekcije dišnog sustava koji su zahtijevali etiološku dijagnostiku. Isključujući kriteriji su bili kronična upalna bolest u osobnoj anamnezi i započeta antibiotska terapija te postavljena klinička, radiološka ili mikrobiološka dijagnoza bakterijske infekcije drugog sijela izvan mokraćnog sustava.

Sudionici kojima je iz urinokulture izolirana bakterija u signifikantnom broju označeni su kao ispitanici, dok su sudionici s dokazanom virusnom infekcijom dišnog sustava označeni kao kontrole. Također, sudionici sa sterilnom leukociturijom bez kliničke, radiološke ili mikrobiološke dijagnoze bakterijske infekcije drugog sijela koji su tijekom obrade razvili simptome virusne infekcije dišnog sustava uvršteni su u kontrole bez dokazanog virusnog uzročnika. Sudionici s nejasnom urinokulturom u kojoj je nađena nesignifikantna bakteriurija isključeni su iz istraživanja, kao i sudionici s virusnom infekcijom dišnog sustava u kojih je bila prisutna i konkomitantna bakterijska infekcija.

Shematski prikaz tijeka prikupljanja sudionika istraživanja i njihova podjela u ispitanike i kontrole nalazi se na slici 3.



Slika 3. Shematski prikaz tijeka prikupljanja sudionika za istraživanje i njihova podjela u ispitanike i kontrole te trenutak određivanja koncentracije kalprotektina iz sačuvanih uzoraka seruma sudionika.

4.2. Provedba istraživanja

Prikazano prospektivno opservacijsko istraživanje provođeno je tijekom 16 mjeseci u Klinici za pedijatriju KBCSM. Svakom potencijalnom sudioniku istraživanja (dijete mlađe od tri godine s vrućicom koja traje kraće od tri dana i patološkim nalazom urina, odnosno respiratornim simptomima zbog kojih je uzet bris nosa/nazofarinska za detekciju virusa) u HA je izvađen uzorak krvi za određivanje konvencionalnih biljega akutne faze upale (L, ABN, N%, CRP te ovisno o kliničkoj sumnji na bakterijemiju/sepsu i PCT), dok se ostatak seruma sačuvao sukladno praksi Kliničkog zavoda za kemiju KBCSM. Urin se poslao na mikroskopsku analizu te urinokulturu, dok su tijekom sezone u djece s respiratornim simptomima uzeti brisevi nosa/nazofarinksa za detekciju RSV-a, odnosno influence tipa A ili B. Roditelj/skrbnik je potpisao informirani pristanak da dopušta mjerenje serumskog kalprotektina (sCal-a) iz već izvađenog djetetovog uzorka krvi te analizu djetetovih podataka i ostalih nalaza u svrhu izrade ove disertacije, nakon čega je ostatak seruma uzorkovanog prilikom dolaska u HA smrznut i pohranjen za eventualnu analizu sCal-a. Ovisno o dobi bolesnika, kliničkoj slici, laboratorijskim nalazima i odluci liječnika ordinariusa vođenoj NICE smjernicama (116) odlučilo se o uvođenju antibiotske terapije i prije dospijeća mikrobioloških nalaza. Prema prilagođenom algoritmu AAP-a (178) za dijagnostički pristup djetetu s vrućicom učinile su se, na temelju kliničke slike i laboratorijskih nalaza, preporučene pretrage u svrhu isključenja bakterijske infekcije drugog sijela. Lumbalna punkcija učinjena je svakom febrilnom novorođenčetu, a dojenčadi mlađoj od tri mjeseca ovisno o kliničkoj prezentaciji i odluci vodećeg liječnika. Svakom djetetu je liječnik u HA učinio otoskopski pregled kako bi isključio gnojnu upalu srednjeg uha (ovisno o indikaciji učinio je to konzilijarno i otorinolaringolog). U slučaju sumnje na pneumoniju (znakovi dispneje, tahipneja, patološki auskultacijski nalaz nad plućima, saturacija krvi kisikom < 95% mjereno pulsnim oksimetrom) učinjen je rentgen prsnih organa. Stolica je mikrobiološki analizirana svim ispitanicima s kliničkim simptomima i znakovima gastroenterokolitisa.

U istraživanju su ostali sudionici s patološkim urinom i signifikantnom bakteriurijom, i/ili sterilnom leukociturijom i respiratornim simptomima, i/ili respiratornim simptomima i dokazanim virusom u brisu gornjeg dišnog sustava, a kod kojih na temelju detaljne anamneze, kliničkog pregleda i dijagnostičke obrade nisu nađeni isključni kriteriji. Navedenim sudionicima određena je vrijednost serumskog kalprotektina iz inicijalnog krvnog uzorka

izvađenog u HA Klinike za pedijatriju i pohranjenog u Kliničkom zavodu za kemiju KBCSM (Slika 3).

Sudionici čije su urinokulture bile nejasne u smislu nalaza nesignifikantne bakteriurije isključeni su iz istraživanja, kao i ispitanici sa sterilnom leukociturijom kod kojih je naknadno ipak postavljena klinička, radiološka ili mikrobiološka dijagnoza bakterijske infekcije izvan urotrakta (Slika 3).

Uzorci pohranjeni za određivanje sCal sudionika koji su isključeni iz istraživanja odbačeni su u skladu s protokolima Kliničkog zavoda za kemiju KBCSM.

4.3. Metodologija i definicije

4.3.1. Mjerenje tjelesne temperature i vrućica

Tjelesna temperatura se mjerila aksilarno ili rektalno elektronskim termometrom (HA KBCSM), a vrućicom su se smatrale vrijednosti ≥ 38˚C (179). Prema NICE smjernicama (146), relevantnim se smatrao i anamnestički podatak o aksilarno, aurikularno ili rektalno izmjerenoj tjelesnoj temperaturi ≥ 38˚C djetetu u kućnim uvjetima koja se do dolaska u HA uspješno kupirala antipiretikom.

4.3.2. Prikupljanje urina, patološki urin, dijagnoza IMS-a

U ovom istraživanju patološki nalaz urina definiran je kao pozitivna leukocitna esteraza (LE) 1+ do 3+, detektirana kemijskom test-trakom. Pozitivni nitriti nisu ušli u kriterije s obzirom na to da su sudionici istraživanja bili mlađa djeca koja većinom ne kontroliraju mokrenje, stoga rijetko zadržavaju urin u mokraćnom mjehuru dulje od 4 sata što je minimalno vrijeme potrebno bakterijama da razgrade nitrate (151). Signifikantna bakteriurija, odnosno pozitivna urinokultura značila je da je izolirano ≥ 10^5 CFU jedne vrste bakterije u 1 ml urina dobivenog pomoću sterilnog sakupljača, odnosno ≥ 10^4 CFU/ml urina dobivenog kateterizacijom mokraćnog mjehura (Zavod za mikrobiologiju, parazitologiju i bolničke infekcije KBCSM). Mikroskopska analiza urina sastojala se od brojanja leukocita u 1 mm^3 necentrifugiranog urina (Klinički zavod za kemiju KBCSM), a piurijom se smatra prisustvo najmanje 10 leukocita.

U većine sudionika urin se prikupljao pomoću sterilnih plastičnih sakupljača (vrećica), neinvazivnom metodom koja je prema važećim NICE smjernicama prihvatljiva za kemijsku analizu urina (116). Usprkos tome što navedene smjernice zbog visokog postotka kontaminacije uzorka bakterijama periuretralnog područja za mikrobiološku analizu preporučuju invazivne metode poput kateterizacije mokraćnog mjehura i suprapubične punkcije, u ovom istraživanju u djece s jasnom kliničkom prezentacijom i mikroskopskim nalazom urina (leukociti > 100) indikativnim za dijagnozu IMS-a, urin prikupljen pomoću sterilnog sakupljača koristio se i za mikrobiološku analizu. Navedena praksa raširena je u mnogim bolničkim centrima, uključujući centar u kojem se provodilo istraživanje, kako bi se djeca poštedjela od invazivnih postupaka kojima ni roditelji često nisu skloni (8, 180). U svrhu maksimalnog smanjenja kontaminacije

uzorka bakterijama, čitav postupak prikupljanja urina proveo je iskusan zdravstveni djelatnik koji je prije aplikacije sterilnog sakupljača djetetu oprao perineum antiseptičkim sredstvom, redovito kontrolirao i mijenjao praznu vrećicu svakih 30 minuta uz ponovno ispiranje perineuma antiseptikom te skinuo vrećicu neposredno nakon mokrenja. Samo sudionici s jasnim nalazom urinokulture (jedna vrsta bakterija $\geq 10^5$ CFU/ml) uvršteni su u ispitanike, dok su uzorci u kojima je izoliran manji broj bakterija, kao i oni s više vrsta izoliranih bakterija (tzv. nesignifikantne bakteriurije) isključeni iz istraživanja. U rijetkim slučajevima kada je iz bilo kojeg razloga liječnik ordinarius odlučio bolesniku prikupiti urin kateterizacijom mokraćnog mjehura, signifikantna bakteriurija je definirana kao prisustvo $\geq 10^4$ CFU bakterija iste vrste u 1 ml urina.

Za potrebe istraživanja dijagnoza IMS-a je postavljena u febrilnih sudionika s patološkim nalazom urina i signifikantnom bakteriurijom / pozitivnom urinokulturom. Sterilna je pak leukociturija podrazumijevala patološki nalaz urina bez pozitivne urinokulture. Atipična prezentacija IMS-a bila je definirana prema NICE smjernicama jednom od sljedećih karakteristika: teška klinička slika, oslabljen mlaz urina, povišene koncentracije kreatinina u krvi, tvorba u abdomenu ili mokraćnom mjehuru, infekcija uzrokovana mikrobiološkim uzročnikom koji nije Escherichia coli, dokazana bakterijemija te izostanak terapijskog odgovora unutar 48 – 72 sata od započetog antimikrobnog liječenja (116).

4.3.3. Dokazivanje virusne infekcije

U centru u kojem se provodilo ovo istraživanje, a u eri prije COVID-19 pandemije, jedini virusi koji su se rutinski dokazivali u male djece s respiratornim simptomima u zimskim i ranim proljetnim mjesecima su RSV i influenca tip A i tip B. Sukladno tome, febrilna djeca mlađa od tri godine, koja su zaražena upravo tim navedenim sezonskim virusima, predstavljala su model dokazane virusne infekcije. Detekcija RSV-a se vršila iz brisa nosa pomoću komercijalne test trake (RSVGnost Resp, BIOGNOST®) na Pedijatrijskom odjelu za pulmologiju i alergologiju Klinike za pedijatriju KBCSM. Navedeno je imunokromatografska metoda za brzo kvalitativno otkrivanje antigena RSV-a. Bris nazofarinksa za detekciju antigena virusa influence tip A i tip B uzet je djeci u HA, na Pedijatrijskom odjelu za pulmologiju i alergologiju, na Odjel za opću pedijatriju ili u Dnevnoj bolnici Klinike za pedijatriju te je poslan na Zavod za javno zdravstvo

RH (Rockefellerova 12, Zagreb) gdje je dobiven rezultat metodom direktne imunofluorescencije (DFA, engl. *direct immunofluorescence antibody*).

4.3.4. Konvencionalni biljezi akutne faze upale iz krvi

U rutinski korištene krvne biljege akutne faze upale spadaju broj leukocita (L), postotak i apsolutni broj neutrofila (N%, ABN), CRP i PCT, te su oni izmjereni prilikom prvog pregleda u HA Klinike za pedijatriju, prema standardnom protokolu Kliničkog zavoda za kemiju KBCSM. Točnije, L, N% i ABN su određeni na hematološkom analizatoru Sysmex XN-1000 (Sysmex, Kobe, Japan), CRP imunoturbidimetrijskom metodom na analizatoru Architect c8000, a PCT kemiluminiscentnom metodom na mikročesticama na analizatoru i2000 sr (oboje Abbott, Abbott Park, IL, SAD).

4.3.5. Serumski kalprotektin

Analiza serumskog kalprotektina provodila se pomoću komercijalno dostupnog imunokromatografskog testa (engl. *quantitative lateral flow*) Quantum Blue® sCal za određivanje koncentracije serumskog kalprotektina te odgovarajućeg aparata Quantum Blue® Reader (Bühlmann, Švicarska) u Kliničkom zavodu za kemiju KBCSM-a. Ostatak seruma iz kojeg je inicijalno izmjeren CRP bio je pohranjen i zamrznut na -20˚C do skupljanja 69 valjanih uzoraka koji su se analizirali u isto vrijeme, a za potrebe ovog istraživanja iskorištena su dva Quantum Blue® sCal paketa tj. određena je vrijednost kalprotektina u 138 serumskih uzoraka od 138 sudionika. Za analizu jednog uzorka potrebno je 20μL seruma (razrijeđenog 1:10), a rezultati su dobiveni već nakon 20 minuta od početka procesa. Osjetljivost testa je < 0,5μg/mL. Određivanje vrijednosti serumskog kalprotektina nije rutinska metoda u dijagnostičkoj obradi febrilnog djeteta te se navedena pretraga radila samo za potrebe ovog istraživanja.

4.4. Statistička analiza

Potrebna veličina uzorka izračunata je preko programa za analizu statističke snage testa (engl. *power analysis*) dostupnog na mrežnoj stranici Sveučilišta u Iowi (http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/index.html), što je rezultiralo brojem sudionika n = 56 (28 ispitanika i 28 kontrola). Izabrana je snaga statističkih testova 0,8, razina značajnosti (greška tipa I, greška tipa α odnosno P vrijednost) < 0,05 te veličina učinka (engl. *effect size)* 0,5 jer se očekivalo da je koncentracija serumskog kalprotektina u ispitanika s bakterijskom infekcijom za 50% viša od kontrola s virusnom infekcijom. Opisano se odnosilo na opći cilj istraživanja, usporedbu sCal-a između ispitanika i kontrola. Odlučeno je broj sudionika povećati za otprilike 100% kako bi se i za specifične ciljeve postigla što bolja snaga istraživanja ovisno o broju sudionika u određenoj podskupini. Kako u jednom setu korištenog Quantum Blue® sCal testa ima reagensa za odrediti kalprotektin iz 69 uzorka, nabavljena su 2 seta i određen je konačan broj od 138 izabranih sudionika kojima će se odrediti koncentracija serumskog kalprotektina, uz pretpostavku da će određen broj sudionika s već određenom koncentracijom sCal-a zbog naknadno razvijenih isključnih kriterija biti izbačen iz istraživanja. Normalnost raspodjele kontinuiranih numeričkih varijabli testirana je Kolmogorov-Smirnovljevim testom. S obzirom na relativno mali broj sudionika u pojedinim podskupinama (posebno prilikom odgovaranja na specifične ciljeve) te raspodjeli numeričkih podataka koja se značajno razlikovala od normalne, korištena je neparametrijska statistika, stoga su podaci izraženi kao medijani i interkvartilni rasponi (engl. *interquartile range,* IQR).

Parametri između ispitanika i kontrola su uspoređivani pomoću Mann-Whitney U testa, uz izračunatu statističku značajnost pomoću Fisherovog točnog testa (engl. *Fisher's exact test*). P vrijednosti manje od 0,05 smatrane su statistički značajnima. Kada su uspoređivani medijani koncentracije sCal-a između više od dvije podskupine ispitanika korišten je Kruskal-Wallis test kojim je pokazano postoji li statistički značajna razlika između barem dvije proučavane podskupine, nakon čega je rađena Dwass-Steel-Critchlow-Flinger višestruka komparativna analiza (*post-hoc* analiza) kojom se utvrdilo koje dvije podskupine se međusobno statistički značajno razlikuju.

Distribucije su prikazane grafički i tablično. ROC analizom (engl. *receiver operating charactristic curve*) ispitivana je najbolja osjetljivosti i specifičnosti kalprotektina, kao i ostalih korištenih konvencionalnih biljega akutne faze upale (L, ABN, N%, CRP i PCT), u razlikovanju

ispitanika s bakterijskom infekcijom od kontrola s virusnom infekcijom, ovisno o optimalnim graničnim (engl. *cut-off*) vrijednostima. Dijagnostička sposobnost pojedinog biljega u detekciji bakterijske infekcije izražena je vrijednošću ispod ROC krivulje (engl. *area under ROC curve*, AUC). Napravljena je univarijantna i multivarijantna binarna logistička regresijska analiza svih promatranih upalnih biljega kao prediktora postojanja bakterijske infekcije.

Kako bi se ispitala međusobna povezanost vrijednosti sCal-a i ostalih biljega u ispitanika i kontrola, korišten je Spearmanov koeficijent korelacije r_s. U statističkoj analizi se koristila programska podrška IBM SPSS Statistics, verzija 25.0 (https://www.ibm.com/analytics/spss-statistics-software) te MedCalc for Windows, verzija 19.1.7 (MedCalc Statistical Software version 19.1.7 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; https://www.medcalc.org; 2021).

4.5. Etička načela

Ovo istraživanje je započelo nakon odobrenja od strane Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice te Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a provođeno je u skladu s preporukama Helsinške deklaracije iz 1964. godine i njezinim novijim revizijama. Od roditelja/skrbnika sve djece koja su sudjelovala u istraživanju, nakon objašnjenja ciljeva i uvjeta istraživanja, a prije pohrane i analiziranja njihovih seruma i podataka u svrhu istraživanja i izrade ove disertacije, pribavljena je pisana suglasnost za sudjelovanje.

5. REZULTATI

5.1. Osnovni podaci o sudionicima

Osnovni proučavani demografski, klinički, laboratorijski i mikrobiološki podaci o sudionicima istraživanja prikazani su u tablicama 4, 5 i 6.

U istraživanje je inicijalno bilo uključeno ukupno 215 djece mlađe od 36 mjeseci s vrućicom, iz istog geografskog područja, od kojih je 95 imalo patološki urin a 120 respiratorne simptome u zimskim i ranim proljetnim mjesecima zbog čega im je uzet bris nosa/nazofarinksa za dokazivanje antigena virusa RSV i influenca tip A / tip B. Nakon što su iz istraživanja izbačeni sudionici s isključnim kriterijima (n = 21) te oni s inicijalno prisutnim respiratornim simptomima u kojih nije dokazana virusna infekcija (n = 53), kao i troje bolesnika u kojih je uz dokazanu virusnu infekciju dokazana i bakterijska infekcija, ostalo je 138 sudionika kojima je određena serumska vrijednost kalprotektina. Naknadno su isključena 22 sudionika; devet ispitanika zbog nejasnog nalaza urinokulture, tj. prisustva nesignifikantne bakteriurije, te 13 kontrola sa sterilnom leukociturijom kojima je daljnjom obradom ipak postavljena vjerojatna dijagnoza bakterijske infekcije izvan urotrakta. Sedmero djece sa sterilnom leukociturijom je tijekom obrade kojom je isključena bakterijska infekcija razvilo respiratorne simptome te su oni shvaćeni kao vrlo vjerojatne kontrole s virusnom respiratornom infekcijom koja nije etiološki dokazana. Konačno, u skupini ispitanika s potvrđenom bakterijskom infekcijom urotrakta je bilo 58 djece, isto kao i u kontrolnoj skupini djece s virusnom infekcijom.

Udio muške i ženske djece u obje skupine sudionika je bio gotovo jednak (tablica 4). Medijan (interkvartilni raspon) dobi među ispitanicima je bio 3,75 (2 – 6,13) mjeseci, dok su djeca u kontrolnoj skupini bila statistički značajno starija s medijanom (IQR) dobi od 14 (5 – 21,25) mjeseci, $P < 0,001$.

Tablica 4. Podjela sudionika istraživanja obzirom na spol

	Bakterijska infekcija		**Kontrole**	
Spol	N	%	N	%
Muški	29	50	30	51
Ženski	29	50	28	48,3

Od ukupnog broja dokazanih bakterijskih IMS-a, 17,2% se odnosilo na atipične IMS. Sve su imale izraženu piuriju (LE 3+ na kemijskoj test-traci i >100 L u 1 mm^3 urina vidljivih mikroskopskom analizom). *E.coli* nije izolirana kao etiološki čimbenik IMS-a u samo tri ispitanika u kojih su mikrobiološki uzročnici uroinfekcije bili *Klebsiella pneumoniae* (n = 2) i *Enterobacter spp*. (n = 1) (Tablica 5). Kliničke znakove gastroenterokolitisa (povraćanje, proljev, bolovi u trbuhu) imalo je 15,5% ispitanika, čije sve stolice su negativno mikrobiološki testirane. Nadalje, udio respiratornih simptoma (sekrecija iz nosa, kašalj) među ispitanicama je iznosio 17,2%, dok se 41,4% djece prezentiralo s težom kliničkom slikom IMS-a (tjelesna temperatura ≥ 39˚ uz tresavicu i loše opće stanje). Naknadno je dijagnosticiran VUR I i II stupnja u 10,3% bolesnika koji su imali dokazanu bakterijsku infekciju urotrakta (Tablica 6).

Među kontrolama, većina djece je imala dokazanu virusnu infekciju (DVI) uzrokovanu influencom tip A/ tip B (n = 42), zatim RSV-om (n = 9), dok je ostalima dijagnoza virusne infekcije dišnog sustava postavljena nakon pristiglog nalaza sterilne leukociturije, razvoja respiratornih simptoma uz isključenje bakterijske infekcije drugog sijela te spontanog kliničkog oporavaka nakon manje od tjedan dana (n = 7) (Tablica 5).

Tablica 5. Mikrobiološki izolati i njihova distribucija među sudionicima istraživanja

Sudionici	**Dijagnoza**	**Mikrobiološki izolat**	**N**
Bakterijska infekcija (N = 58)	IMS	Escherichia coli	55
		Klebsiella pneumoniae	2
		Enterobacter spp	1
Kontrole (N = 58)	DVI	RSV	9
		Influenza A ili B	42
	Sterilna leukociturija	Nepoznat	7

IMS, infekcija mokraćnog sustava; DVI, dokazana virusna infekcija; RSV, respiratorni sincicijski virus.

Tablica 6. Podjela ispitanika s bakterijskom infekcijom obzirom na prateće nalaze

	Ispitanici s bakterijskom infekcijom	
Prateći nalazi	N	%
Klinički znakovi GEK-a	9	15,5
Respiratorni simptomi	10	17,2
Teža klinička slika	24	41,4
VUR	6	10,3

GEK, gastroenterokolitis; VUR, vezikouretralni refluks.

Vrijeme trajanje vrućice prije nego li je potražena liječnička pomoć je u djece s bakterijskom infekcijom bilo duplo kraće nego u djece bez bakterijske infekcije, odnosno u ispitanika je medijan (IQR) trajanja bolesti prije liječničkog pregleda bio 12 (5,75 - 24,50) h, a u kontrola 24 (12 - 48) h, uz P = 0,006. Drugim riječima, sCal i ostali analizirani laboratorijski biljezi akutne faze upale su određivani u ranijoj fazi bolesti u ispitanika nego u kontrola.

5.2. Usporedba proučavanih parametara između ispitanika s bakterijskom infekcijom i kontrola

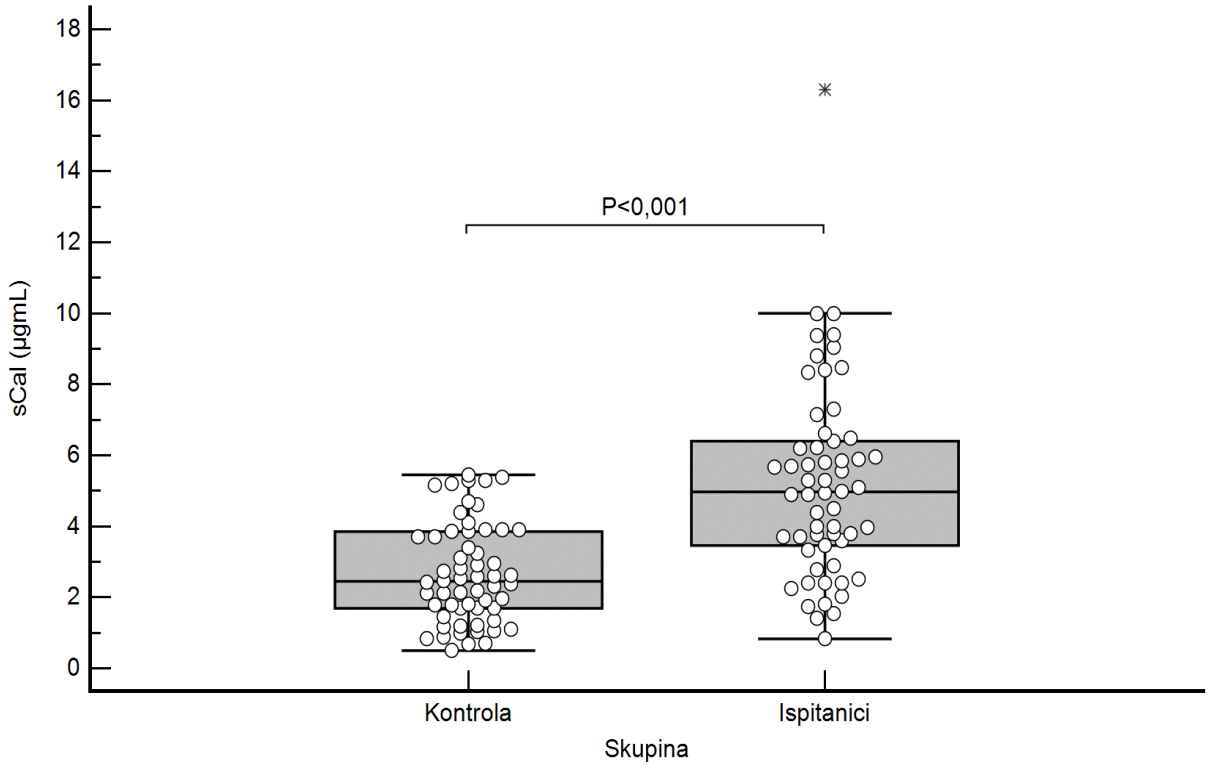
Prema rezultatima deskriptivne statistike (Tablica 7) i usporedbom vrijednosti između kontrola i ispitanika (Mann-Whitney U test), vidljivo je da su vrijednosti svih promatranih biljega upale, uključujući i sCal-a, statistički značajno različite u djece s dokazanom bakterijskom infekcijom i u djece s dijagnozom virusne infekcije. Medijani (i interkvartilne razlike) serumskih koncentracija kalprotektina u ispitanika s bakterijskom infekcijom [4,97 (2,99) µg/mL] su bili statistički značajno viši nego u kontrola bez bakterijske infekcije [2,45 (2,22) µg/mL] ($P < 0.001$) (Slika 4). Također, i ostali konvencionalni biljezi akutne faze upale (CRP, PCT, L, N% i ABN) su izmjereni u višim koncentracijama kod ispitanika u odnosu na kontrole, sve sa statističkom značajnosti.

Tablica 7. Usporedba proučavanih parametara (vrijednosti izražene kao medijani i interkvartilni rasponi) između ispitanika s bakterijskom infekcijom i kontrola (Mann-Whitney U test)

	Bakterijska infekcija (N=58*)	**Kontrole (N=58*)**	**P**
Dob (mjeseci)	3,75 (2,0-6,13)	14,0 (5,0-21,25)	<0,001
Trajanje vrućice (h)	12,0 (5,75-24,5)	24,0 (12,0-48,0)	0,006
sCal (µg/mL)	4,97 (3,43-6,42)	2,45 (1,63-3,85)	<0,001
CRP (mg/L)	41,8 (21,1-104,38)	6,4 (1,68-16,28)	<0,001
PCT (ng/mL)	0,31 (0,11-2,05)	0,09 (0,06-0,2)	<0,001
L (10^9/L)	17,95 (13,08-22,73)	7,8 (5,40-11,7)	<0,001
ABN (10^9/L)	8,99 (6,35-12,01)	3,42 (2,02-5,19)	<0,001
N%	52,45 (45,28-61,43)	45.55 (33,73-55,9)	0,001

*Vrijednost PCT-a je određena u 45 ispitanika s bakterijskom infekcijom i 36 kontrola.

sCal, serumski kalprotektin; CRP, C-reaktivni protein; PCT, prokalcitonin; L, broj leukocita; ABN, apsolutni broj neutrofila; N%- postotak neutrofila.



Slika 4. Kutijasti dijagram (engl. *box plot*) prikazuje odnos minimuma, maksimuma, donjega i gornjega kvartila te medijana koncentracija sCal-a u skupini kontrola s dijagnozom virusne infekcije i skupini ispitanika s dokazanom bakterijskom infekcijom. Razlika među skupinama je statistički značajna, $P < 0,001$ (Mann-Whitney U test).

5.3. Analiza koncentracije sCal-a u pojedinim podskupinama ispitanika s bakterijskom infekcijom

Kako bi se ispunili specifični ciljevi ove disertacije, analizirana je razlika u koncentraciji sCal-a u pojedinim podskupinama ispitanika u odnosu na ostale ispitanike s bakterijskom infekcijom. Točnije, uspoređivana je koncentracija sCal-a (Mann-Whitney U test) između ispitanika koji su razvili težu kliničku sliku bakterijske infekcije urotrakta, kojima je naknadno postavljena dijagnoza atipične infekcije mokraćnog sustava ili VUR-a, te u onih s respiratornim simptomima ili kliničkim znakovima gastroenterokolitisa u odnosu na ostale ispitanike s bakterijskom infekcijom (tablice 8 - 12). Također, analizirana je povezanost vrijednosti sCal-a s mikrobiološkim izolatom (Tablica 13) u kontrola s virusnom infekcijom s obzirom na to da je broj ne-*Escherichia coli* infekcija mokraćnog sustava bio premalen za statističku analizu. Rezultati su jednoznačno pokazali da nema statistički značajne razlike u koncentraciji sCal-a između pojedine podskupine ispitanika i ostalih ispitanika s IMS-om.

Tablica 8. Usporedba koncentracije sCal-a (medijan i interkvartilni raspon) između ispitanika s težom kliničkom slikom IMS-a i ostalih ispitanika s bakterijskom infekcijom.

	N	**Medijan sCal (IQR)**	**P**
Teža klinička slika IMS-a	24	5,30 (3,25)	0,204
Ostali ispitanici s IMS-om	34	4,70 (3,02)	

Tablica 9. Usporedba koncentracije sCal-a (medijan i interkvartilni raspon) između ispitanika koji su uz IMS imali i probavne tegobe i ostalih ispitanika s bakterijskom infekcijom.

	N	**Medijan sCal (IQR)**	**P**
IMS uz znakove GEK-a	9	5,30 (1,95)	0,683
Ostali ispitanici s IMS-om	49	4,90 (3,14)	

GEK, gastroenterokolitis

Tablica 10. Usporedba koncentracije sCal-a (medijan i interkvartilni raspon) između ispitanika koji su uz IMS imali i respiratorne simptome i ostalih ispitanika s bakterijskom infekcijom.

	N	**Medijan sCal (IQR)**	**P**
IMS uz respiratorne simptome	10	5,81 (4,74)	0,365
Ostali ispitanici s IMS-om	48	4,93 (2,77)	

Tablica 11. Usporedba koncentracije sCal-a (medijan i interkvartilni raspon) između ispitanika koji su razvili atipičan IMS i ostalih ispitanika s tipičnim IMS-om.

	N	**Medijan sCal (IQR)**	**P**
Atipičan IMS	10	4,43 (2,05)	0,703
Tipičan IMS	48	5,20 (2,99)	

Tablica 12. Usporedba koncentracije sCal-a (medijan i interkvartilni raspon) između ispitanika kojima je nakon dijagnoze IMS-a nađen VUR i ostalih ispitanika s bakterijskom infekcijom bez VUR-a.

	N	**Medijan sCal (IQR)**	**P**
IMS uz VUR	6	5,04 (5,24)	0,939
IMS bez VUR-a	52	4,97 (2,53)	

VUR, vezikoureteralni refluks

Tablica 13. Usporedba koncentracije sCal-a (medijan i interkvartilni raspon) između kontrola s dokazanim virusom influence tip A / B i kontrola s dokazanom RSV infekcijom.

	N	**Medijan sCal (IQR)**	**P**
Influenca A/B	42	2,45 (1,98)	0,261
RSV	9	1,78 (1,63)	

Povezanost koncentracije sCal-a s brojem leukocita u 1 mm^3 urina analizirana je pomoću neparametrijskog ANOVA testa tj. Kruskall-Wallis testa. Ispitanici su podijeljeni u 4 grupe ovisno o tome je li broj leukocita u 1 mm^3 urina < 50, 60 - 80, 81-100 ili >100. Nije detektirana statistički značajna razlika u koncentraciji sCal-a među navedenim skupinama ispitanika da bi se mogla naći povezanost između koncentracije sCal-a i mikroskopskog nalaza urina ($X^2 = 5,34$, $P = 0,149$).

Za analizu povezanosti koncentracije sCal-a s dobi ispitanika, djeca s bakterijskom infekcijom ponovno su podijeljena u četiri grupe, ovog puta ovisno o tome radi li se o novorođenčadi (dob 0 - 28 dana), mladoj dojenčadi (dob 1 - 3 mjeseca), dojenčadi starijoj od tri mjeseca (dob 4 – 12 mjeseci) ili maloj djeci (dob 13 – 36 mjeseci). U svakoj dobnoj skupini izračunat je medijan koncentracije sCal-a i interkvartilni raspon. Kruskall-Wallis testom nađena je statistički značajna razlika u koncentraciji sCal-a između grupa ($X^2 = 11,1$, $P = 0,011$, Tablica 14), a Dwass-Steel-Critchlow-Fligner testom (Tablica 15) višestrukog uspoređivanja tj. *post hoc* testom utvrđeno je da se statistički značajno razlikuju grupe novorođenče i starije dojenče ($W = 4.140$, $P = 0.018$), što znači da je koncentracija sCal-a u novorođenčadi s bakterijskom infekcijom statistički značajno manja od koncentracije sCal-a u starije dojenčadi s bakterijskom infekcijom.

Tablica 14. Medijani koncentracija sCal-a u ispitanika različitih dobnih skupina

	N	**Medijan sCal (IQR)**
Novorođenče	13	2,40 (3,15)
Mlado dojenče	16	5,20 (2,20)
Starije dojenče	24	5,61 (4,58)
Malo dijete	5	6,40 (4,10)

Novorođenče (dob 0-28 dana); mlado dojenče (dob 1-3 mjeseca); starije dojenče (dob 4-12 mjeseci); malo dijete (dob 13-36 mjeseci).

***** Statistički značajna razlika u vrijednosti medijana sCal-a između dvije ili više dobne skupine nađena je pomoću Kruskal-Wallis testa ($X^2 = 11,1$, $P = 0,011$).

Tablica 15. Višestruka komparativna analiza medijana sCal-a među različitim dobnim skupinama ispitanika s bakterijskom infekcijom pomoću Dwass-Steel-Critchlow-Fligner (DSCF) *post hoc* testa

		W	P
Novorođenče	mlado dojenče	3,071	0,131
Novorođenče	**starije dojenče**	**4,140**	**0,018**
Novorođenče	malo dijete	3,137	0,118
Mlado dojenče	starije dojenče	1,445	0,737
Mlado dojenče	malo dijete	2,103	0,446
Starije dojenče	malo dijete	0,653	0,967

Novorođenče (dob 0-28 dana); mlado dojenče (dob 1-3 mjeseca); starije dojenče (dob 4-12 mjeseci); malo dijete (dob 13-36 mjeseci); W, Wilcoxonov test rangiranja

*DSCF *post hoc* test je pokazao statistički značajnu razliku ($P < 0,05$) u vrijednosti medijana sCal-a između novorođenčadi i starije dojenčadi (podebljano)

5.4. Korelacija (povezanost) serumskog kalprotektina s konvencionalnim biljezima akutne faze upale

U tablicama 16 i 17 prikazane su korelacije sCal-a s ostalim proučavanim konvencionalnim biljezima akutne faze upale. Snažna pozitivna korelacija je definirana kao r_s (Spearmanov koeficijent korelacije) > 0,5 i P ≤ 0,05.

I u ispitanika s bakterijskom infekcijom, i u kontrola s virusnom infekcijom vrijednosti sCal-a snažno su korelirale s apsolutnim brojem (r_s = 0,611 i r_s = 0,606, P < 0,001) i postotkom neutrofila (r_s = 0,601 i r_s = 0,523, P < 0,001) te umjereno s brojem leukocita (r_s = 0,491 i 0,465, P < 0,001). Korelacija između sCal-a i CRP-a u ispitanika je bila umjerena (r_s = 0,446, P < 0,001), a u kontrola slaba (r_s = 0,279, P < 0,034). Nije detektirana značajna korelacija između sCal-a i PCT-a niti u jednoj skupini ispitanika.

Tablica 16. Korelacija vrijednosti sCal-a s drugim promatranim konvencionalnim laboratorijskim biljezima upale u ispitanika s bakterijskom infekcijom (Spearmanova korelacija).

	r_s	**N**	**P**
CRP (mg/L)	0,446	58	<0,001
PCT (ng/mL)	0,263	45	0,081
L (10^9/L)	0,491	58	<0,001
ABN (10^9/L)	0,611	58	<0,001
N%	0,601	58	<0,001

CRP, C-reaktivni protein; PCT, prokalcitonin; L, broj leukocita; ABN, apsulotni broj neutrofila; N%, postotak neutrofila.

Tablica 17. Korelacija vrijednosti sCal-a s drugim promatranim konvencionalnim laboratorijskim biljezima upale u kontrola s virusnom infekcijom (Spearmanova korelacija).

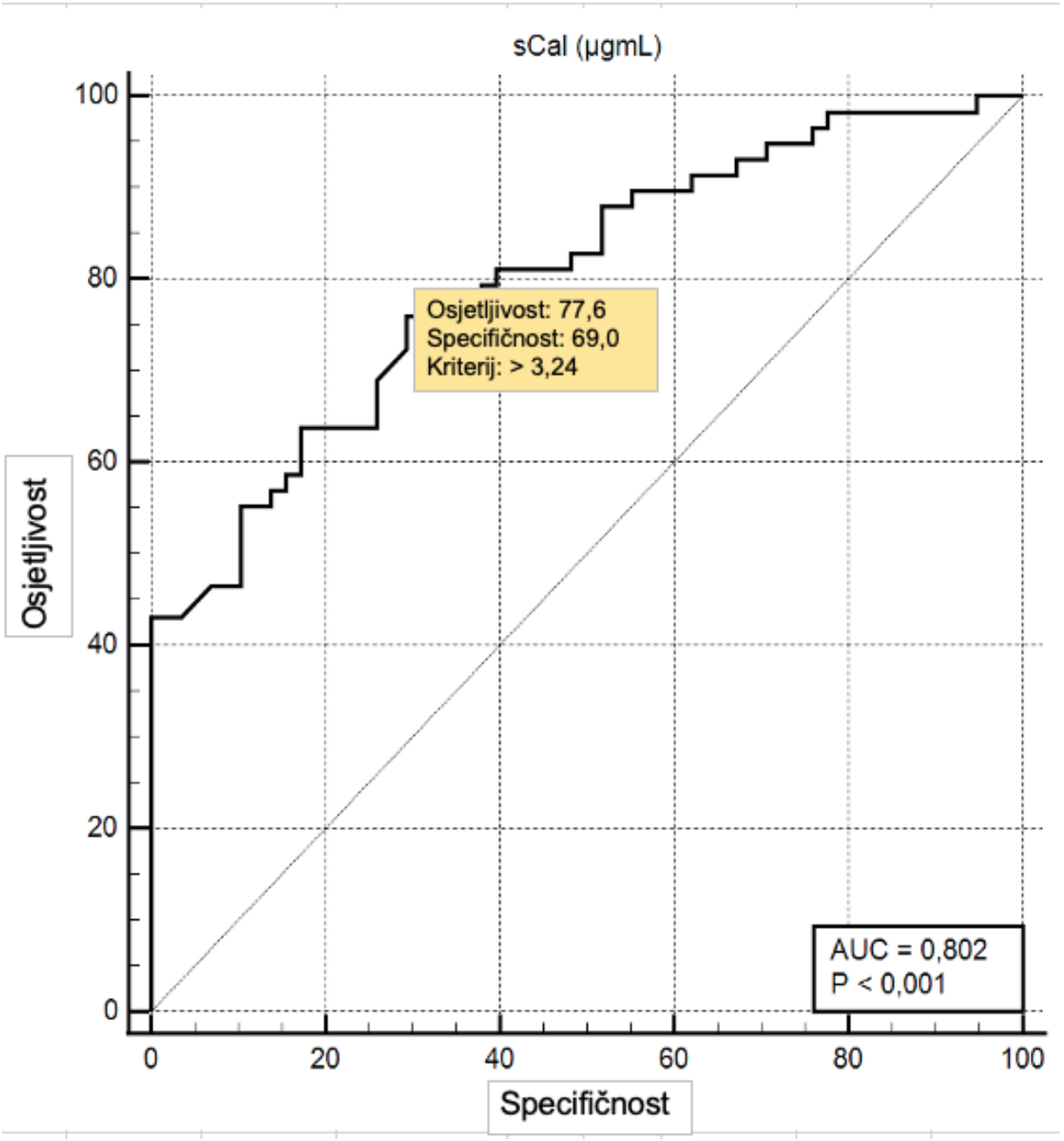
	r_s	N	P
CRP (mg/L)	0,279	58	0,034
PCT (ng/mL)	0,140	36	0,416
L (10^9/L)	0,465	58	0,001
ABN (10^9/L)	0,606	58	0,001
N%	0,513	58	0,001

CRP, C-reaktivni protein; PCT, prokalcitonin; L, broj leukocita; ABN, apsulotni broj neutrofila; N%, postotak neutrofila.

5.5. ROC analiza vrijednosti određivanja sCal-a i ostalih konvencionalih biljega akutne faze upale

ROC analizom vrijednosti određivanja koncentracije sCal-a za dijagnozu bakterijske infekcije nađena je za vrijednost sCal-a > 3,24 µg/ml značajna površina ispod ROC krivulje (AUC) od 80,2% ($P < 0,001$) uz osjetljivost od 77,6% i specifičnost 69% (Slika 5).

Analizirana je i vrijednost određivanja ostalih konvencionalnih biljega akutne faze upale u svrhu razlikovanja djece s bakterijskom od onih s virusnom infekcijom, a rezultati njihovih površina ispod ROC krivulja pri optimalnim graničnim vrijednostima (engl. *cut-off*) uz najbolji omjer osjetljivosti i specifičnosti prikazani su u tablici 18.



Površina ispod ROC krivulje	0,802
Standardna pogreška	0,0403
95% interval pouzdanosti	0,717 – 0,870
Z statistika	7,481
P	< 0,0001
Youden indeks (J)	0,4655
Kriterij	**>3,24**
Osjetljivost	77,59
Specifičnost	68,97

Slika 5. ROC analiza vrijednosti određivanja koncentracije sCal-a za dijagnozu bakterijske infekcije

Tablica 18. Vrijednost određivanja istraživanih biljega akutne faze upale prilikom razlikovanja febrilne djece s bakterijskom infekcijom mokraćnog sustava od one s virusnom infekcijom.

Biljeg	**Ispitanici /kontrole**	**AUC**	**Granična vrijednost**	**Osjetljivost (%)**	**Specifičnost (%)**	**J**
sCal	58/58	0,802	3,24 µg/mL	77,6	69,0	0,46
CRP	58/58	0,8176	19,7 mg/L	75,86	77,59	0,53
PCT	45/36	0,758	0,28 ng/mL	53,33	86,11	0,39
L	58/58	0,8585	12,1 $x10^9$/L	84,48	77,59	0,62
N %	58/58	0,6828	48,35%	63,79	67,24	0,31
ABN	58/58	0,843	6,18 $x10^9$/L	79,3	84,48	0,64

CRP, C-reaktivni protein; PCT, prokalcitonin; L, broj leukocita; ABN, apsolutni broj neutrofila; N%, postotak neutrofila; AUC, površina ispod ROC krivulje; J, Youden indeks

5.6. Binarna logistička regresijska analiza predviđanja bakterijske infekcije u djece s vrućicom

Binarni logistički regresijski model predikcije bakterijske infekcije s obzirom na vrijednost sCal-a u djece mlađe od tri godine s vrućicom ukazuje da je u navedenoj skupini pri koncentraciji sCal-a > 3,24 μg/ml dijagnoza bakterijske infekcije 7,7 puta vjerojatnija nego dijagnoza virusne infekcije (OR 7,6923, 95% CI 3,35 – 17,66, P<0,0001). Vjerojatnost za bakterijsku infekciju ovisno o koncentraciji sCal-a prikazana je grafički na slici 6.

U tablici 19 ispisani su hijerarhijskim redom rezultati univarijantne binarne logističke regresijske analize svih promatranih upalnih biljega kao prediktora postojanja bakterijske infekcije u djece mlađe od tri godine s vrućicom. Analiza je rađena na temelju dobivenih AUC vrijednosti za svaki biljeg. Broj leukocita se pokazao kao najbolji prediktor bakterijske infekcije kojim se može objasniti oko 32% varijanci, dok je promatrani sCal relativno blizu s R^2 od 24%. Napravljena je i multivarijantna binarna logistička regresijska analiza u dva modela (tablica 20) koja je pokazala vrlo malu dodanu vrijednost široko korištenog biljega CRP-a ako za prediktore bakterijske infekcije već koristimo L i sCal (R^2 od 40% u odnosu na R^2 od 37%).

Tablica 19. Hijerarhijski prikaz rezultata univarijantne binarne logističke regresijske analize svih proučavanih biljega akutne faze upale kao prediktora za postojanje bakterijske infekcije u djece s vrućicom.

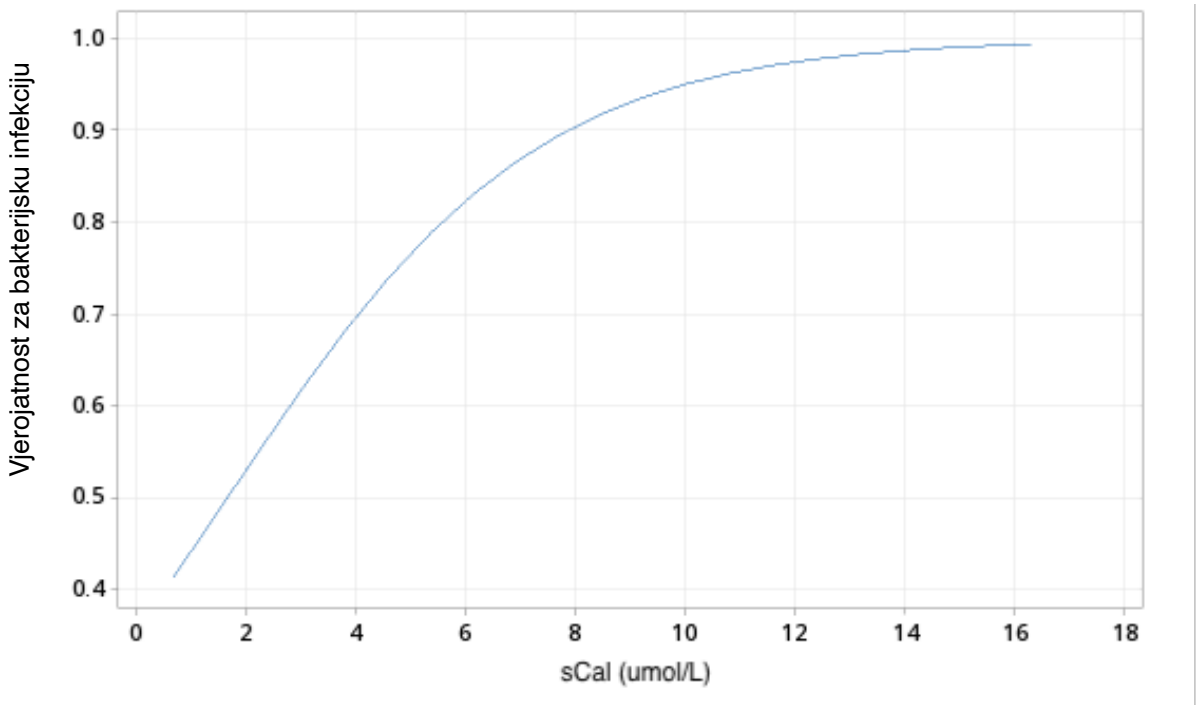
Prediktor	OR	95% CI	R^2(%)	AUC	P
L	1,2898	1,18-1,41	32,26	0,8585	<0,001
N	1,4334	1,25-1,64	28,60	0,8433	<0,001
sCal	1,9494	1,5-2,55	24,2	0,8017	<0,001
CRP	1,0362	1,02-1,05	21,33	0,8176	<0,001
PCT	1,9988	0,93-4,29	12,64	0,7580	0,076
N%	1,0522	1,02-1,08	8,45	0,6828	0,001

CRP, C-reaktivni protein; PCT, prokalcitonin; L, broj leukocita; ABN, broj neutrofila; N%, postotak neutrofila; sCal, sreumski kalprotektin; OR, omjer vjerojatnosti (engl. *odds ratio*); CI, interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*); R^2, korelacijski koeficijent; AUC- površina ispod ROC krivulje (engl. *area under the ROC curve*)

Tablica 20. Multivarijantna binarna logistička regresijska analiza dvije kombinacije biljega akutne faze upale kao prediktora za postojanje bakterijske infekcije u djece s vrućicom.

Prediktor	**OR**	**95% CI**	**P**	**VIF**
Model 1: R^2=36,85%, AUC=0,876				
L	1,2181	1,10-1,35	<0,001	1,07
sCal	1,4881	1,10-2,01	<0,001	1,07
Model 2: R^2=39,87%, AUC=0,8821				
L	1,147	1,02-1,28	0,019	1,06
sCal	1,4269	1,01-2,01	0,041	1,01
CRP	1,0254	0,99-1,05	0,058	1,05

L, broj leukocita; sCal, serumski kalprotektin; CRP, C-reaktivni protein; OR, omjer vjerojatnosti (engl. *odds ratio*); CI, interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*); R^2, korelacijski koeficijent; AUC, površina ispod ROC krivulje (engl. *area under the ROC curve*); VIF, faktor inflacije varijance tj. indikator multikoreliranosti.



Slika 6. Vjerojatnost za bakterijsku infekciju ovisno o koncentraciji sCal-a.

6. RASPRAVA

Kalprotektin je glavni citosolni protein neutrofila koji pripada porodici S100 i DAMP proteina, s ključnom ulogom u nespecifičnom imunološkom odgovoru (18, 19). Do sada se pokazao kao valjani biljeg niza imunološki posredovanih bolesti neinfektivne (83-87), kao i infektivne geneze (105, 109-111), što je temelj hipoteze ove disertacije. Široka rasprostranjenost u tijelu za vrijeme upale, stabilnost pri sobnoj temperaturi i otpornost na razgradnju bakterija, učinila je kalprotektin lako dostupnim biljegom koji se jednostavno može izolirati iz raznih tjelesnih tekućina (46-51).

Prema saznanjima temeljenim na dostupnoj literaturi iz PubMed/MEDLINE baze podataka, do sada nije rađeno istraživanje koje je analiziralo dijagnostički potencijal kalprotektina u razlikovanju bakterijske od virusnih infekcija u djece mlađe od tri godine s vrućicom bez vodećeg simptoma (engl. *fever without a source*), što je bio inicijalni cilj ove disertacije. Međutim, zlatni standard dijagnoze bakterijske infekcije je mikrobiološka izolacija uzročnika, a valjan uzorak za taj postupak je često nedostupan bez korištenja invazivnih metoda. Primjerice, timpanocenteza kod bakterijske upale srednjeg uha te pleurocenteza ili bronhoalveolarna lavaža kod bakterijske pneumonije su invazivni postupci kojima se dokazuje točna etiologija infekcije, ali je njihovo rutinsko izvođenje neprihvatljivo bolesnicima i neopravdano od strane struke (181, 182). Nadalje, mikrobiološki nalaz može biti lažno negativan, posebice kad se radi o hemokulturama, a razlozi su najčešće predanalitički (neadekvatni uzorak) (183). Na umu treba imati i tehnička ograničenja pojedinih mikrobioloških laboratorija. Infekcije mokraćnog sustava su pak rijedak primjer bakterijske infekcije gdje je izolacija mikrobiološkog uzročnika iz kulture urina dijagnostički zlatni standard koji je lako ostvariv (116). Zbog toga, kao i zbog značajne prevalencije među djecom mlađom od tri godine s vrućicom bez vodećeg simptoma, IMS je u prezentiranom istraživanju korišten kao model bakterijske infekcije.

U daljnjem tekstu rasprave usporedit će se rezultati našeg istraživanja u febrilne djece mlađe od tri godine s bakterijskim IMS-om, odnosno virusnom respiratornom infekcijom, s dosad objavljenim rezultatima drugih istraživanja, koja su obuhvaćala razne dobne skupine i sijela infekcije izvan urotrakta.

Naposljetku, na temelju dobivenih rezultata prezentirat će se stav o mogućoj kliničkoj uporabi serumskog kalprotektina kao biljega bakterijske infekcije u djece te će se naglasiti potencijal za nova istraživanja.

6.1. Usporedba dobivenih rezultata s dosad objavljenim istraživanjima

Glavni rezultat prikazanog istraživanja je da febrilna djeca mlađa od tri godine s bakterijskom infekcijom (mokraćnog sustava) imaju statistički značajno višu koncentraciju sCal-a od febrilne djece iste dobi s virusnom infekcijom (dišnog sustava). Taj nalaz podupire recentno istraživanje Havelke i suradnika (109) koje je pokazalo da su plazmatske koncentracije kalprotektina u odraslih s infekcijom dišnog sustava statistički značajno više kod onih s dijagnozom bakterijske pneumonije, streptokoknog tonzilitsa ili pneumonije uzrokovane mikoplazmom, od onih kojima je dokazana virusna infekcija.

Svi analizirani konvencionalni laboratorijski biljezi akutne upale (L, ABN, N%, CRP i PCT) su u našem istraživanju bili statistički značajno povišeni u bakterijskoj infekciji u odnosu na virusnu, međutim različito su korelirali s koncentracijom sCal-a. Najsnažnija korelacija je prikazana između sCal-a i neutrofila (apsolutnog broja i postotka), što je i očekivano s obzirom na to da je kalprotektin dokazani i već dobro znani biljeg aktivacije neutrofila (96, 105). Korelacija sCal-a s CRP-om je bila umjerena, dok je uopće nije bilo s PCT-om što se može objasniti različitim mehanizmom odgovora na akutnu infekciju (184) i vjerojatno manjim brojem ispitanika, što je ograničilo snagu testa navedene podanalize.

Istraživanje iz ove disertacije je prvo u kojem je uspoređena vrijednost mjerenja serumskog kalprotektina s vrijednosti mjerenja drugih konvencionalnih laboratorijskih biljega akutne faze upale u djece s IMS-om. ROC analizom određena je vrijednost poznatih laboratorijskih biljega akutne faze upale i sCal-a u razlikovanju bakterijske od virusnih infekcija te je zaključeno da su svi biljezi izrazito značajni sa sličnim vrijednostima ispod ROC krivulje (AUC). Na temelju dobivenih vrijednosti AUC-a napravljena je univarijantna binarna logistička regresijska analiza svih promatranih upalnih biljega kao prediktora postojanja bakterijske infekcije u djece mlađe od tri godine s vrućicom. Rezultat je pokazao da je broj leukocita najbolji prediktor bakterijske infekcije kojim se može objasniti 32% varijanci. Kada se tom modelu dodala i prediktorska vrijednost promatranog sCal-a, multivarijantnom binarnom logističkom regresijskom analizom dobio se R^2 = 37% što ipak upućuje na dodanu vrijednost sCal-a u dijagnostici bakterijskih infekcija. U drugom modelu multivarijantne binarne logističke regresijske analize koji je uz L i sCal uključivao i CRP, R^2 je samo malo porastao, na 40%. To je manje od očekivanog, s obzirom na to da je dodani CRP jedan od najkorištenijih laboratorijskih biljega akutne upale (185).

Činjenica da se kalprotektin konstitucijski nalazi u velikoj količini u neutrofilima te da se odmah izlučuje bez potrebe za *de novo* sintezom (35) čini sCal potencijalno ranijim biljegom bakterijske infekcije od CRP-a koji se sintetizira u jetri, detektabilan je u serumu tek nakon 6h od početka upale, a treba mu i do nekoliko dana da dosegne svoje maksimalne vrijednosti (186). PCT se po vremenu potrebnom da postane detektabilan u krvi u tijeku akutne upale vjerojatno nalazi negdje između sCal-a i CRP-a, budući da mu koncentracija naraste 4h od početka upale, nakon 6h dosegne svoje maksimalne vrijednosti koje zadržava kroz 8 do 24h, a u slučaju odgovarajuće antibiotske terapije koncentracija mu naglo pada (106, 187). Osim bakterijskih produkata/endotoksina još puno drugih čimbenika uzrokuje porast koncentracije PCT-a i CRP-a, osobito u novorođenčadi. Može se raditi o peripartalnim čimbenicima poput febrilne rodilje, majke koja je imala gestacijsku hipertenziju ili je prenatalno koristila kortikosteroide. Također, u novorođenčeta s respiratornim distres sindromom, srčanom bolesti, traumom ili nakon operacije mogu se naći povišene koncentracije PCT-a i CRP-a. Valja naglasiti da postoje i fiziološke varijacije u koncentraciji PCT-a i CRP-a u prvim danima života (188). Koja je fiziološka koncentracija sCal-a u zdrave novorođenčadi i koji peripartalni čimbenici utječu na nju, tek treba ispitati. Naša pretpostavka o sCal-u kao ranijem biljegu bakterijske infekcije od CRP-a i PCT-a još treba biti istražena studijom drugačijeg dizajna, u kojoj bi se laboratorijski biljezi uzastopno mjerili u određenom vremenskom intervalu.

Terrin i suradnici (110) su u svojem istraživanju na nedonoščadi vrlo niske rodne mase sa suspektnom sepsom zaključili da je određivanje koncentracije sCal-a za dijagnozu sepse značajnije od određivanja vrijednosti CRP-a, L-a i ABN-a, te kod vrijednosti > 1,7 μg/mL ima osjetljivost od 89% i specifičnost od 96%. Nekoliko godina kasnije Decembrino je sa svojim suradnicima (111) objavio sličan rad, ali na terminskoj novorođenčadi. Oni su pokazali da koncentracija sCal > 2,2 μg/mL ukazuje na razvoj novorođenačke sepse osjetljivošću od 62,5% i specifičnošću 69,7% usporedivši to sa CRP-om koji uz graničnu vrijednost od 6,0 mg/L ima osjetljivost 50% i specifičnost 66,7%. Objašnjenje je bilo već opisana spora kinetika CRP-a u inicijalnoj fazi infekcije, ali i postojanje mnogobrojnih peripartalnih čimbenika koji utječu na njegovu serumsku koncentraciju (188). Rezultati našeg istraživanja koji su vezani uz vrijednost određivanja sCal-a i CRP-a za dijagnozu bakterijske infekcije u mlade febrilne djece su donekle slični iznad opisanima. Na većem broju ispitanika je pokazano da CRP > 19.7 mg/L uz osjetljivost od 75.9% i specifičnost 77.6% otkriva djecu s bakterijskom infekcijom, dok koncentracija sCal-a > 3.24 μg/mL za istu svrhu ima osjetljivost 77.6% a specifičnost 69%.

Već nekoliko puta citirano istraživanje Havelke i suradnika iz 2020. godine (109) između ostalog je pokazalo da kalprotektin ima diskretno bolji AUC od PCT-a prilikom razlikovanja odraslih s bakterijskom pneumonijom od odraslih s virusnom respiratornom infekcijom (AUC 0,76 u odnosu na AUC 0,74). Rezultati su ipak izraženiji prilikom uspoređivanja pneumonije uzrokovane mikoplazmom s virusnom infekcijom te je pod tim uvjetima AUC od kalprotektina iznosio 0,88 za razliku od AUC-a PCT-a koji je bio 0,53. U našem istraživanju PCT ima niži AUC (0,76) za dijagnosticiranje bakterijske infekcije od sCal-a (0,80), međutim možda se radilo o sustavnoj pogrešci odabira sudionika istraživanja. Naime, sCal je određen u 100% sudionika, a PCT u samo 62% kontrola i 77,6% ispitanika i to onih koji su odavali dojam teže bolesnog djeteta.

PCT, peptidni prekursor kalcitonina, poznati je biljeg ozbiljne bakterijske infekcije (106). Koncentracija PCT-a generalno je povišena u bolesnika s bakterijskom, ali ne i virusnom infekcijom, što je potvrđeno i u našem istraživanju. No, određivanje PCT-a ima svoju kliničku ograničenost u bolesnika s blažom i lokaliziranom bakterijskom infekcijom, dok se s druge strane radi o najkorisnijem biljegu teške sepse i septičkog šoka (106, 186). U istraživanju iz 2014. godine provedenom među djecom mlađom od dvije godine s prvom febrilnom infekcijom mokraćnog sustava, Koufadaki i sur. (189) su pokazali da je PCT najvrjedniji biljeg zahvaćanja bubrežnog parenhima te prediktor trajnog bubrežnog ožiljčenja. Međutim, još uvijek nema dovoljno snažnih dokaza koji bi svrstali određivanje serumskog PCT-a u službene smjernice zbrinjavanja djece s IMS-om (158). U našem istraživanju sva djeca s infekcijom mokraćnog sustava su, s obzirom na dob mlađu od tri godine, shvaćena i liječena kao da imaju zahvaćen bubrežni parenhim (10), stoga ne možemo govoriti o potencijalu sCal-a kao biljegu razlikovanja infekcije gornjeg od donjeg dijela mokraćnog sustava. Ipak, na temelju naših rezultata može se zaključiti da bi sCal mogao konkurirati PCT-u kao dodatni biljeg IMS-a u febrilne djece.

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da su djeca s bakterijskom infekcijom statistički značajno mlađa od djece s virusnom infekcijom. Navedeno se poklapa s, u dostupnoj literaturi nađenom, prevalencijom IMS-a, RSV-a i influence među febrilnom djecom ovisno o njihovoj dobi (9, 190, 191). Prema korištenim referencama, bakterijska infekcija urotrakta se najčešće javlja u dječaka ispod tri mjeseca i djevojčica mlađih od godine dana (9), što odgovara interkvartilnom rasponu dobi bolesnika s IMS-om u prezentiranom istraživanju koji iznosi 2-6 mjeseci. Doduše, i RSV kao uzročnik bronhiolitisa koji zahtijeva hospitalizaciju se najčešće

javlja u djece dobi 2-4 mjeseca (190), međutim u našem istraživanju RSV je kao etiološki agens potvrđen u samo 15% kontrola s virusnom infekcijom, dok je 72% kontrola imalo influencu bez bakterijske superinfekcije koja se javlja u svim dobnim skupinama. Stoga je razumljiv interkvartilni raspon dobi djece s virusnom infekcijom u našem istraživanju koji iznosi 5-21 mjesec. Daljnje objašnjenje zašto su u našem istraživanju djeca s virusnom infekcijom starija od djece s bakterijskom infekcijom, može biti i činjenica da su djeca mlađa od šest mjeseci, čije majke su cijepljene protiv influence tijekom trudnoće, dijelom zaštićena majčinim cirkulirajućim protutijelima (191). Valja naglasiti da je sezonsko cijepljenje protiv influence važeća preporuka za sve trudnice (192). Također je poznato da djeca koja su isključivo dojena prvih šest mjeseci života, zbog zaštite majčinim IgA protutijelima, imaju u prvim mjesecima života manju pojavnost respiratornih bolesti (193).

Nadalje, u našem istraživanju trajanje simptoma vrućice u djece prije dolaska u Hitnu ambulantu je bilo duplo kraće u ispitanika s bakterijskom infekcijom u odnosu na kontrole s virusnom infekcijom. Podatak da su roditelji djece s bakterijskom infekcijom u prosjeku ranije potražili liječničku pomoć od roditelja djece s virusnom infekcijom je izrazito pozitivan. Naime, glavni simptom ozbiljne bakterijske infekcije koji se spominje u raznim relevantnim preporukama za postupanje s febrilnim novorođenčetom, dojenčetom mlađim od tri mjeseca ili čak djetetom mlađim od pet godina (redom Rochester, Philadelphia i Boston kriteriji te NICE smjernice), a ne može se objektivizirati, je upravo dojam bolesnog djeteta (engl. *ill appearing child*) (146, 194). Navedeni podatak iz našeg istraživanja ukazuje da roditelji uglavnom imaju ispravan dojam o ozbiljnosti bolesti svojeg djeteta te bi njihov dolazak u Hitnu ambulantu u prvim satima bolesti trebao liječniku ordinariusu biti indikativan da bi se moglo raditi o bakterijskoj infekciji.

Ispitanike s bakterijskom infekcijom u našem smo istraživanju podijelili u četiri dobne skupine: novorođenčad (starosti do 28 dana), mlada dojenčad starosti do tri mjeseca, dojenčad starija od četiri mjeseca i mala djeca dobi 13-36 mjeseci. U NICE smjernicama za dijagnozu IMS-a u djece ispod 16 godina (116) djeca su podijeljena na onu mlađu od 3 mjeseca i onu starosti 3-36 mjeseci. U našem radu su iz dobne skupine do 3 mjeseca izdvojena novorođenčad, a u dobnoj skupini 3-36 mjeseci dojenčad je odvojena od male djece. Uspoređivali smo medijane koncentracija sCal-a između navedenih dobnih skupina s bakterijskom infekcijom i rezultat je pokazao da su vrijednosti sCal-a u novorođenčadi statistički značajno niže od vrijednosti sCal-a u starije dojenčadi. Iako je broj ispitanika u pojedinoj dobnoj skupini bio premalen za

donošenje generalnih zaključaka, spomenuti rezultat ukazuje da na kinetiku sCal-a vjerojatno utječe i dob ispitanika. U dostupnoj literaturi nema podataka na tu temu te je potrebno novo istraživanje u kojem bi se odredile granične vrijednosti sCal-a po dobnim skupinama, s osobitim naglaskom na novorođenčad.

Jedan od važnih rezultata našeg istraživanja je da čak 17,2% ispitanika s dokazanom IMS ima respiratorne simptome. Navedeno je pokazatelj da se kod male djece s vrućicom i jasnim simptomima infekcije dišnog sustava ne smije propustiti testirati urin kako bi se isključila konkomitantna uroinfekcija, koja je prema različitim autorima prisutna u 3-10% bronhiolitisa (195-197).

Prevalencija VUR-a od 10,3% u ispitanika nakon prve epizode IMS-a utvrđena našim istraživanjem je oko tri puta niža od one opisane u literaturi koja iznosi 25-40% (117, 198, 199). Navedeno se može objasniti različitom metodologijom dijagnosticiranja VUR-a i slijeđenju starih smjernica u citiranim radovima u kojima se svakom djetetu nakon preboljene prve epizode nekompliciranog IMS-a radio MCUG. Različito od toga, u našem istraživanju je VUR tražen samo nakon patološkog ultrazvučnog nalaza urotrakta i to isključivo ceVUS-om (164). Svi VUR-evi u našem istraživanju su bili niskoga stupnja (< III). U švedskom istraživanju iz 2017. (177) rezultati su pokazali da je VUR visokog stupnja vrlo rijedak kod male djece koja imaju uredan ultrazvučni nalaz urotrakta nakon preboljenja prve epizode febrilnog IMS-a uzrokovanog *E.coli* i iznosi < 1%. Ako je uzročnik IMS-a bakterija koja nije *E.coli* vjerojatnost za VUR visokog stupnja raste na 26%, a u slučaju i patološkog ultrazvučnog nalaza urotrakta iznosi 55%.

U ovom istraživanju analizirana je razlika u koncentraciji sCal-a između pojedine podskupine ispitanika s IMS-om u odnosu na ostale ispitanike s IMS-om. Podskupine su obuhvaćale ispitanike koji su razvili težu kliničku sliku bakterijske infekcije urotrakta, kojima je naknadno postavljena dijagnoza atipične infekcije mokraćnog sustava ili VUR-a, one s respiratornim simptomima te one s kliničkim znakovima gastroenterokolitisa. Rezultati su jednoznačno pokazali da nema statistički značajne razlike u koncentraciji sCal-a između pojedine podskupine ispitanika i ostalih ispitanika s IMS-om, za što je vjerojatno odgovaran mali broj ispitanika.

6.2. Preporuke za korištenje sCal-a u kliničkoj praksi

Slijedom svega navedenoga, rezultati ove disertaciju upućuju na potencijal kalprotektina, važnog aktera nespecifičnog imunološkog odgovora predvođenog neutrofilima, kao ranog serumskog biljega bakterijske infekcije u djece mlađe od tri godine. Nadalje, određivanje vrijednosti sCal-a u djece s patološkim nalazom urina, posebice u slučaju nejasnog ili dvojbenog nalaza kemijske/mikroskopske analize urina, moglo bi pomoći u ranoj dijagnostici IMS-a u male febrilne djece, te time smanjiti postotak onih koji nepotrebno primaju antibiotsku terapiju do iščekivanja nalaza urinokulture, istodobno ne propuštajući pravovremeno liječiti one s bakterijskom infekcijom urotrakta.

6.3. Daljnja istraživanja

Rezultati ove disertacije otvaraju vrata novim istraživanjima serumskog kalprotektina kao biljega bakterijske infekcije. Hipoteza istraživanja, da je serumski kalprotektin osjetljiv i specifičan rani biljeg akutne bakterijske infekcije mokraćnog sustava u djece, je potvrđena. Pokazano je da je sCal statistički značajno viši u djece s bakterijskom infekcijom u odnosu na djecu s virusnom infekcijom u bolesti koja traje do 72 sata. Prema svim iznesenim informacijama može se zaključiti da je sCal izrazito rani biljeg akutne upale, međutim za potvrdu da se radi o najranijem biljegu akutne infekcije potrebno je novo istraživanje u kojem će se koncentracija sCal-a i ostalih biljega akutne upale uzastopno mjeriti tijekom određenog vremenskog intervala. Potrebno je i istraživanje dinamike sCal-a kao biljega bakterijske infekcije dječje dobi, ali drugog sijela izvan urotrakta. Također, iskristalizirala se potreba određivanja referentnih vrijednosti sCal-a u djece raznih dobnih skupina, s posebnim naglaskom na novorođenačku dob.

No, osim daljnjih kliničkih istraživanja, rezultati otvaraju potrebu za daljnjim provođenjem bazičnih istraživanja koja će za cilj imati dodatno rasvijetliti ulogu kalprotektina u lokalnom upalnom procesu, ali i u sistemskom širenju lokalnog upalnog procesa te interakciji s drugim citokinima dominantno prisutnima u bakterijskoj odnosno virusnoj infekciji. K tome, rezultati prikazanog istraživanja dodatno potiču otkrivanje novih terapijskih modaliteta s kalprotektinom kao ciljem djelovanja.

Može se stoga zaključiti kako provedeno kliničko istraživanje pokazuje i svojevrsni „obrnuti“ translacijski potencijal budući da dodatno informira buduća bazična istraživanja koja bi mogla dovesti do bolje primjenjivosti kalprotektina u svakodnevnoj kliničkoj praksi.

6.4. Prednosti i nedostaci provedenog istraživanja

Postojanje detaljnog plana istraživanja s kojim su bili upoznati svi djelatnici Hitne ambulante i pedijatrijskih odjela na kojima su se liječili sudionici istraživanja te Kliničkog zavoda za kemiju KBCSM, rezultiralo je, u metodama već opisanim, neproblematičnim tijekom istraživanja, usprkos činjenici da su inicijalnu regrutaciju sudionika radili različiti liječnici neujednačenog pedijatrijskog iskustva, ovisno o trenutnom rasporedu službe. Zbog nedvosmislenih kriterija odabira sudionika kojima se određivala vrijednost kalprotektina iz sačuvanog seruma, stvorena je jasno definirana homogena kohorta sudionika, dok je vjerojatnosti sustavne pogreške (engl. *bias*) reducirana, te su maksimalno iskorišteni ograničeni reagensi za određivanje koncentracije serumskog kalprotektina.

Moguće ograničenje ovoga istraživanja je relativno malen broj sudionika iz samo jednog centra. Ipak, kako je već iznad opisano, sudionici su bili pažljivo birani prema strogim kriterijima uključivanja i isključivanja te su činili homogenu kohortu ispitanika i kontrola, što je s druge strane prednost istraživanja. Također, pripadnost istom geografskom području ima pozitivnu stranu jer smanjuje mogućnost utjecaja na rezultate povezane s okolišnim čimbenicima.

Inicijalnu regrutaciju pacijenata iz HA u sudionike istraživanja radili su različiti liječnici ovisno o rasporedu, što je moglo rezultirati time da neki pacijenti nisu uključeni u istraživanje iz nemara, nemotiviranosti ili pak nedostatka iskustva liječnika, iako su imali sve uključne kriterije.

Diskutabilni mogu biti i uzorci krvi iz kojih se određivala vrijednost kalprotektina. U objavljenim istraživanjima u otprilike jednakom omjeru je određivana koncentracija kalprotektina iz seruma i iz plazme (78, 98, 103, 108, 109, 111). U uvodu je već objašnjeno da se serum dobiva nakon koagulacije krvi, tijekom koje može doći do aktivacije neutrofila i posljedično tome viših koncentracija sCal-a (200). Postoje dva recentna istraživanja na pacijentima s IBD-om i RA-om čiji je zaključak da je plazmatski uzorak superiorniji od serumskog (201, 202). Međutim, prema službenim proizvođačevim uputama komercijalnog analizatora kalprotektina koji je korišten prilikom izrade ove disertacije (Quantum Blue® sCal test i Quantum Blue® Reader aparat, Bühlmann, Švicarska[‡]), serumski i plazmatski uzorci su jednako pouzdani za određivanje koncentracije kalprotektina u krvi. Također, svim sudionicima

[‡] https://buhlmannlabs.com/products-solutions/autoimmunity/mrp814/#downloadIFU

istraživanja, i ispitanicima i kontrolama, određena je koncentracija kalprotektina u serumu pa je uspoređivanje vrijednosti između jednih i drugih sigurno relevantno jer se radilo u istim uvjetima. Dodatno već spomenuto objašnjenje zašto je u ovom istraživanju korišten serumski uzorak, je pošteda male djece od traume ponovnog vađenja krvi. Naime, kalprotektin smo određivali iz istog uzorka krvi već izvađenog za mjerenje koncentracije CRP-a.

Važno je spomenuti i potencijalna ograničenja povezana s dokazivanjem virusnih infekcija. Naime, dokazivanje virusne infekcije u kontrolnih sudionika je rađeno pomoću antigenskih testova, iako je poznato da je molekularna detekcija virusne nukleinske kiseline superiornija dijagnostička metoda (203). U našem istraživanju RSV je dokazan brzim antigenskim testom (RSVGnost Resp, BIOGNOST®). Radi se o komercijalnom imunokromatografskom testu koji u proizvođačevim uputama ima opisanu 95%-tnu osjetljivost i 99%-tnu specifičnost u detekciji RSV-a. Influenca A i influenca B su dokazani antigenskom metodom direktne imunofluorescencije (DFA) na Zavodu za javno zdravstvo RH. Barenfanger i sur. (204) su opisali pozitivnu prediktivnu vrijednost antigenske imunofluorescentne metode za detekciju virusa influence od 100%, a negativnu prediktivnu vrijednost od 96%. Dokazivanje virusa antigenskim metodama je na našem području bila uobičajena praksa prije COVID-19 pandemije, kada se dokazivanje nukleinskih kiselina respiratornih virusa iz brisa nazofarinksa PCR (lančana reakcija polimeraze, engl. *polymerase chain reaction*) metodom nije rutinski radila. Smatramo da virusna dijagnostika u našem istraživanju nije direktno utjecala na rezultate, s obzirom na to da korišteni testovi imaju visoku specifičnost te sa sigurnošću možemo reći da kontrole s dokazanom virusnom infekcijom stvarno imaju virusnu infekciju. Indirektni utjecaj niže osjetljivosti korištenih antigenskih testova od PCR-a je taj što smo sigurno propustili određeni broj pacijenata uvrstiti u istraživanje, čime bi povećali uzorak kontrola s potvrđenom virusnom infekcijom i time snagu istraživanja.

Nadalje, uzorak urina analiziran kod ispitanika sakupljen je u većini slučajeva pomoću plastičnog sterilnog sakupljača (vrećice), što nije važeća preporuka europskih i svjetskih pedijatrijskih društava. Međutim, radi se o uobičajenoj praksi mnogih centara našeg podneblja, među kojima je i KBCSM u kojem se vršilo istraživanje, a u svrhu maksimalne poštede male djece s jasnom i nekompliciranom kliničkom i laboratorijskom slikom IMS-a od invazivnih zahvata kateterizacije mokraćnog mjehura i suprapubične punkcije (8, 180). Kako bi se smanjio postotak kontaminacije uzorka urina bakterijama periuretralnog područja, iskusan zdravstveni radnik pažljivo je slijedio proizvođačeve upute prilikom stavljanja i skidanja sterilnog

sakupljača ispitanicima. Broj bakterija korišten za ispunjenje zlatnog standarda dijagnoze IMS-a je bio $\geq 10^5$ CFU/ml urina dobivenog ovom metodom, dok su svi uzorci s manjim brojem bakterija ili prisutnom mješovitom bakterijskom kulturom izbačeni iz istraživanja. Vjerojatno je tim načinom neki pacijent s IMS-om izbačen iz istraživanja, ali je postotak lažno pozitivnih nalaza uslijed kontaminacije sveden na minimum.

Dizajn istraživanja u kojem su se svi laboratorijski biljezi mjerili samo jednom insuficijentan je za donošenje valjanih zaključaka o kinetici pojedinih biljega. Mišljenje da koncentracija sCal-a u akutnoj bakterijskoj infekciji brže raste od koncentracije CRP-a i PCT-a je ostalo na nivou pretpostavke.

7. ZAKLJUČCI

1. Svi proučavani laboratorijski biljezi akutne upale, uključujući sCal, bili su statistički značajno povišeni u ispitanika s dokazanom bakterijskom infekcijom mokraćnog sustava u odnosu na kontrole s dijagnozom virusne infekcije ($P < 0,001$).
2. Koncentracija sCal-a > 3,24 μg/ml ima osjetljivost od 77,6% i specifičnost od 69% za dijagnozu bakterijske infekcije u febrilne djece mlađe od 3 godine.
3. Iako je jasno da se dijagnoza IMS-a ne može postaviti na temelju laboratorijskih biljega, a izolacija mikrobiološkog uzročnika iz kulture urina ostaje zlatni standard dijagnoze, ova disertacija je pokazala da određivanje sCal-a može biti od pomoći liječnicima na svim razinama zdravstvene zaštite prilikom zbrinjavanja djeteta mlađeg od tri godine s vrućicom bez vodećeg simptoma i s patološkim nalazom urina.
4. Rezultati ove disertacije mogu poslužiti prilikom planiranja budućih istraživanja s ciljem daljnjeg proučavanja karakteristika kalprotektina kao biljega bakterijske infekcije. U ovom istraživanju IMS je poslužio kao prihvatljiv model bakterijske infekcije u djece mlađe od tri godine radi lako dostupnog mikrobiološkog zlatnog standarda dijagnoze, no potrebno je još studija kojima bi se potvrdila klinička vrijednost kalprotektina u bakterijskim infekcijama drugih sijela u ovoj ranjivoj skupini djece koja čini većinu vrućica bez vodećeg simptoma.
5. Kako bi se valjano istražila kinetika sCal-a kao biljega bakterijske infekcije i bolje dokazala hipoteza da se radi o ranom biljegu bakterijske infekcije, potrebno je novo istraživanje u kojem će se u nekoliko navrata mjeriti koncentracija sCal-a i konvencionalnih laboratorijskih biljega upale.
6. Na temelju rezultata iz ove disertacije može se zaključiti da na kinetiku sCal-a kao biljega bakterijske infekcije utječe dob pacijenta, te je potrebno učiniti istraživanje u kojem bi se odredile referentne vrijednosti sCal-a po dobnim skupinama, s osobitim naglaskom na novorođenčad, s obzirom na to da su podaci na tu temu nedostatni u dostupnoj literaturi.

8. SAŽETAK

Uvod: Dijete s vrućicom bez vodećeg simptoma još uvijek predstavlja dijagnostički problem, unatoč sve dostupnijim i često korištenim krvnim biljezima akutne upale. Novija istraživanja naglašavaju ključnu ulogu kalprotektina, heterodimera koji se sastoji od S100A8 i S100A9 proteina, u sterilnoj i infektivnoj upali. Glavni cilj ovog rada je ispitivanje i prikazivanje karakteristika serumskog kalprotektina (sCal) kao ranog biljega bakterijske infekcije mokraćnog sustava (IMS) u male djece s vrućicom.

Sudionici i metode: Sudionici ovog istraživanja su bila febrilna djeca dobi 0 – 36 mjeseci sa suspektnim IMS-om ili respiratornom virusnom infekcijom. Sudionici kojima je iz urinokulture izolirana bakterija u signifikantnom broju označeni su kao ispitanici (n = 58), dok su sudionici s dokazanom virusnom infekcijom dišnog sustava označeni kao kontrole (n = 51), kao i sudionici sa sterilnom leukociturijom koji su tijekom obrade razvili simptome virusne respiratorne infekcije, a isključena im je bakterijska infekcija drugog sijela (n = 7). Koncentracije konvencionanih biljega akutne upale (broj leukocita, apsolutni broj i postotak neutrofila, C- reaktivni protein i prokalcitonin) i sCal-a uspoređivane su između ispitanika i kontrola pomoću Mann-Whitney U testa. ROC analizom ispitivana je najbolja osjetljivosti i specifičnosti sCal-a u razlikovanju ispitanika s bakterijskom infekcijom od kontrola s virusnom infekcijom, ovisno o optimalnim graničnim vrijednostima.

Rezultati: Vrijednosti svih ispitivanih biljega akutne upale bile su statistički značajno više u ispitanika nego u kontrola. Medijani (i interkvartilne razlike) serumskih koncentracija kalprotektina u ispitanika s bakterijskom infekcijom [4,97 (2,99) μg/mL] su bili statistički značajno viši nego u kontrola bez bakterijske infekcije [2,45 (2,22) μg/mL] ($P < 0.001$). ROC analizom vrijednosti određivanja koncentracije sCal-a za dijagnozu bakterijske infekcije nađena je za vrijednost sCal-a > 3,24 μg/ml značajna površina ispod ROC krivulje (AUC) od 80,2% ($P < 0,001$) uz osjetljivost od 77,6% i specifičnost 69%.

Zaključak: sCal se pokazao kao pouzdani rani biljeg bakterijske infekcije u febrilne djece mlađe od tri godine, a njegovo određivanje u slučaju patološkog nalaza urina moglo bi pomoći u ranoj dijagnostici IMS-a.

9. SUMMARY

Serum calprotectin as an early biomarker for bacterial urinary tract infections in children; Mirta Lamot, 2022.

Introduction: This research aimed to evaluate the usefulness of serum calprotectin (sCal) as a biomarker of urinary tract infection (UTI) in children.

Methods: Febrile children aged 0-36 months with suspected UTI or viral respiratory tract infection were included. Those with a significant bacteriuria in urine culture were labelled as cases (n=58), while those with proven viral infection (n=51), as well as those with suspected UTI but sterile urine culture who developed symptoms of viral respiratory infection (n = 7), were labelled as controls. Differences in measured biomarkers and sCal between cases and controls were analysed with Mann-Whitney U-test. ROC analysis reported cut-off values with the best sensitivity and specificity to distinguish bacterial UTI from viral respiratory infection.

Results: All analysed inflammatory biomarkers, including sCal, were significantly higher in cases than in controls. For identifying bacterial infection, sensitivity, and specificity of sCal were 77.6% and 69.0%, respectively, at an adjusted cut-off point of > 3.24 μg/mL (AUC 80.2%).

Conclusion: sCal could have substantial added value in the management of a child with suspected UTI and is a promising biomarker in distinction between bacterial and viral causes of febrile illness in children aged under three years.

10. POPIS LITERATURE

1. Barbi E, Marzuillo P, Neri E, Naviglio S, Krauss BS. Fever in Children: Pearls and Pitfalls. Children (Basel) 2017;4.

2. Tešović G. Infekcijske bolesti. U: Mardešić D, ur. Pedijatrija. Zagreb: Školska knjiga; 2016. Str. 470-7.

3. Troelsen FS, Jick S. Antibiotic Use in Childhood and Adolescence and Risk of Inflammatory Bowel Disease: A Case-Control Study in the UK Clinical Practice Research Datalink. Inflamm Bowel Dis 2020;26:440-7.

4. Vangoitsenhoven R, Cresci GAM. Role of Microbiome and Antibiotics in Autoimmune Diseases. Nutr Clin Pract 2020;35:406-16.

5. Tamburini S, Shen N, Wu HC, Clemente JC. The microbiome in early life: implications for health outcomes. Nat Med 2016;22:713-22.

6. Horton DB, Scott FI, Haynes K, Putt ME, Rose CD, Lewis JD *i sur.* Antibiotic Exposure and Juvenile Idiopathic Arthritis: A Case-Control Study. Pediatrics 2015;136:e333-43.

7. Aronson JK, Ferner RE. Biomarkers-A General Review. Curr Protoc Pharmacol 2017;76:9 23 1-9 17.

8. Tešović G, Batinić, D. Infekcije mokraćnog sustava u djece. Medicus 2006;15:275-82.

9. Shaikh N, Morone NE, Bost JE, Farrell MH. Prevalence of urinary tract infection in childhood: a meta-analysis. Pediatr Infect Dis J 2008;27:302-8.

10. Batinić D. Infekcije mokraćnog sustava. U: Mardešić D, ur. Pedijatrija. Zagreb: Školska knjiga; 2016. Str. 904-8.

11. Schaller A, Galloway CS. Bronchiolitis in Infants and Children. S D Med 2017;70:274-7.

12. Zurita-Cruz JN, Gutierrez-Gonzalez A, Manuel-Apolinar L, Fernandez-Garate JE, Arellano-Flores ML, Correa Gonzalez RA *i sur.* Hospitalizations for viral respiratory infections in children under 2 years of age: epidemiology and in-hospital complications. BMC Pediatr 2020;20:285.

13. Tillard C, Chazard E, Faure K, Bartolo S, Martinot A, Dubos F. Burden of influenza disease in children under 2 years of age hospitalized between 2011 and 2020 in France. J Infect 2022;84:145-50.

14. Nair H, Brooks WA, Katz M, Roca A, Berkley JA, Madhi SA *i sur.* Global burden of respiratory infections due to seasonal influenza in young children: a systematic review and meta-analysis. Lancet 2011;378:1917-30.

15. Dale I, Fagerhol MK, Naesgaard I. Purification and partial characterization of a highly immunogenic human leukocyte protein, the L1 antigen. Eur J Biochem 1983;134:1-6.
16. Zwadlo G, Schlegel R, Sorg C. A monoclonal antibody to a subset of human monocytes found only in the peripheral blood and inflammatory tissues. J Immunol 1986;137:512-8.
17. Dorin JR, Novak M, Hill RE, Brock DJ, Secher DS, van Heyningen V. A clue to the basic defect in cystic fibrosis from cloning the CF antigen gene. Nature 1987;326:614-7.
18. Kligman D, Hilt DC. The S100 protein family. Trends Biochem Sci 1988;13:437-43.
19. Pruenster M, Vogl T, Roth J, Sperandio M. S100A8/A9: From basic science to clinical application. Pharmacol Ther 2016;167:120-31.
20. Rammes A, Roth J, Goebeler M, Klempt M, Hartmann M, Sorg C. Myeloid-related protein (MRP) 8 and MRP14, calcium-binding proteins of the S100 family, are secreted by activated monocytes via a novel, tubulin-dependent pathway. J Biol Chem 1997;272:9496-502.
21. Andersson KB, Sletten K, Berntzen HB, Dale I, Brandtzaeg P, Jellum E *i sur.* The leucocyte L1 protein: identity with the cystic fibrosis antigen and the calcium-binding MRP-8 and MRP-14 macrophage components. Scand J Immunol 1988;28:241-5.
22. Odink K, Cerletti N, Bruggen J, Clerc RG, Tarcsay L, Zwadlo G *i sur.* Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages of rheumatoid arthritis. Nature 1987;330:80-2.
23. Vogl T, Gharibyan AL, Morozova-Roche LA. Pro-inflammatory S100A8 and S100A9 proteins: self-assembly into multifunctional native and amyloid complexes. Int J Mol Sci 2012;13:2893-917.
24. Salama I, Malone PS, Mihaimeed F, Jones JL. A review of the S100 proteins in cancer. Eur J Surg Oncol 2008;34:357-64.
25. Steinbakk M, Naess-Andresen CF, Lingaas E, Dale I, Brandtzaeg P, Fagerhol MK. Antimicrobial actions of calcium binding leucocyte L1 protein, calprotectin. Lancet 1990;336:763-5.
26. Schafer BW, Wicki R, Engelkamp D, Mattei MG, Heizmann CW. Isolation of a YAC clone covering a cluster of nine S100 genes on human chromosome 1q21: rationale for a new nomenclature of the S100 calcium-binding protein family. Genomics 1995;25:638-43.
27. Schafer BW, Heizmann CW. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. Trends Biochem Sci 1996;21:134-40.
28. Damo SM, Kehl-Fie TE, Sugitani N, Holt ME, Rathi S, Murphy WJ *i sur.* Molecular basis for manganese sequestration by calprotectin and roles in the innate immune response to invading bacterial pathogens. Proc Natl Acad Sci U S A 2013;110:3841-6.

29. Leukert N, Vogl T, Strupat K, Reichelt R, Sorg C, Roth J. Calcium-dependent tetramer formation of S100A8 and S100A9 is essential for biological activity. J Mol Biol 2006;359:961-72.

30. Hessian PA, Edgeworth J, Hogg N. MRP-8 and MRP-14, two abundant Ca(2+)-binding proteins of neutrophils and monocytes. J Leukoc Biol 1993;53:197-204.

31. Brandtzaeg P, Dale I, Fagerhol MK. Distribution of a formalin-resistant myelomonocytic antigen (L1) in human tissues. II. Normal and aberrant occurrence in various epithelia. Am J Clin Pathol 1987;87:700-7.

32. Nukui T, Ehama R, Sakaguchi M, Sonegawa H, Katagiri C, Hibino T *i sur.* S100A8/A9, a key mediator for positive feedback growth stimulation of normal human keratinocytes. J Cell Biochem 2008;104:453-64.

33. van Lent PL, Grevers LC, Blom AB, Arntz OJ, van de Loo FA, van der Kraan P *i sur.* Stimulation of chondrocyte-mediated cartilage destruction by S100A8 in experimental murine arthritis. Arthritis Rheum 2008;58:3776-87.

34. Vandal K, Rouleau P, Boivin A, Ryckman C, Talbot M, Tessier PA. Blockade of S100A8 and S100A9 suppresses neutrophil migration in response to lipopolysaccharide. J Immunol 2003;171:2602-9.

35. Klempt M, Melkonyan H, Hofmann HA, Eue I, Sorg C. The transcription factors c-myb and C/EBP alpha regulate the monocytic/myeloic gene MRP14. Immunobiology 1998;199:148-51.

36. El Gazzar M. Immunobiology of S100A8 and S100A9 proteins and their role in acute inflammation and sepsis. Int J Immunol Immunother 2015;2.

37. Vogl T, Ludwig S, Goebeler M, Strey A, Thorey IS, Reichelt R *i sur.* MRP8 and MRP14 control microtubule reorganization during transendothelial migration of phagocytes. Blood 2004;104:4260-8.

38. Loser K, Vogl T, Voskort M, Lueken A, Kupas V, Nacken W *i sur.* The Toll-like receptor 4 ligands Mrp8 and Mrp14 are crucial in the development of autoreactive CD8+ T cells. Nat Med 2010;16:713-7.

39. Kumar A, Steinkasserer A, Berchtold S. Interleukin-10 influences the expression of MRP8 and MRP14 in human dendritic cells. Int Arch Allergy Immunol 2003;132:40-7.

40. Frosch M, Strey A, Vogl T, Wulffraat NM, Kuis W, Sunderkotter C *i sur.* Myeloid-related proteins 8 and 14 are specifically secreted during interaction of phagocytes and activated endothelium and are useful markers for monitoring disease activity in pauciarticular-onset juvenile rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 2000;43:628-37.

41. Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W *i sur.* Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against Candida albicans. PLoS Pathog 2009;5:e1000639.

42. Pruenster M, Kurz AR, Chung KJ, Cao-Ehlker X, Bieber S, Nussbaum CF *i sur.* Extracellular MRP8/14 is a regulator of beta2 integrin-dependent neutrophil slow rolling and adhesion. Nat Commun 2015;6:6915.

43. Foell D, Wittkowski H, Vogl T, Roth J. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. J Leukoc Biol 2007;81:28-37.

44. Gomez R, Villalvilla A, Largo R, Gualillo O, Herrero-Beaumont G. TLR4 signalling in osteoarthritis--finding targets for candidate DMOADs. Nat Rev Rheumatol 2015;11:159-70.

45. Ma L, Sun P, Zhang JC, Zhang Q, Yao SL. Proinflammatory effects of S100A8/A9 via TLR4 and RAGE signaling pathways in BV-2 microglial cells. Int J Mol Med 2017;40:31-8.

46. Striz I, Trebichavsky I. Calprotectin - a pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation. Physiol Res 2004;53:245-53.

47. Dunlop O, Bruun JN, Myrvang B, Fagerhol MK. Calprotectin in cerebrospinal fluid of the HIV infected: a diagnostic marker of opportunistic central nervous system infection? Scand J Infect Dis 1991;23:687-9.

48. Cuida M, Brun JG, Tynning T, Jonsson R. Calprotectin levels in oral fluids: the importance of collection site. Eur J Oral Sci 1995;103:8-10.

49. Holt J, Fagerhol MK, Dale I. Quantitation of a leukocyte protein (L1) in urine. Acta Paediatr Scand 1983;72:615-6.

50. Laforgia N, Baldassarre ME, Pontrelli G, Indrio F, Altomare MA, Di Bitonto G *i sur.* Calprotectin levels in meconium. Acta Paediatr 2003;92:463-6.

51. Berntzen HB, Olmez U, Fagerhol MK, Munthe E. The leukocyte protein L1 in plasma and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Scand J Rheumatol 1991;20:74-82.

52. Ricciuto A, Griffiths AM. Clinical value of fecal calprotectin. Crit Rev Clin Lab Sci 2019;56:307-20.

53. Krzesiek E. Fecal Calprotectin as an Activity Marker of Inflammatory Bowel Disease in Children. Adv Clin Exp Med 2015;24:815-22.

54. van Rheenen PF, Van de Vijver E, Fidler V. Faecal calprotectin for screening of patients with suspected inflammatory bowel disease: diagnostic meta-analysis. BMJ 2010;341:c3369.

55. Menees SB, Powell C, Kurlander J, Goel A, Chey WD. A meta-analysis of the utility of C-reactive protein, erythrocyte sedimentation rate, fecal calprotectin, and fecal lactoferrin to exclude inflammatory bowel disease in adults with IBS. Am J Gastroenterol 2015;110:444-54.
56. Petryszyn P, Staniak A, Wolosianska A, Ekk-Cierniakowski P. Faecal calprotectin as a diagnostic marker of inflammatory bowel disease in patients with gastrointestinal symptoms: meta-analysis. Eur J Gastroenterol Hepatol 2019;31:1306-12.
57. Kostakis ID, Cholidou KG, Vaiopoulos AG, Vlachos IS, Perrea D, Vaos G. Fecal calprotectin in pediatric inflammatory bowel disease: a systematic review. Dig Dis Sci 2013;58:309-19.
58. Levine A, Koletzko S, Turner D, Escher JC, Cucchiara S, de Ridder L *i sur.* ESPGHAN revised porto criteria for the diagnosis of inflammatory bowel disease in children and adolescents. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2014;58:795-806.
59. Henderson P, Anderson NH, Wilson DC. The diagnostic accuracy of fecal calprotectin during the investigation of suspected pediatric inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. Am J Gastroenterol 2014;109:637-45.
60. Duman M, Gencpinar P, Bicmen M, Arslan N, Ozden O, Uzum O *i sur.* Fecal calprotectin: can be used to distinguish between bacterial and viral gastroenteritis in children? Am J Emerg Med 2015;33:1436-9.
61. Stoll ML, Punaro M, Patel AS. Fecal calprotectin in children with the enthesitis-related arthritis subtype of juvenile idiopathic arthritis. J Rheumatol 2011;38:2274-5.
62. Lamot L, Miler M, Vukojevic R, Vidovic M, Lamot M, Trutin I *i sur.* The Increased Levels of Fecal Calprotectin in Children With Active Enthesitis Related Arthritis and MRI Signs of Sacroiliitis: The Results of a Single Center Cross-Sectional Exploratory Study in Juvenile Idiopathic Arthritis Patients. Front Med (Lausanne) 2021;8:650619.
63. Kant P, Fazakerley R, Hull MA. Faecal calprotectin levels before and after weight loss in obese and overweight subjects. Int J Obes (Lond) 2013;37:317-9.
64. Lundgren D, Eklof V, Palmqvist R, Hultdin J, Karling P. Proton pump inhibitor use is associated with elevated faecal calprotectin levels. A cross-sectional study on subjects referred for colonoscopy. Scand J Gastroenterol 2019;54:152-7.
65. Montalto M, Santoro L, Curigliano V, D'Onofrio F, Cammarota G, Panunzi S *i sur.* Faecal calprotectin concentrations in untreated coeliac patients. Scand J Gastroenterol 2007;42:957-61.
66. Ertekin V, Selimoglu MA, Turgut A, Bakan N. Fecal calprotectin concentration in celiac disease. J Clin Gastroenterol 2010;44:544-6.

67. Balamtekin N, Baysoy G, Uslu N, Orhan D, Akcoren Z, Ozen H *i sur.* Fecal calprotectin concentration is increased in children with celiac disease: relation with histopathological findings. Turk J Gastroenterol 2012;23:503-8.
68. Capone P, Rispo A, Imperatore N, Caporaso N, Tortora R. Fecal calprotectin in coeliac disease. World J Gastroenterol 2014;20:611-2.
69. Thuijls G, Derikx JP, van Wijck K, Zimmermann LJ, Degraeuwe PL, Mulder TL *i sur.* Non-invasive markers for early diagnosis and determination of the severity of necrotizing enterocolitis. Ann Surg 2010;251:1174-80.
70. Yoon JM, Park JY, Ko KO, Lim JW, Cheon EJ, Kim HJ. Fecal calprotectin concentration in neonatal necrotizing enterocolitis. Korean J Pediatr 2014;57:351-6.
71. Carroll D, Corfield A, Spicer R, Cairns P. Faecal calprotectin concentrations and diagnosis of necrotising enterocolitis. Lancet 2003;361:310-1.
72. Song JY, Lee YM, Choi YJ, Jeong SJ. Fecal calprotectin level in healthy children aged less than 4 years in South Korea. J Clin Lab Anal 2017;31.
73. Lee YM, Min CY, Choi YJ, Jeong SJ. Delivery and feeding mode affects fecal calprotectin levels in infants <7months old. Early Hum Dev 2017;108:45-8.
74. Fallani M, Young D, Scott J, Norin E, Amarri S, Adam R *i sur.* Intestinal microbiota of 6-week-old infants across Europe: geographic influence beyond delivery mode, breast-feeding, and antibiotics. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2010;51:77-84.
75. Wagner CL, Taylor SN, Johnson D. Host factors in amniotic fluid and breast milk that contribute to gut maturation. Clin Rev Allergy Immunol 2008;34:191-204.
76. Rutayisire E, Huang K, Liu Y, Tao F. The mode of delivery affects the diversity and colonization pattern of the gut microbiota during the first year of infants' life: a systematic review. BMC Gastroenterol 2016;16:86.
77. Oord T, Hornung N. Fecal calprotectin in healthy children. Scand J Clin Lab Invest 2014;74:254-8.
78. Azramezani Kopi T, Shahrokh S, Mirzaei S, Asadzadeh Aghdaei H, Amini Kadijani A. The role of serum calprotectin as a novel biomarker in inflammatory bowel diseases: a review study. Gastroenterol Hepatol Bed Bench 2019;12:183-9.
79. Carlsen K, Malham M, Hansen LF, Petersen JJH, Paerregaard A, Houen G *i sur.* Serum Calprotectin in Adolescents With Inflammatory Bowel Disease-A Pilot Investigation. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2019;68:669-75.

80. Fukunaga S, Kuwaki K, Mitsuyama K, Takedatsu H, Yoshioka S, Yamasaki H *i sur.* Detection of calprotectin in inflammatory bowel disease: Fecal and serum levels and immunohistochemical localization. Int J Mol Med 2018;41:107-18.

81. Okada K, Okabe M, Kimura Y, Itoh H, Ikemoto M. Serum S100A8/A9 as a Potentially Sensitive Biomarker for Inflammatory Bowel Disease. Lab Med 2019;50:370-80.

82. Kalla R, Kennedy NA, Ventham NT, Boyapati RK, Adams AT, Nimmo ER *i sur.* Serum Calprotectin: A Novel Diagnostic and Prognostic Marker in Inflammatory Bowel Diseases. Am J Gastroenterol 2016;111:1796-805.

83. Ometto F, Friso L, Astorri D, Botsios C, Raffeiner B, Punzi L *i sur.* Calprotectin in rheumatic diseases. Exp Biol Med (Maywood) 2017;242:859-73.

84. Mariani A, Marsili M, Nozzi M, Faricelli R, Chiarelli F, Breda L. Serum calprotectin: review of its usefulness and validity in paediatric rheumatic diseases. Clin Exp Rheumatol 2015;33:109-14.

85. Romand X, Bernardy C, Nguyen MVC, Courtier A, Trocme C, Clapasson M *i sur.* Systemic calprotectin and chronic inflammatory rheumatic diseases. Joint Bone Spine 2019;86:691-8.

86. Jarlborg M, Courvoisier DS, Lamacchia C, Martinez Prat L, Mahler M, Bentow C *i sur.* Serum calprotectin: a promising biomarker in rheumatoid arthritis and axial spondyloarthritis. Arthritis Res Ther 2020;22:105.

87. Romano M, Gerloni V, De Lucia O, Piskin D, Giani T, Gattinara M *i sur.* Serum calprotectin (S100A8/9), clinical and ultrasound assessment in patients with juvenile idiopathic arthritis. Clin Exp Rheumatol 2021;39:1132-40.

88. Choi IY, Gerlag DM, Herenius MJ, Thurlings RM, Wijbrandts CA, Foell D *i sur.* MRP8/14 serum levels as a strong predictor of response to biological treatments in patients with rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 2015;74:499-505.

89. Foell D, Wulffraat N, Wedderburn LR, Wittkowski H, Frosch M, Gerss J *i sur.* Methotrexate withdrawal at 6 vs 12 months in juvenile idiopathic arthritis in remission: a randomized clinical trial. JAMA 2010;303:1266-73.

90. Frosch M, Ahlmann M, Vogl T, Wittkowski H, Wulffraat N, Foell D *i sur.* The myeloid-related proteins 8 and 14 complex, a novel ligand of toll-like receptor 4, and interleukin-1beta form a positive feedback mechanism in systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. Arthritis Rheum 2009;60:883-91.

91. Moncrieffe H, Ursu S, Holzinger D, Patrick F, Kassoumeri L, Wade A *i sur.* A subgroup of juvenile idiopathic arthritis patients who respond well to methotrexate are identified by the serum biomarker MRP8/14 protein. Rheumatology (Oxford) 2013;52:1467-76.

92. Kane D, Roth J, Frosch M, Vogl T, Bresnihan B, FitzGerald O. Increased perivascular synovial membrane expression of myeloid-related proteins in psoriatic arthritis. Arthritis Rheum 2003;48:1676-85.
93. van Bon L, Cossu M, Loof A, Gohar F, Wittkowski H, Vonk M *i sur.* Proteomic analysis of plasma identifies the Toll-like receptor agonists S100A8/A9 as a novel possible marker for systemic sclerosis phenotype. Ann Rheum Dis 2014;73:1585-9.
94. Soyfoo MS, Roth J, Vogl T, Pochet R, Decaux G. Phagocyte-specific S100A8/A9 protein levels during disease exacerbations and infections in systemic lupus erythematosus. J Rheumatol 2009;36:2190-4.
95. Tyden H, Lood C, Gullstrand B, Jonsen A, Nived O, Sturfelt G *i sur.* Increased serum levels of S100A8/A9 and S100A12 are associated with cardiovascular disease in patients with inactive systemic lupus erythematosus. Rheumatology (Oxford) 2013;52:2048-55.
96. Hammer HB, Odegard S, Fagerhol MK, Landewe R, van der Heijde D, Uhlig T *i sur.* Calprotectin (a major leucocyte protein) is strongly and independently correlated with joint inflammation and damage in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 2007;66:1093-7.
97. Liao H, Wu J, Kuhn E, Chin W, Chang B, Jones MD *i sur.* Use of mass spectrometry to identify protein biomarkers of disease severity in the synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 2004;50:3792-803.
98. Lech M, Guess J, Duffner J, Oyamada J, Shimizu C, Hoshino S *i sur.* Circulating Markers of Inflammation Persist in Children and Adults With Giant Aneurysms After Kawasaki Disease. Circ Genom Precis Med 2019;12:e002433.
99. Striz I, Jaresova M, Lacha J, Sedlacek J, Vitko S. MRP 8/14 and procalcitonin serum levels in organ transplantations. Ann Transplant 2001;6:6-9.
100. Lee YG, Hong J, Lee PH, Lee J, Park SW, Kim D *i sur.* Serum Calprotectin Is a Potential Marker in Patients with Asthma. J Korean Med Sci 2020;35:e362.
101. Burkhardt K, Radespiel-Troger M, Rupprecht HD, Goppelt-Struebe M, Riess R, Renders L *i sur.* An increase in myeloid-related protein serum levels precedes acute renal allograft rejection. J Am Soc Nephrol 2001;12:1947-57.
102. Decaesteker T, Bos S, Lorent N, Everaerts S, Vanoirbeek J, Bullens D *i sur.* Elevated serum calprotectin (S100A8/A9) in patients with severe asthma. J Asthma 2021:1-6.
103. Calcaterra V, De Amici M, Leonard MM, De Silvestri A, Pelizzo G, Buttari N *i sur.* Serum Calprotectin Level in Children: Marker of Obesity and its Metabolic Complications. Ann Nutr Metab 2018;73:177-83.

104. Pechkovsky DV, Zalutskaya OM, Ivanov GI, Misuno NI. Calprotectin (MRP8/14 protein complex) release during mycobacterial infection in vitro and in vivo. FEMS Immunol Med Microbiol 2000;29:27-33.

105. Sander J, Fagerhol MK, Bakken JS, Dale I. Plasma levels of the leucocyte L1 protein in febrile conditions: relation to aetiology, number of leucocytes in blood, blood sedimentation reaction and C-reactive protein. Scand J Clin Lab Invest 1984;44:357-62.

106. Hamade B, Huang DT. Procalcitonin: Where Are We Now? Crit Care Clin 2020;36:23-40.

107. Assicot M, Gendrel D, Carsin H, Raymond J, Guilbaud J, Bohuon C. High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. Lancet 1993;341:515-8.

108. Bartakova E, Stefan M, Stranikova A, Pospisilova L, Arientova S, Beran O *i sur.* Calprotectin and calgranulin C serum levels in bacterial sepsis. Diagn Microbiol Infect Dis 2019;93:219-26.

109. Havelka A, Sejersen K, Venge P, Pauksens K, Larsson A. Calprotectin, a new biomarker for diagnosis of acute respiratory infections. Sci Rep 2020;10:4208.

110. Terrin G, Passariello A, Manguso F, Salvia G, Rapacciuolo L, Messina F *i sur.* Serum calprotectin: an antimicrobial peptide as a new marker for the diagnosis of sepsis in very low birth weight newborns. Clin Dev Immunol 2011;2011:291085.

111. Decembrino L, De Amici M, Pozzi M, De Silvestri A, Stronati M. Serum Calprotectin: A Potential Biomarker for Neonatal Sepsis. J Immunol Res 2015;2015:147973.

112. Dale I. Plasma levels of the calcium-binding L1 leukocyte protein: standardization of blood collection and evaluation of reference intervals in healthy controls. Scand J Clin Lab Invest 1990;50:837-41.

113. Bjork P, Bjork A, Vogl T, Stenstrom M, Liberg D, Olsson A *i sur.* Identification of human S100A9 as a novel target for treatment of autoimmune disease via binding to quinoline-3-carboxamides. PLoS Biol 2009;7:e97.

114. Leclair MD, Heloury Y. Non-neurogenic elimination disorders in children. J Pediatr Urol 2010;6:338-45.

115. Korbel L, Howell M, Spencer JD. The clinical diagnosis and management of urinary tract infections in children and adolescents. Paediatr Int Child Health 2017;37:273-9.

116. Urinary tract infection in under 16s: diagnosis and management. National Institute for Health and Care Excellence: Clinical Guidelines. London: NICE; 2018.

117. Hellerstein S. Urinary tract infections. Old and new concepts. Pediatr Clin North Am 1995;42:1433-57.

118. Freedman AL, Urologic Diseases in America P. Urologic diseases in North America Project: trends in resource utilization for urinary tract infections in children. J Urol 2005;173:949-54.

119. Schlager TA. Urinary tract infections in children younger than 5 years of age: epidemiology, diagnosis, treatment, outcomes and prevention. Paediatr Drugs 2001;3:219-27.

120. Tullus K, Shaikh N. Urinary tract infections in children. Lancet 2020;395:1659-68.

121. Larcombe J. Urinary tract infection in children. Am Fam Physician 2010;82:1252-6.

122. Schlager TA. Urinary Tract Infections in Infants and Children. Microbiol Spectr 2016;4.

123. Keren R, Shaikh N, Pohl H, Gravens-Mueller L, Ivanova A, Zaoutis L *i sur.* Risk Factors for Recurrent Urinary Tract Infection and Renal Scarring. Pediatrics 2015;136:e13-21.

124. Marcus N, Ashkenazi S, Yaari A, Samra Z, Livni G. Non-Escherichia coli versus Escherichia coli community-acquired urinary tract infections in children hospitalized in a tertiary center: relative frequency, risk factors, antimicrobial resistance and outcome. Pediatr Infect Dis J 2005;24:581-5.

125. Friedman S, Reif S, Assia A, Mishaal R, Levy I. Clinical and laboratory characteristics of non-E. coli urinary tract infections. Arch Dis Child 2006;91:845-6.

126. Schlager TA, Hendley JO, Lohr JA, Whittam TS. Effect of periurethral colonization on the risk of urinary tract infection in healthy girls after their first urinary tract infection. Pediatr Infect Dis J 1993;12:988-93.

127. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. Nat Rev Microbiol 2015;13:269-84.

128. McLellan LK, Hunstad DA. Urinary Tract Infection: Pathogenesis and Outlook. Trends Mol Med 2016;22:946-57.

129. Vranes J, Gmajnicki B, Delajlija M. [The effect of adherence on virulence of uropathogenic strains of Escherichia coli]. Lijec Vjesn 1994;116:70-4.

130. Yamamoto S. Molecular epidemiology of uropathogenic Escherichia coli. J Infect Chemother 2007;13:68-73.

131. Ragnarsdottir B, Lutay N, Gronberg-Hernandez J, Koves B, Svanborg C. Genetics of innate immunity and UTI susceptibility. Nat Rev Urol 2011;8:449-68.

132. Ragnarsdottir B, Svanborg C. Susceptibility to acute pyelonephritis or asymptomatic bacteriuria: host-pathogen interaction in urinary tract infections. Pediatr Nephrol 2012;27:2017-29.

133. Kucheria R, Dasgupta P, Sacks SH, Khan MS, Sheerin NS. Urinary tract infections: new insights into a common problem. Postgrad Med J 2005;81:83-6.
134. Palsson-McDermott EM, O'Neill LA. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. Immunology 2004;113:153-62.
135. Robinson JL, Finlay JC, Lang ME, Bortolussi R, Canadian Paediatric Society ID, Immunization Committee CPC. Urinary tract infections in infants and children: Diagnosis and management. Paediatr Child Health 2014;19:315-25.
136. Garcia EC, Brumbaugh AR, Mobley HL. Redundancy and specificity of Escherichia coli iron acquisition systems during urinary tract infection. Infect Immun 2011;79:1225-35.
137. Simoes ESAC, Oliveira EA, Mak RH. Urinary tract infection in pediatrics: an overview. J Pediatr (Rio J) 2020;96 Suppl 1:65-79.
138. Levine DA, Platt SL, Dayan PS, Macias CG, Zorc JJ, Krief W *i sur.* Risk of serious bacterial infection in young febrile infants with respiratory syncytial virus infections. Pediatrics 2004;113:1728-34.
139. Subcommittee On Urinary Tract I. Reaffirmation of AAP Clinical Practice Guideline: The Diagnosis and Management of the Initial Urinary Tract Infection in Febrile Infants and Young Children 2-24 Months of Age. Pediatrics 2016;138.
140. Ammenti A, Alberici I, Brugnara M, Chimenz R, Guarino S, La Manna A *i sur.* Updated Italian recommendations for the diagnosis, treatment and follow-up of the first febrile urinary tract infection in young children. Acta Paediatr 2020;109:236-47.
141. Garcia FJ, Nager AL. Jaundice as an early diagnostic sign of urinary tract infection in infancy. Pediatrics 2002;109:846-51.
142. Zenel JA, Jr. Failure to thrive: a general pediatrician's perspective. Pediatr Rev 1997;18:371-8.
143. Skerk V, Krhen I, Kalenic S, Francetic I, Barsic B, Kuzmic AC *i sur.* [Guidelines for antimicrobial treatment and prophylaxis of urinary tract infections]. Lijec Vjesn 2004;126:169-81.
144. Feld LG, Mattoo TK. Urinary tract infections and vesicoureteral reflux in infants and children. Pediatr Rev 2010;31:451-63.
145. Mattoo TK, Shaikh N, Nelson CP. Contemporary Management of Urinary Tract Infection in Children. Pediatrics 2021;147.
146. Fever in under 5s: assessment and initial management. National Institute for Health and Care Excellence: Clinical Guidelines. London: NICE; 2019.

147. Roberts KB, Wald ER. The Diagnosis of UTI: Colony Count Criteria Revisited. Pediatrics 2018;141.

148. Subcommittee on Urinary Tract Infection SCoQI, Management, Roberts KB. Urinary tract infection: clinical practice guideline for the diagnosis and management of the initial UTI in febrile infants and children 2 to 24 months. Pediatrics 2011;128:595-610.

149. Shaikh N, Hoberman A, Hum SW, Alberty A, Muniz G, Kurs-Lasky M *i sur.* Development and Validation of a Calculator for Estimating the Probability of Urinary Tract Infection in Young Febrile Children. JAMA Pediatr 2018;172:550-6.

150. Shaikh N, Shope MF, Kurs-Lasky M. Urine Specific Gravity and the Accuracy of Urinalysis. Pediatrics 2019;144.

151. Powell HR, McCredie DA, Ritchie MA. Urinary nitrite in symptomatic and asymptomatic urinary infection. Arch Dis Child 1987;62:138-40.

152. Williams GJ, Macaskill P, Chan SF, Turner RM, Hodson E, Craig JC. Absolute and relative accuracy of rapid urine tests for urinary tract infection in children: a meta-analysis. Lancet Infect Dis 2010;10:240-50.

153. Shaikh N, Shope TR, Hoberman A, Vigliotti A, Kurs-Lasky M, Martin JM. Association Between Uropathogen and Pyuria. Pediatrics 2016;138.

154. Smolkin V, Koren A, Raz R, Colodner R, Sakran W, Halevy R. Procalcitonin as a marker of acute pyelonephritis in infants and children. Pediatr Nephrol 2002;17:409-12.

155. Pecile P, Miorin E, Romanello C, Falleti E, Valent F, Giacomuzzi F *i sur.* Procalcitonin: a marker of severity of acute pyelonephritis among children. Pediatrics 2004;114:e249-54.

156. Chen SM, Chang HM, Hung TW, Chao YH, Tsai JD, Lue KH *i sur.* Diagnostic performance of procalcitonin for hospitalised children with acute pyelonephritis presenting to the paediatric emergency department. Emerg Med J 2013;30:406-10.

157. Shaikh N, Borrell JL, Evron J, Leeflang MM. Procalcitonin, C-reactive protein, and erythrocyte sedimentation rate for the diagnosis of acute pyelonephritis in children. Cochrane Database Syst Rev 2015;1:CD009185.

158. Shaikh KJ, Osio VA, Leeflang MM, Shaikh N. Procalcitonin, C-reactive protein, and erythrocyte sedimentation rate for the diagnosis of acute pyelonephritis in children. Cochrane Database Syst Rev 2020;9:CD009185.

159. Leroy S, Fernandez-Lopez A, Nikfar R, Romanello C, Bouissou F, Gervaix A *i sur.* Association of procalcitonin with acute pyelonephritis and renal scars in pediatric UTI. Pediatrics 2013;131:870-9.

160. Lee LC, Lorenzo AJ, Koyle MA. The role of voiding cystourethrography in the investigation of children with urinary tract infections. Can Urol Assoc J 2016;10:210-4.
161. Marceau-Grimard M, Marion A, Cote C, Bolduc S, Dumont M, Moore K. Dimercaptosuccinic acid scintigraphy vs. ultrasound for renal parenchymal defects in children. Can Urol Assoc J 2017;11:260-4.
162. Sofia C, Solazzo A, Cattafi A, Chimenz R, Cicero G, Marino MA *i sur.* Contrast-enhanced voiding urosonography in the assessment of vesical-ureteral reflux: the time has come. Radiol Med 2021;126:901-9.
163. Riccabona M, Avni FE, Damasio MB, Ording-Muller LS, Blickman JG, Darge K *i sur.* ESPR Uroradiology Task Force and ESUR Paediatric Working Group--Imaging recommendations in paediatric uroradiology, part V: childhood cystic kidney disease, childhood renal transplantation and contrast-enhanced ultrasonography in children. Pediatr Radiol 2012;42:1275-83.
164. Roic G, Roic AC, Palcic I, Grmoja T, Batos AT. [Contrast Enhanced Voiding Urosonography (Cevus) in the Diagnosis of Vesicoureteral Reflux]. Lijec Vjesn 2016;138:39-46.
165. Thomson J, Cruz AT, Nigrovic LE, Freedman SB, Garro AC, Ishimine PT *i sur.* Concomitant Bacterial Meningitis in Infants With Urinary Tract Infection. Pediatr Infect Dis J 2017;36:908-10.
166. Yoon SH, Shin H, Lee KH, Kim MK, Kim DS, Ahn JG *i sur.* Predictive factors for bacteremia in febrile infants with urinary tract infection. Sci Rep 2020;10:4469.
167. Hilarius KWE, Skippen PW, Kissoon N. Early Recognition and Emergency Treatment of Sepsis and Septic Shock in Children. Pediatr Emerg Care 2020;36:101-6.
168. Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiol Mol Biol Rev 2010;74:417-33.
169. Tambić Andrašević A, Tambić T, Žmak Lj, Obrovac M, Payerl Pal M, Debelec D, Bukovski S, Hunkak B, Unukuć T, Bošnjak S, Škoda AM, Butić I, Šoprek S, Lucić S. Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2019. g. Zagreb: Akademija medicinskih znanosti Hrvatske, 2020.
170. Skerk V, Andrasevic AT, Andrasevic S, Susic E, Dzepina AM, Madaric V *i sur.* [ISKRA guidelines on antimicrobial treatment and prophylaxis of urinary tract infections--Croatian national guidelines]. Lijec Vjesn 2009;131:105-18.

171. HDPN. Dijagnostički i terapijski postupnik uroinfekcija u djece. Dostupno na: https://www.hdpn.org/datoteke/Dijagnostički%20i%20terapijski%20postupnik%20%20uroinfekcija%20u%20djece.pdf.

172. Arshad M, Seed PC. Urinary tract infections in the infant. Clin Perinatol 2015;42:17-28, vii.

173. Baracco R, Mattoo TK. Diagnosis and management of urinary tract infection and vesicoureteral reflux in the neonate. Clin Perinatol 2014;41:633-42.

174. Selekman RE, Shapiro DJ, Boscardin J, Williams G, Craig JC, Brandstrom P *i sur.* Uropathogen Resistance and Antibiotic Prophylaxis: A Meta-analysis. Pediatrics 2018;142.

175. Williams G, Craig JC. Long-term antibiotics for preventing recurrent urinary tract infection in children. Cochrane Database Syst Rev 2011:CD001534.

176. Investigators RT, Hoberman A, Greenfield SP, Mattoo TK, Keren R, Mathews R *i sur.* Antimicrobial prophylaxis for children with vesicoureteral reflux. N Engl J Med 2014;370:2367-76.

177. Pauchard JY, Chehade H, Kies CZ, Girardin E, Cachat F, Gehri M. Avoidance of voiding cystourethrography in infants younger than 3 months with Escherichia coli urinary tract infection and normal renal ultrasound. Arch Dis Child 2017;102:804-8.

178. Gomez B, Mintegi S, Bressan S, Da Dalt L, Gervaix A, Lacroix L *i sur.* Validation of the "Step-by-Step" Approach in the Management of Young Febrile Infants. Pediatrics 2016;138.

179. Niven DJ, Gaudet JE, Laupland KB, Mrklas KJ, Roberts DJ, Stelfox HT. Accuracy of peripheral thermometers for estimating temperature: a systematic review and meta-analysis. Ann Intern Med 2015;163:768-77.

180. Butorac Ahel I, Flajšman Raspor S, Šubat Dežulović M. Infekcija mokraćnog sustava u dječjoj dobi: dijagnoza, liječenje i obrada. Medicina Fluminensis 2012;48:142-50.

181. Lieberthal AS, Carroll AE, Chonmaitree T, Ganiats TG, Hoberman A, Jackson MA *i sur.* The diagnosis and management of acute otitis media. Pediatrics 2013;131:e964-99.

182. Yun KW, Wallihan R, Juergensen A, Mejias A, Ramilo O. Community-Acquired Pneumonia in Children: Myths and Facts. Am J Perinatol 2019;36:S54-S7.

183. Chandler L. U: Dasgupta P, ur. Accurate results in the clinical laboratory: Elsevier; 2013. Str. 315-26.

184. Nargis W, Ibrahim M, Ahamed BU. Procalcitonin versus C-reactive protein: Usefulness as biomarker of sepsis in ICU patient. Int J Crit Illn Inj Sci 2014;4:195-9.

185. Watson J, Jones HE, Banks J, Whiting P, Salisbury C, Hamilton W. Use of multiple inflammatory marker tests in primary care: using Clinical Practice Research Datalink to evaluate accuracy. Br J Gen Pract 2019;69:e462-e9.
186. Castelli GP, Pognani C, Meisner M, Stuani A, Bellomi D, Sgarbi L. Procalcitonin and C-reactive protein during systemic inflammatory response syndrome, sepsis and organ dysfunction. Crit Care 2004;8:R234-42.
187. Brunkhorst FM, Heinz U, Forycki ZF. Kinetics of procalcitonin in iatrogenic sepsis. Intensive Care Med 1998;24:888-9.
188. Ng PC. Diagnostic markers of infection in neonates. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 2004;89:F229-35.
189. Koufadaki AM, Karavanaki KA, Soldatou A, Tsentidis C, Sourani MP, Sdogou T *i sur.* Clinical and laboratory indices of severe renal lesions in children with febrile urinary tract infection. Acta Paediatr 2014;103:e404-9.
190. Homaira N, Oei JL, Mallitt KA, Abdel-Latif ME, Hilder L, Bajuk B *i sur.* High burden of RSV hospitalization in very young children: a data linkage study. Epidemiol Infect 2016;144:1612-21.
191. Zaman K, Roy E, Arifeen SE, Rahman M, Raqib R, Wilson E *i sur.* Effectiveness of maternal influenza immunization in mothers and infants. N Engl J Med 2008;359:1555-64.
192. Haberg SE, Trogstad L, Gunnes N, Wilcox AJ, Gjessing HK, Samuelsen SO *i sur.* Risk of fetal death after pandemic influenza virus infection or vaccination. N Engl J Med 2013;368:333-40.
193. Chantry CJ, Howard CR, Auinger P. Full breastfeeding duration and associated decrease in respiratory tract infection in US children. Pediatrics 2006;117:425-32.
194. Woll C, Neuman MI, Aronson PL. Management of the Febrile Young Infant: Update for the 21st Century. Pediatr Emerg Care 2017;33:748-53.
195. Hendaus MA, Alhammadi AH, Khalifa MS, Muneer E, Chandra P. Risk of urinary tract infection in infants and children with acute bronchiolitis. Paediatr Child Health 2015;20:e25-9.
196. Ralston S, Hill V, Waters A. Occult serious bacterial infection in infants younger than 60 to 90 days with bronchiolitis: a systematic review. Arch Pediatr Adolesc Med 2011;165:951-6.
197. McDaniel CE, Ralston S, Lucas B, Schroeder AR. Association of Diagnostic Criteria With Urinary Tract Infection Prevalence in Bronchiolitis: A Systematic Review and Meta-analysis. JAMA Pediatr 2019;173:269-77.
198. Greenfield SP, Wan J. Vesicoureteral reflux: practical aspects of evaluation and management. Pediatr Nephrol 1996;10:789-94.

199. Williams G, Fletcher JT, Alexander SI, Craig JC. Vesicoureteral reflux. J Am Soc Nephrol 2008;19:847-62.

200. Asberg A, Lofblad L, Felic A, Hov GG. Measuring calprotectin in plasma and blood with a fully automated turbidimetric assay. Scand J Clin Lab Invest 2019;79:50-7.

201. Malham M, Carlsen K, Riis L, Paerregaard A, Vind I, Fenger M *i sur.* Plasma calprotectin is superior to serum calprotectin as a biomarker of intestinal inflammation in ulcerative Colitis. Scand J Gastroenterol 2019;54:1214-9.

202. Nordal HH, Fagerhol MK, Halse AK, Hammer HB. Calprotectin (S100A8/A9) should preferably be measured in EDTA-plasma; results from a longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. Scand J Clin Lab Invest 2018;78:102-8.

203. Hanson KE, Azar MM, Banerjee R, Chou A, Colgrove RC, Ginocchio CC *i sur.* Molecular Testing for Acute Respiratory Tract Infections: Clinical and Diagnostic Recommendations From the IDSA's Diagnostics Committee. Clin Infect Dis 2020;71:2744-51.

204. Barenfanger J, Drake C, Leon N, Mueller T, Troutt T. Clinical and financial benefits of rapid detection of respiratory viruses: an outcomes study. J Clin Microbiol 2000;38:2824-8.

11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 25.04.1989. u Zagrebu. Od ranog djetinjstva bavim se plesom te sam završila Školu suvremenog plesa Ane Maletić u Zagrebu i stekla zvanje plesnog pedagoga. Nakon završene XVI. Gimnazije u Zagrebu, 2008. godine upisala sam Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, koji sam s odličnim uspjehom završila 2014. godine. Tijekom studija bila sam demonstratorica Kliničke propedeutike na Katedri za internu medicinu te Patologije na Katedri za patologiju. Nakon odrađenog pripravničkog staža u Poliklinici Svjetlost te Klinici za dječje bolesti u Zagrebu, 2015. godine započinjem specijalizaciju iz pedijatrije na Zavodu za neonatologiju Klinike za ženske bolesti i porodništvo Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice, a iduće godine i Doktorski studij „Biomedicina i zdravstvo“ na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Dodatno sam se usavršavala na nekoliko domaćih i međunarodnih stručnih i znanstvenih tečajeva iz područja pedijatrije, uključujući tečajeve za naprednog oživljavanje odraslih (ALS), djece (APLS) i novorođenčadi (NLS), a godine 2019. bila sam u kratkom studijskom posjetu Zavodu za neonatologiju Dječje bolnice Britanska Kolumbija u Vancouveru, Kanada. Aktivno sam sudjelovala na desetak domaćih i međunarodnih kongresa te u izradi dvadesetak kongresnih priopćenja. Prvi sam autor jednog te koautor četiriju radova objavljenih u indeksiranim časopisima. Članica sam Sekcije za neonatologiju Hrvatskog pedijatrijskog društva.