

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
"FEDERICO II"**

**Dottorato di Ricerca in
"Riproduzione, Sviluppo ed Accrescimento
dell'uomo"**

Coordinatore: Prof. Claudio Pignata

Tesi di Dottorato

"Sviluppo e funzione dell'immunità innata in età pediatrica"

**Tutore
Prof. Roberto Berni Canani**



**Candidato
Dott.ssa Annalisa Passariello**

Anno Accademico 2006/2007

INDICE

<i>Sez.</i>		<i>Pagine</i>
	Summary	2
	Abbreviazioni	5
1	Introduzione	6
2	Descrizione fasi della ricerca	9
2.1	FASE A: Studio dello sviluppo dell'immunità innata e del possibile impiego diagnostico di componenti dell'immunità innata nel neonato con sospetta sepsi.	10
2.1.1	La Calprotectina <i>Determinazione delle concentrazioni sieriche di Calprotectina su sangue di funicolo ombelicale per la definizione dei valori normali e suo possibile impiego nella diagnosi di sepsi neonatale</i>	11
2.1.1.1	<i>Obiettivi</i>	13
2.1.1.2	<i>Metodologia</i>	14
2.1.1.3	<i>Risultati</i>	26
2.1.1.4	<i>Significato dei risultati della ricerca</i>	32
2.1.2	Le Defensine <i>Definizione dei livelli sierici normali di defensine in epoca neonatale</i>	41
2.1.2.1	<i>Obiettivi</i>	42
2.1.2.2	<i>Metodologia</i>	42
2.1.2.3	<i>Risultati</i>	45
2.1.2.4	<i>Significato dei risultati della ricerca</i>	47
2.2	FASE B: Studio del possibile ruolo patogenetico di alterazioni dell'immunità innata nello sviluppo di malattie infiammatorie croniche intestinali in eta' pediatrica.	49
	<i>Genotipo e funzione delle β-defensine e della lectina legante il mannano</i>	
2.2.1	<i>Obiettivi</i>	54
2.2.2	<i>Metodologia</i>	54
2.2.3	<i>Risultati</i>	58
2.2.4	<i>Significato dei risultati della ricerca</i>	62
3	Analisi statistica	64
4	Conclusioni e discussione	65
5	Tabelle e figure	67
6	Bibliografia	101
7	Appendice	116

SUMMARY

The body of the child is continually exposed to micro-organisms that are inhaled, swallowed, or that inhabit skin and mucous membranes. Whether these micro-organisms penetrate and cause disease is the result of micro-organisms pathogenicity and integrity of host defence mechanisms (1-3). The immune system through an interactive network of lymphoid organs, cells, humoral factors, and cytokines has got an essential function in host defence. The underactivity of immune system results in immunodeficiency, severe infections, and tumors, whenever the overactivity determines allergic and autoimmune diseases. Immunity is traditionally divided into two major components depending on the time of the response and its specificity. These two components are named innate and adaptative responses, and many evidences suggest a complex interaction between them (1-3). The term "innate immunity" is sometimes used to include physical, chemical, and microbiological barriers, but more usually encompasses the elements of the immune system (neutrophils, monocytes, macrophages, complement, cytokines, and acute phase proteins) which provide immediate, and largely aspecific, host defence (1,4). The highly conserved nature of the response, which is seen in even the simplest animals, confirms its importance in survival (5). Adaptative immunity is well represented in the immune system of more developed animal species. This response consists of antigen-specific reactions through T- and B-lymphocytes. Clonal expansion of lymphocytes in response to infections is absolutely necessary for the generation of efficient immune response (1-3). However, it takes three to five days for sufficient numbers of clones production and differentiation into effector cells, which allows more than enough time for most pathogens to damage the host tissues. In contrast, the effector mechanisms of innate immunity are activated immediately after the host-pathogen interaction to control rapidly

the replication of the pathogen (1-4). For long time the main function of innate immunity has been considered a sort of preliminary response of the body before the action of adaptative immunity (1-3).

More recently, it has become increasingly clear that the innate immune system exerts a more important and fundamental role in the host defense, and the activity of several components of innate immunity has been defined (1-3). Antimicrobial peptides represent important effectors of innate immunity. Extensive research in the last decade has established that cationic host defence peptides have an eclectic range of functions, including the ability to confer protection against a variety of pathogens, limit sepsis and even the potential as novel cytotoxic agents against certain types of cancers (4,6). The expression of many peptides increases during infection or inflammation; for example, the expression of human β -defensin-2 (hBD-2), is up regulated in various cell types such as monocytes, epithelial cells and keratinocytes during bacterial infections, and upon stimulation with different bacterial components that activate the Toll-like receptor (TLR) to nuclear factor (NF)- κ B pathway, and in contrast human cathelicidin LL-37 seems to be upregulated only by endogenous inflammatory molecules (7-10). The enhanced expression of these peptides in transgenic murine models results in increased resistance to bacterial infections (11,12). Similarly, in various inflammatory clinical conditions such as psoriasis, bronchiolitis and cystic fibrosis, inflammatory bowel disease (IBD) the concentration of several peptides of innate immunity, such as calprotectin, results remarkably increased (13-17). In addition to exhibit protective activities against a broad range of pathogens from bacteria, fungi, parasites and viruses (18-25), and to protect against systemic inflammatory syndrome (6), these peptides are also thought to be beneficial in other scenarios such as wound healing and counteracting tumors (26-28). The potential for beneficial applications of cationic host defence peptides has

continued to grow with increased interest in elucidating the mechanisms associated with the protective functions of these defence peptides (6). The immunomodulatory activities of these peptides indicate the potential application of natural and synthetic cationic host defence peptides in infection and inflammation management.

This PhD thesis is focused on the study of the physiological neonatal serum expression of some innate immunity's peptides, such as calprotectin and α - and β -defensins, and of the pattern of calprotectin expression in septic newborns to establish the protective role of antimicrobial peptides during neonatal age and to investigate the potential diagnostic utility of serum calprotectin determination in neonatal sepsis. The second phase of the research is focused on the investigation of a possible role for β -defensin and mannan-binding-lectin genetic variations in the susceptibility to IBD development in pediatric patients.

Abbreviazioni

MC: malattia di Crohn

RCU: rettocolite ulcerosa

hBD: human β -defensin

TLR: Toll-like receptors

MICI: malattie infiammatorie croniche intestinali

Clp: calprotectina

PCR: proteina C reattiva

SGB: streptococco gruppo B

ROC: Receiver Operating Characteristics curve

HNP: human neutrophil defensin

MBL: mannan binding lectin

1. INTRODUZIONE

La vasta area di superficie corporea in contatto con l'esterno rappresenta un potenziale continuo punto di attacco da parte di patogeni e sostanze antigeniche presenti nell'ambiente. Questo continuo interplay è in gran parte regolato dal sistema immunitario (1-3). Il sistema immunitario è tradizionalmente suddiviso in due componenti definite come innata ed adattativa (1-4). La componente adattativa è specifica, caratterizzata da memoria immunitaria e la sua potenza si accresce ad ogni successiva esposizione ad uno stesso patogeno. Tuttavia l'attivazione e la differenziazione linfocitaria che si verificano in seguito al contatto antigenico richiedono dai tre ai cinque giorni e sono poco sviluppate nelle prime epoche della vita (1-3,29). Al contrario l'immunità innata è considerata la prima linea di difesa, pronta, immediata ed aspecifica, contro i microrganismi e consente di contenere le infezioni in attesa dell'attivazione dell'immunità adattativa (1,4). L'immunità innata è dotata di un ampio ventaglio di funzioni che includono la limitazione dell'adesione di patogeni alle superfici epiteliali, la modulazione dei processi infiammatori acuti e cronici, l'attivazione e la regolazione della risposta adattativa, l'induzione di proliferazione e sviluppo cellulare, l'azione citotossica contro cellule tumorali (4,6). In particolare nelle prime fasi della vita l'immunità innata rappresenta la componente effettrice principale nella limitazione delle patologie a carattere infettivo (29-38), mentre nelle epoche successive disordini a carico dell'immunità innata sembrano essere alla base dello sviluppo di patologie infiammatorie croniche ed autoimmuni come la malattia di Crohn (MC), la

rettocolite ulcerosa (RCU), le allergie (39-41). L'analisi filogenetica delle diverse componenti dell'immunità innata dimostra come questa sia stata altamente conservata durante l'evoluzione delle specie (5).

L'immunità innata è costituita da una complessa rete cellulare che coinvolge cellule residenti e migratorie che si attiva allo stesso modo a partire da stimoli differenti. Elementi principali dell'immunità innata sono i recettori di membrana (Toll-like receptor) o intracellulari (NOD2/CARD15) di componenti batteriche, e i peptidi antimicrobici (Collectine, Defensine, Catelicidine, Calprotectina), le cellule ad attività fagocitica (neutrofili, macrofagi), le cellule ad attività citotossica (Natural Killer), le proteine sieriche che compongono il sistema del complemento od altri mediatori dell'infiammazione, che interagiscono direttamente con l'ambiente ed orientano volta per volta la risposta immune verso una reazione infiammatoria tesa ad eliminare l'antigene che l'ha innescata o verso la tolleranza nei confronti dello stesso (1,4). L'espressione di alcuni peptici antimicrobici aumenta durante le infezioni e nei processi infiammatori; ad esempio durante infezioni batteriche l'espressione delle β -defensine (hBD-2) da parte di cellule come i monociti, le cellule epiteliali ed i cheratinociti aumenta in seguito alla stimolazione da parte di differenti componenti batteriche di fattori nucleari (NF)- κ B attraverso i Toll-like receptors (TLR), al contrario l'espressione della catelicidina umana LL-37 aumenta solo in seguito a stimoli endogeni (7-10). In modelli di topi transgenici la stimolazione dell'espressione dei peptici antimicrobici aumenta la resistenza di tali animali alle infezioni batteriche (11,12). Numerosi dati recenti evidenziano l'importante ruolo dell'immunità innata nella fisiopatologia di molte malattie del bambino (29-43). Ad esempio in condizioni cliniche caratterizzate da infiammazione

quali psoriasi, bronchilite, fibrosi cistica è stata dimostrata un'aumentata espressione di molecole quali defensine e catelicidine (13-16,43). La calprotectina fecale ha acquisito un ruolo diagnostico nelle malattie infiammatorie croniche intestinali (MICI) nelle quali è stato dimostrato un notevole incremento del suo valore (17,44). Un deficit di defensine e catelicidine LL-37 si associa d'altro canto ad un maggior rischio di infezioni come è stato dimostrato per soggetti affetti da dermatite atopica (42).

Lo studio di sviluppo e funzione dell'attività dell'immunità innata potrebbe fare luce su aspetti patogenetici di numerose patologie in età pediatrica e gettare le basi per l'identificazione di nuove strategie terapeutiche.

2. DESCRIZIONE FASI DELLA RICERCA

La ricerca è stata suddivisa in due fasi:

Fase A. Studio dello sviluppo dell'immunità innata e del possibile impiego diagnostico di componenti dell'immunità innata nel neonato con sospetta sepsi.

Fase B. Studio del possibile ruolo patogenetico di alterazioni dell'immunità innata nello sviluppo di malattie infiammatorie croniche intestinali in età pediatrica.

Le due fasi della Ricerca riportate di seguito comprendono per ognuna di esse una breve descrizione dei presupposti scientifici e degli obiettivi, l'illustrazione della metodologia e dei risultati, e l'interpretazione conclusiva dei dati ottenuti. Al termine verranno trattati i risultati della Ricerca nel suo complesso ed il loro possibile impatto sulle conoscenze attuali in pediatria.

2.1 FASE A: STUDIO DELLO SVILUPPO DELL'IMMUNITÀ INNATA E DEL POSSIBILE IMPIEGO DIAGNOSTICO DI COMPONENTI DELL'IMMUNITÀ INNATA NEL NEONATO CON SOSPETTA SEPSI

Durante la vita intrauterina il feto vive in un ambiente sterile, immediatamente dopo la nascita il neonato viene a contatto con molte specie microbiche ed antigeni di diversa natura (33,45). La difesa dalle infezioni per il neonato che non possiede ancora memoria immunologica e che ha un'abilità ridotta a produrre anticorpi specifici verso batteri, virus, protozoi e miceti, dipende in gran parte dal sistema immune innato (29-38). Tuttavia, nonostante in linea teorica l'immunità innata rappresenti la principale linea di difesa nei riguardi delle infezioni in epoca neonatale, lo sviluppo e la maturazione dei diversi componenti dell'immunità innata in tale epoca della vita non sono stati ancora completamente definiti. Non è noto inoltre il "peso" che tali componenti possiedono nei riguardi delle infezioni ed infine non sono ancora ben conosciuti i meccanismi di regolazione dell'espressione dei peptidi dell'immunità innata.

2.1.1 LA CALPROTECTINA. *Determinazione delle concentrazioni sieriche di Calprotectina su sangue di funicolo ombelicale per la definizione dei valori normali e suo possibile impiego nella diagnosi di sepsi neonatale*

Recentemente, la misurazione della Calprotectina (Clp), peptide di 36KDa legante Ca^{2+} e Zn^{2+} prodotto dalle cellule che partecipano alla risposta immune innata, è stata proposta con successo per l'identificazione di stati infiammatori locali e sistemici (46-54). La Clp rappresenta il 60% di tutte le proteine solubili presenti nel citosol di granulociti neutrofilici e monociti (55,56). A seguito del contatto tra leucociti e patogeni la Clp è immediatamente rilasciata nel sito di infiammazione (Figura 1) (55,56). La Clp svolge un ruolo cruciale durante le fasi precoci della risposta immune innata grazie alle sue azioni chemoattraente e antimicrobica diretta, ed è capace di promuovere la risposta immune adattativa Th1-mediata (Figura 1) (55,56). È dosabile in sangue, liquido cerebrospinale, liquido sinoviale, urine e feci (55,56). L'associazione con il calcio la rende stabile a temperatura ambiente fino a 7 giorni. Le concentrazioni di Clp sono facilmente misurabili in diversi liquidi biologici con un test rapido immunoenzimatico (ELISA) di recente introduzione sul mercato (54). Il più largo impiego di questo marcatore di infiammazione lo si ritrova in gastroenterologia (17,44). La misurazione nelle feci della Clp si è dimostrata una metodica non-invasiva, affidabile ed accurata per identificare uno stato di infiammazione del tratto gastrointestinale (17,44). Più recentemente, il dosaggio della Clp su siero e liquido sinoviale è stato impiegato per l'identificazione delle articolazioni colpite da processo infiammatorio in corso di molteplici patologie

reumatiche (52,53). Studi su adulti dimostrano come i livelli sierici di Clp aumentino rapidamente in corso di infezioni sistemiche (56,57). Ancora scarse sono le esperienze riguardo il dosaggio della Clp nei liquidi biologici in epoca neonatale (58-60). Recentemente è stato dimostrato un aumento significativo dei livelli di Clp fecale in corso di enterocolite necrotizzante (58).

L'ipotesi dello studio è che il dosaggio della Clp sierica possa essere utilizzato come marcatore dello stato di sepsi in epoca neonatale.

2.1.1.1 OBIETTIVI:

1. Definizione del pattern di espressione della Clp sierica nel neonato sano e in corso di sepsi.
2. Individuazione del valore ottimale di cut-off per la misurazione dei livelli sierici di Clp in epoca neonatale.
3. Valutazione dell'accuratezza diagnostica del dosaggio della Clp sierica per l'identificazione di sepsi ad esordio precoce e tardivo in epoca neonatale.
4. Determinazione dei livelli liquorali di Clp in corso di meningite nel neonato.

2.1.1.2 METODOLOGIA

Disegno dello studio.

Lo studio collaborativo tra il Dipartimento di Pediatria dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II" e l'Ospedale Fatebenefratelli di Napoli, si è svolto lungo un periodo di 12 mesi a partire da ottobre 2004. Per ogni soggetto arruolato è stato effettuato un follow-up clinico di almeno 12 settimane. Il disegno dello studio è stato approvato dal Comitato Etico della Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II". Un'accurata informazione a fine di consenso è stata fornita ai genitori di tutti i soggetti arruolati.

Lo studio è stato disegnato in tre fasi: 1) determinazione delle concentrazioni sieriche di Clp su sangue di funicolo alla nascita, per la definizione dei valori normali e l'identificazione di neonati con sepsi ad esordio precoce; 2) determinazione delle concentrazioni sieriche di Clp su sangue periferico in neonati con più di 72 ore di vita per la diagnosi di sepsi ad esordio tardivo; 3) determinazione dei livelli liquorali di Clp in corso di meningite per fini diagnostici.

Definizione dei gruppi di neonati inclusi nello studio

Per le prime due Fasi dello studio, in relazione alla sintomatologia ed agli esami di laboratorio, i pazienti arruolati sono stati classificati in 4 gruppi: a) sepsi accertata; b) sepsi clinica; c) sepsi possibile in cui è stata successivamente posta una diagnosi differente da patologia infettiva; d) controlli sani. Nella terza fase i neonati arruolati sono stati classificati in: a) soggetti con meningite, b) controlli.

La definizione della classe di appartenenza per ogni soggetto arruolato è stata effettuata secondo i criteri riportati di seguito.

Sono stati considerati neonati con sepsi accertata quelli con uno o più segni suggestivi (pallore o ittero, letargia, apnea, bradicardia, irritabilità o convulsioni, tachipnea, distress respiratorio, scarsa perfusione periferica, tachicardia o ipotensione, distensione addominale o vomito, febbre, ipotermia o temperatura instabile, alterazione dell'omeostasi glucidica e/o acidosi metabolica senza altra causa plausibile) accompagnati dalla positività di almeno uno degli indici infiammatori quali proteina C reattiva (PCR) (>1.0 mg/dl), conta dei globuli bianchi (< 4.0 o $> 30.0 \times 10^3/\text{mm}^3$), conta piastrinica (< 50.0 o $> 500.0 \times 10^3/\text{mm}^3$), indice di immaturità leucocitaria (rapporto I/T >0.2) ed emocoltura positiva (61).

La diagnosi di sepsi clinica è stata posta in presenza di uno o più segni suggestivi di sepsi accompagnati dalla positività di almeno uno degli indici infiammatori quali PCR, conta dei globuli bianchi, conta piastrinica, indice di immaturità leucocitaria, con emocoltura negativa e correlazione temporale tra evoluzione clinica e inizio della terapia antibiotica (61).

Un'ulteriore distinzione è stata effettuata in base all'epoca di insorgenza della sepsi in forme ad esordio precoce (<72 ore di vita) o tardivo (>72 ore di vita) (62). I neonati con sepsi accertata (emocoltura positiva) e sepsi clinica (emocoltura negativa) sono stati definiti complessivamente come settici.

Nel gruppo con sepsi possibile sono stati inclusi i neonati con un segno clinico o un valore degli indici infiammatori patologico con emocoltura negativa, per i quali al follow-up è stata posta con certezza diagnosi differente da una patologia infettiva

localizzata o sistemica, oppure si è assistito alla risoluzione completa della sintomatologia entro 8 ore dall'arruolamento (61).

Come controlli sani sono stati considerati neonati con caratteristiche demografiche simili senza alcuna patologia accertata all'arruolamento e durante le 12 settimane successive di follow-up.

La diagnosi di meningite è stata posta in relazione alla positività dell'esame colturale del liquor e/o in presenza nel liquor di > 20 globuli bianchi/ml, > 160 mg/dl di proteine e un livello di glucosio < 50 mg/dL (oppure di un rapporto tra glicorrachia e glicemia < 0,5) (63).

Determinazione delle concentrazioni sieriche di Clp su sangue di funicolo ombelicale per la definizione dei valori normali e la diagnosi di sepsi ad esordio precoce

Criteri di inclusione

Tutti i nuovi nati a termine, consecutivamente osservati, per i quali è stato ottenuto consenso informato da parte dei genitori per l'impiego di campioni biologici ad uso di ricerca scientifica, sono stati considerati eleggibili per lo studio. Non sono stati inclusi i figli di donna con patologie infiammatorie acute o croniche in atto, i neonati con diagnosi prenatale di malformazioni, sindromi cromosomiche, infezioni congenite diagnosticate durante la gravidanza, travaglio prolungato, sofferenza prenatale, nati da gravidanza gemellare, storia familiare di patologie a carico del sistema immunitario, uso di antibioticoterapia materna per positività allo Streptococco gruppo B (SGB) del tampone vaginale.

Sono stati successivamente esclusi dall'analisi finale dei dati i neonati con le seguenti caratteristiche: asfissia alla nascita (indice di Apgar < 6 a 1'), sindrome da aspirazione di meconio, follow-up di durata inferiore a 12 settimane, diagnosi di immunodeficienza, infezione congenita, sindrome genetica, sindrome cromosomica, neoplasie, malformazioni.

Raccolta dati clinici

Per ogni neonato arruolato sono state raccolte le seguenti informazioni anamnestiche e cliniche: fattori di rischio materni di sepsi ad esordio precoce (febbre materna intrapartum, corioamnionite, rottura prematura delle membrane, minaccia di parto prematuro, fratello con storia di sepsi neonatale) (62), tipo di parto, sesso, età gestazionale e peso alla nascita, comparsa entro 72 ore di vita di pallore o ittero, letargia, apnea, bradicardia, irritabilità o convulsioni, tachipnea, distress respiratorio, scarsa perfusione periferica, tachicardia o ipotensione, distensione addominale o vomito, febbre, ipotermia o temperatura instabile, insufficienza cardiaca, alterazione dell'omeostasi glucidica, acidosi metabolica, exitus. Tutti i neonati che presentavano sintomatologia suggestiva di infezione sono stati osservati in regime di ricovero presso reparti di patologia neonatale e terapia intensiva neonatale dei centri partecipanti.

Determinazione delle concentrazioni sieriche di Clp su sangue periferico in neonati con più di 72 ore di vita per la diagnosi di sepsi ad esordio tardivo

Criteri di inclusione

Sono stati considerati eleggibili per lo studio tutti i neonati consecutivamente osservati presso i reparti di patologia neonatale e terapia intensiva neonatale dei Centri partecipanti con più di 72 ore di vita, età gestazionale alla nascita di 27-42 settimane, peso alla nascita > 750 grammi, che hanno meritato approfondimento diagnostico per sospetta infezione sistemica, per i quali è stato ottenuto consenso informato da parte dei genitori per l'impiego di campioni biologici ad uso di ricerca scientifica.

Sono stati successivamente esclusi dall'analisi finale dei dati i figli di donna con malattie infiammatorie acute o croniche in atto, neonati con diagnosi di infezioni congenite, nati da gravidanza gemellare, storia familiare di patologie a carico del sistema immunitario, necessità di ventilazione meccanica al momento dell'arruolamento, sepsi ad esordio precoce, travaglio prolungato, sofferenza perinatale, asfissia alla nascita, sindrome da aspirazione di meconio, follow-up di durata inferiore a 12 settimane, diagnosi di immunodeficienza, neoplasie, interventi chirurgici nelle precedenti 3 settimane, sindrome genetica, sindrome cromosomica, malformazioni. L'uso di antibioticoteraapia materna per positività allo SGB del tampone vaginale non è stato utilizzato come criterio di esclusione. Come controlli sani sono stati arruolati neonati con caratteristiche demografiche e cliniche simili al gruppo indagato per sepsi.

Raccolta dati clinici

Per ogni neonato arruolato sono state raccolte le seguenti informazioni: fattori di rischio materni per sepsi (febbre materna intrapartum, corioamnionite, rottura prematura delle membrane, minaccia di parto prematuro), età gestazionale e peso alla nascita, tipo di parto, sesso, indice di Apgar a 1' di vita, uso di cateteri vascolari centrali, comparsa di segni suggestivi di sepsi quali pallore o ittero, letargia, apnea, bradicardia, irritabilità o convulsioni, tachipnea, distress respiratorio, scarsa perfusione periferica, tachicardia o ipotensione, distensione addominale o vomito, residuo gastrico prealimentare giornaliero superiore al 40% del totale di nutrizione enterale somministrata in 24 ore, febbre, ipotermia o temperatura instabile, insufficienza cardiaca, alterazione dell'omeostasi glucidica, acidosi metabolica, modalità della terapia antibiotica.

Determinazione dei livelli liquorali di Clp in corso di meningite nel neonato

Criteri di inclusione

Sono stati inclusi 5 neonati con meningite batterica (2 E.coli, 1 Streptococcus agalactiae, 1 Klebsiella pneumoniae, 1 Candida albicans), e 25 controlli (10 emorragia cerebrale periventricolare, 8 iponatriemia, 5 sindrome da astinenza neonatale, 2 leucoencefalomalacia periventricolare) osservati presso i reparti di patologia neonatale e terapia intensiva neonatale dei Centri partecipanti. Per tutti è stato ottenuto consenso informato da parte dei genitori per l'impiego di campioni biologici ad uso di ricerca scientifica.

Raccolta dati clinici

Per ogni neonato arruolato sono state raccolte le seguenti informazioni: febbre materna intrapartum, corioamnionite, rottura prematura delle membrane, minaccia di parto prematuro, uso di farmaci materno, sofferenza fetale, tipo di parto, sesso, età gestazionale, peso alla nascita, comparsa di segni quali pallore o ittero, letargia, apnea, bradicardia, irritabilità o convulsioni, tachipnea, distress respiratorio, scarsa perfusione periferica, tachicardia o ipotensione, distensione addominale o vomito, residuo gastrico prealimentare giornaliero superiore al 40% del totale di nutrizione enterale somministrata in 24 ore, febbre, ipotermia o temperatura instabile, insufficienza cardiaca, alterazione dell'omeostasi glucidica, acidosi metabolica, terapia, impiego di cateteri vascolari centrali.

Raccolta campioni e Indagini di laboratorio

Per la determinazione delle concentrazioni sieriche di Clp è stato raccolto un campione di sangue (0,5 ml) dal funicolo alla nascita (Fase 1) o da vaso periferico (Fase 2) in provette Vacutainer® contenenti EDTA per ognuno dei soggetti arruolati.

Per la determinazione delle concentrazioni liquorali di Clp è stato prelevato un campione di liquor in provette non trattate. I campioni sono stati centrifugati a 2000 giri per 15 minuti. Il sopranatante è stato congelato a -20°C entro 20 minuti dal prelievo per essere conservato in aliquote di 150-200 µl.

La raccolta del campione di sangue periferico nei soggetti con sospetto di sepsi, per la determinazione delle concentrazioni sieriche di Clp, è avvenuta sempre contestualmente all'esecuzione di prelievo per la determinazione degli altri indici di infiammazione.

Nei soggetti appartenenti al gruppo di controlli sani è stata effettuata la raccolta del campione di sangue per la misurazione delle concentrazioni sieriche di Clp solo contemporaneamente ad un prelievo di sangue necessario per motivi assistenziali.

Nel sospetto di sepsi, per ogni soggetto arruolato, sono state effettuate le seguenti indagini: emocoltura, urinocoltura, emocromo con conta dei globuli bianchi e delle piastrine, determinazione del rapporto I/T, misurazione della concentrazione plasmatica della PCR, gas ematici, esami ematochimici (glicemia, calcemia, sodiemia, potassiemia, cloremia, creatininemia, azotemia, proteinemia, albuminemia, latticoacidemia, ammoniemia), radiografia del torace, ecografia transfontanellare, cardiaca e addominale.

Riguardo la Fase 3, in caso di sospetto coinvolgimento del sistema nervoso centrale in corso di sepsi, insieme con le indagini sopradescritte, sono state effettuate coltura

ed esame delle caratteristiche chimico-fisiche del liquor, e conta dei globuli bianchi nel liquor. Per ogni neonato arruolato è stato raccolto un campione di liquor (0,25 ml pari a 5 gocce) per la determinazione delle concentrazioni di Clp, contestualmente all'esecuzione di puntura lombare per l'esame colturale, chimico-fisico e microscopico del liquor.

Le indagini previste dallo studio coincidono con quelle normalmente utilizzate dai centri partecipanti in caso di sospetta infezione in epoca neonatale. La terapia antibiotica è stata iniziata in tutti i neonati con sospetto di sepsi e/o meningite immediatamente dopo l'esecuzione delle indagini sopradescritte.

Metodiche di misurazione degli indici infiammatori

Tutti i campioni biologici sono stati analizzati presso il medesimo laboratorio.

Determinazione della PCR

Le concentrazioni plasmatiche della PCR sono state misurate con metodo immunoturbidimetrico (limite di determinazione 0.5 mg/dl). Livelli superiori a 1.0 mg/dl sono stati definiti come patologici (64,65).

Esame emocromocitometrico e rapporto I/T

La determinazione del numero totale di leucociti è stata effettuata mediante contatore Sysmex TM NE 8000 (Toa Medical electronics Co, Ltd, Japan). Un numero complessivo di globuli bianchi compreso tra 4.0 e $25.0 \times 10^3/\text{mm}^3$ è stato considerato come normale (66). La conta totale di neutrofili è stata determinata considerando la somma di neutrofili maturi e immaturi. Una conta piastrinica < 50.0 o $> 500.0 \times$

$10^3/\text{mm}^3$ è stata considerata patologica (66). La misurazione dell'indice di immaturità dei neutrofili è invece stato calcolato a partire dal rapporto tra numero di neutrofili immaturi e numero totale di neutrofili. Un valore del rapporto I/T inferiore a 0.20 è stato considerato come normale (66).

Misurazione delle concentrazioni sieriche di Clp

Per misurare i livelli di Clp è stato impiegato un test immunoenzimatico ELISA (Calprest®, Eurospital, Trieste, Italia). Il principio è brevemente descritto di seguito: la Clp presente nel campione diluito si lega all'anticorpo adsorbito su una superficie in plastica dei pozzetti forniti con il kit Calprest®. Gli anticorpi coniugati con fosfatasi alcalina legano l'antigene, quindi l'enzima catalizza la conversione del substrato in prodotto colorato. L'intensità del colore è proporzionale alla quantità del coniugato legato e pertanto alla quantità di Clp legata. I campioni conservati a -20° C sono stati scongelati a temperatura ambiente. Da ciascun campione sono stati pesati e prelevati circa 100 µl cui è stata aggiunta la soluzione di estrazione diluita (rapporto p/v 1:50). Dopo aver agitato vigorosamente con vortex per 30 secondi, i campioni sono stati resi omogenei per 30 minuti su di un agitatore e successivamente trasferiti in provette Eppendorf per essere centrifugati per 20 minuti a 10000 giri a temperatura ambiente. A questo punto sono stati trasferiti 50 µl del sopranatante in una nuova provetta Eppendorf. L'estratto così ottenuto è stato analizzato immediatamente con procedura ELISA. I valori di densità ottica sono stati letti mediante lettore per ELISA a 450 nm. La concentrazione di Clp è stata

quindi determinata estrapolando il valore ottenuto sulla curva standard ed espressa in $\mu\text{g/ml}$.

2.1.1.3 RISULTATI

Determinazione della Clp sierica nel sangue di funicolo ombelicale alla nascita

Popolazione studiata

Sono stati consecutivamente raccolti 367 campioni di sangue di funicolo da altrettanti neonati al momento della nascita. Sono stati esclusi 35 neonati per asfissia alla nascita (10 neonati), sindrome da aspirazione di meconio (5 soggetti), follow-up di durata inferiore a 12 settimane (3 neonati), diagnosi di immunodeficienza (2 neonati) o infezione congenita (8 neonati), sindrome genetica (2 neonati), sindrome cromosomica (3 neonati) e malformazioni (2 neonati) (Figura 2). I neonati arruolati sono stati classificati nel seguente modo: sepsi con emocoltura positiva, 6 casi (3 per SGB, 2 per *Escherichia coli*, 1 per *Stafilococco coagulasi negativo*); sepsi clinica, 1 caso; sepsi possibile con diagnosi definitiva di patologia non infettiva, 16 casi (10 con maladattamento polmonare, 4 sindrome da astinenza neonatale, 1 aritmia cardiaca, 1 ipotiroidismo congenito); controlli sani, 309 casi (Figura 2).

Il neonato con sepsi clinica ha ricevuto diagnosi a 60 ore di vita sulla base della persistenza di sintomi suggestivi (instabilità termica, ipotensione, difficoltà nella suzione, colorito pallido, crisi di apnea ripetute, e desaturazioni severe) e indici infiammatori elevati (PCR 2.8 mg/dl; conta dei globuli bianchi $3.8 \times 10^3/\text{mm}^3$). È stato trattato con ampicillina associata a gentamicina per via endovenosa per 4 settimane (Tabella 1). Si è osservato miglioramento clinico associato a riduzione dei

livelli di PCR e del numero dei globuli bianchi in correlazione temporale (~ 48 ore) con l'inizio della terapia antibiotica. Pertanto si ritiene che questo caso sia stato correttamente classificato come neonato con sepsi.

Sono state effettuate determinazioni su 130 campioni di neonati classificati come controlli sani, scelti in maniera casuale mediante l'ausilio di un software specifico sui 309 controlli disponibili, e su tutti i 16 campioni di soggetti con patologia non infettiva, e i 7 campioni ottenuti da sangue di funicolo di neonati con sepsi (sepsi accertata + sepsi clinica) ad esordio precoce (Figura 2).

Non sono state rilevate differenze statisticamente significative tra i gruppi sepsi, controlli sani e patologia non infettiva riguardo sesso, età gestazionale e peso alla nascita (Tabella 2). La frequenza di parti per via vaginale è risultata maggiore nei soggetti con sepsi rispetto a controlli sani e neonati con patologia non infettiva (Tabella 2). La frequenza di almeno un fattore di rischio per sepsi ad esordio precoce è risultata maggiore nei soggetti settici rispetto ai controlli sani e ai neonati con patologia non infettiva (Tabella 2). La mediana dell'età alla diagnosi per i soggetti con sepsi è risultata di 46 ore (IQR 23 ore).

Concentrazioni di Clp sierica nei differenti Gruppi dello studio

La mediana della concentrazione sierica di Clp è risultata essere significativamente più elevata nei neonati con sepsi (3,60 µg/ml; IQR 1,9 µg/ml) rispetto ai soggetti con patologia non infettiva (1,45 µg/ml; IQR 1,23 µg/ml) e ai controlli (1,25 µg/ml; IQR 1,23 µg/ml)($p < 0.0001$)(Figura 3).

Nessuna differenza nei livelli sierici di Clp è stata riscontrata tra controlli sani e neonati con sepsi possibile ma con diagnosi definitiva differente da patologia infettiva (Figura 3).

I valori di riferimento espressi come percentili delle concentrazioni sieriche di Clp nel neonato sano sono riportati in Figura 4.

L'analisi di Spearman ha escluso una correlazione tra i livelli di Clp sierica e peso alla nascita ($r=0,3$). L'analisi di regressione lineare con metodo stepwise per la selezione delle variabili ha escluso che peso alla nascita, sesso, e tipo di parto abbiano influenzato le concentrazioni sieriche di Clp misurate su sangue di funicolo ombelicale alla nascita. Mediante la costruzione della curva ROC (Receiver Operating Characteristics curve) confrontando i gruppi Sepsis (sepsi accertata + sepsi clinica) vs. altre categorie (controlli sani + neonati con patologie non infettive) è stato stabilito a $2,9 \mu\text{g/ml}$ il valore di cut-off ottimale delle concentrazioni sieriche di Clp (Figura 5). Tale valore è stato impiegato per la definizione dell'accuratezza diagnostica. Dei 7 neonati infetti, 6 hanno mostrato un valore di Clp sierica superiore a $2,9 \mu\text{g/ml}$, mentre nessuno dei 130 controlli sani e dei 16 neonati con patologie non infettive ha superato il limite sopradescritto. I valori di sensibilità, specificità, valore predittivo positivo, valore predittivo negativo della Clp sierica su funicolo ombelicale alla nascita come indice di sepsi ad esordio precoce sono riportati in Figura 5. Il test K di Cohen ha mostrato come vi sia una maggiore concordanza con la diagnosi definitiva di sepsi da parte dei livelli sierici di Clp (normali/patologici) ($K=0,923$) rispetto ai criteri clinici ($K=0,490$).

Determinazione della Clp sierica nel sangue periferico in neonati con più di 72 ore di vita

Popolazione studiata

Sono stati raccolti 140 campioni di sangue periferico da 140 neonati ricoverati presso i reparti di patologia neonatale e terapia intensiva neonatale dei Centri partecipanti allo studio. Sono stati esclusi 13 casi per follow-up di durata inferiore a 12 settimane (5 casi), diagnosi di immunodeficienza (2 casi), infezione congenita (5 casi), malformazione cardiaca (1 caso) (Figura 6). Pertanto i neonati considerati per l'analisi finale sono risultati 127, di cui 28 con sepsi con emocoltura positiva (10 SGB, 5 Escherichia coli, 3 Stafilococco coagulasi negativo, 2 per Serratia marcescens, 2 Klebsiella pneumoniae, 6 Candida albicans), 41 con sepsi clinica, 29 con sepsi possibile con diagnosi definitiva differente da infezione (18 con sindrome da distress respiratorio, 6 con maladattamento polmonare, 2 con persistenza di dotto arterioso pervio, 3 con sindrome da astinenza neonatale), e 29 controlli sani (Figura 6).

I neonati con sepsi clinica hanno ricevuto diagnosi sulla base della persistenza di segni e sintomi suggestivi (instabilità termica, ipotensione, difficoltà nella suzione, colorito pallido, crisi di apnea ripetute, desaturazioni severe) e indici di laboratorio (PCR, conta dei globuli bianchi, rapporto I/T) patologici. In correlazione temporale con l'inizio della terapia antibiotica si è osservato miglioramento clinico associato a normalizzazione degli indici di laboratorio. Pertanto si ritiene che questi casi siano

stati correttamente classificati come settici. Sono stati esclusi dall'analisi finale dei dati 3 neonati classificati inizialmente come controlli sani che hanno ricevuto nelle 48 ore successive diagnosi di sepsi. I valori di Clp per questi soggetti sono risultati essere 3,8 µg/ml, 4,2 µg/ml, e 3,1 µg/ml.

Le principali caratteristiche demografiche e cliniche dei gruppi dello studio sono riportate in Tabella 3. La mediana dell'età alla diagnosi per i soggetti con sepsi è risultata di 15 giorni (IQR 10). L'età mediana al momento della raccolta di campioni di sangue per la misurazione delle concentrazioni di Clp sierica non è risultato differente tra i gruppi sepsi, controlli sani (16 giorni; IQR 8 giorni) e patologia non infettiva (15 giorni; IQR 9 giorni).

Concentrazioni di Clp sierica nei differenti Gruppi dello studio

Nessuna differenza nella mediana dei livelli sierici di Clp è stata riscontrata tra i neonati con sepsi accertata (3,5 µg/ml; IQR 1,2 µg/ml) e sepsi clinica (2,8 µg/ml; IQR 1,1 µg/ml), e tra i soggetti sani (0,9 µg/ml; IQR 1,7 µg/ml) e con possibile infezione ma con diagnosi definitiva differente da patologia infettiva (1,4 µg/ml; IQR 0,6 µg/ml) (Figura 7).

Le concentrazioni sieriche di Clp dei 69 neonati con sepsi sono risultate significativamente più elevate rispetto a quelle misurate sui 26 campioni del gruppo controlli sani e sui 29 campioni del gruppo con patologie non infettive (Figura 7).

L'analisi di regressione lineare con metodo stepwise per la selezione delle variabili ha escluso che fattori quali sesso, età gestazionale e peso alla nascita possano influenzare le concentrazioni sieriche di Clp.

L'analisi di Spearman ha escluso una correlazione tra i livelli di Clp sierica e numero di Globuli bianchi ($r=0,2$). Nei neonati sani i livelli di Clp sierica misurati su sangue periferico dopo le prime 72 ore di vita non sono risultate significativamente differenti rispetto a quelli misurati su funicolo ombelicale alla nascita (Figura 8).

La costruzione di curve ROC confrontando prima i gruppi Sepsi tardiva vs. Controlli sani e successivamente Sepsi tardiva vs. neonati con diagnosi definitiva differente da patologia infettiva, ha consentito di stabilire il valore ottimale di cut-off delle concentrazioni sieriche di Clp (Figure 9).

I valori dell'accuratezza diagnostica della misurazione delle concentrazioni sieriche di Clp per la sepsi ad esordio tardivo sono riportati in Tabella 4. Confrontata con gli altri indici infiammatori la misurazione dei livelli sierici di Clp ha mostrato più elevati valori di sensibilità, valore predittivo positivo (VPP), valore predittivo negativo (VPN) e Likelihood ratio per la diagnosi di sepsi ad esordio tardivo (Tabella 4).

Il test K di Cohen ha mostrato come vi sia una maggiore concordanza con la diagnosi definitiva di sepsi da parte dei livelli sierici di Clp (normali/patologici) ($K=0,730$) rispetto ai criteri clinici ($K=0,480$).

Determinazione dei livelli liquorali di Clp in corso di meningite nel neonato

Le caratteristiche demografiche dei soggetti con meningite non sono risultate differenti rispetto ai controlli (Tabella 5). Le principali caratteristiche dell'analisi chimico-fisica e microscopica del liquor sono riportate in Tabella 6. La mediana della concentrazione liquorale di Clp è risultata essere significativamente più elevata nei neonati con meningite rispetto ai controlli (Figura 10).

2.1.1.4 SIGNIFICATO DEI RISULTATI DELLA RICERCA

I risultati ottenuti in questa ricerca hanno permesso di definire per la prima volta i valori di Clp sierica in neonati sani e colpiti da sepsi. Gli studi effettuati su sangue di funicolo hanno consentito di stabilire i livelli normali di Clp sierica alla nascita e di fare luce sulla capacità di risposta di una componente dell'immunità innata durante la sepsi del neonato. Il calcolo dell'accuratezza diagnostica ha permesso di verificare l'utilità della misurazione delle concentrazioni di Clp su siero di funicolo alla nascita per la diagnosi tempestiva della sepsi neonatale ad esordio precoce.

Lo studio dei livelli di Clp su siero isolato da sangue periferico, in neonati con più di 72 ore di vita, ha permesso di individuare il valore di cut-off ottimale per l'utilizzo di tale marcatore nella diagnosi di sepsi ad esordio tardivo. Infine la dimostrazione di un aumento dei livelli liquorali di Clp in corso di meningite consente di ipotizzare un ulteriore impiego di questo marcatore per la diagnosi delle infezioni del sistema nervoso centrale.

I risultati ottenuti mostrano che la Clp sierica è un marcatore diagnostico di sepsi ad elevata sensibilità e valore predittivo negativo, utili per l'identificazione del numero più elevato possibile di neonati settici, mentre l'elevato grado di specificità e valore predittivo positivo consentono di ipotizzare un suo impiego per restringere i criteri per l'inizio della terapia antimicrobica.

L'interazione tra patogeno e cellule immunitarie scatena una cascata di eventi la cui entità e i cui effetti dipendono dalla virulenza del microrganismo e dalla risposta dell'ospite, entrambe estremamente variabili. Le conoscenze riguardo le modalità di risposta delle diverse componenti del sistema immune in epoca neonatale restano ancora in gran parte da definire. Mentre sembra abbastanza chiaro il deficit a carico

dell'immunità adattativa, particolarmente se Th1-mediata, dati contrastanti derivano dallo studio dell'immunità innata (36,67,68). I neutrofili e le altre cellule dell'immunità innata sono capaci di produrre peptidi antimicrobici che giocano un ruolo cruciale nella protezione del neonato dalle infezioni (69). Studi recenti indicano come molte funzioni di neutrofili e monociti, sebbene ridotte in condizioni basali, risultino poi normali a seguito di uno stimolo infiammatorio (68). La dimostrazione che i livelli di Clp sierica aumentano in maniera considerevole in corso di sepsi, conferma questa visione della funzione dell'immunità innata in epoca neonatale.

Considerata la particolare importanza di possedere difese pronte al passaggio da un ambiente sterile a quello extrauterino, in attesa del completamento dello sviluppo dell'immunità adattativa, il ruolo dei peptidi antimicrobici pre-sintetizzati, come la Clp, è fondamentale per la difesa dalle infezioni in epoca neonatale (69,70).

La Clp è un peptide antimicrobico contenuto in elevate concentrazioni nel citosol delle cellule coinvolte attivamente nella risposta immune innata (55,56). Viene liberata precocemente nel sito di interazione tra patogeno e sistema immunitario e promuove la diffusione sistemica del processo infiammatorio (55,56).

La Clp promuove la chemiotassi, favorisce la comunicazione tra le cellule del sistema immune, stimola la migrazione transendoteliale di monociti e neutrofili, regola il termine del processo infiammatorio e partecipa attivamente alla ricostruzione dei tessuti danneggiati dalla cascata infiammatoria (55). L'azione antimicrobica della Clp deriva invece dalle sue facoltà di legare lo zinco riducendone la disponibilità per la crescita batterica (56).

La capacità del neonato di produrre livelli sierici di Clp simili a quelli delle età successive, l'assenza di correlazione con l'età gestazionale, e la stabilità dei livelli di Clp durante tutto il periodo neonatale (Figura 5), lasciano ipotizzare una maturazione precoce e completa di questa componente dell'immunità innata durante lo sviluppo fetale (55,56).

In accordo con ricerche precedenti, i risultati dello studio evidenziano che ad elevati livelli di Clp sierici non corrisponde un numero di globuli bianchi circolanti aumentato (55). Questo potrebbe dipendere dal fatto che la massa leucocitaria midollare nel neonato è solo il 20% rispetto a quella dell'adulto (64,71). Tuttavia la ridotta risposta midollare agli stimoli infiammatori e/o la scarsa capacità chemiotattica dei leucociti in età neonatale potrebbero contribuire almeno in parte a questo fenomeno (63,64,71). Ancora poco si conosce riguardo i rapporti tra Clp liberata nel sito di origine del processo infiammatorio e attivazione leucocitaria sistemica. Studi futuri sono necessari per fare luce su questo fenomeno.

I risultati dello studio dimostrano come la Clp possa essere impiegato come marcatore precoce di sepsi neonatale. La Clp sierica viene rilasciata dai leucociti molto precocemente ed è dosabile già dopo 6 ore dal contatto del patogeno con le cellule dell'immunità innata (55). Nei soggetti con sepsi ad esordio precoce, in cui la diagnosi viene posta a circa 2 giorni di vita, la Clp sierica raggiunge elevati livelli già alla nascita su sangue di funicolo. Per quanto attiene invece alla sepsi ad esordio tardivo, dall'analisi finale dei dati sono stati esclusi tre pazienti inizialmente classificati come controlli sani che hanno mostrato nelle 48 ore successive un decorso clinico compatibile con uno stato settico. Al momento del prelievo, questi soggetti avevano livelli di Clp tutti superiori al valore ottimale di cut-off indicato

dai nostri risultati come limite per l'identificazione dei neonati con sepsi ad esordio tardivo. È possibile speculare che l'aumento della Clp sierica, dopo il contatto tra organismo e patogeno, sia tanto precoce e rapido da precedere le manifestazioni cliniche, secondarie alla diffusione sistemica del processo infiammatorio. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi per accertare questa ipotesi.

Altri marcatori precoci sono stati recentemente proposti per la diagnosi di sepsi nel neonato (64). Tra questi il dosaggio di citochine quali IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF α e l'identificazione dell'antigene di superficie dei neutrofili CD11 pur dimostrando una buona accuratezza diagnostica non ha trovato largo impiego nella pratica clinica per la complessità dei metodi di determinazione e soprattutto per i costi ad essi correlati (64). In più, alla luce delle più recenti acquisizioni riguardo i meccanismi patogenetici della sepsi, il dosaggio delle citochine pro-infiammatorie garantirebbe uno scarso successo diagnostico, considerato il deficit dell'immunità adattativa e lo stato di anergia in cui versano i neonati con sepsi (72).

Recentemente la misurazione sierica della procalcitonina, una proteina della fase acuta implicata in fenomeni di neurotrasmissione e immunomodulazione in corso di infiammazione sistemica, è stata proposta come una metodica accurata per la diagnosi di sepsi in epoca neonatale (64). Tuttavia i livelli di procalcitonina sono ampiamente influenzati da condizioni materne, quali infezioni e preeclampsia, e neonatali, come sindrome da distress respiratorio, instabilità emodinamica, traumi (64). L'ampia variabilità dei livelli normali di procalcitonina nelle prime ore di vita la rende un marcatore poco affidabile per la diagnosi di sepsi neonatale ad esordio precoce (64).

Al momento l'indice infiammatorio più comunemente impiegato in clinica è la PCR (62). La PCR è una proteina della fase acuta della risposta infiammatoria, prodotta dal fegato, che aumenta in circolo in caso di infezione o lesione dei tessuti (64). Le concentrazioni più alte di PCR sono state riscontrate in pazienti con infezioni batteriche, mentre aumenti modesti si ritrovano in corso di altri stati infiammatori cronici (47). La sintesi delle proteine della fase acuta è regolata dalle citochine IL-1 β , IL-6, IL-8, e TNF α (47). Dal primo contatto con l'agente scatenante la reazione infiammatoria, sono necessarie almeno 6 ore per dare il via alla sintesi e alla liberazione in circolo della PCR (47). I livelli di PCR raddoppiano ogni 8 ore e raggiungono il livello massimo a 36-50 ore dall'inizio del processo infiammatorio (73). I livelli rimangono elevati con il progredire dell'infiammazione e diminuiscono rapidamente in caso di guarigione a causa della breve emivita (4-7 ore). I risultati del nostro studio confermano una discreta sensibilità e un buon valore predittivo negativo della PCR nella diagnosi di sepsi neonatale. Tuttavia, studi precedenti dimostrano che un singolo valore normale non esclude un'infezione, perché il campionamento potrebbe precedere l'aumento della PCR (64). Aumenti della PCR sono stati rilevati anche in neonati con asfissia neonatale, sindrome da distress respiratorio, e sindrome da aspirazione meconiale (64,65,73). Sebbene la sintesi della PCR avvenga più rapidamente e in maggiori quantità rispetto agli altri marcatori della fase acuta, è comunque subordinata alla produzione di citochine infiammatorie e prevede un tempo di latenza non sempre accettabile in età neonatale dove l'inizio precoce della terapia resta il principale fattore prognostico di questi pazienti (62,63). La PCR, infine, non è affidabile nelle prime 24-48 ore di vita e risulta essere aumentata in circa il 10% dei soggetti normali (62,64). I risultati del

nostro studio confermano, inoltre, che solo una minoranza dei neonati con sepsi ad esordio tardivo da *Candida albicans* mostra valori elevati di PCR (1 su 5), mentre la totalità presenta valori patologici di Clp (dati non mostrati) (64).

La necessità in epoca neonatale di un test ad elevata sensibilità e valore predittivo negativo al fine di identificare e classificare correttamente il maggior numero possibile di neonati con sepsi, fanno del dosaggio della Clp sierica un metodo con grandi potenzialità diagnostiche. In più l'importanza di ridurre i costi e i rischi di un uso ingiustificato di antibiotici, rendono la determinazione dei livelli di Clp sierica uno dei migliori marcatori fino ad oggi identificato per l'elevata specificità e valore predittivo positivo.

La metodica di misurazione ELISA della Clp è a basso costo e facilmente eseguibile. La necessità di esigue quantità di sangue (< 0.5 ml) per la determinazione rappresenta un ulteriore vantaggio nel neonato, soprattutto se pretermine, per il rischio di anemia iatrogena. La spesa richiesta per ogni misurazione di Clp sierica è di circa 10 euro, mentre per la determinazione della PCR si aggira intorno ai 15 euro. Al pari della PCR, per la quale esiste già in commercio un test per la misurazione delle concentrazioni sieriche in tempo reale, tra pochi mesi sarà disponibile un test rapido colorimetrico che consentirà di ottenere risultati rapidi e ridurre ulteriormente i costi della determinazione della Clp sierica. Pertanto la misurazione della Clp sierica supera molti dei problemi posti dai marcatori di infezione precedentemente studiati e rappresenta un metodo rapido ed a basso costo, ottimale per l'identificazione precoce di uno stato infiammatorio sistemico in epoca neonatale.

Lo studio presenta alcune limitazioni che sono discusse di seguito. I livelli sierici di Clp non sono stati monitorati quotidianamente in modo da consentire di stabilire una correlazione tra inizio e progressione delle manifestazioni cliniche e concentrazioni sieriche di questo marcatore. Lo studio non accerta il rapporto tra efficacia della terapia antibiotica e livelli sierici di Clp. I risultati ottenuti sono validi soltanto per un sottogruppo specifico di neonati non intubati, con un peso superiore a 750 g alla nascita, in assenza di malformazioni. Tuttavia, questo sottogruppo rappresenta la maggioranza di neonati che ricevono una valutazione e un trattamento antibiotico per il rischio di sepsi, osservati in centri nascita di primo livello, centri di patologia neonatale e terapie intensive neonatali. L'accuratezza diagnostica stabilita dal nostro studio risente della prevalenza della sepsi nei centri partecipanti che, nonostante sia molto simile a quella descritta dalle recenti indagini epidemiologiche, potrebbe essere differente in altre realtà assistenziali (62,74-76). Infine, non è possibile escludere con certezza che la concentrazione di Clp nel siero di funicolo ombelicale alla nascita non risenta dei livelli di materni di Clp circolante. Per le caratteristiche chimiche relative a peso molecolare e carica ionica di superficie, resta difficile ipotizzare un passaggio placentare della Clp dalla madre al feto. Tuttavia le cellule dei villi coriali sono capaci di produrre e secernere attivamente proteine S100, della stessa famiglia della Clp, soprattutto in caso di sofferenza feto-placentare (77). In ogni caso, dal nostro studio sono state escluse le donne gravide con patologie infiammatorie in atto ed è stata dimostrata l'assenza di differenze significative tra i livelli di Clp misurati su funicolo e quelli determinati dopo le prime 72 ore di vita su sangue periferico. Inoltre, i livelli di Clp sierica in

epoca neonatale non sembrano differenti da quelli delle età successive ($< 2 \mu\text{g/ml}$ per i soggetti sani) (55,56).

Tali limiti non impediscono in ogni caso di concludere che la Clp sierica sembra esser il parametro diagnostico più attendibile ed accurato per identificare precocemente i neonati con sepsi ad esordio precoce e tardivo. L'introduzione nella pratica quotidiana della misurazione delle concentrazioni sieriche di Clp potrebbe ottimizzare la gestione dei neonati con sepsi, anticipando la diagnosi e dunque migliorando la prognosi, riducendo contemporaneamente errori diagnostici e uso di antibiotici non necessari.

L'analisi effettuata mediante test K di Cohen conferma la possibilità della costruzione di nuovi approcci diagnostici e terapeutici della sepsi ad esordio neonatale, dove l'uso della Clp sierica potrebbe contribuire in maniera decisiva alla corretta classificazione di neonati con sospetta sepsi.

I risultati dello studio aprono nuove prospettive di ricerca sulla relazione tra patologie infiammatorie sistemiche e Clp sierica, e indicano la necessità di studi ulteriori per la messa a punto di nuove strategie diagnostiche e terapeutiche volte a ridurre la morbilità e la mortalità legate alla sepsi in epoca neonatale.

Studi futuri sono necessari per valutare il significato prognostico della Clp e verificare l'esistenza di una relazione tra livelli di Clp e gravità della risposta infiammatoria sistemica.

Il Government Performance Results Act, agenzia governativa statunitense per la pianificazione di interventi di sanità pubblica volti a ridurre le minacce ambientali, ha recentemente stabilito quale obiettivo nazionale la riduzione dei casi di sepsi neonatale sotto il tetto delle 0,3 unità ogni 1000 nascite. Analogamente l'Healthy

People 2010, organo internazionale per la promozione dello stato di salute, ha stabilito tra i propri obiettivi principali quello di ridurre i casi di sepsi neonatale ad esordio precoce a meno di 0,5 casi ogni 1000 nati vivi entro l'anno 2010, per tutti i ceti sociali. Alla luce dei nostri risultati l'introduzione nella pratica clinica della misurazione della Clp sierica in epoca neonatale potrebbe consentire di raggiungere rapidamente tali obiettivi.

Tale studio vista la elevata sensibilità e specificità del test ha posto le basi scientifiche per la costruzione di Kit rapidi ELISA per la diagnosi precoce di sepsi, con importanti ripercussioni sulla gestione clinica del neonato settico ed eventuali applicazioni anche nella medicina dell'adulto.

2.1.2 LE DEFENSINE. *Definizione dei livelli sierici normali di defensine in epoca neonatale*

Le defensine sono tra i principali peptidi antimicrobici dell'immunità innata (78,79) (Figura 11). La loro conservazione durante l'evoluzione e la distribuzione in tutto il regno animale riflettono l'importanza di queste molecole nella difesa dalle infezioni (80). Sono state per la prima volta isolate dai neutrofili, sono poi risultate essere componenti delle cellule epiteliali di diversi distretti confermando il ruolo antimicrobico a livello delle superfici mucosali costantemente esposte all'aggressione da parte di microorganismi patogeni (Figura 11) (39,81-85). Le defensine sono peptidi cationici relativamente ricchi di arginina, non glicosilati, con peso molecolare di 3.5-4.5 kDa e contenenti sei residui di cisteina formanti tre caratteristici ponti disolfuro intramolecolari. La distribuzione spaziale dei residui di cisteina, l'allineamento dei ponti disolfuro e la struttura globale della molecola sono i criteri in base ai quali vengono distinte tre classi di defensine: α -defensine, β -defensine, θ -defensine (78,79). Le defensine sono state ritrovate in elevate concentrazioni nell'aspirato tracheale di neonati con polmonite ed infezioni sistemiche e nel plasma di bambini con sepsi (86). Sebbene non siano conosciuti i livelli normali di defensine plasmatici in epoca neonatale una carente produzione o un'alterata funzione di questi peptidi antimicrobici potrebbe favorire lo sviluppo di processi infiammatori mucosali e/o sistemici.

2.1.2.1 OBIETTIVI

Definire i livelli normali di α - e β -defensine in epoca neonatale al fine di identificare valori di riferimento potenzialmente utili per studi successivi atti a stabilire un loro possibile ruolo fisiopatologico in corso di sepsi.

2.1.2.2 METODOLOGIA

Disegno dello studio

Lo studio collaborativo tra Dipartimento di Pediatria dell'Università degli Studi di Napoli Federico II e l'Ospedale Mauro Scarlato di Scafati, si è svolto a partire dal giugno 2007 ed è tuttora in corso. In questa tesi sono presentati i dati preliminari ottenuti nella fase iniziale della ricerca.

Per ogni soggetto arruolato è in corso un follow-up clinico di almeno 12 mesi. Il disegno dello studio è stato approvato dal Comitato Etico della Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II". Un'accurata informazione a fine di consenso è stata fornita ai genitori di tutti i soggetti arruolati.

Criteri di inclusione ed esclusione

Gestanti e neonati consecutivamente osservati presso il nido dell'Ospedale Mauro Scarlato di Scafati sono stati considerati eleggibili per lo studio. Sono stati esclusi i soggetti con le seguenti caratteristiche: madri con patologie infiammatorie acute o croniche in atto, sofferenza prenatale, storia familiare di patologie a carico del sistema immunitario, uso di antibioticoterapia materna per positività allo SGB del

tampone vaginale, asfissia alla nascita (indice di Apgar < 6 a 1'), sindrome da aspirazione di meconio, immunodeficienza, infezione congenita, sindrome genetica, sindrome cromosomica, neoplasie, malformazioni.

Raccolta dati

Per ogni neonato arruolato sono state raccolte informazioni riguardo patologie materne, gestosi, immunodeficienze familiari, rottura prolungata delle membrane (>18 ore), positività del tampone vaginale materno alla ricerca di SGB, età gestazionale, tipo di parto, gemellarità, caratteristiche del liquido amniotico alla nascita, etnia, sesso, indice di Apgar a 1' ed a 5', peso, lunghezza e circonferenza cranica alla nascita.

Campioni biologici

Sono stati raccolti campioni di sangue da gestanti al momento del parto, da cordone ombelicale (3 ml) alla nascita e da neonati a 28 giorni di vita, in provette Vacutainer® con EDTA. I campioni sono stati centrifugati a 2000g per 15 minuti ed il siero è stato congelato e conservato in aliquote di almeno 150 µl.

Misurazione delle concentrazioni sieriche di defensine

Le concentrazioni sieriche di defensine sono state misurate mediante ELISA come descritto precedentemente (87). Per misurare i livelli di human β -defensin 2 (hBD2) e di human neutrophil defensins 1-3 (HNP1-3) sono stati impiegati test immunoenzimatici ELISA (Phoenix Pharmaceuticals, Inc. Belmont, CA, USA per hBD2 e Hbt HyCult Biotechnology, Uden, The Netherlands per HNP1-3

rispettivamente). Il principio è brevemente descritto di seguito: le hBD2 o le HNP1-3 presenti nel campione diluito si legano all'anticorpo adsorbito su una superficie in plastica dei pozzetti forniti con il kit. Il materiale non legato viene rimosso dai lavaggi. Viene aggiunto un secondo anticorpo biotinilato che lega a sua volta le defensine catturate dal primo anticorpo adeso alla superficie del pozzetto. Il materiale in eccesso viene rimosso dai lavaggi. Si aggiunge la streptavidina-perossidasi coniugata che reagisce specificamente con l'anticorpo biotinilato. L'eccesso di streptavidina-perossidasi viene rimosso dai lavaggi. Si procede ad aggiungere il substrato tetrametilbenzidina, segue lo sviluppo di una colorazione. L'intensità del colore è proporzionale alla quantità del coniugato legato e pertanto alla quantità di hBD2 o di HNP1-3 legata. I campioni conservati a -20° C sono stati scongelati a temperatura ambiente. Il campione è stato quindi analizzato immediatamente con procedura ELISA. I valori di densità ottica sono stati letti mediante lettore per ELISA a 450 nm. La concentrazione di hBD2 è stata quindi determinata estrapolando il valore ottenuto sulla curva standard ed espressa in pg/ml, mentre la concentrazione di HNP1-3 è stata quindi determinata estrapolando il valore ottenuto sulla curva standard ed espressa in ng/ml.

2.1.2.3 RISULTATI

Misurazione livelli sierici di hBD2

Sono stati consecutivamente raccolti 88 campioni di sangue di funicolo da altrettanti neonati al momento della nascita. Sono stati esclusi 6 neonati per sofferenza fetale (2 neonati), sindrome da aspirazione di meconio (2 neonati), infezioni congenite (2 neonati).

Sono stati analizzati i campioni derivanti da 82 neonati le cui caratteristiche cliniche e demografiche sono riportate in Tabella 7. I livelli di defensine misurati in questi soggetti sono stati utilizzati per costruire le curve di normalità riportate nella Figura 12.

L'analisi di regressione lineare con metodo stepwise per la selezione delle variabili ha escluso che gestosi materna, PROM, età gestazionale, gemellarità, caratteristiche del liquido amniotico alla nascita, etnia, sesso, indice di Apgar, parametri auxologici, abbiano influenzato le concentrazioni sieriche di hBD2 misurate su sangue di funicolo ombelicale alla nascita. Mediante l'analisi di Spearman è stata evidenziata la correlazione tra concentrazioni sieriche di hBD2 su sangue proveniente dal moncone ombelicale alla nascita e modalità di parto ($r=0,3$). I livelli di hBD 2 dosati su sangue di funicolo ombelicale alla nascita di soggetti nati da parto spontaneo sono risultati significativamente maggiori (media 122.7 pg/ml, SD 4.6) dei nati mediante taglio cesareo (media 107.5 pg/ml, SD 5.5)($p=0.038$) (Figura 13).

Misurazione livelli sierici di HNP1-3

Sono stati consecutivamente arruolati 66 gestanti e 66 neonati. Sono stati esclusi 2 neonati e le rispettive madri per infezioni congenite. Sono stati analizzati i campioni derivanti da 64 neonati e 64 madri le cui caratteristiche cliniche e demografiche sono riportate in Tabella 7bis. I valori ottenuti sono stati considerati per costruire curve di normalità riportate nella Figura 14. L'analisi di regressione lineare con metodo stepwise per la selezione delle variabili ha escluso che gestosi materna, PROM, età gestazionale, tipo di parto, gemellarità, caratteristiche del liquido amniotico alla nascita, etnia, sesso, parametri auxologici, abbiano influenzato le concentrazioni sieriche di HNP1-3 misurate su sangue di funicolo ombelicale alla nascita. I valori dosati su sangue materno al momento del parto non sono risultati significativamente diversi da quelli dei neonati alla nascita ed a 28 giorni di vita (Figura 15). L'analisi di Spearman ha evidenziato la correlazione tra concentrazioni sieriche di HNP1-3 su sangue materno e tipo di parto ($r=0,3$). Tali valori sono sovrapponibili a quelli riportati in letteratura per il soggetto adulto (88). I livelli di HNP1-3 dosati su sangue venoso materno durante il parto sono risultati significativamente maggiori nelle donne in travaglio (media 594.6 ng/ml, SD 36.3) rispetto a quelle fuori travaglio (media 245.3 ng/ml, SD 25.7) ($p=0.007$) (Figura 16).

2.1.2.4 SIGNIFICATO DEI RISULTATI DELLA RICERCA

Le conoscenze riguardo le modalità di risposta delle diverse componenti del sistema immune in epoca neonatale restano ancora in gran parte da definire. Mentre sembra abbastanza chiaro il deficit a carico dell'immunità adattativa, particolarmente per la parte Th1-mediata, dati contrastanti derivano dallo studio dell'immunità innata (36,67,68). I neutrofili e le altre cellule dell'immunità innata sono capaci di produrre peptidi antimicrobici che giocano un ruolo cruciale nella protezione del neonato dalle infezioni. La dimostrazione che i livelli di α - e β -defensine sieriche siano simili a quelli dell'adulto sin dalla nascita dimostra che l'espressione di questi componenti dell'immunità innata è già matura sin dalle primissime epoche della vita. Considerata la particolare importanza di possedere difese pronte al passaggio da un ambiente sterile a quello extrauterino, in attesa del completamento dello sviluppo della componente adattativa, il ruolo dei peptidi antimicrobici, come le defensine, è cruciale nell'ambito della risposta immune. L'immunità innata possiede la capacità di contrastare potenziali infezioni bloccando l'ingresso dei microrganismi nei tessuti prima dell'attivazione della componente adattativa. L'immunità innata è in grado di riconoscere un'ampia varietà di microrganismi: batteri Gram positivi e Gram negativi, lieviti e virus. E' ipotizzabile che i peptidi dell'immunità innata in epoca neonatale per le loro caratteristiche di pronta disponibilità giochino un ruolo da protagonista durante la colonizzazione delle mucose alla nascita. È possibile speculare che il travaglio di parto rappresenti un momento cruciale per innescare la risposta immune innata nel feto per prepararlo al contatto con l'ambiente esterno contaminato da un'ampia varietà di microorganismi. Variazioni delle concentrazioni

sieriche di α - e β -defensine correlate ad eventi quali la modalità di parto, la rottura prematura delle membrane, la nascita pretermine potrebbero rappresentare il razionale della diversa suscettibilità alle infezioni tra le diverse categorie di neonati (30).

2.2 FASE B. STUDIO DEL POSSIBILE RUOLO PATOGENETICO DI ALTERAZIONI DELL'IMMUNITÀ INNATA NELLO SVILUPPO DI MALATTIE INFIAMMATORIE CRONICHE INTESTINALI IN ETÀ PEDIATRICA.

Genotipo e funzione delle β -defensine e della lectina legante il mannanio

Le MICI, classicamente distinte in MC e RCU, costituiscono un problema di crescente rilevanza clinica in pediatria per il significativo e progressivo aumento di incidenza (89). L'incidenza attuale in età pediatrica è stimata intorno a 8-10 nuovi casi per 100000 per anno (90). Nel nostro Paese il numero di nuove diagnosi/anno in età pediatrica è aumentato di oltre 10 volte dal 1979 ad oggi con una netta prevalenza di MC. L'eziologia della MC è ancora poco nota, l'ipotesi attualmente più condivisa è quella di un disordine ad eziologia multifattoriale al cui sviluppo concorrono fattori endogeni (predisposizione genetica) e fattori esogeni (microrganismi, sostanze antigeniche) in grado di indurre e perpetuare a livello intestinale (e in alcuni casi anche a livello di altri apparati) uno stato infiammatorio (91,92). Il principale fattore di rischio in età pediatrica è costituito dalla presenza nel gentilizio di un parente di primo grado affetto da MICI (91-95). Infatti nel 10-25% delle famiglie di pazienti con MICI è possibile identificare altri membri affetti, ed è stato calcolato che un fratello di un paziente affetto da MC ha un rischio 30 volte maggiore, rispetto alla popolazione generale, di sviluppare tale tipo di patologia. Diversi studi dimostrano inoltre una concordanza fenotipica in pazienti con MICI appartenenti alla stessa famiglia. In particolare, in famiglie con ≥ 2 membri affetti da MC è stata dimostrata una concordanza dell'86% per quanto riguarda la

localizzazione intestinale e dell'82% per quanto riguarda le manifestazioni cliniche più comuni della malattia. È stato proposto un meccanismo di "anticipazione genetica" in relazione a forme molto precoci di MICI in figli di genitori affetti da MC: bambini affetti da MC figli di genitori con MC sviluppano spesso i sintomi molti anni prima dei loro genitori (91-94). Studi su gemelli con MICI forniscono ulteriori prove di una predisposizione genetica: è stato dimostrato che gemelli monozigoti sviluppano MC con una concordanza del 30-50%. Più volte è stata ipotizzata l'esistenza di loci di predisposizione per la MC (91-96). Recentemente è stato dimostrato che la MC può associarsi a polimorfismi a carico del gene *Nod-2/CARD15* in posizione 16q12. Diversamente da molti altri geni chiamati in passato in causa nella patogenesi delle MICI, il gene *Nod-2/CARD15* sembra avere una funzione più definita: codifica per una proteina essenziale nella gestione del 'fisiologico rapporto' tra sistema immunitario e flora batterica intestinale. La proteina CARD15 infatti è in grado di legare componenti della parete batterica e di attivare il fattore nucleare NFκB, molecola chiave nella patogenesi dei processi flogistici (97). Più recentemente, l'espressione di *Nod2/CARD15* è stata riscontrata in prossimità delle cellule intestinali di Paneth e sembra influenzarne la capacità di secernere molecole antibatteriche in risposta a microrganismi presenti nel lume intestinale o a loro prodotti (lipopolisaccardi, peptidoglicani, DNA) (98). Mutazioni a carico di questo gene si riscontrano in eterozigosi nel 10-30% ed in omozigosi nel 3-15% dei pazienti affetti da MC. Sia per la RCU che per la MC sono stati identificati numerosi loci di suscettibilità su più della metà dei cromosomi incluso il cromosoma X (Tabella 8). Queste evidenze hanno aperto nuove prospettive per lo studio dei meccanismi alla base di tali affezioni ma non sono sufficienti ancora per

comprendere interamente la complessa patogenesi delle MICI. Accanto ad una predisposizione generica altri dati della letteratura permettono di ipotizzare la presenza di fattori presenti nel lume intestinale in grado di consentire lo sviluppo della malattia. I dati epidemiologici sembrano in accordo con un modello di malattia in cui un ipotetico agente infettivo esplica un ruolo patogenetico in soggetti geneticamente predisposti. Molti microrganismi, sia di tipo virale che batterico, sono stati chiamati in causa nella patogenesi della MC, ma nessuno di essi è stato riconosciuto come agente causale specifico. Alternativamente i pazienti con MC potrebbero produrre un'esaltata risposta infiammatoria verso batteri o componenti batterici presenti nel lume intestinale che sono normalmente tollerati da soggetti sani. Molti studi sono stati effettuati sulla composizione della microflora intestinale del paziente con MICI segnalando in più di una occasione differenze qualitative e quantitative per quanto riguarda diverse specie batteriche. Al contrario i dati più recenti pongono in evidenza più che differenze qualitative a carico della microflora intestinale, una maggiore aderenza della flora batterica all'epitelio in soggetti con MC. Questo aspetto rende difficile poter spiegare lo stato di infiammazione cronica riscontrato in questo disordine solo sulla base di una alterazione dei meccanismi di controllo della risposta immunitaria (99). In questo scenario diventa essenziale fare luce sul ruolo nell'immunità innata dei peptidi antimicrobici prodotti dalla mucosa intestinale per definire i momenti patogenetici fondamentali della MC. Un deficit di produzione o di funzione di questi peptidi antimicrobici potrebbe favorire una graduale e persistente penetrazione di batteri componenti la flora batterica intestinale stimolando ed alimentando il processo infiammatorio cronico. I peptidi antimicrobici più importanti sono rappresentati dalle defensine (39,78). Le defensine

sono peptidi cationici che rappresentano una componente essenziale dell'immunità innata. Sulla base della distribuzione tissutale e della loro struttura terziaria le defensine umane si distinguono in α - e β -defensine. Le α -defensine, rilasciate dai neutrofili e dalle cellule di Paneth, sono preposte alla difesa antimicrobica a livello intestinale. In modelli animali sperimentali, mutazioni del gene per le α -defensine comportano attenuazione o talvolta perdita di attività microbica nei confronti di molte specie batteriche. Nell'uomo non ci sono dati riguardo la presenza di mutazioni a carico dei geni codificanti per le defensine. L'espressione delle β -defensine è limitata alle cellule epiteliali e ai cheratinociti. Ne deriva che le β -defensine costituiscono la prima linea di difesa contro patogeni a livello delle barriere mucosali dell'intero organismo. I geni della famiglia delle defensine sono tutti localizzati sul cromosoma 8, a livello della regione p22-23.1, e codificano per peptidi che nella forma attiva sono costituiti da 28-44 amminoacidi e hanno peso molecolare di 3-5 kD (99). Recentemente alcuni autori hanno verificato un'alterata espressione a carico di diversi geni che precedentemente non erano stati associati alle MICI, fra i quali le α -defensine HD5 e HD6. In particolare le defensine HD5 e HD6 risultano indotte nella mucosa di pazienti con MICI. L'induzione di HD6 ma non quella di HD5 è specifica per le MICI poiché non si osserva in altre forme di coliti come quelle infettive. Le alterazioni a carico delle β -defensine sono ancora più interessanti per la differente espressione mucosale rilevata tra MC e RCU (100). È stato dimostrato che la β -defensina hBD1 è espressa costitutivamente a livello dell'epitelio intestinale di soggetti normali e di pazienti con MICI. L'espressione di hBD1 aumenta sia nella MC che nella RCU. La β -defensina hBD2 è espressa a livello del colon durante stati di infiammazione inclusa la RCU, ma, sorprendentemente,

nelle porzioni di mucosa infiammata di pazienti con MC si evidenzia una ridotta espressione di hBD2. Si può ipotizzare che nei soggetti con MC vi sia una ridotta espressione o una produzione di defensine anomale che rende difettosa la barriera antimicrobica mucosale. In tabella 10 è indicato lo spettro d'azione delle hBD. Il deficit di defensine potrebbe condurre ad una moderata ma persistente invasione batterica che innesca e alimenta il processo infiammatorio. Ciò costituirebbe una spiegazione ragionevole e plausibile della perdita di tolleranza nei confronti della flora batterica intestinale aderente alla mucosa che si osserva nella MC. Numerosi studi hanno dimostrato variazioni della concentrazione di tali peptidi in campioni biotici intestinali provenienti da pazienti con MICI (Tabella 9). Anche altri peptidi antimicrobici, oltre le defensine, potrebbero essere coinvolti nella patogenesi delle MICI ad esempio la mannan binding lectin (MBL). L'MBL è una lectina di tipo C con un dominio simile al collagene codificata da un gene localizzato in posizione 10q11.2 e caratterizzata da una elevata affinità per i domini ricchi di mannosio tipici delle superfici microbiche (101). L'MBL è in grado di legarsi ad un'ampia varietà di batteri ed altri microrganismi, neutralizzandoli e/o attivando un pathway che conduce alla loro opsonizzazione. Numerosi polimorfismi del gene sono stati identificati (101). E' stato recentemente dimostrato che una combinazione di polimorfismi omozigoti o eterozigoti dell'esone 1 del gene associata a specifici polimorfismi del promotore conduce ad un decremento dei livelli di MBL plasmatici. Si è ipotizzato che la riduzione o l'assenza di MBL nel plasma possa alterare i meccanismi di difesa immunitari mediati dal mannano. Un'alterazione della espressione e della struttura dell'MBL potrebbe dunque essere coinvolta nella suscettibilità alle infezioni nei pazienti con MICI (102). Acquisire maggiori

informazioni sulla funzione e sulla regolazione dell'espressione di tali peptidi a livello intestinale, per comprenderne il ruolo di microbici, microbistatici o chemioattraenti rappresenta un aspetto chiave che consentirebbe di chiarire aspetti cruciali della patogenesi della MC.

2.2.1. OBIETTIVI:

Definire il genotipo di β -defensine ed MBL di bambini affetti da MICI con lo scopo di individuare una possibile relazione tra il genotipo dei soggetti con MICI ed il fenotipo clinico della malattia.

2.2.2 METODOLOGIA

Studio multicentrico nazionale che ha coinvolto 3 Centri di III° livello di Gastroenterologia Pediatrica italiani nell'ambito della Società Italiana Gastroenterologia ed Epatologia Pediatrica.

Popolazione

L'indagine genetica è stata condotta su un campione di soggetti comprendente controlli sani e pazienti con MICI di età compresa tra i 6 e i 18 anni. E' stato ottenuto il consenso informato scritto da parte dei genitori (o dei tutori) e dai pazienti stessi. Sono stati considerati criteri di esclusione l'età inferiore a 6 anni o superiore a 18, presenza di immunodeficienze, fibrosi cistica, neoplasie, assenza di consenso informato.

Raccolta dati clinici

Lo studio ha previsto la compilazione di un'apposita scheda di raccolta dati, nella quale sono state riportate informazioni relative alle caratteristiche demografiche dei pazienti arruolati, alla localizzazione/estensione della malattia, alla presenza e al tipo di manifestazioni extraintestinali, ai risultati dei test di laboratorio e strumentali, alla necessità di intervento chirurgico e alla terapia pregressa ed in atto.

Raccolta campioni biologici, estrazione DNA ed analisi molecolare

In data riportata sulle suddette schede è stato raccolto per ciascun paziente un campione di 8 ml sangue intero mediante prelievo venoso. Il campione è stato conservato in EDTA alla temperatura di -20°C. La genotipizzazione è stata realizzata attraverso un procedimento articolato in quattro fasi. Il DNA è stato estratto mediante kit presenti in commercio. Sono stati adoperati primers per amplificare tutti gli esoni nell'ambito del medesimo protocollo di PCR. L'analisi delle sequenze è stata effettuata con procedura automatizzata mediante Genetic Analyzer. Tutti i frammenti sono stati sequenziati adoperando gli stessi primers adoperati per l'amplificazione. Le sequenze ottenute nei pazienti con MC e nei familiari di primo grado di pazienti con MC sono state comparate con quelle di soggetti sani controllo e con quelle di pazienti affetti da altre condizioni infiammatorie intestinali (colite infettive o allergiche) precedentemente valutate e archiviate nel nostro data-base.

Estrazione del DNA e quantizzazione

In questa fase il DNA viene isolato e purificato a partire dai leucociti del sangue periferico. Il processo viene effettuato utilizzando appositi kit disponibili in commercio.

Il campione di sangue periferico è trasferito in un flacone sterile graduato da 50 ml riportante i parametri identificativi del paziente. Partendo dal volume iniziale di sangue utilizzato vengono aggiunti 4 volumi del reagente A (disponibile nel kit commerciale). Questa prima operazione permette di ottenere la lisi cellulare. Il campione viene quindi centrifugato a 2500 gpm per 5 minuti e viene poi allontanato il sovrnatante.

Al pellet vengono quindi aggiunti 2 ml del reagente B, si ottiene una sospensione che viene trasferita in un tubo di polipropilene da 15 ml riportante il codice identificativo di ogni paziente. Dopo aver incubato il campione per 10 minuti alla temperatura di 37°C (al fine di garantire il completo scioglimento del pellet), si aggiunge del perclorato di Na (nel kit) per consentire la depolimerizzazione. Si procede con l'aggiunta di 2 ml di cloroformio e quindi della resina in alcool. Dopo aver centrifugato a 2500 gpm per tre minuti, il sovrnatante viene trasferito in un nuovo tubo da 15 ml riportante i codici identificativi. Si aggiungono 2 volumi di etanolo assoluto freddo. Si mescola per inversione fino alla formazione del precipitato. La "nuvola di DNA" così ottenuta viene raccolta mediante una pipetta Pasteur in vetro (l'estremità viene chiusa mediante il contatto con una fiamma). Il DNA raccolto viene lasciato in agitazione per una notte alla temperatura di 4°C in Eppendorf contenenti 500 µl di H₂O. Quando la nuvola di DNA è completamente disciolta possono essere preparate le aliquote per le fasi successive.

Amplificazione del DNA mediante PCR

La PCR è una tecnica utilizzata per amplificare selettivamente una piccola regione genomica delimitata da due sequenze specifiche. Le tre fasi fondamentali di una PCR sono la denaturazione, l'appaiamento e la depolimerizzazione: i due filamenti della molecola di DNA vengono separati e fatti poi riassociare in presenza di un eccesso di due oligonucleotidi sintetici che rappresentano le sequenze estreme della regione che si vuole amplificare. Per lo studio delle defensine e dell'MBL sono stati utilizzati come primers sequenze introniche localizzate nei siti di giunzione con gli esoni da sequenziare. L'eccesso di oligonucleotidi causa la tendenza dei due originari filamenti ad appaiarsi con gli oligonucleotidi stessi invece che tra loro, aumentando vertiginosamente il numero di copie ad ogni ciclo. Ai fini dello studio è stata effettuata una PCR multiplex, che prevede per ogni campione la preparazione di due mix di reazione contenenti i primers biotinilati, la Taq Polimerasi, i nucleotidi terminators marcati con fluorocromi. A ciascun mix si aggiungono aliquote di DNA diluito. Si utilizza un controllo negativo.

Le provette così allestite sono inserite in un termal cycler e viene attivato il programma di amplificazione dopo aver impostato la temperatura (per indurre le denaturazioni) e il numero di cicli da eseguire.

Sequenziamento automatico

Il sequenziatore automatico preleva il prodotto della PCR di sequenziamento e lo sottopone ad elettroforesi all'interno di un capillare. Un raggio laser colpisce il capillare eccitando la fluorescenza dei fluorocromi che lo attraversano. Ciascuno dei

quattro diversi fluorocromi emette una diversa lunghezza d'onda, una cellula fotoelettrica rileva i segnali fluorescenti che vengono memorizzati e li registra in forma grafica.

Interpretazione dell'elettroferogramma

Si ottiene un tracciato in cui la sequenza dei picchi corrisponde alla sequenza dei nucleotidi. Il tipo (colore) del picco corrisponde ad una determinata base azotata.

2.2.3 RISULTATI

Nell'anno 2006 sono stati arruolati complessivamente 156 soggetti che sono stati suddivisi in due gruppi. Il gruppo dei controlli comprendeva un totale di 100 di soggetti sani in età pediatrica (età compresa tra 6 e 18 anni) tutti con storia familiare negativa per le MICI. Il gruppo dei pazienti comprendeva invece 56 bambini dei quali 22 con diagnosi di RCU e 24 con diagnosi di MC. In tabella 11 sono riportate le principali caratteristiche cliniche dei pazienti arruolati.

Ottenuti tutti i campioni ematici è stato possibile procedere alle indagini molecolari e all'analisi statistica dei dati.

Identificazione dei polimorfismi di singoli nucleotidi (SNP) nei geni in hBD1, hBD2, hBD3, hBD4 e MBL

I geni che codificano per le quattro defensine studiate sono localizzati sul cromosoma 8p22-p23. Le sequenze delle defensine hBD2 (DEFB4), hBD3 (DEFB103) e hBD4 (DEFB104) appartengono ad un cluster alla distanza di circa 600 kb da hBD1 (DEFB1) che include anche i geni delle α -defensine. Tale cluster genico rappresenta una regione

di 240 kb ricca di unità ripetute in cui è stata dimostrata l'esistenza di più copie geniche delle β -defensine (da 2 a 12 copie dei geni in un genoma diploide). Sebbene vi sia un numero elevato di copie in molti casi si tratta di pseudogeni, cioè di sequenze codificanti i cui trascritti sono interrotti da prematuri codoni di stop. Il pattern dei geni delle beta defensine mostra un'organizzazione comune. La struttura genomica consiste di due esoni e un introne. In tutte le defensine, ad eccezione della hBD1, il primo esone codifica per il peptide segnale, il secondo per una breve sequenza anionica eliminata con il clivaggio della proteina, il propeptide, mentre il secondo esone contiene le informazioni della porzione proteica matura. In hBD1 la sequenza segnale e il propeptide si ritrovano nel primo esone. Per quanto riguarda MBL, sono stati analizzati il promoter e l'esone 1 del gene MBL2 che mappa sul cromosoma 10 (il gene MBL1 è uno pseudogene).

L'identificazione dei polimorfismi è stata ottenuta mediante amplificazione con PCR e sequenziamento dei due esoni e delle giunzioni esone/introne. I nucleotidi sono stati numerati in base alle sequenze note disponibili in banche geniche, indicando con nucleotide 1 il primo nucleotide dell'esone 1.

Il maggior numero di polimorfismi è stato riscontrato nelle sequenze esoniche dei geni hBD1, hBD2 e hBD4. Nel caso del gene hBD1, SNPs sono state identificate prevalentemente a livello delle regioni non tradotte del trascritto primario (5'UTR e 3'UTR) e a livello delle giunzioni esone/introne¹. In totale sono state osservati 8 polimorfismi. Nel gene hBD2 invece sono coinvolte prevalentemente le sequenze che codificano per il preprosegmento idrofobico essenziale per la processazione della proteina e le sequenze di giunzione esone/introne². Anche hBD2 si presenta altamente polimorfico, essendo stati individuati sia nei pazienti che nei controlli ben 10 SNPs.

hBD3 è il gene con il minor numero di SNP, ne sono state identificate solo due sul secondo esone. L'analisi del gene hBD4 invece ha permesso di ottenere i risultati più interessanti sia per il numero elevato di polimorfismi sia per l'esito delle indagini statistiche eseguite per valutare una eventuale associazione con la malattia. Le regioni in cui si localizzano gli SNPs coinvolgono praticamente tutto il gene: le giunzioni esone/introne, le preprosequenze e la sequenza che codifica per la porzione matura della proteina. Attraverso il sequenziamento del gene della MBL sono state identificati sei polimorfismi, due nel promoter e 4 sul primo esone. Nessun nuovo polimorfismo è stato identificato confrontando i risultati ottenuti con quelli derivanti da sequenziamenti effettuati in precedenti studi.

Polimorfismi di hBD1-4 e MBL : frequenze nella popolazione di affetti e confronto con la popolazione dei controlli in relazione alla malattia.

Nelle tabelle 12-15 sono riportate le frequenze dei polimorfismi osservati nella popolazione di controllo e negli affetti. La frequenza è descritta distinguendo tra MC e RCU per quanto riguarda la malattia e tra omozigoti, eterozigoti e wild type per quanto riguarda i siti polimorfici. Mediante il sistema SPSS 14.0 per Windows è stato applicato alle classi di frequenza il test del chi-quadro per valutare la presenza di associazioni statistiche tra MICI e mutazione (p1) e tra mutazione e tipo di malattia (p2). Come riportato nelle tabelle, un polimorfismo di hBD1 (1-113 C/T), due in hBD2 (81+160 insT, 319+26G/A) e ben 10 per hBD4 sono risultati in associazione statisticamente significativa con le MICI. Nessun polimorfismo però è stato associato

ad un particolare tipo di malattia (CD e RCU). Nessuna differenza statisticamente significativa (p_1, p_2) è stata dimostrata per MBL.

Relazione genotipo/caratteristiche di malattia

Sono stati applicati diversi test statistici per ricercare eventuali associazioni tra polimorfismi e caratteristiche di malattia. La ricerca ha avuto esito negativo per la maggior parte degli SNPs studiati. Un'associazione statisticamente significativa è stata riscontrata tra il polimorfismo hBD4114C/A e la necessità di intervento chirurgico. Lo stesso sito risulta associato in presenza di polimorfismo.

La ricerca di correlazioni con la terapia ha mostrato che la mutazione hBD4285+13 G/T è in correlazione inversa con la necessità di ricorrere ad AZA, mentre la mutazione hBD4 73-192 è correlata positivamente all'uso dello stesso farmaco.

Nessuna associazione statisticamente significativa è stata dimostrata tra caratteristiche di malattia e MBL.

2.2.4 SIGNIFICATO DEI RISULTATI DELLA RICERCA

La patogenesi delle MICI non è ancora completamente definita. Queste patologie sono caratterizzate da alterazione dei processi infiammatori, di riparazione cellulare e di interplay con i normali costituenti della microflora intestinale (91,92).

I dati ottenuti in questa tesi sperimentale sono i primi disponibili circa la genetica delle defensine in pazienti pediatriche affette da MICI. La significativa maggiore prevalenza di polimorfismi a carico delle beta defensine riscontrata nella popolazione dei pazienti MICI rispetto ai controlli sani supporta l'ipotesi dell'importante ruolo del background genetico nello sviluppo di queste condizioni. E' noto che il maggiore fattore di rischio per lo sviluppo delle MICI è la presenza di un familiare di primo grado affetto. Questo dato insieme all'evidenza che modelli animali germ-free non sviluppano MICI ma che il successivo contatto con costituenti della microflora intestinale determina infiammazione cronica a livello intestinale in animali geneticamente predisposti suggerisce anche un ruolo di un difettoso interplay con i germi presenti nel lume intestinale.

I polimorfismi riscontrati a carico dei geni che codificano per le principali β -defensine espresse a livello intestinale sono a carico di regioni essenziali per la normale sintesi ed espressione di questi peptici antimicrobici a livello della mucosa intestinale. Studi di espressione tissutale in frammenti biopsici intestinali di bambini affetti da MICI sono attualmente in corso nei nostri laboratori. Ma già i dati in nostro possesso attualmente sono sufficienti per poter ipotizzare un ruolo decisivo di mutazioni a carico di questi componenti dell'immunità innata nello sviluppo delle MICI. Infatti, conoscendo il ruolo biologico delle β -defensine nella regolazione dei processi infiammatori

(mediante, in parte, l'interazione con NF- κ B), dei processi di riparazione cellulare, e nell'interplay con i costituenti della microflora intestinale, è facile ipotizzare che le mutazioni riscontrate in questo studio potrebbero costituire un fattore predisponente decisivo per lo sviluppo delle MICI.

Ulteriori studi sono necessari per valutare in maniera ancora più approfondita il peso biologico delle mutazioni riscontrate a carico dei geni che codificano per le defensine attraverso studi di espressione tissutale e di verifica in vitro dell'attività antimicrobica delle defensine mutate.

3. ANALISI STATISTICA DEI DATI

Le variabili categoriche sono state analizzate mediante il test del chi-quadro o i test esatti. Per dimostrare la correlazione tra due variabili continue è stato utilizzato il test di correlazione di Spearman. Le variabili continue sono state analizzate mediante T-test, Mann-Whitney U ed Kruskal-Wallis H test. Il rapporto tra variabile dipendente e le variabili indipendenti è stato analizzato volta per volta mediante regressione lineare con metodo stepwise per la selezione delle variabili. La concordanza tra la diagnosi definitiva (Sepsi vs. altre categorie), i criteri clinici e i valori di Clp (normali/patologici) è stata calcolata mediante il test K di Cohen. Per il calcolo del valore ottimale di cut-off e dell'accuratezza diagnostica, sono state costruite curve ROC.

Come software per l'analisi statistica e la rappresentazione grafica dei risultati sono state impiegate le più recenti versioni dei seguenti software: SPSS for Windows, StatsDirect, SamplePower, GraphPad.

4.CONCLUSIONI e DISCUSSIONE

I dati ottenuti durante il Corso di Dottorato in Riproduzione, Sviluppo ed Accrescimento dell'Uomo e riportati in questa tesi costituiscono un significativo progresso nelle conoscenze di alcuni aspetti dell'immunità innata in età pediatrica. Lo studio dei livelli di Clp sierica nei neonati normali e in quelli affetti da patologia infettiva e non infettiva ha permesso di verificare l'utilità della misurazione delle concentrazioni sieriche di Clp per la diagnosi tempestiva di sepsi e per la diagnosi differenziale con altre condizioni di natura non infettiva in epoca neonatale. Questi risultati sono stati oggetto di un lavoro scientifico attualmente in corso di pubblicazione sulla rivista *Pediatrics*, organo ufficiale dell'Accademia Americana di Pediatria, ed hanno aperto la strada alla realizzazione industriale di nuovi dispositivi diagnostici ultrarapidi che potranno essere presto utilizzati in campo clinico. Sono stati infatti avviati contatti con 2 aziende produttrici di dispositivi diagnostici per la realizzazione di kit appositamente "tarati" sui valori normali e patologici ottenuti in questi anni di studi e ben presto tali dispositivi saranno disponibili per un ampio uso clinico.

La definizione dei livelli sierici di alcune componenti dell'immunità innata (hBD2 e HNP1-3) ha permesso di acquisire conoscenze utili a spiegare le differenze esistenti riguardo al rischio infettivo tra bambini nati da parto spontaneo e da taglio cesareo. Questi dati permettono di individuare possibili target per un intervento nutrizionale in grado di correggere le differenze e quindi capace di prevenire l'insorgenza di severe infezioni in campo neonatale. Sono infatti in fase avanzata di

programmazione studi su modelli cellulari e animali per meglio individuare gli effetti ed i meccanismi di regolazione del possibile ruolo di nutrienti sulla maturazione dell'immunità innata.

Lo studio del genotipo delle defensine e del MBL rappresenta un naturale sviluppo di questi studi e ha permesso di approfondire le conoscenze sulla patogenesi delle malattie infiammatorie croniche intestinali in età pediatrica. Una parte di tali risultati è stata descritta in un lavoro scientifico inviato per la revisione alla rivista *Inflammatory Bowel Disease*. Questi dati costituiscono da un lato un presupposto scientifico essenziale per l'individuazione di possibili target diagnostici e terapeutici dall'altro costituiscono un utile modello sperimentale per poter meglio definire la fisiopatologia di altre condizioni patologiche potenzialmente connesse ad un difetto dell'immunità innata come le infezioni, le allergie e le intolleranze alimentari.

In conclusione, durante il Dottorato di Ricerca in Riproduzione Sviluppo e Accrescimento dell'Uomo svolto presso il Dipartimento di Pediatria dell'Università degli Studi di Napoli Federico II, è stato possibile ideare e realizzare le ricerche scientifiche riportate in questa tesi grazie all'integrazione di competenze diverse quali la pediatria clinica, la genetica, la microbiologia, l'immunologia, l'anatomia patologica e la statistica medica. Tale rete di competenze costruita durante questi studi è ora pronta per lo sviluppo ulteriore di questo e altri temi di ricerca clinica e di base in età pediatrica.

5.TABELLE E FIGURE

Tabella 1. Modalità della terapia antibiotica impiegata nel corso dello studio

<i>Farmaco (Principio attivo)</i>	<i>Età post-concezionale (settimane)</i>	<i>Dose (mg/kg/dose)</i>	<i>Intervallo (ore)</i>
Ampicillina	Tutte	50-100	12
Gentamicina	≤ 33	5	12
	> 34	5	8
Teicoplanina	Tutte	10	24
Meropemen	Tutte	3-8	8
Cefotaxime	Tutte	50-100	12
Vancomicina	≤ 29	10-15	18
	30-36	10-15	12
	≥ 37	10-15	12
Amfotericina B	Tutte	1-5	24

Tabella 2. Principali caratteristiche demografiche e cliniche alla nascita dei neonati arruolati durante la Fase 1

	<i>Controlli sani</i> (n=130)	<i>Patologie non infettive</i> (n=16)	<i>Sepsi</i> (n=7)	P
Peso alla nascita (g)	3190 (525)	3025 (310)	3300 (790)	0,321
Età gestazionale (settimane)	39 (1)	38 (1,8)	40 (2)	0,168
Maschi	46,8%	62,5%	16,7%	0,153
Fattori di rischio di sepsi precoce*	10,8%	6,3%	57,1%	0,001
Parto spontaneo	15,4%	12,5%	57,1%	0,01

Dati espressi come mediana (IQR) quando non specificato.

*Neonati con almeno un fattore di rischio materno (PROM, Febbre materna, corioamnionite, infezione per sepsi ad esordio precoce).

Tabella 3. Principali caratteristiche demografiche e cliniche dei neonati arruolati durante la Fase 2

	<i>Controlli sani (n=26)</i>	<i>Patologie non infettive (n=29)</i>	<i>Sepsi accertata (n=28)</i>	<i>Sepsi clinica (n=41)</i>	P
Peso alla nascita (g)	2890 (1305)	1750 (1190)	2400 (1780)	2960 (1100)	0,240
Età gestazionale (settimane)	36 (4)	35 (3)	34 (7)	36 (4)	0,325
Maschi	57,7%	48,4%	67,7%	60,5%	0,55
Tipo di parto (PS)	15,4%	16,1%	33,3%	23,3%	0,43
Presenza catetere centrale	26,9%	38,7%	51,9%	44,2%	0,135

Dati espressi come mediana (IQR) quando non specificato.

Tabella 4. Comparazione dell'accuratezza diagnostica di differenti indici infiammatori per la diagnosi di sepsi neonatale ad esordio tardivo

	Sensibilità	Specificità	VPP	VPN	Likelihood ratio (+ test)
Conta globuli bianchi	5 (1-14)	94 (85-98)	57 (18-90)	45 (35-54)	1,08
Rapporto I/T	40 (30-50)	80 (75-90)	80 (60-90)	48 (40-65)	2,95
Conta Piastrinica	45 (40-68)	78 (60-85)	60 (52-77)	41 (28-49)	2,98
PCR	43 (31-55)	87 (75-94)	81 (64-92)	54 (43-65)	3,35
Calprotectina sierica	90 (80-95)	82 (70-91)	86 (76-93)	87 (75-94)	5,13

Legenda. Conta piastrinica, VPP: valore predittivo positivo; VPN: valore predittivo negativo.
 Cut-off : Conta globuli bianchi $4.0-25.0 \times 10^3/\text{mm}^3$; conta piastrinica $50.0-500.0 \times 10^3/\text{mm}^3$;
 Rapporto I/T >0.2 ; PCR $> 10 \text{ mg/L}$; Calprotectina $> 1,9 \text{ mg/L}$.

Tabella 5. Principali caratteristiche demografiche e cliniche dei neonati arruolati durante la Fase 3

	<i>Controlli</i> (n=19)	<i>Neonati con Meningite</i> (n=5)	p
Peso alla nascita (g)	2020 (1315)	2100 (2050)	0,240
Età gestazionale (settimane)	35 (5)	33 (10)	0,325
Maschi	52%	60%	0,168

Dati espressi come mediane (IQR) quando non specificato

Tabella 6. Caratteristiche dell'esame liquorale

	<i>Controlli</i> (n=19)	<i>Neonati con</i> <i>Meningite</i> (n=5)	P
Conta Cellule (n/ml)	4 (2)	120 (260)	< 0,0001
Glicorrachia (g/dL)	55 (25)	31 (27)	0,05
Rapporto Glicorrachia/Glicemia	0,7 (0,3)	0,43 (0,3)	0,05
Proteinorrachia (g/L)	103 (54)	150 (120)	0,05

Dati espressi come mediane (IQR)

Tabella 7. Caratteristiche demografiche dei neonati per i quali sono stati determinati i valori sierici su sangue cordonale di hBD2

<i>Caratteristica</i>	
N	82
Maschi, n (%)	41 (50)
Età gestazionale, settimane	38,8 (38,5-39,1)
Peso alla nascita, g	3278 (3183-3372)
Lunghezza, cm	50,2 (49,7-50,6)
Circonferenza cranica, cm	34,4 (34,0-34,7)
Tipo di parto, n parti spontanei (%)	42 (51)
Punteggio di Apgar a 1'	8,8 (8,7-8,9)
Punteggio di Apgar a 5'	9,6 (9,5-9,7)
Gemellarità, n (%)	4 (4,9)
Gestosi, n (%)	5 (4,8)
PROM > 18 ore	1 (1,0)

Note. I dati sono espressi come medie (95° intervallo di confidenza) se non specificato

Tabella 7 bis. Caratteristiche demografiche dei neonati per i quali sono stati determinati i valori sierici su sangue cordonale di HNP1-3

<i>Caratteristica</i>	
N	64
Maschi, n (%)	31(48,4)
Età gestazionale, settimane	38,9 (38,6-39,2)
Peso alla nascita, g	3254 (3145-3363)
Lunghezza, cm	49,8 (49,3-50,3)
Circonferenza cranica, cm	34,4 (34-34,7)
Parto spontaneo, n (%)	31 (48,4)
Liquido tinto, n (%)	2 (3,1)
Apgar a 1'	8,8 (8,7-8,9)
Apgar a 5'	9,6 (9,5-9,7)
Gemellarità, n (%)	2 (3,1)
Gestosi, n (%)	2 (3,1)
PROM>18 ore, n (%)	1 (1,6)

Note. I dati sono espressi come medie (95° intervallo di confidenza) se non specificato

Tabella 8. Principali loci di suscettibilità identificati per lo sviluppo delle Malattie infiammatorie croniche intestinali

<i>Locus</i>	<i>Cromosoma</i>	<i>Geni</i>
IBD1	16p12-q13	NOD2/CAD15
IBD2	12p13.2-q24.1	STAT6, VDR, MMP18 b2 integrina
IBD3	6p	HLA, TNF
IBD4	14q11-12	TCR, LTB4 receptor
IBD5	5q31-33	SLC22A4/A5CD
IBD6	19p13	(ICAM1, C3, TBXA2
IBD7	1p36	(TNF-R family)
IBD8	16p12	Sconosciuto
IBD9	3p26	(CCR5, CCR9, hMLH1)
IBD10	10q23	DLG5

Tabella 9. Variazioni della concentrazione di difensine in campioni biotici intestinali di pazienti con MICI

	<i>MC</i>		<i>RCU</i>		<i>Controlli</i>
	<i>Segmenti infiammati</i>	<i>Segmenti non infiammati</i>	<i>Segmenti infiammati</i>	<i>Segmenti non infiammati</i>	
hBD1	↓	↔	↓	↔	↔
hBD2	↔	↔	↑↑↑	↑	↔
hBD3	↑	↔	↑↑↑	↑	↔
hBD4	↔	↔	↔	↔	↔
HD5	↑↑	↑	↑	↑↑	↑
HD6	↔	↑↑	↑↑	↑↑	↑

Tabella 10. Spettro d'azione delle defensine

<i>Defensina</i>	<i>Patogeno</i>
hBD-1	<i>Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, Staphylococcus aureus</i>
hBD-2	<i>E. coli, P. aeruginosa, K. Pneumoniae, S. aureus, Streptococcus pneumoniae. Candida albicans. Candida parapsilosis, Candida krusei. Enterococcus faecalis, HIV-1</i>
hBD-3	<i>E. coli, P. aeruginosa, K. pneumoniae, S. aureus, Streptococcus pyogenes, Ent.faecium, Strep. pneumoniae, Staphylococcus carnosus, Burkholderia cepacia, Saccharomyces cerevisiae, C. albicans, C. krusei, HIV- 1</i>
hBD-4	<i>E. coli. S. carnosus, P. aeruginosa, B. cepacia, Strep. pneumoniae, S. aureus, Sacch. Cerevisiae</i>

Tabella 11. Caratteristiche cliniche dei pazienti MICI partecipanti allo studio.

	<i>MC</i>	<i>RCU</i>
N° pazienti	24	22
Età	15,5 (6-18)	14 (6-18)
Età alla diagnosi	12,2 (6-18)	9 (6-18)
Localizzazione (SI/IC/C/A)	4/7/12/1	0/0/21/1
Soggetti con Complicanze intestinali	6	2
Soggetti sottoposti ad Intervento chirurgico	5	2
Manifestazioni extraintestinali	7	7
5-ASA/AZA/steroidi/infliximab	18/13/6/5	15/11/14/3

Note: SI=Tratto superiore, ileo; IC=ileocolon; C= colon; A=localizzazione esclusivamente anale

Tabella 12. Genotipo hBD1 in bambini affetti da MICI e in controlli sani

Polimorfismo	MC	RCU	Controlli sani	p ¹ /p ²
1-113 C/T				
W	79	14	100	
O	0	0	0	
E	21	86	0	<0.001/0.5
16G/A				
W	21	41	33	
O	17	18	22	
E	62	41	45	0.5/0.2
24C/G				
W	66	84	64	
O	4	4	4	
E	12	32	32	0.4/0.2
48A/G				
W	9	18	18	
O	29	28	44	
E	62	54	38	0.1/0.6
128+19T/A				
W	20	15	65	
O	25	0	75	
E	7	17	76	0.3/0.1
279 A/G				
W	4	5	1	
O	75	86	78	
E	21	9	21	0.5/0.5
217G/A				
W	100	96	100	
O	0	0	0	
E	0	4	0	0.5/0.4

Tabella 13. Genotipo hBD2/hBD3 in bambini affetti da MICI e in controlli sani

Polimorfismo	MC	RCU	Controlli sani	p ¹ /p ²
85C/T				
W	25	27	100	
O	4	0	0	
E	71	74	0	0.6/0.6
44C/T				
W	96	100	100	
O	0	0	0	
E	4	0	0	0.7/0.6
319+53G/A				
W	25	23	54	
O	4.2	0	2	
E	71	77	44	0.1/0.6
319+26G/A				
W	87	82	100	
O	0	0	0	
E	13	18	0	<0.001/0.4

Nota: p¹ MICI vs Controlli; p² MC vs RCU

Tabella 13 bis. Genotipo hBD2/hBD3 in bambini affetti da MICI e in controlli sani

Polimorfismo	MC	RCU	Controlli	p1/p2
87A/G				
W	16.7	13.6	30	
O	16.7	13.6	1.7	
E	66.7	72.7	68.3	0.6/0.9

Nota: p¹ MICI vs Controlli; p² MC vs RCU

Tabella 14. Genotipo hBD4 in bambini affetti da MICI e in controlli sani

Polimorfismo	MC	RCU	Controlli	p ¹ /p ²
V10I				
W	12	4	10	
O	4	18	16	
E	84	78	74	0.5/0.2
R36c				
W	96	95	100	
O	0	0	0	
E	4	5	0	0.1/0.2
192 T/C				
W	42	32	98	
O	0	0	0	
E	58	68	2	<0.001/ 0.3
158 A/G				
W	0	4	95	
O	25	36	2	
E	75	60	3	<0.001/ 0.3
114C/A				
W	25	27	90	
O	4	0	1	
E	71	73	9	<0.001/ 0.6
77C/T				
W	83	82	98	
O	0	0	0	
E	17	18	2	0.003/0. 5
29G/T				
W	4	4	79	
O	12	4	3	
E	44	92	18	<0.001/ 0.6
R38Q				

Nota: p¹ MICI vs Controlli; p² MC vs RCU

Tabella 14 bis. Genotipo hBD4 in bambini affetti da MICI e in controlli sani

Polimorfismo	MC	RCU	Controlli	p1/p2
W	92	100	100	
O	0	0	0	
E	8	0	0	0.006/0.2
285+26C/T				
W	8	13	79	
O	25	41	7	
E	67	46	14	<0.001/0.3
285+99C/T				
W	0	4	79	
O	29	46	8	
E	71	50	13	<0.001/0.2

Tabella 15. Genotipo MBL in bambini affetti da MICI e in controlli sani

<i>Polimorfismo</i>	<i>MC</i>	<i>RCU</i>	<i>Controlli</i>	<i>p¹/p²</i>
-550G/C				
W	17	23	16	
O	46	45	33	
E	37	32	51	0.4/0.8
221G/C				
W	71	63	62	
O	0	14	4	
E	29	23	34	0.3/0.1
+4C/T				
W	50	55	64	
O	8	9	5	
E	42	37	31	0.7/0.9
R52C				
W	88	91	87	
O	0	0	0	
E	12	9	13	0.9/0.5
G54D				
W	83	77	79	
O	0	4	3	
E	17	18	18	0.9/0.5

Nota: p¹ MICI vs Controlli; p² MC vs RCU

Figura 1. Funzione biologica della Calprotectina. Dopo il contatto con i batteri, le cellule della risposta immunitaria innata (neutrofili, macrofagi, cellule dendritiche) rilasciano mediatori dell'infiammazione e attivano la risposta immunitaria adattativa coinvolgendo i linfociti T. La Calprotectina (Clp) è rilasciata immediatamente dopo il contatto di neutrofili e macrofagi con i batteri. La Clp favorisce la diapedesi e la migrazione transcapillare (attraverso le giunzioni endoteliali) dei neutrofili; esercita azione antimicrobica diretta e favorisce l'attivazione dell'immunità adattativa *T_H1*-mediata.

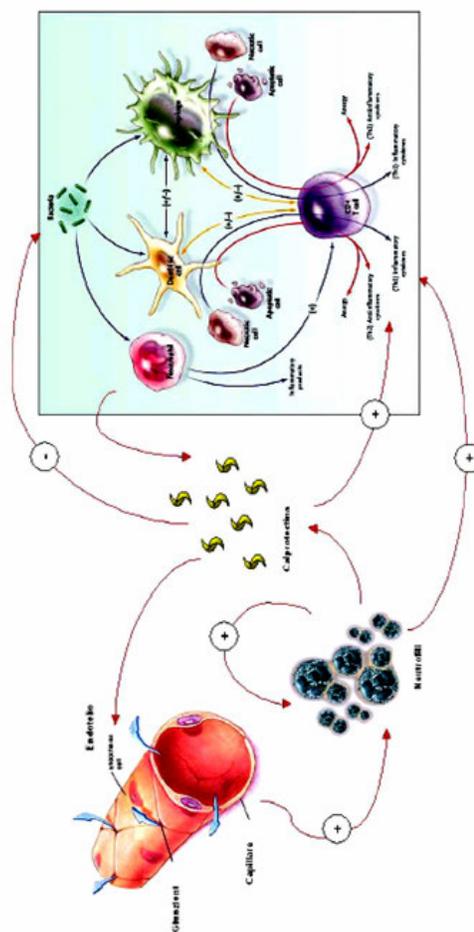
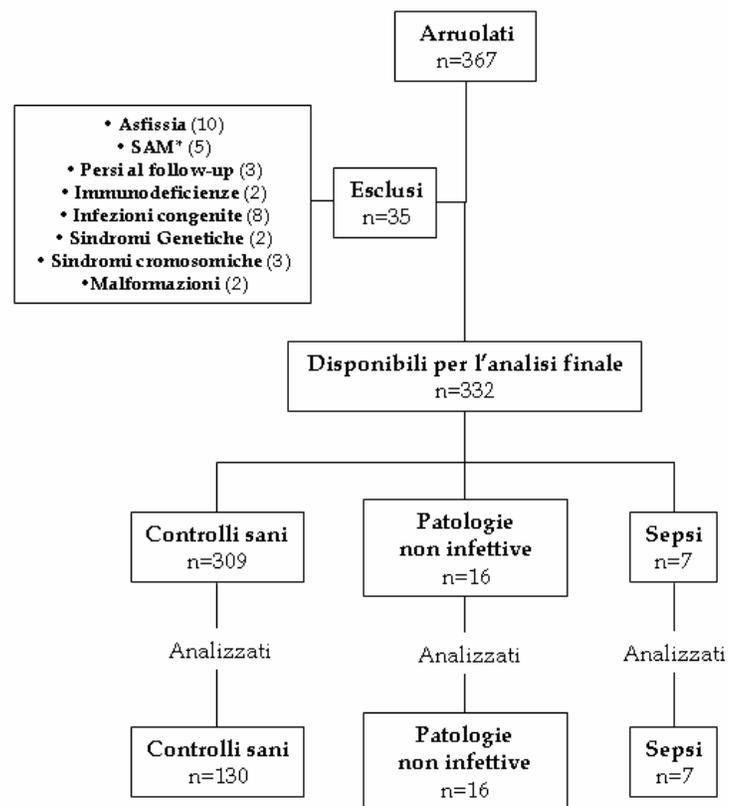


Figura 2. Determinazione dei livelli sierici di Calprotectina su sangue di funicolo alla nascita



*SAM: *Sindromi da Aspirazione di Meconio*

Figura 3. Concentrazioni di Calprotectina sierica misurate su sangue di funicolo ombelicale alla nascita.
La linea nera orizzontale, all'interno dei rettangoli, indica la mediana; i limiti superiore e inferiore dei rettangoli raffigurano l'intervallo interquartile (IQR); mentre le linee verticali rappresentano il primo e il 99° percentile.

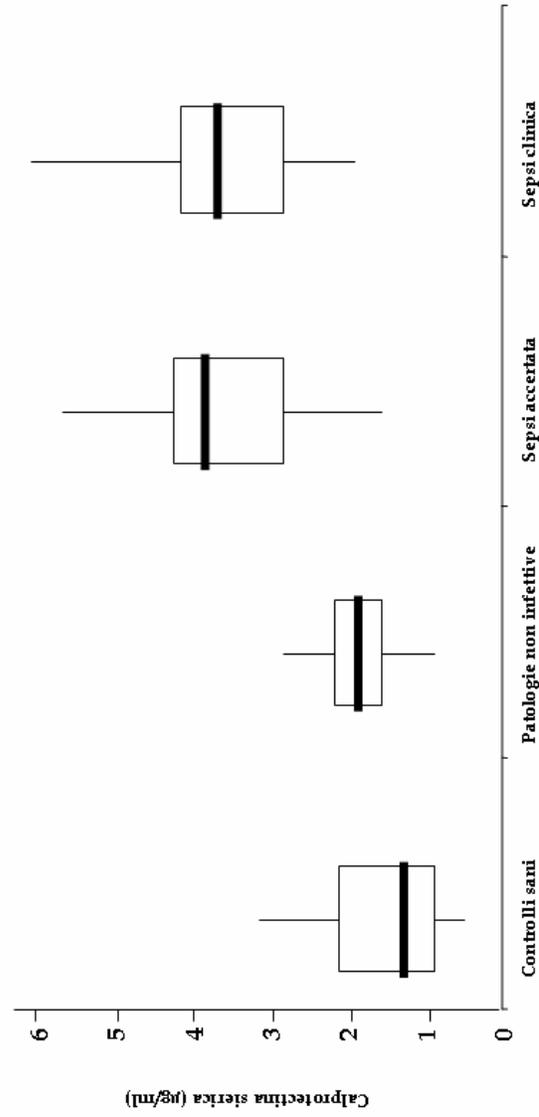


Figura 4. Valori normali (espressi in percentili) delle concentrazioni di Calprotectina sierica misurate su sangue di funicolo ombelicale alla nascita nel neonato a termine



Figura 5. Curva ROC per la determinazione del valore ottimale di cut-off delle concentrazioni sieriche di Calprotectina misurate su sangue di funicolo ombelicale alla nascita, per la distinzione dei neonati con sepsi precoce dai controlli sani.

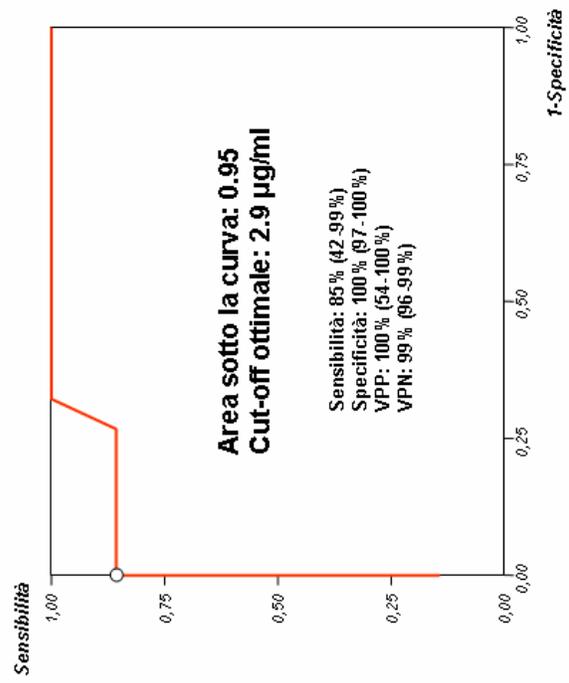


Figura 6. Determinazione dei livelli sierici di Calprotectina su sangue periferico in neonati con più di 72 ore di vita

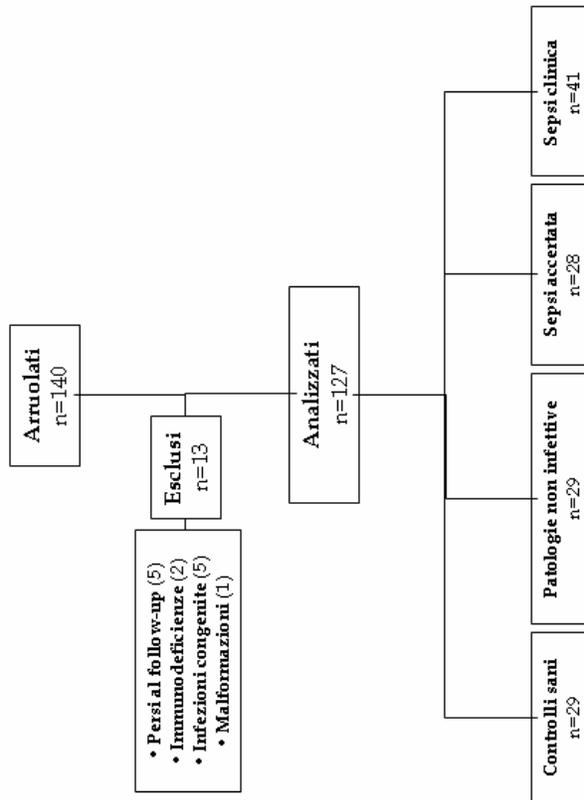


Figura 7. Concentrazioni di Calprotectina sierica nel neonato con più di 72 ore di vita. La linea nera orizzontale, all'interno dei rettangoli, indica la mediana; i limiti superiore e inferiore dei rettangoli raffigurano l'intervallo interquartile (IQR); mentre le linee verticali rappresentano il primo e il 99° percentile.

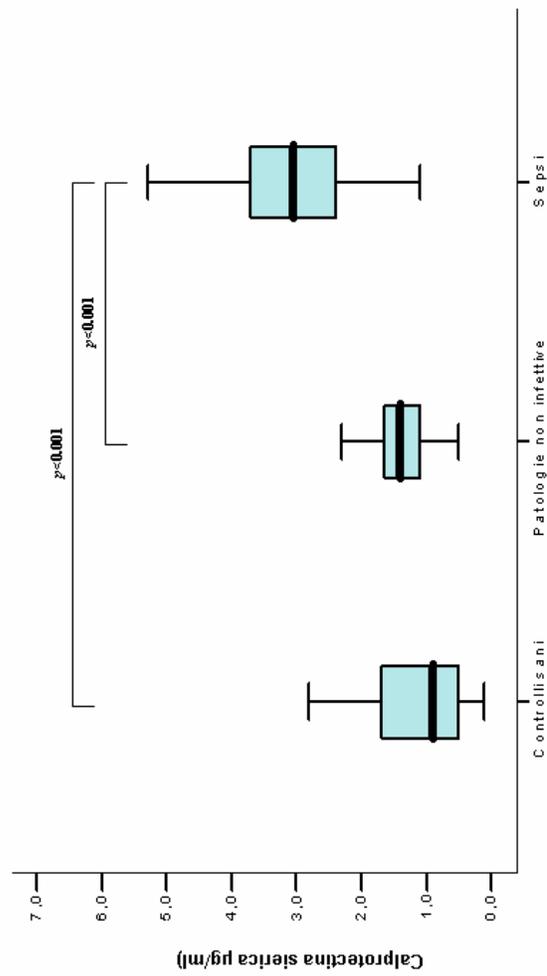


Figura 8. Confronto tra i livelli di Calprotectina sierica misurati alla nascita e in neonati con più di 72 ore di vita. La linea rossa orizzontale rappresenta la mediana.

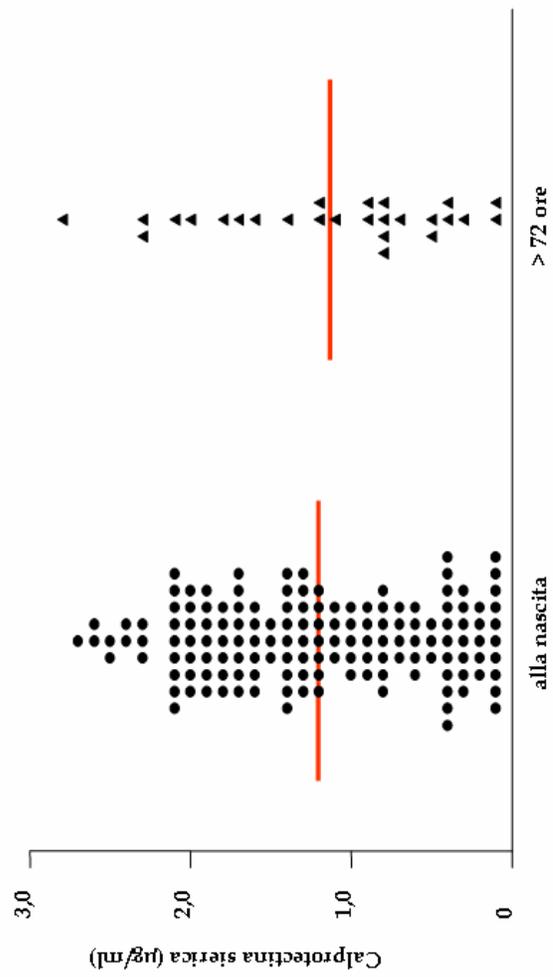


Figura 9. Curva ROC per la determinazione del valore ottimale di cut-off delle concentrazioni sieriche di Calprotectina misurate su sangue periferico, per la distinzione dei neonati con sepsi tardiva accertata dai controlli sani (A) e dai neonati con patologia non infettiva (B).

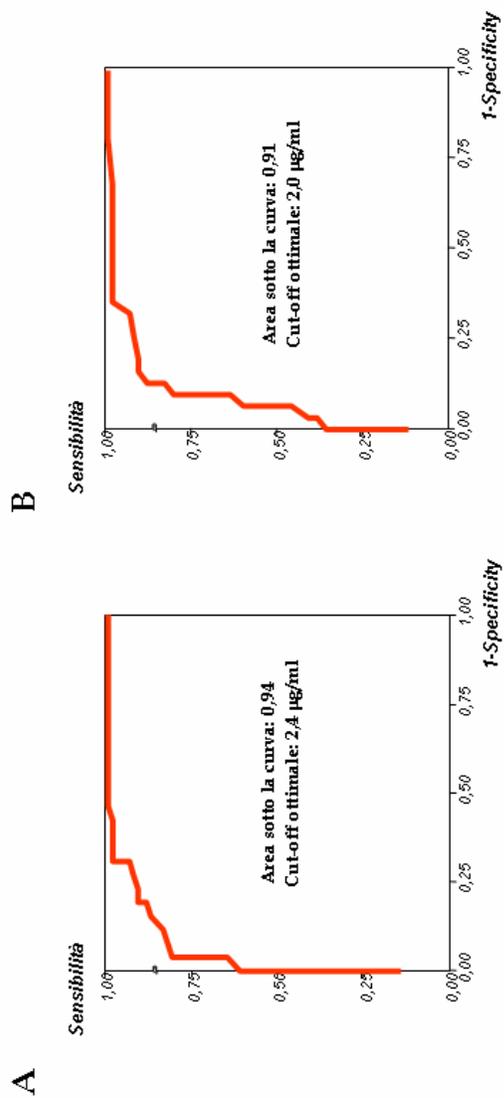


Figura 10. Confronto tra i livelli di Calprotectina nel liquor cefalorachidiano di neonati con meningite e controlli.
La linea orizzontale rossa indica la mediana.

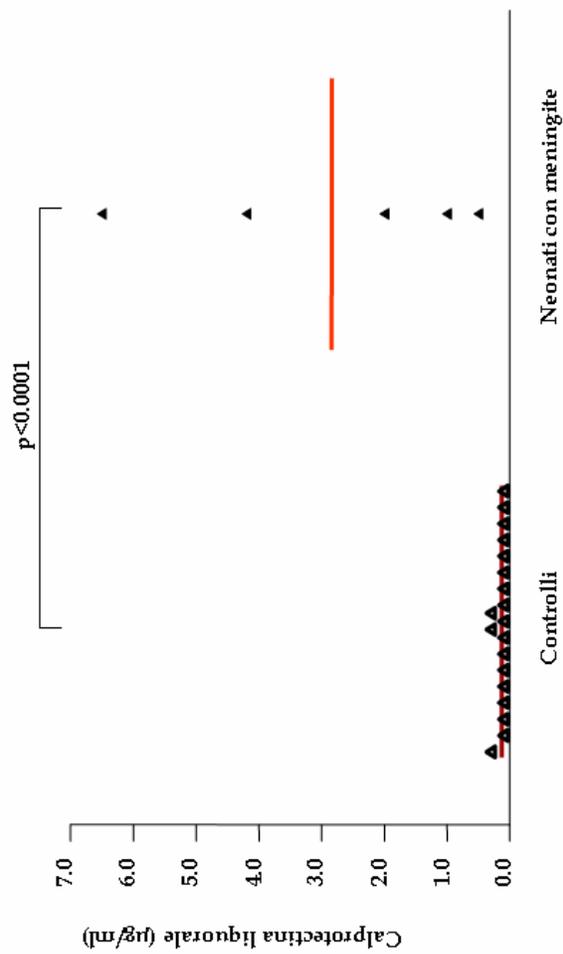


Figura 11. Funzione biologica delle defensine. Vari stimoli fisiologici possono indurre la mobilitazione delle α -defensine presintetizzate e la up-regulation dell'espressione di β -defensine nei tessuti. Le defensine a loro volta possono interagire con cellule e tessuti per promuovere una risposta secondaria svolgendo un ruolo chiave nei processi di infiammazione acuta, nel reclutamento di cellule del sistema immunitario adattativo, nell'angiogenesi e nella riparazione delle ferite.

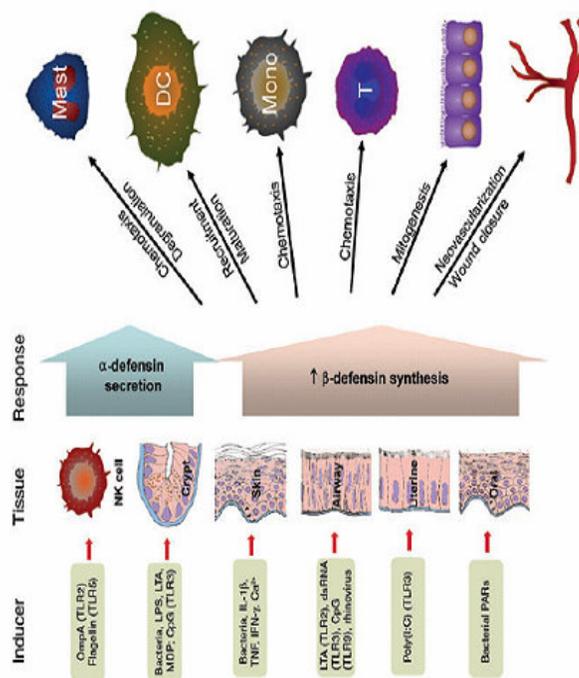


Figure 12. Valori normali (espressi in percentili) dei livelli sierici di hBD2 in nati mediante parto spontaneo o taglio cesareo

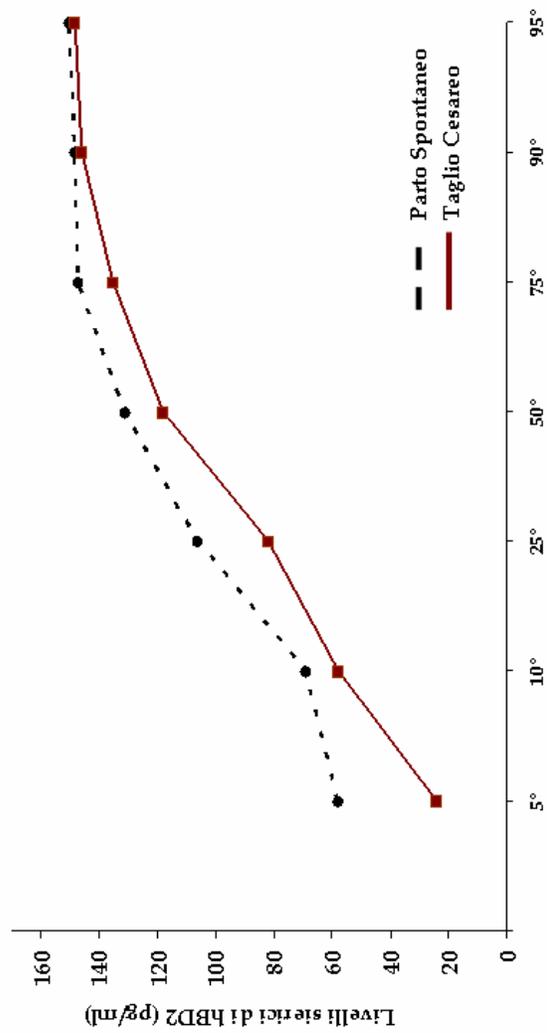


Figura 13. Confronto fra i livelli sierici di hBD2 di neonati nati mediante parto spontaneo o taglio cesareo

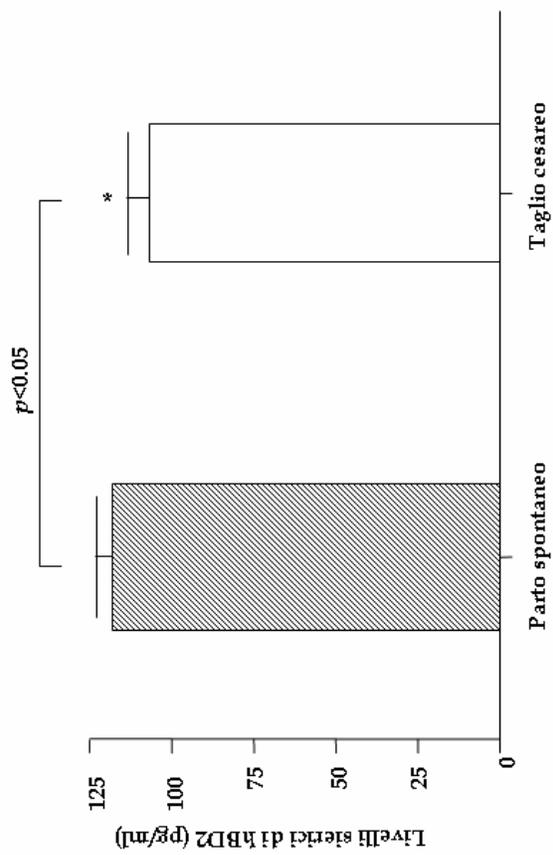


Figure 14. Valori normali (espressi in percentili) dei livelli sierici neonatali di HNPI-3 alla nascita

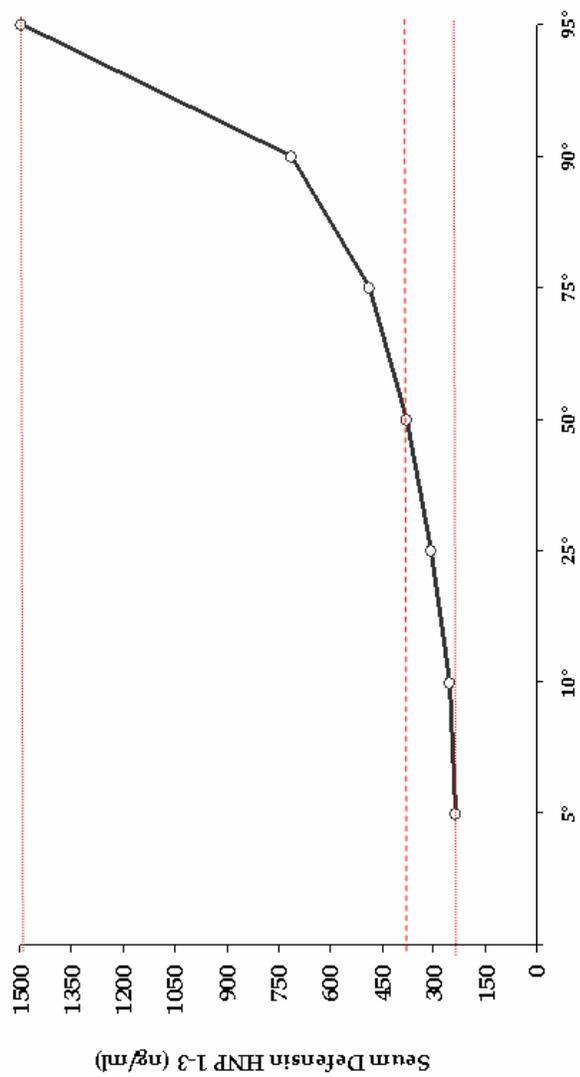


Figura 15. Confronto tra i livelli di HNP 1-3 nel siero di madri, neonati alla nascita ed a 28 giorni di vita

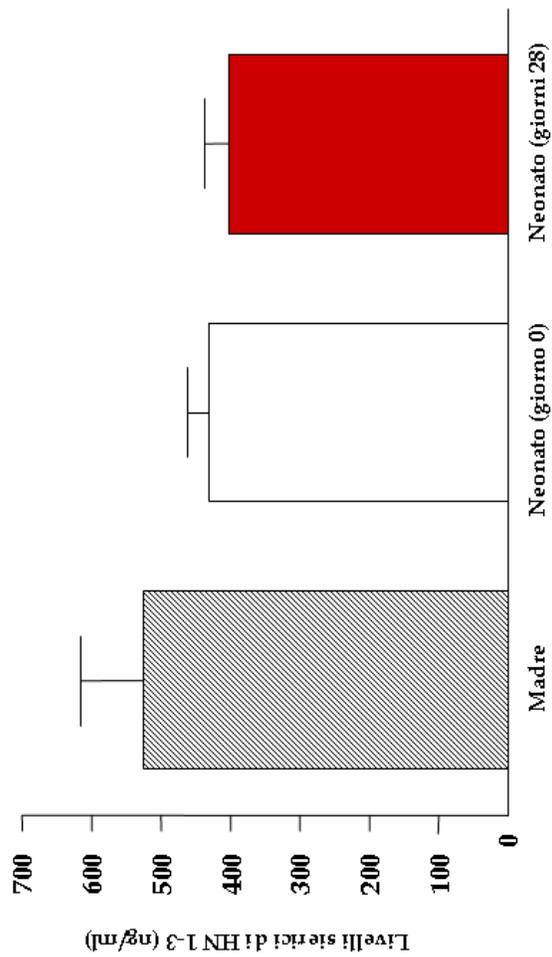
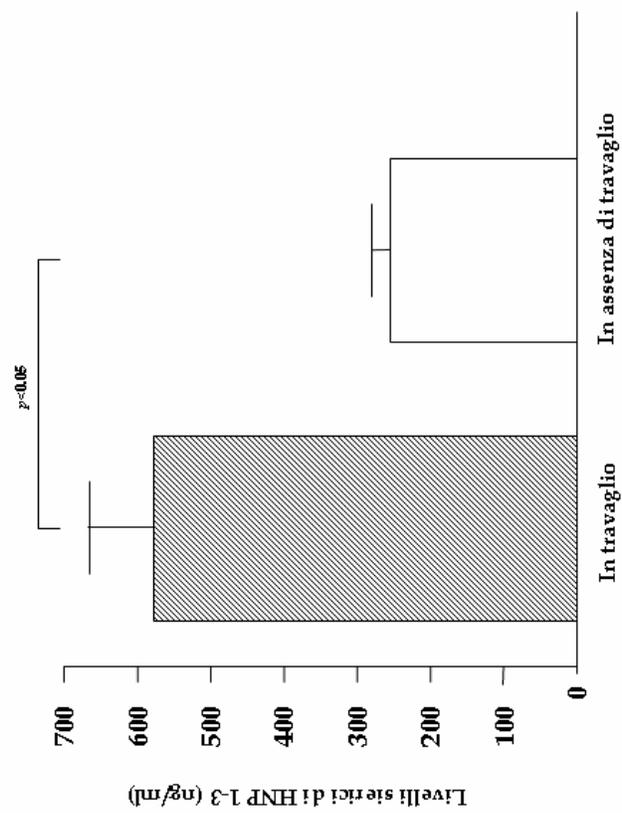


Figura 16. Livelli sierici di HNP1-3 in gestanti al momento del parto



6. BIBLIOGRAFIA

1. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet* 2001; 357: 1777-89.
2. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. Part 1. *N Engl J Med* 2000; 343: 3-49.
3. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. Part 2. *N Engl J Med* 2000; 343: 108-17.
4. Medzhitov R, Janeway C. Innate immunity. *NEJM* 2000; 343:338-44.
5. Mookherjee N, Hancock REW. Cationic host defence peptides: innate immune regulatory peptides as a novel approach for treating infections. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64:922-33.
6. Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA. Phylogenetic perspectives of innate immunity. *Science* 1999; 284: 1313-8.
7. Harder J, Meyer-Hoffert U, Wehkamp K, Schwichtenberg L, Schroder JM, Differential gene induction of human beta-defensins (hBD1,-2,-3, and -4) in keratinocytes is inhibited by retinoic acid. *J Invest Dermatol* 2004; 123: 522-29.
8. Proud D, Sanders SP, Wiehler S, Human rhinovirus infection induces airway epithelial cell production of human beta-defensin 2 both *in vitro* and *in vivo*. *J Immunol* 2004; 172:4637-45.
9. Vora P, Youdim A, Thomas LS, Fukuta M, Tesfay SY, Lukasek K, Michelsen KS, Wada A, Hirayama T, Arditi M, Abreu MT. Beta-defensin -2

- expression is regulated by TLR signalling in intestinal epithelial cells. *J Immunol* 2004; 173: 5398-405.
10. Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 1997; 387: 861.
 11. Bals R, Weiner DJ, Moscioni AD, Meegalla RL, Wilson JM. Augmentation of innate host defense by expression of a cathelicidin antimicrobial peptide. *Infect Immunol* 1999; 67:6084-9.
 12. Salzman NH, Ghosh D, Huttner KM, Paterson Y, Bevins CL. Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin. *Nature* 2003; 422: 522-6.
 13. De Smet K, Contreras R. Human antimicrobial peptide : defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnol Lett* 2005; 27: 1337-47.
 14. Hiratsuka T, Mukae H, Iiboshi H, Ashitani J, Nabeshima K, Minematsu T, Chino N, Ihi T, Kohno S, Nakazato M. Increased concentrations of human beta-defensins in plasma and bronchoalveolar lavage fluid of patients with diffuse panbronchiolitis. *Thorax* 2003; 58: 425-30.
 15. Dorschner RA, Pestonjamas VK, Tamakuwala S, Ohtake T, Rudisill J, Nizet V, Agerberth B, Gudmundsson GH, Gallo L. Cutaneous injury induces the release of cathelicidin anti-microbial peptides active against group A *Streptococcus*. *J Invest Dermatol* 2001; 117: 91-7.
 16. Saiman L, Tabibi S, Starner TD, San Gabriel P, Winokur PL, Jia HP, McCray PB Jr, Tack BF. Cathelicidin peptides inhibit multiply antibiotic-

- resistant pathogens from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:2838-44.
17. Berni Canani R, Rapacciuolo L, Romano MT, Tanturri de Horatio L, Terrin G, Manguso F, Cirillo P, Paparo F, Troncone R. Diagnostic value of faecal calprotectin in paediatric gastroenterology clinical practice. *Dig Liver Dis*. 2004; 36:467-70.
18. Hancock REW, Lehrer R. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol* 1998; 16: 82-8.
19. Elahi S, Buchanan RM, Attah-Poku S, Townsend HG, Babiuk LA, Gerdt V. The host defense peptide beta-defensin 1 confers protection against *Bordetella pertussis* in newborn piglets. *Infect Immun* 2006; 74: 2338-52.
20. Lupetti A, Danesi R, van't Wout JW, van Dissel JT, Senesi S, Nibbering PH. Antimicrobial peptides: therapeutical potential for the treatment of *Candida* infections. *Expert Opin Investig Drugs* 2002; 11:309-18.
21. Haines LR, Hancock RE, Pearson TW. Cationic antimicrobial peptide killing of African trypanosomes and *Sodalis glossinidius*, a bacterial symbiont of the insect vector of sleeping sickness. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2003; 3: 175-86.
22. Boulanger N, Bulet P, Lowenberger C. Antimicrobial Peptides in the interactions between insects and flagellate parasites. *Trends Parasitol* 2006;22:262-8.
23. Klotman ME, Chang TL. Defensins in innate antiviral immunity. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:447-56.

24. Jenssen H, Hamill P, Hancock REW. Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19:491-511.
25. Gordon YJ, Romanowski EG, McDermott AM. A review of antimicrobial peptides and their therapeutical potential as anti-infective drugs. *Curr Eye Res* 2005; 30:505-15.
26. Lee PH, Rudisill JA, Lin KH, Zhang L, Harris SM, Falla TJ, Gallo RL. HB-107, a nonbacteriostatic fragment of the antimicrobial peptide cecropinB, accelerates murine wound repair. *Wound Repair Regen* 2004; 12:351-8.
27. Lichtenstein A, Ganz T, Selsted ME, Lehrer RI. *In vitro* tumor cell cytotoxicity mediated by peptide defensins of human and rabbit granulocytes. *Blood* 1986; 68: 1407-10.
28. Mader JS, Hoskin DW. Cationic antimicrobial peptides as novel cytotoxic agents for cancer treatment. *Expert Opin Investg Drugs* 2006; 15: 933-46.
29. Levy O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nature Review Immunology* 2007; 7: 379-90.
30. Petrova A, Mehta R. Dysfunction of innate immunity and associated pathology in neonates. *Indian J Pediatr* 2007; 74:185-91.
31. Marchini G, Lindow S, Brismar H, Stabi B, Bergren V, Ulfgren AK, Lonner-Rahm S, Agerberth B, Gudmundssons GH. The newborn infant is protected by an innate antimicrobial barrier: peptide antibiotics are present in the skin and vernix. *British J Dermatol.* 2002; 147:1127-34.
32. Newburg DS, Walker A. Protection of the neonate by innate immune system of developing gut and of human milk. *Pediatr Res* 2007; 61: 2-8.

33. Yoshio H, Tollin M, Gudmundsson GH, Lagercrantz H, Jornvall H, Marchini G, Agerberth B. Antimicrobial polypeptides of human vernix caseosa and amniotic fluid: implications for newborn innate defense. *Pediatr Res* 2003; 53: 211-6.
34. Levy O. Genetic screening for susceptibility to infection in the NICU setting. *Pediatr Res*. 2004; 55:546-8.
35. Georgeson GD, Szony BJ, Streitman K, Kovacs A, Kovacs L, Laszlo A. Natural killer cell cytotoxicity is deficient in newborns with sepsis and recurrent infections. *Eur J Pediatr* 2001; 160: 478-82.
36. Levy O. Impaired innate immunity at birth: deficiency of bactericidal/Permeability-Increasing protein (BPI) in the neutrophils of newborns. *Pediatr Res* 2002; 51: 667-9.
37. Karlsson H, Hessle C, Rudin A. Innate immune responses of human neonatal cells to bacteria from the normal gastrointestinal flora. *Infection and Immunity* 2002; 70:6688-96.
38. Aherens P, Kattner E, Kohler B, Hartel C, Seidenberg J, Segerer H, Moller J, e Wolfgang Gopel for the genetic factors in neonatolog study group. Mutations of genes involved in the innate immune system as predictor of sepsis in very low birth weight infants. *Pediatr Res* 2004; 55:652-6.
39. Mallow EB, Harris A, Salzman N, Russel JP, DeBerardinis J, Ruchelli E, Bevins CL. Human enteric defensins. *J Biol Chem* 1996; 23: 4038-45.
40. Cunliffe RN, Rose FRA, Keyte J, Abberley L, Chan WC, Madida YR. Human defensin 5 is stored in precursor form in normal Paneth cells and is

expressed by some villous epithelial cells and by metaplastic Paneth cells in the colon in inflammatory bowel disease. *Gut* 2001; 48:176-85.

41. MacDonald TT, Monteleone G. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science* 2005; 307: 1920-5.
42. Poindexter BJ Immunofluorescence deconvolution microscopy and image reconstruction of human defensins in normal and burned skin. *J Burns Wounds*. 4: 101-111.
43. Bos JD, Psoriasis, innate immunity, and gene pools. *J Am Acad Dermatol* 2007; 56:468-71.
44. Berni Canani R, Romano MT, Terrin G, Rapacciuolo L. Fecal calprotectin is a useful diagnostic tool in pediatric gastroenterology. *Ital J Pediatr* 2005; 31: 89-94
45. Long SS, Swenson RM. Development of anaerobic fecal flora in healthy newborn infants. *J Pediatr* 1977; 91: 298-301.
46. 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.
47. Stříž I, Wang YM, Švarcová I, Trnka L, Sorg C, Costabel U. The phenotype of alveolar macrophages and its correlation with immune cells in bronchoalveolar lavage. *Eur Respir J* 1993; 6: 1287-94.

48. Burkhardt K, Radespiel-Troger M, Rupperecht HD, Goppelt-Struebe M, Riess R, Renders L, Hauser IA, Kunzendorf U. An increase in myeloid-related protein serum levels precedes acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 1947-57.
49. Stockley RA, Dale I, Hill SL, Fagerhol MK. Relationship of neutrophil cytoplasmic protein (L1) to acute and chronic lung disease. *Scand J Clin Lab Invest* 1984; 44: 629-34.
50. Sander J, Fagerhol MK, Bakken JS, Dale I. Plasma levels of the leukocyte 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.
51. Poullis A, Foster R, Mendall MA, and Fagerhol MK. Emerging role of calprotectin in gastroenterology. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2003; 18: 756-762.
52. Hitchon CA, El-Gabalawy HS. Immune features of seronegative and seropositive arthritis in early synovitis studies. *Curr Opin Rheumatol* 2002; 14: 348-53.
53. Madland TM, Hordvik M, Haga HJ, Jonsson R, Brun JG. leukocyte protein calprotectin and outcome in rheumatoid arthritis. A longitudinal study. *Scand J Rheumatol* 2002; 31: 351-4.

54. Fagerhol MK. Calprotectin, a faecal marker of organic gastrointestinal abnormality. *Lancet* 2000; 356: 1783-4.
55. Stritz I, Trebichavsky I. Calprotectin - a pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation. *Physiological Research* 2004; 53: 245-253.
56. Yui S, Nakatani Y, Masaaki M. Calprotectin (S100A8/S100A9), an inflammatory protein complex from neutrophils with a broad apoptosis - inducing activity. *Biol Pharm Bull* 2003; 26(6): 753-760.
57. Golden BE, Clohessy PA, Russel G, Fagethol MK. Calprotectin as a marker inflammation in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 1996; 74: 136-9.
58. Carroll D, Corfield A, Spicer R, Cairns P. Faecal calprotectin concentrations and diagnosis of necrotising enterocolitis. *Lancet*. 2003 Jan 25;361(9354):310-1.
59. Campeotto F, Butel MJ, Kalach N, Derrieux S, Aubert-Jacquin C, Barbot L, Francoual C, Dupont C, Kapel N. High faecal calprotectin concentrations in newborn infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2004; 89:F353-5.
60. Nissen AC, van Gils CE, Menheere PP, Van den Neucker AM, van der Hoeven MA, Forget PP. Fecal calprotectin in healthy term and preterm infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004; 38:107-8.

61. Ng PC., Karen LI, Wong R PO, Chui KM, Wong E, and Fok TF. Neutrophil CD64 Expression: a sensitive diagnostic marker for late-onset nosocomial infection in very low birthweight infants. *Pediatr Res* 2002; 51:296-303.
62. Gerdes JS. Diagnosis and management of bacterial infections in the neonate. *Pediatr Clin North Am* 2004; 51:939-59
63. Kapur R, Yoder MC, Polin RA, Edwards MS, Baley JE, Toltzis P. The immune System. In: *Neonatal-Perinatal Medicine. Disease of the Fetus and Infant*. Eds. Fanaroff AA, Martin RJ. Ed 7th; pg. 676-744
64. Ng PC. Diagnostic marker of infection in neonates. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2004; 89:F229-F235.
65. Ng PC, Cheng SH, Chui KM, et al. Diagnosis of late onset neonatal sepsis with cytokines, adhesion molecules, and C-reactive protein in preterm very low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1997;77:F221-7.
66. Geaghan SM. Hematologic values and appearances in the healthy fetus, neonate, and child. *Clin Lab Med*. 1999; 19:1-37.
67. Levy O, Martin S, Eichenwald E, et al. Impaired innate immunity in the newborn: newborn neutrophils are deficient in

- bactericida/permeability - increasing protein (BPI). *Pediatrics* 1999; 104:1327-33.
68. Nupponen I, Turunen R, Nevalainen T, Peuravuori H, Pohjavuori M, Repo H, Andersson S. Extracellular release of bactericidal/permeability-increasing protein in newborn infants. *Pediatr Res* 2002; 51:670-4
69. Marchini G, Lindow S, Brismar H, et al. The newborn infant is protected by an innate antimicrobial barrier: peptide antibiotics are present in the skin and vernix caseosa. *British Journal of Dermatology* 2002; 147: 1127-1134.
70. Akinbi HT, Narendran V, Pass AK, Markart P, Hoath SB. Host defense proteins in vernix caseosa and amniotic fluid. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191 (6): 2090-6.
71. Carr R. Neutrophil production and function in newborn infants. *British Journal of Haematology* 2000; 110: 18-28.
72. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003; 348:138-150.
73. Da Silva O, Ohlsson A, Kenyon C. Accuracy of leukocyte indices and C-reactive protein for diagnosis of neonatal sepsis: a critical review. *Pediatr Infect Dis J* 1995;14:362-6.

74. Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, *et al.* Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics* 2002;110:285-91.
75. Brodie SB, Sands KE, Gray JE, *et al.* Occurrence of nosocomial bloodstream infections in six neonatal intensive care units. *Pediatr Infect Dis J* 2000;19:56-65.
76. Berger A, Salzer HR, Weninger M, *et al.* Septicaemia in an Austrian neonatal intensive care unit: 7-year analysis. *Acta Paediatr* 1998;87:1066-9.
77. Marinoni E, Di Iorio R, Gazzolo D, Lucchini C, Michetti F, Corvino V, Cosmi EV. Ontogenetic localization and distribution of S-100beta protein in human placental tissues. *Obstet Gynecol.* 2002 Jun;99(6):1093-9.
78. Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature Review.* 2003; 3:710-20.
79. Selsted ME, Ouellette AJ. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nature Immunol.* 2005; 6: 551-7.
80. Yang D, Biragyn A, Kwak LW, Oppenheim JJ. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends in Immunol.* 2002; 23: 291-7.

81. Fellermann K, Stange EF. Defensins-innate immunity at the epithelial frontier. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 771-776.
82. Menendez A, Finlay BB. Defensins in the immunology of bacterial infections. *Curr Opin Immunol*. 2007; 19:385-91.
83. Pitman RS, Blumberg RS. First line of defense: the role of the intestinal epithelium as an active component of the mucosal immune system. *J Gastroenterol*. 2000; 35: 805-14.
84. O'Neil DA, Porter EM, Elewaut D, Anderson GM, Eckmann L, Ganz T, Kagnoff MF. Expression and regulation of the human β -defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. *J Immunol* 1999;163:6718-24.
85. O'Neil DA. Regulation of expression of β -defensins: endogenous enteric peptide antibiotics. *Mol Immunol* 2003; 40: 445-50.
86. Thomas NJ, Carcillo JA, Doughty LA, Sasser H, Heine RP. Plasma concentrations of defensins and lactoferrin in children with severe sepsis. *Pediatr Infect Dis J*. 2002; 21:34-8.
87. Panyutich AV, Voitenok NN, Lehrer RI, Ganz T. An enzyme immunoassay for human defensins. *J Immunol Methods*. 1991; 141:149-55.

88. Mukae H, Ishimoto H, Yanagi S, Ishii H, Nakayama S, Ashitani J, Nakazato M, Kohno S. Elevated BLF concentrations of α - and β -defensins in patients with pulmonary alveolar proteinosis. *Respiratory Medicine*. 2007; 101: 715-21.
89. Montgomery SM, Ekbom A. Epidemiology of inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol*. 2002 Jul;18(4):416-20.
90. Cottone M, Martorana G, Di Mitri R, Cammà C, Caprilli R. Epidemiology of inflammatory bowel disease in Italy. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1999; 31: 503-7.
91. Shanahan F. Crohn's disease. *The Lancet* 2002; 359: 62-69.
92. Farrel RJ, Peppercorn MA. Ulcerative colitis. *The Lancet* 2002; 359: 331-40.
93. Vermeire S, Rutgeers P. Current status of genetics research in inflammatory bowel disease. *Genes and immunity* 2005; 6: 637-645.
94. Yamada R, Ymamoto K. Recent findings on genes associated with inflammatory bowel disease. *Mutation Research* 2005; 573: 136-151.
95. Ahmad T, Pesi Tamboli C, Jewell D, Colombel JF. Clinical relevance of advances in genetics and pharmacogenetics of IBD. *Gastroenterology*. 2004; 126: 1533-49.

96. Noble C, Nimmo E, Gaya D, Russel RK, Satsangl J. Novel susceptibility genes in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2006; 12:1991-1999.
97. Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Schwab M, Schaffeler E, Schlee M, Herrlinger KR, Stallmach A, Noack F, Fritz P, Schroder JM, Bevins CL, Fellermann K, Stange EF. NOD2 (CARD 15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal α -defensin expression. *Gut* 2004; 53:1658-64.
98. Grimm MC, Pavli P. NOD2 mutations and Crohn's disease: are Paneth cells and their antimicrobial peptides the link? *Gut* 2004; 53:1558-60.
99. Limbergen JV, Russel RK, Nimmo ER, Ho GT, Arnott ID, Wilson DC, Satsangi J. Genetics of the innate immune response in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 1-18.
100. Lawrance IC, Fiocchi C, Chakravarti S. Ulcerative colitis and Crohn's disease: distinctive gene expression profiles and novel susceptibility candidate. *Hum Mol Genet* 2001;10 :445-56.
101. Uemura K, Saka M, Nakagawa T, Kawasaki N, Thiel S, Jensenius JC, Kawasaki T. L-MBP is expressed in epithelial cells of mouse small intestine. *J Immunol* 2002; 169: 6945-50.

102. Seibold F, Konrad A, Flogerzi B, Seibold-Schmid B, Arni S, Juliger S, Kun JFJ. Genetic variants of the mannan-binding lectin are associated with immune reactivity to mammals in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004; 127: 1076-84.

7. APPENDICE

Pubblicazioni prodotte durante il corso di dottorato

LAVORI IN EXTENSO PUBBLICATI SU RIVISTE INTERNAZIONALI:

1. Berni Canani R, Cirillo P, Buccigrossi V, Ruotolo S, **Passariello A**, De Luca P, Porcaro F, De Marco G, Guarino A. ZINC INHIBITS CHOLERA TOXIN-INDUCED, BUT NOT ESCHERICHIA COLI HEAT-STABLE ENTEROTOXIN-INDUCED, ION SECRETION IN HUMAN ENTEROCYTES. *J Infect Dis* 2005; 191:1072-7.
2. Berni Canani R, Cirillo P, Buccigrossi V, Ruotolo S, **Passariello A**, De Luca P, Porcaro F, De Marco G, Guarino A. REPLY TO NALIN. *J Infect Dis* 2005; 192 :1672-3.
3. Berni Canani R, De Marco G, **Passariello A**, Buccigrossi V, Ruotolo S, Bracale I, Porcaro F, Bifulco G, Guarino A. INHIBITORY EFFECT OF HIV-1 TAT PROTEIN ON THE SODIUM-D-GLUCOSE SYMPORTER OF HUMAN INTESTINAL EPITHELIAL CELLS. *AIDS* 2006; 20:5-10.
4. Berni Canani R, Cirillo P, Roggero P, Romano C, Malamisura B, Terrin G, **Passariello A**, Manguso F, Morelli L, Guarino A; Working Group on Intestinal Infections of Italian society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (SIGENP). THERAPY WITH GASTRIC ACIDITY INHIBITORS INCREASES THE RISK OF ACUTE GASTROENTERITIS AND COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA IN CHILDREN. *Pediatrics* 2006; 117(59):e817-20.
5. Berni Canani R, Cirillo P, Mallardo G, Buccigrossi V, **Passariello A**, Ruotolo S, De Marco G, Porcaro F, Guarino A. GROWTH HORMONE REGULATES INTESTINAL ION TRANSPORT THROUGH A MODULATION OF THE CONSTITUTIVE NITRIC OXIDE SYNTHASE - NITRIC OXIDE - cAMP PATHWAY. *World J Gastroenterol* 2006; 12(29):4710-5.
6. Berni Canani R, Ruotolo S, Buccigrossi V, **Passariello A**, Porcaro F, Siani MC, Guarino A. ZINC FIGHTS DIARRHOEA IN HIV-1-INFECTED CHILDREN: IN-VITRO EVIDENCE TO LINK CLINICAL DATA AND PATHOPHYSIOLOGICAL MECHANISM. *AIDS* 2007; 21(1):108-110.
7. Moulson CL, Fong LG, Gardner JM, Go G, **Passariello A**, Grange DK, Young SG, Miner JH. INCREASED PROGERIN EXPRESSION ASSOCIATED WITH UNUSUAL LMNA MUTATIONS CAUSES A SEVERE PROGEROID SYNDROME. *Hum Mut* 2007; 28:882-9
8. Berni Canani R, Cirillo P, Terrin G, Cesarano L, Spagnolo MI, De Vincenzo A, Albano F, **Passariello A**, De Marco G, Manguso F, Guarino A. PROBIOTICS FOR THE TREATMENT OF ACUTE DIARRHOEA: A RANDOMIZED SINGLE-BLIND TRIAL WITH FIVE DIFFERENT PREPARATIONS. *BMJ* 2007; 335:340-6.

9. Terrin G, **Passariello A**, Manguso F, Salvia G, Zappulli D, Rapacciuolo L, Berni Canani R. SERUM CALPROTECTIN AS NEW DIAGNOSTIC MARKER FOR NEONATAL SEPSIS. *Pediatrics*, in press.
10. **Passariello A**, Baldassarre ME, Terrin G, Bernardo I, Cimadamore N, Cipolla D, Lunetta F, Longo R, Ruotolo S, De Curtis M, Paludetto R, Berni Canani R. NEONATAL DIARRHOEA: AN UNCOMMON SYMPTOM FOR A BROAD SPECTRUM OF DISEASES. *Arch Dis Child* submitted.
11. Terrin G, **Passariello A**, Berni Canani R, Manguso F, Paludetto R, Cascioli CF. EFFICACY AND SAFETY OF MINIMAL ENTERAL FEEDING IN FEED INTOLERANTE VERY LOW BIRTH WEIGHT NEWBORNS. *Arch Dis Child* submitted.
12. Berni Canani R, **Passariello A**, Buccigrossi V, Secondo A, Canzoniero LMT, Ruotolo S, Puzone C, Porcaro F, Annunziato L, Guarino A. ZINC IN THE TREATMENT OF CHILDHOOD DIARRHEA: *IN VITRO* EVIDENCES ON CALCIUM AND NITRIC OXIDE-MEDIATED INTESTINAL ION SECRETION. *Gastroenterology* submitted.

LAVORI IN ESTENSI PUBBLICATI SU RIVISTE NAZIONALI:

Cascioli CF, **Passariello A**, Terrin G. BUON USO DEL FERRO: EFFETTI A BREVE E A LUNGO TERMINE. XII Congresso Nazionale SIN, Montecatini Terme, Italia, 28-31 maggio 2006. *Acta Neonatologica & Pediatrica* 2006; 20:150-4.

CAPITOLO DI LIBRO

Roberto Berni Canani, Gianluca Terrin, **Annalisa Passariello**. IL MALASSORBIMENTO. LA DIARREA NEONATALE. M. De Curtis, V. Carnielli Editeam s.a.s. gruppo editoriale 2006, pag. 37-62.

ABSTRACT

1. Campanozzi F, Bussi M, Romano MT, Terrin G, **Passariello A**, Cascioli CF. INSUFFICIENZA RESPIRATORIA IN NEONATO AFFETTO DA RARA MIOPATIA CONGENITA. XI Congresso Nazionale SIN, Montecatini Terme, Italia, 19-22 maggio 2005. *Acta Neonatologica & Pediatrica* 2005; 19:274
2. **Passariello A**, Terrin G, Romano MT, Campanozzi F, Cascioli CF. UN RARO CASO DI SEVERA ATROFIA CUTANEA. XI Congresso Nazionale SIN, Montecatini Terme, Italia, 19-22 maggio 2005. *Acta Neonatologica & Pediatrica* 2005; 19:249

3. Porcaro F, Ruotolo S, Buccigrossi V, **Passariello A**, Siani MC, De Luca P, Maiorino R, Guarino A, Berni Canani R. ATTRAVERSO LA DIRETTA INTERAZIONE CON L'ENTEROCITA LO ZINCO INIBISCE DIVERSI MECCANISMI DI SECREZIONE DI FLUIDI A LIVELLO INTESTINALE: IMPLICAZIONI CLINICHE PER LA TERAPIA DI DIVERSE FORME DI DIARREA. Giornate scientifiche del polo delle scienze e delle tecnologie per la vita. Università degli Studi di Napoli "Federico II", Napoli, 26-27 maggio 2005
4. Berni Canani R, Buccigrossi V, **Passariello A**, Ruotolo S, Porcaro F, Siani MC, De Luca P, Guarino A. IN VITRO ZINC EFFECTS ON DIFFERENT INTESTINAL ION SECRETION SIGNAL PATHWAYS ACTIVATION: IMPLICATIONS FOR TREATMENT OF DIARRHEA IN CHILDREN. 38th Annual Meeting of the European Society of Pediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition, ESPGHAN-NASPGHAN, Porto, Portugal, 1-4 June 2005. JPGN 2005; 40 (5):632
5. Terrin G, **Passariello A**, De Santo G, Berni Canani R, De Luca P, Russo MT, Maiorino R, Cascioli CF. BENEFICIAL EFFECTS OF MINIMAL ENTERAL NUTRITION ON FEEDING INTOLERANT VERY LOW BIRTH WEIGHT PRETERM INFANTS. 38th Annual Meeting of the European Society of Pediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition, ESPGHAN-NASPGHAN, Porto, Portugal, 1-4 June 2005. JPGN 2005; 40 (5): 660
6. Ruotolo S, Porcaro F, De Marco G, Buccigrossi V, **Passariello A**, Bracale I, Ruggeri FM, Guarino A, Berni Canani R. ZINC EFFECTS ON VIRAL REPLICATION, ION SECRETION AND CELL DAMAGE IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF ROTAVIRUS INTESTINAL INFECTION: IMPLICATIONS FOR NEW PREVENTIVE AND THERAPEUTIC STRATEGIES AGAINST THE LEADING CAUSE OF CHILDHOOD DIARRHOEA. XII Congresso Nazionale SIGENP, Milano 22-24 settembre 2005. Dig Liv Dis 2006
7. Porcaro F, Ruotolo S, Buccigrossi V, **Passariello A**, Siani MC, Muscariello R, Maiorino R, Guarino A, Berni Canani R. REGULATORY ACTION OF ZINC ON DIFFERENT INTRACELLULAR SIGNAL PATHWAYS IN HUMAN ENTEROCYTES. XII Congresso Nazionale SIGENP, Milano 22-24 settembre 2005. Dig Liv Dis 2006
8. Terrin G, Castaldo G, Cardillo G, Salvatore F, **Passariello A**, Cirillo P, Porcaro F, Siani MC, Troncone R, Berni Canani R. ATYPICAL SLC26A3 GENOTYPES IN CHILDREN WITH CONGENITAL CHLORIDE DIARRHEA. XII Congresso Nazionale SIGENP, Milano 22-24 settembre 2005. Dig Liv Dis 2006
9. **Passariello A**, Migliorati R, Fiorillo A, Roseto V, Riccio F, Ruggieri A, Cascioli CF. CAUSA RARA DI IDROCEFALO CONGENITO OSTRUTTIVO. XII Congresso Nazionale SIN, Montecatini Terme, Italia, 28-31 maggio 2006. Acta Neonatologica & Pediatrica 2006; 20:443

10. De Rosa I, D'Amora S, Mozzarella G, Migliaro F, **Passariello A**, Signoriello G, Cascioli CF ENTEROPATIA PROTEINODISPERDENTE IN NEONATO PREMATURO DI PESO INFERIORE A 1500 GR. XII Congresso Nazionale SIN, Montecatini Terme, Italia, 28-31 maggio 2006. *Acta Neonatologica & Pediatrica* 2006; 20:399
11. Berni Canani R, Terrin G, Salvatore S, Cirillo P, **Passariello A**, Muscariello R, Siani MC, Porcaro F, Guarino A PROBIOTICS AS PREVENTION OF INFECTIONS IN GERD-AFFECTED CHILDREN TAKING GASTRIC ACIDITY INHIBITORS. *Digestive Disease Week 2006*, Los Angeles, California, 20-25 May. *Gastroenterology* 2006;
12. Terrin G, Cardillo G, **Passariello A**, Castaldo G, Porcaro F, Siani MC, Puzone C, Troncone R, Salvatore F, Berni Canani R NEW INSIGHTS ON GENOTYPE OF CONGENITAL CHLORIDE DIARRHEA. *Digestive Disease Week 2006*, Los Angeles, California, 20-25 May. *Gastroenterology* 2006;
13. Berni Canani R, Porcaro F, Ruotolo S, Buccigrossi V, **Passariello A**, Siani MC, Maiorino R, Ruggeri FM, Lima S, De Marco G, Guarino A IN VITRO EXPERIMENTAL DATA SUPPORTING THE ZINC USE IN THE TREATMENT OF ACUTE GASTROENTERITIS IN CHILDREN. *Digestive Disease Week 2006*, Los Angeles, California, 20-25 May. *Gastroenterology* 2006;
14. Raimondi F, Indrio F, Capasso L, Baldassarre ME, Francavilla R, Berni Canani R, **Passariello A**, Terrin G UNCONJUGATED BILIRUBIN AFFECTS FECAL PROTEIN LOSS AND CLINICAL PRESENTATION OF FOOD ALLERGY IN HEALTHY TERM NEONATES. A PILOT, CLINICAL STUDY. 39th Annual Meeting of the European Society of Pediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition, ESPGHAN, Dresden, Germany, 7-10 June 2006. *JPGN* 2006;
15. Terrin G, Ruggieri A, Salvia G, Lega L, Cascioli CF, Messina F, **Passariello A**, Berni Canani R GASTRIC ACIDITY INHIBITORS THERAPY INCREASES THE RISK OF INFECTION IN NEWBORNS. 39th Annual Meeting of the European Society of Pediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition, ESPGHAN, Dresden, Germany, 7-10 June 2006. *JPGN* 2006;
16. Iovine G, Orsini B, Balestriere L, Iovino A, **Passariello A**, Messina F. TROMBOEMBOLISMO NEONATALE: DAL CASO CLINICO ALLA REVISIONE DELLA LETTERATURA SULL'IMPIEGO DEI FARMACI TROMBOEMBOLITICI. *Work up in terapia Intensiva Neonatale*. Verona, 27-28 marzo 2006.
17. Terrin G, Castaldo G, Cardillo G, Salvatore F, Siani MC, Puzone C, **Passariello A**, Muscariello R, Berni Canani R. NUOVE ACQUISIZIONI SUL GENOTIPO DELLA CLORIDORREA CONGENITA. XII Giornate scientifiche del polo delle scienze e delle tecnologie per la vita. Università degli Studi di Napoli "Federico II", Napoli, 15-16 giugno 2006

18. Terrin G, **Passariello A**, Ruggieri A, Puzone C, Siani MC, Messina F, Cascioli C, Paludetto R, Berni Canani R. AGGRESSIVE NUTRITION IMPROVE GROWTH AND RESPIRATORY FUNCTION IN VLBW INFANTS. XIII Congresso Nazionale SIGENP. Genova 26-28 ottobre. Dig Liv Dis 2006; 38:A106.
19. Terrin G, Salvatore S, Cirillo P, **Passariello A**, Muscariello R, Siani MC, Porcaro F, Guarino A, Berni Canani R. PREVENTIVE EFFECT OF PROBIOTICS ON INFECTIONS ASSOCIATED WITH GASTRIC ACIDITY INHIBITORS THERAPY IN CHILDREN. XIII Congresso Nazionale SIGENP. Genova 26-28 ottobre. Dig Liv Dis 2006; 38:A94.
20. Terrin G, **Passariello A**, Ruggieri A, Salvia G, Lega L, Zappulli D, Messina F, De Martino A, Cascioli C, Paludetto R, Berni Canani R. for Neonatal Working Group of SIGENP. INCREASED RISK OF INFECTIONS IN GASTRIC ACIDITY INHIBITORS TREATED NEWBORN A MULTICENTRE SIGENP STUDY. XIII Congresso Nazionale SIGENP. Genova 26-28 ottobre. Dig Liv Dis 2006;38:A94.
21. **Passariello A**, Castaldo A, Russo S, Terrin G, Porcaro F, Siani MC, Puzone C, Luciani L, Carlucci A, Cirillo P, Guarino A, Berni Canani R, for the Intestinal Infections Working Group of the Italian Society of Pediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition (SIGENP). ZINC IN THE TREATMENT OF PAEDIATRIC ACUTE DIARRHOEA: FIRST CLINICAL TRIAL PERFORMED IN AN INDUSTRIALISED COUNTRY. XIII Congresso Nazionale SIGENP. XIII Congresso Nazionale SIGENP. Genova 26-28 ottobre Dig Liv Dis 2006;38:A94.
22. Terrin G, **Passariello A**, Castaldo G, Cardillo G, Salvatore F, Siani MC, Porcaro F, Puzone C, Troncone R, Berni Canani R. GENOTYPE-PHENOTYPE CORRELATIONS IN CHILDREN AFFECTED BY CONGENITAL CHLORIDE DIARRHEA. Second ESPGHAN Capri Meeting. 12-14 Ottobre 2006.
23. Messina F, **Passariello A**. L'ALIMENTAZIONE DEL NEONATO NATO DA TAGLIO CESAREO. X Congresso Internazionale Problematiche in Pediatria e Neonatologia: "I bambini nel bacino del Mediterraneo" Aversa 24-25 novembre 2006.
24. Terrin G, **Passariello A**, Salvia G, Zappulli D, Lega L, Messina F, Porcaro F, De Martino A, Manguso F, Berni Canani R. GASTRIC ACIDITY INHIBITORS THERAPY INCREASE THE RISK OF NECROTIZING ENTEROCOLITIS IN VLBW INFANTS. 40th Annual Meeting of the European Society of Pediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition, ESPGHAN, Barcelona , Spain, 9-12 May 2007. JPGN 2007;
25. Berni Canani R, Terrin G, Salvatore S, Cirillo P, **Passariello A**, Puzone C, Siani MC, Porcaro F, Guarino A. PROBIOTICS PREVENT THE INCREASED RISK OF INFECTIONS ASSOCIATED WITH GASTRIC ACIDITY INHIBITORS THERAPY IN CHILDREN. 40th Annual Meeting of

- the European Society of Pediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition, ESPGHAN, Barcelona , Spain, 9-12 May 2007. JPGN 2007;
26. Moschella S, Fonterico V, Sarnelli M, Di Lena S, Umbaldo A, Terrin G, **Passariello A**, Zappulli D, Salvia G. TIMING NELLA SOMMINISTRAZIONE DI SURFATTANTE E OUTCOME RESPIRATORIO. XIII Congresso Nazionale SIN, Rimini, Italia, 20-23 maggio 2007. Acta Neonatologica & Pediatrica 2007.
 27. **Passariello A**, Martone A, Migliorati R, De Chiara C, Moschella S, Fonterico V, Sarnelli M, Di Lena S, Umbaldo A, Zappulli D, Russo S, Salvia G. NEUROBLASTOMA SURRENALICO CONGENITO: UNA DIAGNOSI INSIDIOSA. XIII Congresso Nazionale SIN, Rimini, Italia, 20-23 maggio 2007. Acta Neonatologica & Pediatrica 2007.
 28. Di Lena S, Moschella S, Fonterico V, Sarnelli M, , Umbaldo A, Terrin G, **Passariello A**, Zappulli D, Salvia G. MORBIDITA' RESPIRATORIA IN NATI DA TC A TERMINE. XIII Congresso Nazionale SIN, Rimini, Italia, 20-23 maggio 2007. Acta Neonatologica & Pediatrica 2007.
 29. Salvia G, Terrin G, Di Comite A, Stronati M, Moschella S, Fonterico V, Di Lena S, Sarnelli M, **Passariello A**, Umbaldo A, Zappulli D. NUTRIZIONE ENTERALE PRECOCE O TARDIVA NEL NEONATO VLBW. RISULTATI PRELIMINARI DI UNO STUDIO MULTICENTRICO RANDOMIZZATO E CONTROLLATO. XIII Congresso Nazionale SIN, Rimini, Italia, 20-23 maggio 2007. Acta Neonatologica & Pediatrica 2007.
 30. Umbaldo A, Moschella S, Fonterico V, Sarnelli M, Di Lena S, Terrin G, **Passariello A**, Zappulli D, Salvia G. OSTRUZIONE INTESTINALE DA MECONIO NEL NEONATO ESTREMAMENTE PREMATURO. XIII Congresso Nazionale SIN, Rimini, Italia, 20-23 maggio 2007. Acta Neonatologica & Pediatrica 2007.
 31. Siani MC, Scudiero O, Cucchiara S, Romeo E, De Angelis G, Monaco M, Forgione L, Castaldo G, Troncone R, Terrin G, **Passariello A**, Salvatore F, Berni Canani R. INNATE IMMUNITY AND PAEDIATRIC ONSET INFLAMMATORY BOWEL DISEASES: A HUMAN BETA DEFENSINS GENOTYPE INVESTIGATION. XIV Congresso Nazionale SIGENP Roma 18-20 ottobre 2007. Dig Liv Dis. 2007; 39: A 50.
 32. Terrin G, Salvatore S, Cirillo P, **Passariello A**, Luini C, Siani MC, Ruotolo S, Porcaro F, Guarino A, Berni Canani R. PROBIOTIC LIMIT THE RISK OF INFECTIONS DERIVING FROM GASTRIC ACIDITY INHIBITORS THERAPY IN CHILDREN. XIV Congresso Nazionale SIGENP Roma 18-20 ottobre 2007. Dig Liv Dis. 2007; 39: A 61.
 33. Terrin G, **Passariello A**, Salvia G, Manguso F, Porcaro F, Zappulli D, Lega L, Puzone C, Ruotolo S, Berni Canani R. RANITIDINE TREATMENT IS ASSOCIATED WITH AN INCREASED RISK OF NECROTIZING ENTEROCOLITIS IN NEWBORN. XIV Congresso Nazionale SIGENP Roma 18-20 ottobre 2007. Dig Liv Dis. 2007; 39: A 62.

Pubblicazioni attinenti alla tesi

Terrin G, Passariello A, Manguso F, Salvia G, Zappulli D, Rapacciuolo L, Berni Canani R. SERUM CALPROTECTIN AS NEW DIAGNOSTIC MARKER FOR NEONATAL SEPSIS. Pediatrics, in press.

Siani MC, Scudiero O, Cucchiara S, Romeo E, De Angelis G, Monaco M, Forgiione L, Castaldo G, Troncone R, Terrin G, Passariello A, Salvatore F, Berni Canani R. INNATE IMMUNITY AND PAEDIATRIC ONSET INFLAMMATORY BOWEL DISEASES: A HUMAN BETA DEFENSINS GENOTYPE INVESTIGATION. XIV Congresso Nazionale SIGENP Roma 18-20 ottobre 2007. Dig Liv Dis. 2007; 39: A 50.

Title Page**DIAGNOSTIC UTILITY OF SERUM CALPROTECTIN DETERMINATION IN NEONATAL SEPSIS**

Gianluca Terrin¹, MD; Annalisa Passariello¹, MD; Francesco Manguso², MD, PhD; Gennaro Salvia³, MD; Donato Zappulli³, MD; Luciano Rapacciuolo¹, MD; Concetta Fausta Cascioli¹, MD; Francesco Raimondi¹, MD; Roberto Paludetto¹, MD; Riccardo Troncone¹, MD; and Roberto Berni Canani¹, MD, PhD.

¹Department of Pediatrics, University Federico II of Naples, ²Cardarelli Hospital, ³Fatebenefratelli Hospital, Naples, Italy.

Corresponding author:

Roberto Berni Canani, MD, PhD

Department of Pediatrics

University "Federico II" of Naples

Via S. Pansini 5, 80131 Naples, Italy

Phone: +39 0817462680. Fax: +39 0815451278

E-mail: berni@unina.it

Total words count. 1825

Running title: Serum Calprotectin as early diagnostic marker of neonatal sepsis.

Key Words. Newborn, Infection, Diagnosis, Antibiotic, Innate Immunity, C-Reactive Protein.

ABSTRACTS

Objectives. The determination of calprotectin (Clp) levels in different biological samples was tested as a diagnostic marker of many infectious and inflammatory conditions. We investigated whether serum Clp determination could be useful for the diagnosis of neonatal sepsis.

Design, Setting, and Participants. Prospective, multicenter study involving newborns with a birth weight > 750 g, gestational age > 24 weeks, postnatal age > 72 hours of life observed into two neonatal intensive care units. Subjects presenting clinical condition suggestive for sepsis received a full diagnostic work-up including white blood cell count, immature-to-total-neutrophil ratio, platelets count, C-Reactive protein, serum Clp, cultures for bacteria and fungi, chest or abdominal radiograph. Newborns not presenting any pathological condition during hospitalization were classified as healthy subjects and served for normative data definition. Serum Clp values was determined by an ELISA technique (Calprest®, Trieste, Italy) at the same postnatal age for subject with suspected sepsis and healthy controls.

Results. Normal data for serum Clp was defined (median 0.8 µg/ml; IQR 2). Among patients with suspected sepsis, median serum Clp concentration was higher in newborns with proven sepsis (3.5 µg/ml; IQR 1.2) compared to that observed in patients with non-infectious diseases (1.4 µg/ml; IQR 0.6)($p < 0.001$). An optimal cutoff point of 2.1 µl/ml serum Clp was calculated by the ROC-curve to distinguish newborns with proven sepsis by subjects with non infectious diseases. Compared with other inflammatory markers, serum Clp determination showed a better diagnostic accuracy (sensitivity 100%, specificity 97%, positive predictive value 93%, negative predictive value 100%).

Conclusions. Serum Clp may be an accurate additional diagnostic marker for early identification of sepsis during the neonatal period.

INTRODUCTION

The mortality rate in neonatal sepsis remains high despite new treatment modalities and improvements in technology (1-3). Neonatal sepsis onset is often inconspicuous, with minimal, subtle and non-specific signs. At the same time, the clinical course may be fulminating, leading to septic shock, disseminated intravascular coagulation, and death within few hours (4,5). For these reasons, a prompt diagnosis to initiate an appropriate therapy is crucial for a newborn with sepsis. A wide variety of biochemical markers have been proposed for the early diagnosis of sepsis in these particular patients, including phase reactant inflammatory proteins, CD11b, CD64, interleukin-6, and interleukin-8 (6). However, in neonatology clinical practice the use of these diagnostic markers is still limited (6). In addition, many of these markers are components of acquired immunity, that is largely immature in the neonatal period (6, 7). On the contrary, innate immunity seems to be activated in the first weeks of life (8,9), but the potential diagnostic use of selected innate immunity components in newborn remain largely uninvestigated. Calprotectin (Clp), originally discovered as an antimicrobial S100 protein has recently emerged as a valuable marker in the diagnostic approach of several infectious and inflammatory conditions (10-14). Calprotectin is a 36-kDa calcium and zinc binding protein and it constitutes approximately 60% of soluble cytosol proteins in human neutrophils (14). Calprotectin have an important role in protecting cells against invasive microorganisms and in inflammatory processes by regulating adhesion of myeloid cells to endothelium and extracellular matrix (10). This protein is released by innate immunity cells after host-pathogen interaction, and it exerts several antimicrobial effects largely related to a competition for Zn^{2+} (10). Calprotectin is detectable in serum, urine, feces, and liquor by a simple, rapid and inexpensive ELISA technique (10, 12, 14). The serum level of Clp are elevated in many infectious or inflammatory diseases in adults (10, 11). In this prospective study we aimed to investigate whether serum Clp determination could be useful for the diagnosis of neonatal sepsis.

METHODS

Study design

This prospective investigation involved two Neonatal Intensive Care Units (NICU) over a 12-month study period starting from October 2004. The study protocol was approved by the Ethic Committee of each center. Written informed consent was obtained from the parents of all patients enrolled in the study. A common clinical policy for sepsis management in the Centers was defined during two meetings. The research was not sponsored by any company.

Study population

Newborns were eligible for the study when they fulfilled all of the following criteria: 1) gestational age > 24 weeks or birth body weight > 750g; 2) postnatal age > 72 h; 3) no antibiotic treatment before enrollment; 4) parental consent. We excluded all subjects with: maternal history of immunologic, inflammatory, or infectious diseases requiring antibiotic therapy during pregnancy; history of severe perinatal asphyxia, surgery, or intraventricular hemorrhage (IVH, grades III-IV)(15), before enrollment. All subjects were examined daily by expert neonatologists during the entire length of hospitalization (at least 4 weeks) to monitor the presence or the absence of any pathological condition. Full sepsis evaluation was reserved to subjects presenting ≥ 2 well established signs suggestive for a systemic infection (16-18), including: poor perfusion; muscular dystonia; lethargy; enteral nutrition intolerance; bloody stools; progressive increase in O₂ requirement; bradycardia; dyspnea (tachypnea, grunting, nasal flaring, retractions); and unstable body temperature ($<35.5^{\circ}$ or $>37.5^{\circ}\text{C}$); unexplained and persistent metabolic acidosis (base deficit > 10) and/or hyperglycaemia (>10 mmol/l). In patients with suspected sepsis, a full diagnostic work up was performed within 60 min, including hematology and biochemical laboratory investigations (white blood cell count, WBC; immature-to-total-neutrophil ratio, I/T ratio; platelets count, Plt; and C-Reactive protein, CRP), cultures for bacteria and fungi, chest or abdominal radiograph if the patient presented signs suggestive of thoracic or intra-abdominal disease. A first blood

sample was taken at the time of the initial sepsis evaluation, and further samples were collected at 24 and 48 hours after the onset of the symptoms to monitor the pattern of WBC, I/T ratio, Plt, and CRP (6, 16, 19). In any case, during the first 60 min from the onset of the signs of suspected sepsis, a small blood sample for serum Clp determination (0.5 ml) was collected and analyzed separately.

At the end of this diagnostic work-up, subjects with a suspected sepsis were classified into 2 groups, according to previously standardized criteria (16-18): 1) sepsis group, consisted of patients with positive cultures (culture-proven sepsis) or with negative culture but presenting signs or symptoms suggestive for sepsis and at least one persistent (>24h) pathological value of laboratory parameters (WBC <4 or >30 x 10³/mm³; I/T ratio > 0.20; Plt < 50'000 or > 500'000 x 10³/mm³; CRP > 1.0 mg/dl)(clinical sepsis); 2) non-infectious conditions group, consisted of neonates without evidence of sepsis and who received a final diagnosis of a non-infectious disease. Newborns consecutively observed in the same study period and not presenting any pathological condition during the 4 weeks of follow up were classified as healthy subjects and served as controls. The collection of blood specimens in healthy subjects was performed during routine sampling, to determine: WBC, I/T ratio, Plt, CRP, and serum Clp. Data obtained in healthy neonates were analysed to define normative data. At the end of the 12 month-study-period each subject with sepsis was matched with the next one healthy neonate with the similar postnatal age (range 96 h), gestational age (range 3 weeks) and birth weight (range 250 g).

Laboratory procedures

All laboratory investigations were performed by researchers blind from clinical data. Complete blood counts were done by cell counter (20). Leukocytes were differentiated by microscopy. The I/T ratio was calculated as the sum of the immature granulocyte divided by the sum of all neutrophils (20). CRP was measured by rate nephelometry (16). Serum Clp

was measured by commercial ELISA assay (*Calprest®*, Eurospital, Trieste, Italy), as previously described (10,12,14). The minimum concentration that can be measured with this kit is 1.6 ng/ml human Clp.

Statistical analysis

For categorical variables the Pearson chi-square test was performed. Continuous variables were expressed as median and interquartile range (IQR). The different groups were compared for variables by the Kruskal-Wallis H test, with the Dunn test for the post hoc analysis. Linear regression analysis with stepwise method was used to study the possible influence of different variable on the serum Clp concentrations. Binary logistic regression analysis was used to examine the relationship between the absence or presence of an infectious disorder as the dependent variable and serum Clp (normal/increased), WBC and CRP values (normal/increased), as the independent variables. All tests of significance were two-sided. A p value of ≤ 0.05 was considered significant. The statistical analysis was performed using the SPSS software package for Windows (release 14.0.2, 21 Apr 2006; SPSS Inc., Chicago, IL., USA) and StatsDirect (release 2.5.6, 15 Apr 2006).

RESULTS

During the observational period, 300 newborns were considered eligible for the study (165 and 135 in the two centers respectively). Twenty-five patients were excluded because of: incomplete clinical data or deviation from study protocol (10 cases), parental consent withdraw (8 patients), immunodeficiency (2 patients), IVH grades III and IV (5 patients). One-hundred newborns were investigated for suspected late-onset sepsis: 28 patients were classified as culture-proven sepsis (10 *Streptococcus* Group B; 5 *E. coli*; 3 *Staphylococcus coagulase negative*; 2 *Serratia marcescens*; 2 *Klebsiella pneumoniae*; 6 *Candida albicans*), 41 as clinical sepsis, 29 infants received a final diagnosis of non-infectious disease (6 intestinal malformations; 5 persistent ductus arteriosus; 4 metabolic disorders; 4 neonatal withdrawal syndrome; 2 meconium aspiration syndrome; 2 cardiac malformations; 2 diaphragmatic hernia; 2 aspiration of foreign material; 2 hemolytic diseases), and 2 patients were lost to follow-up (transferred to other hospital). One-hundred and seventy-five subjects were considered healthy controls and their serum Clp levels were used to define normative data (Figure 1). Among this population, for comparison with subjects investigated for suspected sepsis, 100 matched healthy controls were selected. Main clinical and demographic characteristics of the study population were reported in Table 1. Serum Clp values were reported in Figure 2. Patients with culture proven sepsis and clinical sepsis showed higher median serum Clp concentration in comparison to healthy subjects ($p < 0.001$) and non-infectious diseases ($p < 0.001$). No significant difference in serum Clp concentration was observed between patients with culture-proven and clinical sepsis, and between patients with non-infectious conditions and healthy subjects (Figure 2).

The linear regression analysis showed that serum Clp concentrations were not influenced by birth weight, sex, gestational and postnatal age, mode of delivery, prenatal steroid use, and the pathogen responsible for sepsis. No correlation was found between serum Clp and total WBC values. Optimal cut-off serum Clp value useful to identify a newborn with sepsis from

non-septic subjects was revealed by the ROC curve (Figure 3). The diagnostic accuracy of all tests included in this investigation was reported in Table 2.

DISCUSSION

The necessity of a diagnostic marker for sepsis with elevated sensitivity and negative predictive value (NPV), to easily identify the greatest number of patients with this condition, and with a high positive predictive value (PPV), to reduce the cost and risk of unjustified antibiotic use is a major challenge in neonatology (6).

The results of our study suggest that serum Clp could be a reliable and accurate diagnostic marker for early identification of late-onset sepsis in newborn. When measured simultaneously with the appearance of the first clinical signs of sepsis Clp showed higher sensitivity, PPV and NPV compared to the other inflammatory markers commonly used in clinical practice. The most used laboratory marker for neonatal sepsis is CRP (6,17,19).

Studies suggest that CRP is particularly useful in the late onset infections management (6,19). However, a major limitation for this test is related to the low diagnostic sensitivity during the first 24 h from the appearance of sepsis symptoms. Moreover, increased CRP concentrations have been demonstrated in non-infectious conditions, such as meconium aspiration syndrome (21). Conversely, in our study serum Clp resulted within the normal range in all patients with non-infectious diseases. In addition, it has been reported cases of life threatening systemic candidiasis that were not identified by CRP or by other markers of infection (22). Our results confirm that only a minority of the infants affected by *Candida albicans* sepsis showed elevated levels of CRP (1 out of 6), whenever all these patients showed increased level of serum Clp (23). Serum Clp is easily measured in a small volume of blood sample, using a simple, rapid and inexpensive ELISA technique (10 \$ for each determination). In addition, a new more rapid bedside Clp test (needs about 5 min) has been recently proposed to assess patients with inflammatory bowel diseases (24), and it could be useful in the future also in NICU.

To conclude, our results suggest that serum Clp measurement could be useful in the diagnostic approach in a newborn with suspected sepsis. Future studies are necessary to

determine the prognostic value of serum Clp, the correlation with the severity of sepsis, and to better define the possible influence of selected pathogens.

Table 1. Main demographic and clinical characteristics of the enrolled newborns.

	Healthy controls	Not-infectious diseases	Culture-proven Sepsis	Clinical sepsis
Number	100	29	28	41
Birth weight, g	2890 (IQR 1305; range 1360-3900)	1750 (IQR 1190; range 800-3930)	2960 (IQR 1100; range 750-3700)	2950 (IQR 1930; range 750-4420)
Gestational age, weeks	36 (IQR 4; range 30-41)	35 (IQR 3; range 27-40)	36 (IQR 4; range 26-41)	38 (IQR 8; range 25-40)
Male, n (%)	57 (57)	14 (49)	17 (61)	28 (65)
Spontaneous delivery, n (%)	15 (15)	5 (17)	6 (21)	10 (23)
Subjects with central vascular access, n (%)	27 (27)	11 (38)	12 (43)	17 (40)
Day of life at the enrollment	6 (IQR 8; range 5-20)	6 (IQR 3; range 4-18)	6 (IQR 7; range 4-25)	6 (IQR 3; range 4-26)

Note. Data expressed as median (IQR; range) if not specified.

Table 2.
Diagnostic accuracy of different markers in distinguishing among newborns with suspected sepsis, non-infectious conditions from sepsis (A) or culture proven sepsis (B).

	Sensitivity		Specificity		PPV		NPV		Likelihood ratio (+ test)	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
WBC	15 (8-27)	11 (2-30)	93 (77-99)	93 (77-99)	84 (54-98)	60 (14-94)	32 (22-43)	54 (39-68)	2 (1-9)	2 (1-7)
I/T Ratio	21 (6-45)	28 (3-70)	85 (42-99)	85 (42-99)	80 (28-99)	67 (9-99)	25 (11-52)	54 (23-83)	2 (1-9)	2 (1-14)
Plt	11 (5-21)	23 (9-43)	96 (82-99)	96 (82-99)	88 (52-99)	85 (42-99)	31 (22-42)	58 (43-72)	3 (1-20)	7 (1-41)
CRP	29 (18-41)	35 (17-35)	93 (77-99)	93 (77-99)	90 (70-98)	81 (48-97)	35 (25-47)	61 (45-76)	4 (1-16)	5 (1-19)
Serum Clp	88 (78-95)	100 (87-100)	93 (77-99)	93 (77-99)	97 (89-100)	93 (76-99)	77 (60-90)	100 (87-100)	13 (4-46)	14 (4-51)

Abbreviations. PPV: Positive predictive value. NPV: negative predictive value. CRP: C-reactive protein. Clp: Calprotectin.

Note. Cut-off value: Total neutrophil count = $4.0-25.0 \times 10^3/\text{mm}^3$; Platelet count = $50.0-500.0 \times 10^3/\text{mm}^3$; I/T Ratio >0.2 ; PCR $> 1 \text{ mg/dl}$; Serum Clp $> 2.0 \mu\text{l/ml}$ (A) and $> 2.1 \mu\text{l/ml}$ (B).

Figure 1.
Serum Calprotectin normative levels in newborn.

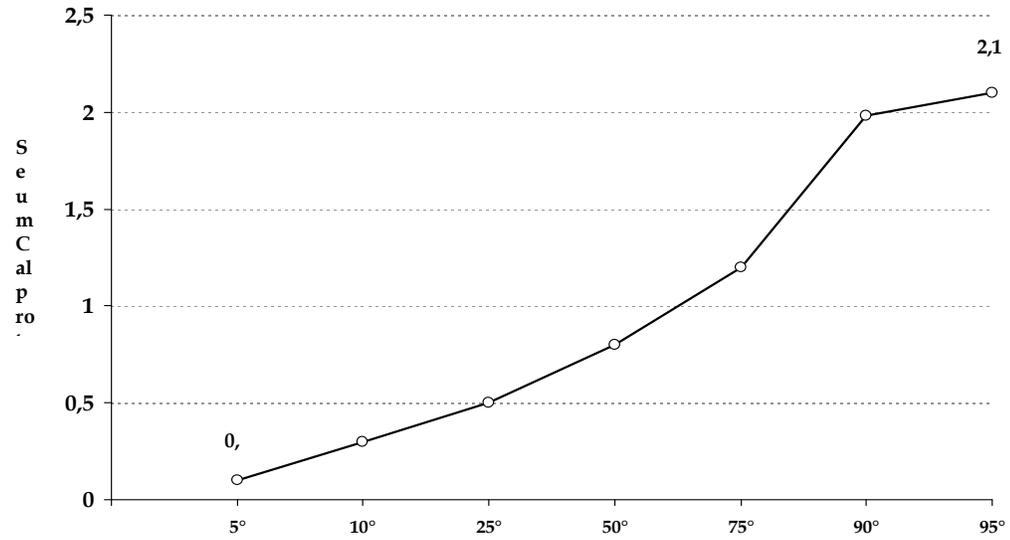


Figure 2.

Serum Calprotectin levels. Bold bars represent median values, upper and down limits of the box represent interquartile range (IQR); vertical lines represent 1° and 99° percentile.

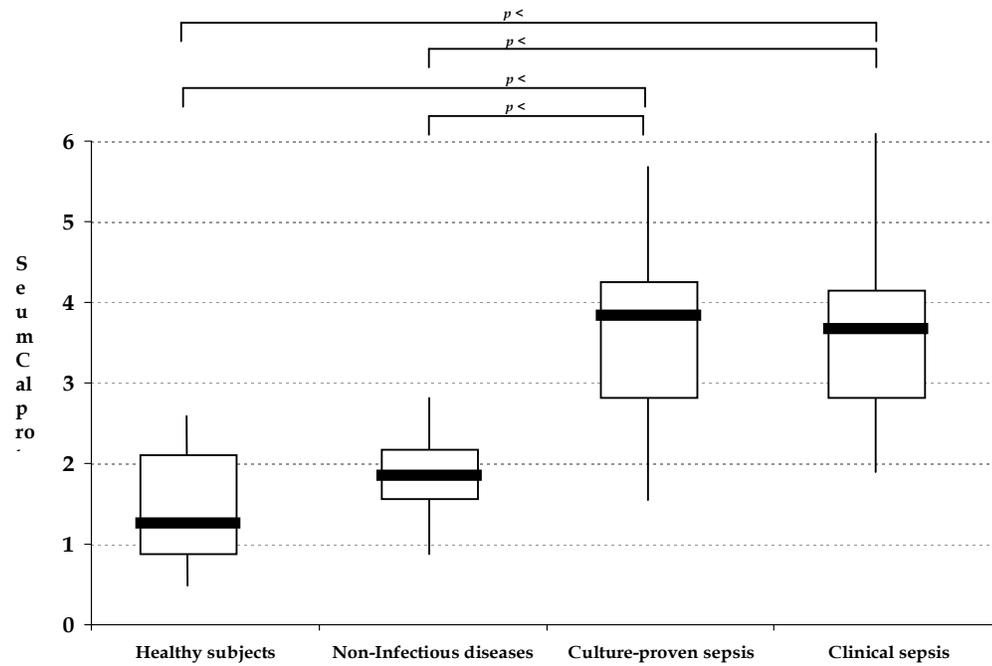
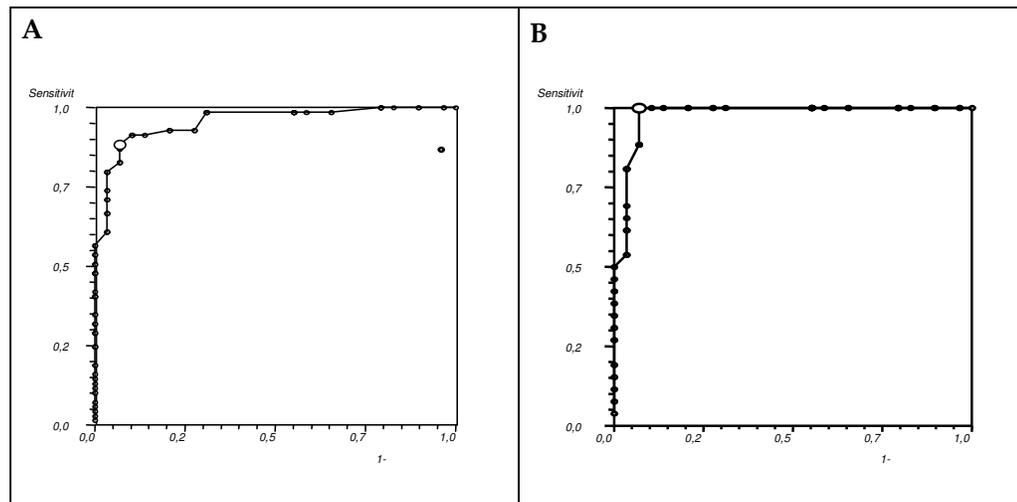


Figure 3.
Receiver operating characteristics (ROC) curve defining an optimal serum calprotectin cut-off value to distinguish among newborns with suspected sepsis, non-infectious diseases from sepsis (A) and culture proven sepsis (B).



REFERENCES

1. Gerdes JS. Diagnosis and management of bacterial infections in the neonate. *Pediatr Clin North Am* 2004; 51:939-59
2. Stoll BJ, Gordon T, Korones SB, et al. Early onset sepsis in very low birth weight neonates: a report from the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. *J Pediatr* 1996;129:72-80.
3. Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, et al. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics* 2002;110:285-91.
4. Brodie SB, Sands KE, Gray JE, et al. Occurrence of nosocomial blood-stream infections in six neonatal intensive care units. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19:56-65.
5. Berger A, Salzer HR, Weninger M, et al. Septicaemia in an Austrian neonatal intensive care unit: 7-year analysis. *Acta Paediatr* 1998; 87:1066-9.
6. Ng PC. Diagnostic marker of infection in neonates. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2004; 89:F229-35.
7. Kapur R, Yoder MC, Polin RA, Edwards MS, Baley JE, Toltzis P. The immune System. In: *Neonatal-Perinatal Medicine. Disease of the Fetus and Infant*. Eds. Fanaroff AA, Martin RJ. Ed 7th; pp. 676-744
8. Nupponen I, Turunen R, Nevalainen T, et al. Extracellular release of bactericidal/permeability-increasing protein in newborn infants. *Pediatr Res* 2002; 51:670-4

9. Marchini G, Lindow S, Brismar H, et al. The newborn infant is protected by an innate antimicrobial barrier: peptide antibiotics are present in the skin and vernix caseosa. *Br J Dermatol* 2002; 147: 1127-34.
10. Stritz I, Trebichavsky I. Calprotectin a pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation. *Physiol Res* 2004; 53: 245-53.
11. Poullis A, Foster R, Mendall MA, Fagerhol MK. Emerging role of calprotectin in gastroenterology. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 756-62.
12. Fagerhol MK. Calprotectin, a faecal marker of organic gastrointestinal abnormality. *Lancet* 2000; 356: 1783-4.
13. 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.
14. Berni Canani R, Rapacciuolo L, Romano MT, et al. Diagnostic value of faecal calprotectin in paediatric gastroenterology clinical practice. *Dig Liver Dis* 2004; 36:467-70.
15. Bassan H, Benson CB, Limperopoulos C et al . Diagnosis of neonatal sepsis. *Pediatrics* 2006; 117:2111-18.
16. Franz AR, Bauer K, Schalk A, et al. Measurement of Interleukin 8 in combination with C-reactive protein reduced unnecessary antibiotic therapy in newborn infants: a multicenter, randomized, controlled trial. *Pediatrics* 2004; 114:1-8.
17. Benitz WE, Han MY, Madan A, Ramachandra P. Serial serum C-reactive protein levels in the diagnosis of neonatal infection. *Pediatrics* 1998; 102: e41.

18. Ng PC, Cheng SH, Chui KM, et al. Diagnosis of late onset neonatal sepsis with cytokines, adhesion molecules, and C-reactive protein in preterm very low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1997; 77:F221-7.
19. Franz A, Steinbach G, Kron M, Pohlandt F. Interleukin-8 and C-reactive protein as markers of bacterial infections. *Pediatrics* 1999;104:447-53.
20. Geaghan SM. Hematologic values and appearances in the healthy fetus, neonate, and child. *Clin Lab Med* 1999; 19:1-37
21. Pourcyrous M, Bada HS, Korones SB, et al. Significance of serial C-reactive protein responses in neonatal infection and other disorders. *Pediatrics* 1993; 92:431-5.
22. Ng PC, Lee CH, Fok TF, et al. Central nervous system candidiasis in preterm infants: limited value of biochemical markers for diagnosis. *J Paediatr Child Health* 2000; 36:509-10.
23. Kleinegger CL, Stoeckel DC, Kurago ZB. A comparison of salivary calprotectin levels in subjects with and without oral candidiasis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 92:62-7.
24. Shastri Y, Povse N, Stein J. Comparative study of new rapid bedside fecal calprotectin test with an established ELISA to assess intestinal inflammation in a prospective study. *Gastroenterology* 2006; S1314.