

Diagnostický význam postnatální dynamiky interleukinu-6 u předčasně narozených novorozenců

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

¹Dětská klinika, Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty Univerzity Palackého Olomouc

²Novorozenecké oddělení, Fakultní nemocnice Olomouc

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

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

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

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

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

Klíčová slova: novorozenec, sepse, interleukin-6, pupečník.

Diagnostic significance of postnatal interleukin-6 dynamics in preterm neonates

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

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

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

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

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

Úvod

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

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

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

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



MUDr. Anna Baštan

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

Cit. zkr: Pediatr. praxi. 2023;24(6):398-402

Článek přijat redakcí: 5. 9. 2023

Článek přijat k publikaci: 24. 10. 2023

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

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

Hypotetický ideální marker sepsy by měl mít dobře definovanou optimální „cut-off“ hodnotu a co největší senzitivitu a negativní prediktivní hodnotu. Měl by předpovědět závažnost infekce v počátku klinických příznaků

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

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

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

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

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

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

Pacienti a metody

Pacienti

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

Metody

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

Statistické metody

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

Výsledky

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

Tab. 1. Demografická data sledované kohorty

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

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

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

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

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

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

Diskuze a závěr

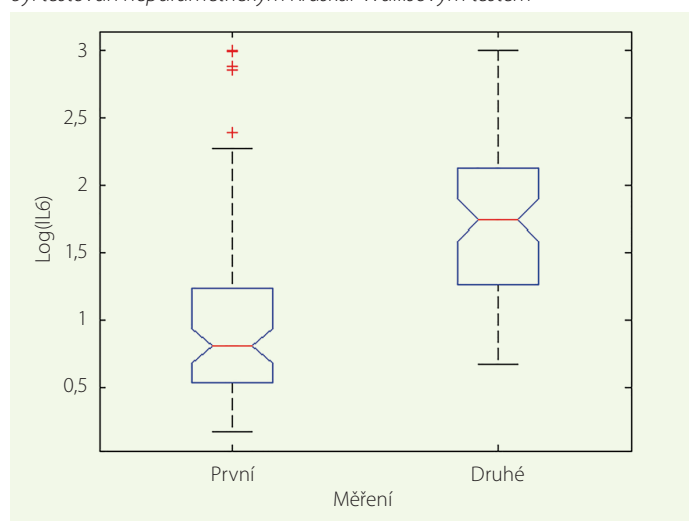
Novorozenecké sepse jsou stále palčivým tématem a jedním z hlavních výzkumných témat v odborném neonatologickém světě. Problém v časném rozpoznání septického novorozence tkví převážně v nezralém imunitním systému předčasně narozeného novorozence a v nespecifickém klinickém obraze. Dalším problémem je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

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

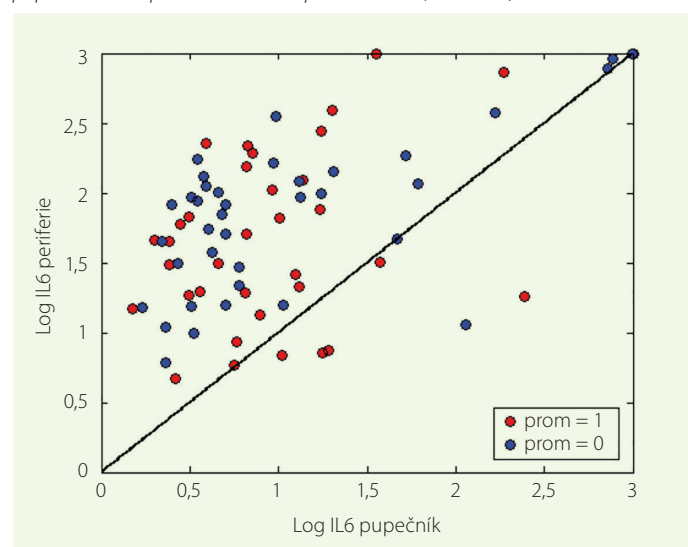
Studie, která porovnává pupečnickové a periferní hodnoty IL-6 u zdravých a septických novorozenců, je studie týmu indických lékařů z roku 2013. Periferní krev byla odebrána v okamžiku vzniku klinických známek sepse. U zdravých kontrol čas není definován. Přesný čas odběru periferní krve neznáme. U septických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

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

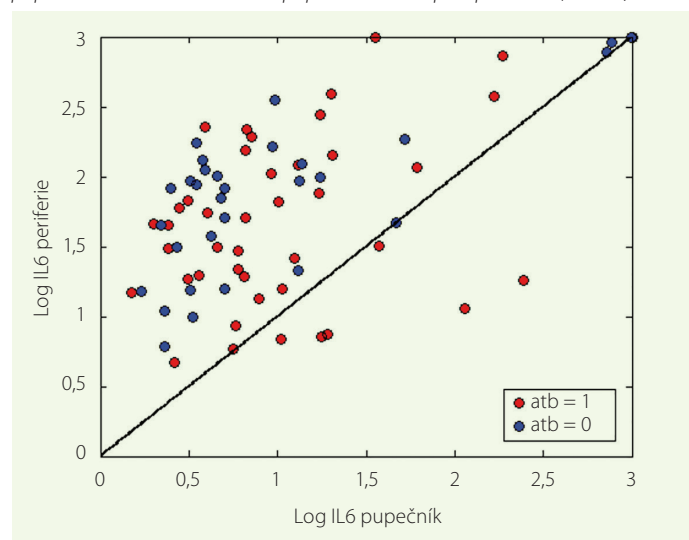
Graf 1. Srovnání hladiny IL-6 z pupečnickové a periferní krve. Osa y je zobrazena v logaritmické škále. Rozdíl mezi hodnotami je významný ($p < 0,001$). Rozdíl byl testován neparametrickým Kruskal-Wallisovým testem



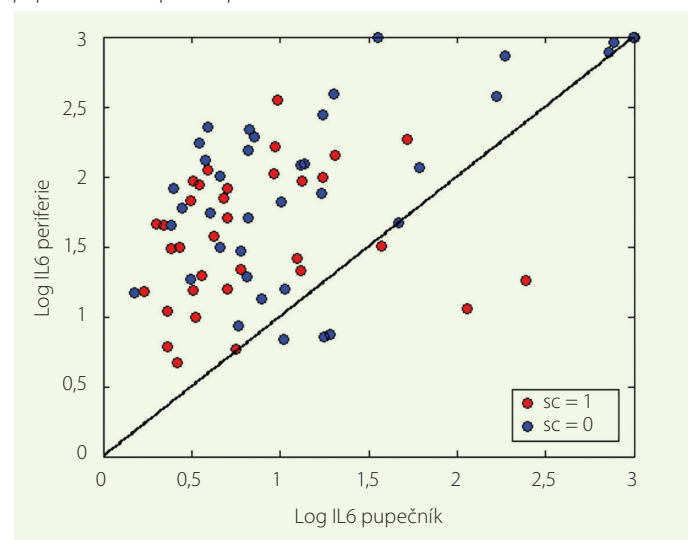
Graf 2. Závislost vzrůstu interleukinu-6 v periferní krvi oproti jeho hodnotě v krvi pupečnickové na předčasně odtěklé plodové vodě (PROM = 1)



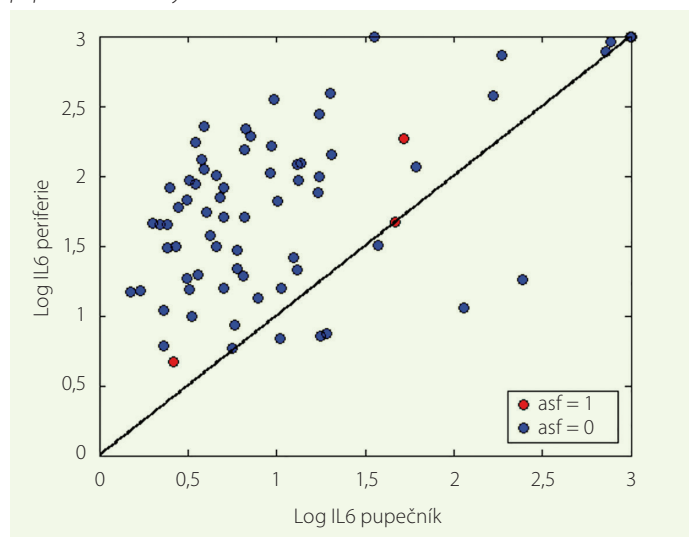
Graf 3. Závislost vzrůstu interleukinu-6 v periferní krvi oproti jeho hodnotě v krvi pupečnickové na antibiotické terapii podané matce před porodem (ATB = 1)



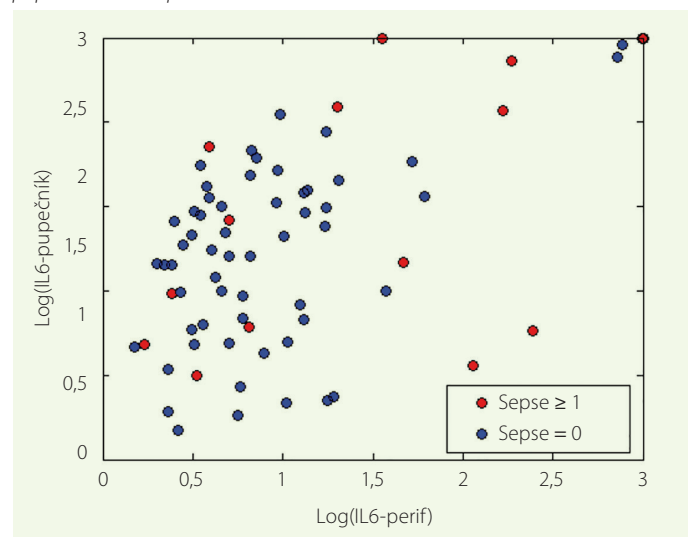
Graf 4. Závislost vzrůstu interleukinu-6 v periferní krvi oproti jeho hodnotě v krvi pupečnickové na způsobu porodu



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



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



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

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

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

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

- pupečnickové hodnoty, při klinických známkách: 20–25 ng/l velmi suspektní
- sérové hladiny, při klinických známkách: 250–300 ng/l velmi suspektní
- při těchto hodnotách a klinických známkách indikujeme ATB a ev. dle dalšího monitoringu časné vysadíme
- pokud jsou tyto hodnoty bez klinických známek sepse, čili odběr se bral z jiného důvodu, pak ATB neindikujeme
- hodnoty (pupečnickové i periferní) 1 000 ng/l a více – ATB indikujeme i bez klinických známek sepse

*Článek vznikl za podpory grantu
IGA_LF_2021_047.*

LITERATURA

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

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

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

18. Weeks J, Reynolds L, Taylor D, et al. Umbilical cord blood interleukin-6 levels and neonatal morbidity. *Obstet Gynecol*. 1997;90(5):815–818.
19. Cernada M, Badia N, Modesto V, et al. Cord blood interleukin-6 as a predictor of early-onset neonatal sepsis. *Acta Paediatr Int J Paediatr*. 2011;101(5):203–207. doi: 10.1111/j.1651-2227.2011.02577.x.
20. Cobo T, Kacerovsky M, Andrys C, et al. Umbilical Cord Blood IL-6 as Predictor of Early-Onset Neonatal Sepsis in Women with Preterm Prelabour Rupture of Membranes. *PLoS One*. 2013;8(7):4–9. doi: 10.1371/journal.pone.0069341.
21. Fan Y, Yu JL. Umbilical blood biomarkers for predicting early-onset neonatal sepsis. *World J Pediatr*. 2012;8(2):101–108. doi: 10.1007/s12519-012-0347-3.
22. Steinberger E, Hofer N, Resch B. Cord blood procalcitonin and Interleukin-6 are highly sensitive and specific in the prediction of early-onset sepsis in preterm infants. *Scand J Clin Lab Invest*. 2014;74(5):432–436. doi: 10.3109/00365513.2014.900696.
23. Santana C, Guindeo M, González G, et al. Cord blood levels of cytokines as predictors of early neonatal sepsis. *Acta Paediatr*. 2001;90(10):1176–1181. doi: 10.1080/080352501317061602.
24. Marhukumar R, Thangam EB. Differential regulation of inflammatory mediators and granule-associated mediators in neonatal sepsis observed in cord and peripheral blood. *Int J Interf Cytokine Mediat Res*. 2013;5:33–37. doi: <https://doi.org/10.2147/IJICMR.S54301>.
25. Eichberger J, Resch B. Reliability of Interleukin-6 Alone and in Combination for Diagnosis of Early Onset Neonatal Sepsis: Systematic Review. *Front Pediatr*. 2022;10(March). doi: 10.3389/fped.2022.840778. eCollection 2022.