



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΥΓΕΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΙΔΙΟΥ
ΝΕΟΓΝΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ
ΠΡΩΩΡΩΝ ΚΑΙ ΤΕΛΕΙΟΜΗΝΩΝ ΝΕΟΓΝΩΝ ΚΑΤΑ ΤΟΝ
ΠΡΩΤΟ ΜΗΝΑ ΤΗΣ ΖΩΗΣ**

**ΕΥΘΑΛΙΑ ΧΟΤΟΥΡΑ
ΠΑΙΔΙΑΤΡΟΣ - ΝΕΟΓΝΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2009





**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΥΓΕΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΙΔΙΟΥ
ΝΕΟΓΝΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ
ΠΡΟΩΡΩΝ ΚΑΙ ΤΕΛΕΙΟΜΗΝΩΝ ΝΕΟΓΝΩΝ ΚΑΤΑ ΤΟΝ
ΠΡΩΤΟ ΜΗΝΑ ΤΗΣ ΖΩΗΣ**

**ΕΥΘΑΛΙΑ ΧΟΤΟΥΡΑ
ΠΑΙΔΙΑΤΡΟΣ - ΝΕΟΓΝΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ



ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2009





ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ
ΕΡΕΥΝΑΣ ΚΑΙ ΔΙΔΑΚΤΙΚΗΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ

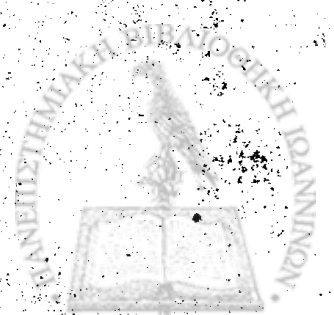
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΡΕΥΝΑΣ ΚΑΙ ΔΙΔΑΚΤΙΚΗΣ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΡΕΥΝΑΣ ΚΑΙ ΔΙΔΑΚΤΙΚΗΣ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ



ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΡΕΥΝΑΣ ΚΑΙ ΔΙΔΑΚΤΙΚΗΣ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΡΕΥΝΑΣ ΚΑΙ ΔΙΔΑΚΤΙΚΗΣ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ



«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα»

Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2



Ημερομηνία αίτησης της κ. Χοτούρα Ευθαλίας: 23-5-1997

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 331^α/21-10-1997

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Ανδρονίκου Στυλιανή Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Νεογνολογίας

Μέλη

Δρόσο Αλέξανδρο Αναπληρωτή Καθηγητή Παθολογίας

Σιαμοπούλου-Μαυρίδου Αντιγόνη Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παιδιατρικής

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 16-12-1997

«Η λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος προώρων και τελειόμηνων νεογνών τον πρώτο μήνα ζωής»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 653^α/3-2-2009

1. Ανδρονίκου Στυλιανή Καθηγήτρια Νεογνολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. Δρόσος Αλέξανδρος Καθηγητής Παθολογίας-Ρευματολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. Μπουραντάς Κωνσταντίνος Καθηγητής Παθολογίας-Αιματολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
4. Παρασκευαΐδης Ευάγγελος Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. Σιαμοπούλου –Μαυρίδου Αντιγόνη Καθηγήτρια Παιδιατρικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. Καλφακάκου Βασιλική Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
7. Χάλλα Άννα Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παιδιατρικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 5-3-2009

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Ιωάννης Γουδέβενος

Καθηγητής Παθολογίας -Καρδιολογίας

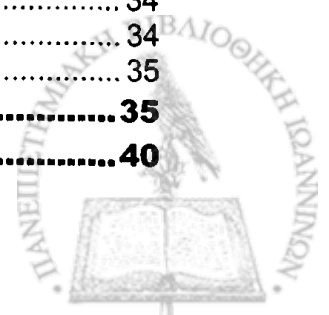
Η Γραμματέας της Σχολής

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΒΕΝΤΖΟΥΡΗ-ΖΩΗ



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	1
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	i
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	3
2. ΚΥΤΤΑΡΑ	4
2α. Λεμφοκύτταρα	5
2β. Τ-Λεμφοκύτταρα	5
2γ. Β-Κύτταρα (Ref)	6
IgM - Ανοσοσφαιρίνη	7
IgM - Ανοσοσφαιρίνη	7
IgG-Ανοσοσφαιρίνη	8
IgA-Ανοσοσφαιρίνη	8
IgD-Ανοσοσφαιρίνη	9
IgE-Ανοσοσφαιρίνη	9
3. ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑ	9
4. ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	10
4α. Το μονοπύρηνιο φαγοκυτταρικό σύστημα	10
4β. Το πολυμορφοπύρηνιο φαγοκυτταρικό σύστημα	12
Ηωσινόφιλα	13
5. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΗΣ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗΣ	14
5α. Χημειοταξία	14
5β. Οψονινοποίηση και εγκόλπωση	145
5γ. Ενσωμάτωση και αποκοκκιοποίηση	15
5δ. Ενδοκυττάρια μικροβιοκτονία και πέψη	16
6. ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ	16
6α. Ιντερλευκίνη 1 (IL- 1) (REF)	17
6β. Ιντερλευκίνη-6 (IL-6)	18
6γ. Παράγοντας νέκρωσης των όγκων (Tumor Necrosis Factor, TNF)	18
7. ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΝΕΟΓΝΟΥ	19
7α. Μη ειδικοί αμυντικοί μηχανισμοί	19
Ανατομικοί και χυμικοί φραγμοί	20
Πολυμορφοπυρηνικό φαγοκυτταρικό σύστημα	20
7β. Λειτουργικότητα νεογνικών πολυμορφοπύρηνων	21
Κινητικότητα	22
Επιφανειακή έκφραση των μορίων προσκόλλησης των ΠΜΠ	22
Φαγοκυττάρωση	23
Ενδοκυττάρια μικροβιοκτονία και δραστηριότητα των οξειδωτικών μηχανισμών των ΠΜΠ	24
Μονοπυρηνικό φαγοκυτταρικό σύστημα	25
Οψονίνες	25
7γ. Ειδικοί αμυντικοί μηχανισμοί	26
8. ΧΥΜΙΚΗ ΑΝΟΣΙΑ	26
9. ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΝΟΣΙΑ	27
Fc γάμμα υποδοχείς και φαγοκυττάρωση	33
Επίδραση της προωρότητας και του stress στη φαγοκυττάρωση	33
Αναπνευστική έκρηξη (Respiratory burst – RB)	34
Παραγωγή υπεροξειδίου	34
Λακτοφερρίνη και μυελοπεροξειδάση	35
10. ΝΕΟΓΝΙΚΕΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ	35
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	40



ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	41
ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	41
Ανοσοσφαιρίνες συμπληρώματος	42
Μέτρηση των κυτταροκινών	42
CRP	43
<i>Η κυτταρομετρία ροής</i>	43
<i>Στην κυτταρομετρία ανάλυσης εικόνας</i>	43
ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΗΤΗ ΡΟΗΣ	44
1. ΣΥΣΤΗΜΑ ΡΟΗΣ	44
2. ΟΠΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	45
3. ΣΥΣΤΗΜΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ, ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗΣ ΣΕ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟ ΣΗΜΑ	45
Ορισμοί	46
Μικροβιολογία	47
Στατιστική Ανάλυση	47
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	48
Σύγκριση ΤΜ (n=28) και πρόωρων (n=31) με πιθανή λοίμωξη (Πίνακας 12)	55
ΤΜ (n=22) και πρόωρα νεογνά (n=19) με σήψη (Πίνακας 13)	58
Πρόωρα με πιθανή λοίμωξη (IV _Σ) και σήψη (IV _{ΠΛ})	64
ΤΜ με πιθανή λοίμωξη (III _{ΠΛ}) και σήψη (III _Σ)	64
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	66
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	73
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	74
SUMMARY	75
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	777



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ένας μεγάλος αριθμός νεογνών εισάγεται στις Μονάδες Εντατικής Νοσηλείας Νεογνών (MENN) με τη διάγνωση της πιθανής λοίμωξης. Εντούτοις, μόνο ένα μικρό ποσοστό επιβεβαιώνεται. Στις ΗΠΑ τουλάχιστον 600.000 βρέφη υφίστανται μια εκτίμηση για βακτηριακή λοίμωξη κατά την περιγεννητική περίοδο και αυτά τα οποία παίρνουν αντιβίωση ανέρχονται σε 130.000-400.000/έτος. Οι επιβεβαιωμένες λοιμώξεις ανέρχονται σε 1-5/1.000 ζώσες γεννήσεις. Παρά την υπερ-θεραπεία υπάρχει καθυστέρηση στη διάγνωση.

Το 48.7% των νεογνών που εισέρχονται στη MENN είναι για αποκλεισμό λοίμωξης, το 63% απ' αυτά έχει πιθανή λοίμωξη με κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα και μόνο το 3.7% έχει επιβεβαιωμένη σήψη (θετικές καλλιέργειες αίματος (1)). Οι λοιμώξεις στη νεογνική ηλικία διακρίνονται σε πρώιμης έναρξης (<72 ωρών) και όψιμης (72 ωρών έως και 40 ημερών).

Τα εργαστηριακά ευρήματα επίσης, ιδιαίτερα οι τιμές των λευκών και των ουδετεροφίλων, δείχνουν μια χρονοεξαρτώμενη πορεία. Επίσης, η εκτίμησή τους ποικίλλει κατά ποικίλλους τρόπους. Τα «νυχτερινά» εργαστηριακά περνούν μέσα από το διπλό φίλτρο του φόβου και της κόπωσης, ή αν βρισκόμαστε δίπλα στο βρέφος η ενημερωνόμαστε μέσω τηλεφώνου. Ιδανικά φυσιολογικές τιμές για κάθε τεστ θα έπρεπε να τεκμηριώνονται με αυστηρά κριτήρια για το τι είναι «φυσιολογικό». Τα λευκά σε επείγουσες περιπτώσεις δεν είναι χρήσιμα και δεν υπάρχουν τιμές για λευκά που αφορούν νεογνά ασυμπτωματικά, που έχουν σήψη. Εντούτοις, ασυμπτωματικά παιδιά έχουν αναφερθεί ότι έχουν καλή έκβαση (Wiswell). Το ερώτημα παραμένει: ποιος αποφασίζει τι είναι ασυμπτωματικό. Οι περισσότερες μελέτες για το τι είναι φυσιολογικό περιλαμβάνουν μικρό αριθμό νεογνών.

Στόχος δεν πρέπει να είναι η κατάργηση του παραδοσιακού εργαστηριακού ελέγχου για τον αποκλεισμό της λοίμωξης αλλά διαφορετικής προσέγγισης καθορισμό τιμών σε φυσιολογικά νεογνά όπως και σε νεογνά με πιθανή λοίμωξη και επιβεβαιωμένη σήψη. Επίσης, κατανόηση της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος σε πρόωρα νεογνά. Ένα πρόωρο 28 εβδομάδων μπορεί να είναι διαφορετικό από ένα μεγαλύτερο πρόωρο 34 εβδομάδων.

Στόχος αυτής της μελέτης ήταν οι μελέτες των κυττάρων (κυτταρική και χυμική ανοσία), ανοσοφαιρινών και διαφόρων δεικτών λοίμωξης στη διάρκεια πιθανών και



επιβεβαιωμένων λοιμώξεων. Επίσης, μελετάται η επίδραση της ΗΚ στις διάφορες παραμέτρους που έχουν σχέση με την ανοσία του νεογνού.

Παραδίδοντας την εργασία μου νοιώθω την ανάγκη να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε Σας που ποικιλοτρόπως στηρίξατε την πεποίθησή μου ότι η εργασία μου διαλαμβάνει όλα τα στοιχεία της επιστημονικής τεκμηρίωσης.

Την Καθηγήτρια και Διευθύντρια της Παιδιατρικής Κλινικής του Π.Γ.Ν.Ι. κα Αντιγόνη Σιαμοπούλου-Μαυρίδου, που με κατήχησε στο σωστό προσανατολισμό από τα πρώτα δείγματα της έρευνάς μου.

Τον Καθηγητή της Ρευματολογικής Κλινικής του Π.Γ.Ν.Ι. κ. Αλέξανδρο Δρόσο, που η μακροχρόνια και συστηματική ενασχόλησή του με την ανοσολογία με βοήθησε να οδηγηθώ στην εμβάθυνση των στοιχείων της μελέτης μου.

Την Καθηγήτρια και Διευθύντρια της Νεογνολογικής Κλινικής του Π.Γ.Ν.Ι. κα Στυλιανή Ανδρονίκου που η επιμονή, και κυρίως η υπομονή της, ενεθάρρυνε τις όποιες αμφιβολίες μου στην πορεία των ερευνών μου και στήριξε την εργασία μου τόσο με την αδιάλειπτη παροχή πληροφοριών όσο κυρίως με τις πολύτιμες συμβουλές της.

Ευχαριστίες επίσης οφείλω στους:

Κ. Βασίλη Χολέβα για τη στατιστική ανάλυση και τη βοήθειά του στην εκτίμηση των αποτελεσμάτων.

Κα Πολυξένη Σπύρου για την πραγματοποίηση των εργαστηριακών εξετάσεων που αφορούν την κυτταρομετρία (CD3, CD4, CD8, Β-κύτταρα, NK), ανοσοσφαιρίνες (IgA, IgM, IgG), CRP και του συμπληρώματος (C3, C4).

Κα Αγγελική Κωστούλα, Αναπληρώτρια Διευθύντρια του Μικροβιολογικού Εργαστηρίου για τη διενέργεια των τεστ για τις κυτταροκίνες (IL-1β, IL-6, TNF-α).



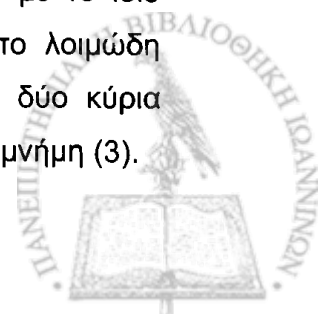
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Η ανοσολογία είναι μια νέα σχετικά επιστήμη. Ανοσία και λοίμωξη είναι αλληλένδετες. Λέγεται ότι τα θεμέλια τα έθεσε ο Edward Jenner ο οποίος 200 χρόνια πριν, το 1796 ανακάλυψε ότι η δαμαλίτιδα ή ο ιός της ευλογιάς των αγελάδων παρείχε προστασία έναντι της ευλογιάς του ανθρώπου. Όταν ο Jenner παρουσίασε το εμβόλιο δεν ήξερε τίποτα για το υπεύθυνο παθογόνο (2).

Το 19ο αιώνα ο Robert Koch απέδειξε ότι οι λοιμώξεις προκαλούνται από μικροοργανισμούς κάθε ένας από τους οποίους είναι υπεύθυνος για συγκεκριμένη νόσο ή παθολογική οντότητα. Ζούμε σε έναν κόσμο γεμάτο μικροοργανισμούς, ερχόμαστε διαρκώς σε επαφή με βακτηρίδια, μύκητες, ιούς, και ποικιλία άλλων παρασιτικών μορφών ζωής. Έχουμε πλούσια φυσική μικροχλωρίδα σε όλες τις επιφάνειες του σώματος, μέσα στο στόμα και στον γαστρεντερικό σωλήνα. Ζωτικής σημασίας πεπτικές λειτουργίες διαμεσολαβούνται κατά ένα μέρος από την εντερική χλωρίδα. Δεδομένης λοιπόν της συνεχούς επαφής μας με μικροοργανισμούς και παρά την συχνά ευεργετική συμβίωση μαζί τους, προξενεί έκπληξη το γεγονός ότι οι λοιμώξεις δεν είναι συχνότερες. Ωστόσο, μέσα από την μακροχρόνια συνύπαρξη, οι άνθρωποι ανέπτυξαν λεπτούς μηχανισμούς άμυνας κατά των πιθανών παθογόνων (3).

Οι περισσότερες λοιμώξεις στα φυσιολογικά άτομα είναι βραχείας διάρκειας και αφήνουν μικρή μόνιμη βλάβη. Αυτό οφείλεται στο ανοσοποιητικό σύστημα. Οποιαδήποτε ανοσοποιητική απάντηση περιλαμβάνει αναγνώριση του παθογόνου ή άλλου ξένου υλικού και ανάπτυξη αντίδρασης εναντίον του, με σκοπό την εξάλειψή του. Γενικά οι διάφοροι τύποι ανοσοποιητικής απάντησης διακρίνονται σε δύο κατηγορίες εγγενείς ή μη προσαρμοστικές και προσαρμοστικές ανοσοποιητικές απαντήσεις. Η σημαντική διαφορά μεταξύ αυτών είναι ότι η προσαρμοστική ανοσοποιητική απάντηση εμφανίζει υψηλή ειδικότητα για συγκεκριμένο παθογόνο αίτιο. Επιπλέον, η απάντηση βελτιώνεται σε κάθε επόμενη επαφή με το ίδιο παθογόνο αίτιο, ουσιαστικά το επίκτητο ανοσοποιητικό σύστημα «θυμάται» το λοιμώδη παράγοντα και τον εμποδίζει να προκαλέσει νόσο αργότερα. Επομένως, τα δύο κύρια χαρακτηριστικά της επίκτητης ανοσοποιητικής απάντησης είναι η ειδικότητα και η μνήμη (3).

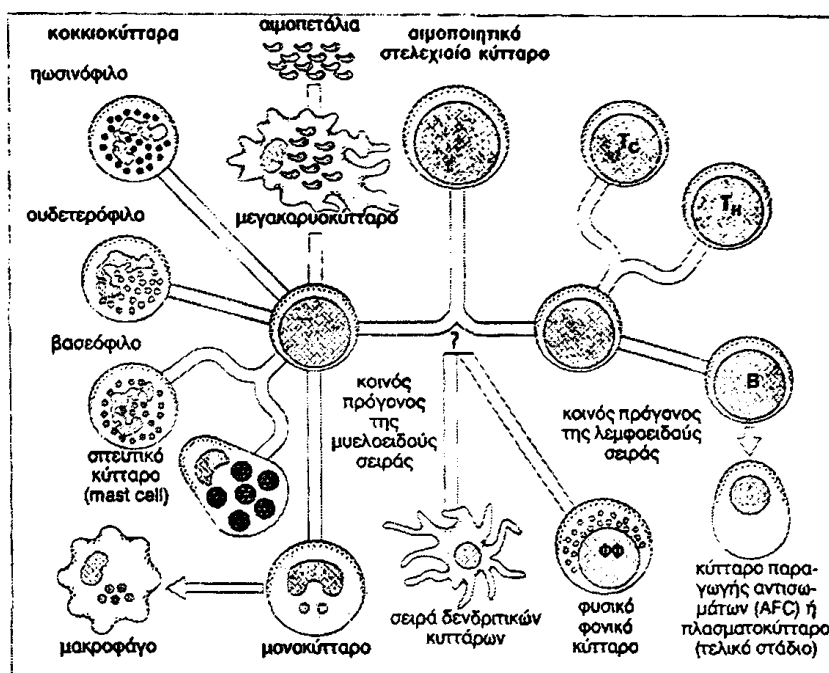


Τα κύρια αμυντικά στοιχεία του οργανισμού περιλαμβάνουν τα Τ και Β λεμφοκύτταρα, τα φαγοκύτταρα και το σύστημα του συμπληρώματος. Σε συνδυασμό με τους φυσιολόγο-ανατομικούς φραγμούς, όπως το δέρμα και τους βλεννογόνους, η κύρια λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος είναι η άμυνα του ξενιστή εναντίον της λοιμώξεως, των αυτοάνοσων νοσημάτων και της κακοήθειας.

2. ΚΥΤΤΑΡΑ

Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος προέρχονται από πολυδύναμα προγονικά κύτταρα, μέσω δύο κύριων οδών διαφοροποίησης (Εικόνα 1)

1. της λεμφοειδούς σειράς-που παράγει τα λεμφοκύτταρα
2. της μυελώδους σειράς-που παράγει τα φαγοκύτταρα(μονοκύτταρα, μακροφάγα, και τα ουδετερόφιλα) και άλλα κύτταρα.



Εικόνα 1. Τα αιμοποιητικά κύτταρα προέρχονται από πολυδύναμα προγονικά κύτταρα, τα οποία δίνουν γένεση σε δύο κύριες σειρές μία για τα λεμφοειδή κύτταρα και άλλη μία για τα μυελοειδή κύτταρα.

Τα αρχέγονα κύτταρα της λεμφικής σειράς διαφοροποιούνται σε δύο κυρίες κυτταρικές σειρές—τα Τ-λεμφοκύτταρα (που ωριμάζουν στο θύμο αδένα μεταξύ 8^{ης} και 12^{ης} εμβρυϊκής εβδομάδας) και τα Β-λεμφοκύτταρα (που ωριμάζουν στο μυελό των οστών μεταξύ 12^{ης} και 16^{ης} εμβρυϊκής εβδομάδας) Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσής τους τα Β και τα Τ λεμφοκύτταρα αποκτούν επιφανειακά αντιγόνα (CD), τα οποία αναγνωρίζονται με μονοκλωνικά αντισώματα (3).

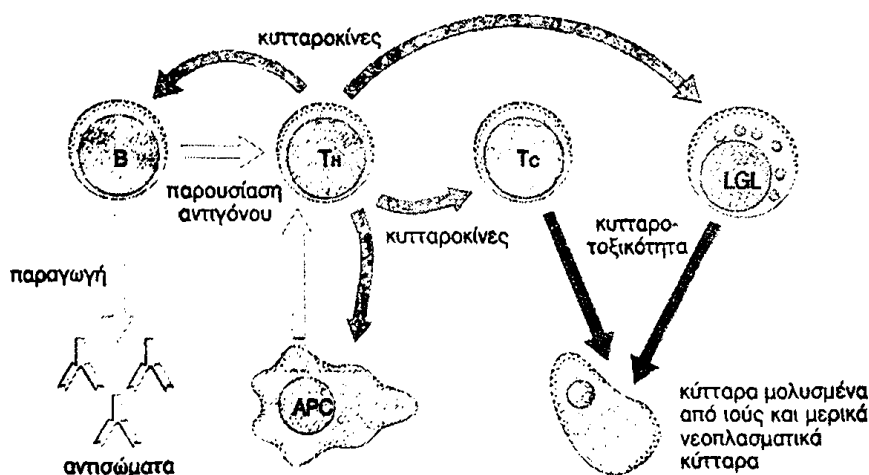


2α. Λεμφοκύτταρα

Τα λεμφοκύτταρα είναι ο πιο πολύπλοκος πληθυσμός των κυττάρων του αίματος και που η όλη μαγεία της ανοσολογίας στηρίζεται στις λειτουργίες των κυττάρων αυτών. Τα λεμφοκύτταρα είναι εξολοκλήρου υπεύθυνα για την ειδική ανοσοποιητική αναγνώριση των παθογόνων. Τα λεμφοκύτταρα αποτελούν ετερογενή πληθυσμό κυττάρων τα οποία διαφέρουν μεταξύ τους, ωστόσο ορισμένα μορφολογικά χαρακτηριστικά τα διαχωρίζουν σε συγκεκριμένους πληθυσμούς. Ανάλογα με το μέγεθός τους τα λεμφοκύτταρα ταξινομούνται σε μικρά, μεσαία και μεγάλα. Τα μικρά λεμφοκύτταρα αποτελούν τον μεγαλύτερο πληθυσμό των λεμφοκυττάρων. Έχουν στρογγυλό πυρήνα, πυκνωτικό και κυανού χρώματος πρωτόπλασμα χωρίς κοκκία. Τα μεγάλα λεμφοκύτταρα αποτελούν το 5-10% των συνολικών λεμφοκυττάρων. Τα λεμφοκύτταρα θεωρούνται ανομοιογενής πληθυσμός που αποτελείται από δύο τουλάχιστον είδη κυττάρων με διαφορετικές λειτουργίες και ιδιότητες, τα T-λεμφοκύτταρα και B-λεμφοκύτταρα (4).

2β. T-Λεμφοκύτταρα

Τα T-λεμφοκύτταρα είναι εκτελεστές της κυτταρικής ανοσίας και ρυθμιστές της ανοσολογικής αντίδρασης. Τα T-λεμφοκύτταρα σε άωρη μορφή μεταναστεύουν από τον μυελό των οστών στο θύμο αδέν. Εκεί το κύτταρο ωριμάζει και διαφοροποιείται (πρωτογενής διαφοροποίηση). Η δευτερογενής διαφοροποίηση των T-κυττάρων εξαρτάται από αντιγονικό ερεθισμό και συμβαίνει στα λεμφικά περιφερικά όργανα. Υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί τύποι T-λεμφοκυττάρων με ποικίλες λειτουργίες (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. Λειτουργίες των λεμφοκυττάρων.

Τα B-κύτταρα παράγουν αντισώματα, ενώ τα T-βοηθητικά κύτταρα (T_H) διεγείρονται από τα κύτταρα παρουσίασης του αντιγόνου (APC) και από B-κύτταρα, με σκοπό την παραγωγή κυτταροκινών.

Τα κυτταροτοξικά T-κύτταρα (T_C) και τα μεγάλα κοκκιώδη λεμφοκύτταρα (LGL) αναγνωρίζουν και σκοτώνουν τα κύτταρα στόχους του ξενιστή αντιγόνου (APC).



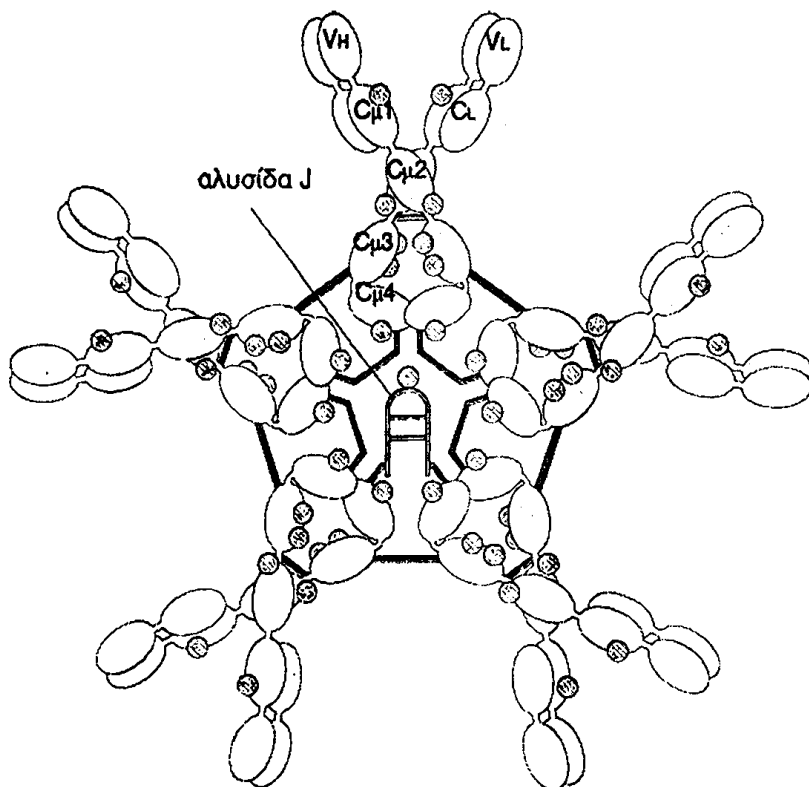
Μια ομάδα αλληλεπιδρά με Β-κύτταρα και τα βοηθά να διαιρεθούν, να διαφοροποιηθούν και να παράγουν αντισώματα. Άλλη ομάδα επιδρά με μονοπύρηνια φαγοκύτταρα και τα βοηθά να καταστρέψουν τα παθογόνα. Αυτές οι δύο ομάδες ονομάζονται Τ-βοηθητικά κύτταρα (T-helper). Μια τρίτη ομάδα Τ-κυττάρων είναι υπεύθυνη για την καταστροφή των κυττάρων του ξενιστή, που έχουν μολυνθεί από ιούς ή άλλα ενδοκυττάρια παθογόνα-αυτού του είδους η δράση καλείται κυτταροτοξικότητα και τα κύτταρα λέγονται Τ-κυτταροτοξικά κύτταρα (T-cytotoxic). Υπάρχει επίσης μια ομάδα λεμφοκυττάρων, τα μεγάλα κοκκιώδη λεμφοκύτταρα (large granular lymphocytes, LGL), που έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν τις μεταβολές που συμβαίνουν στην επιφάνεια διαφόρων νεοπλασματικών κυττάρων και κυττάρων μολυσμένων από ιούς προκαλώντας βλάβες σε αυτά τα κύτταρα στόχους. Αντίθετα από τα Τ-κύτταρα χρησιμοποιούν συστήματα αναγνώρισης που είναι μάλλον μη ειδικά. Αυτή η δράση μερικές φορές καλείται δραστηριότητα φυσικών φονικών κυττάρων (ΦΝΚ-natural killers) (3).

2γ. Β-Κύτταρα

Κύριο έργο τους είναι η παραγωγή αντισωμάτων. Προέρχονται από το stem cell και διαφοροποιούνται στο περιβάλλον του μυελού των οστών. Στη συνέχεια τα ευαίσθητοποιημένα Β-κύτταρα μεταναστεύουν στο σπλήνα και στους λεμφαδένες. Εκεί συμβαίνει η δεύτερη φάση της διαφοροποίησης, η εξαρτημένη από αντιγονικό ερεθισμό. Τα Β-κύτταρα αντιπροσωπεύουν το 5-15% περίπου της δεξαμενής των κυκλοφορόντων λεμφοειδών κυττάρων. Κάθε Β-κύτταρο αναγνωρίζει ειδικά ένα συγκεκριμένο αντιγόνο, χρησιμοποιώντας ένα μόριο υποδοχέα στην επιφάνειά του. Όταν ένα αντιγόνο συνδέεται με τον επιφανειακό υποδοχέα του Β-κυττάρου, το Β-κύτταρο διαφοροποιείται σε πλασμακύτταρο που παράγει μεγάλες ποσότητες μοριακών υποδοχέων σε διαλυτή μορφή η οποία και εκκρίνεται. Είναι γνωστή ως αντίσωμα. Τα πλασματοκύτταρα ζουν λίγες μόνο μέρες και σπάνια διαιρούνται. Τα πλασματοκύτταρα εκκρίνουν τις πέντε κύριες τάξεις ανοσοσφαιρινών-IgG, IgA, IgM, IgD και IgE. Διαφέρουν μεταξύ τους στο μέγεθος, το ηλεκτροφορτίο, τη σύνθεση των αμινοξέων και το περιεχόμενο σε υδατάνθρακες. Οι ανοσοσφαιρίνες ανευρίσκονται στον ορό, σε διάφορα βιολογικά υγρά (δάκρυα, σίελο, μητρικό γάλα, ούρα κλπ) και σε ιστούς (λεμφαδένες, σπλήνα κλπ). Κάθε ανοσοσφαιρίνη έχει δύο ταυτόσημες πολυπεπτιδικές αλυσίδες και δύο ταυτόσημες βαριές πολυπεπτιδικές αλυσίδες που συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς (5).



IgM - Ανοσοσφαιρίνη



Εικόνα 3. Στερεοσκοπική δομή της ανθρώπινης IgM

Το IgM αποτελεί το 10% των ανοσοσφαιρινών. Η IgM ανοσοσφαιρίνη είναι τετραμερής, πενταμερής και εξαμερής ένωση με τέσσερις πεπτιδικές υποομάδες (Εκόννα3). Η IgM ανοσοσφαιρίνη είναι η κύρια ανοσοσφαιρίνη που εμφανίζεται νωρίς φυλογενετικά στην ανάπτυξη του εμβρύου, και στη πρωτογενή ανοσιακή απάντηση. Δεν συμμετέχει στην ανοσολογική μνήμη, για αυτό η παρουσία IgM αντισωμάτων, μετά από κάποιο λοιμογόνο παράγοντα αποτελεί απόδειξη πρόσφατης λοίμωξης. Δεν περνά τον πλακούντα, για αυτό ανεύρεση IgM αντισωμάτων στα νεογέννητα είναι ένδειξη συγγενούς ή περιγεννητικής λοίμωξης (6).

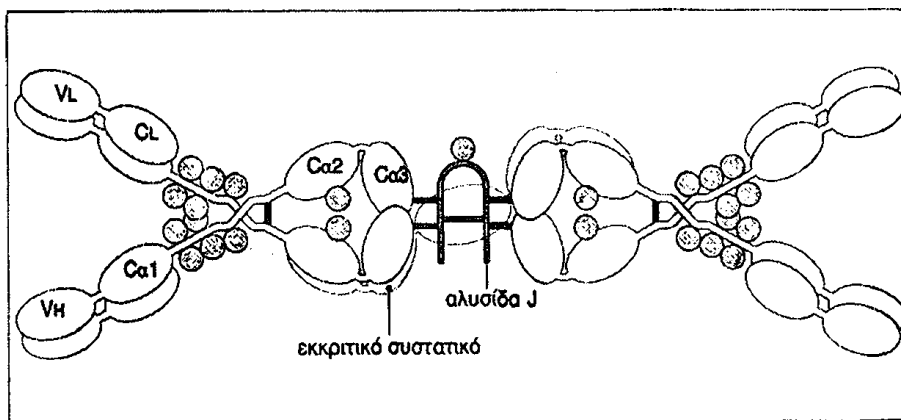
Τα IgM αντισώματα εμφανίζονται πρώιμα κατά την πρωτογενή ανοσιακή απάντηση. Υπό την μονομερή της μορφή η IgM ανοσοσφαιρίνη μαζί με την IgD ανοσοσφαιρίνη αποτελούν τους κυριότερους πρωτεϊνικούς υποδοχείς του αντιγόνου στο B λεμφοκύτταρο. Το 80% των IgM αντισωμάτων βρίσκονται στο ενδοαγγειακό σύστημα εξαιτίας του μεγάλου μεγέθους των. Τα IgM μονομερή υπάρχουν φυσιολογικά στον ορό και στον ορό του ομφάλιου λώρου (6).

IgG-Ανοσοσφαιρίνη

Είναι η τάξη που έχει μελετηθεί καλύτερα τόσο από άποψη δομής τόσο και από άποψη βιολογικών ιδιοτήτων. Η IgG ανοσοσφαιρίνη αποτελεί το 70-75 % της συνολικής ποσότητας ανοσοσφαιρινών. Η ημιπερίοδος ζωής της είναι 3 εβδομάδες και αυτό λαμβάνεται υπόψη κατά τη θεραπευτική χορήγηση της γ-σφαιρίνης στις περιπτώσεις υπογαμμασφαιριναιμιών. Είναι κατανεμημένη τόσο στην ενδοαγγειακή όσο και στην εξωαγγειακή δεξαμενή και διέρχεται τον πλακούντα στη διάρκεια του τελευταίου τριμήνου κύησης. Το IgG είναι το κύριο αντίσωμα κατά των βακτηρίων, των ιών και των μυκητών και θεωρείται ως «αντίσωμα μνήμης» διότι παραμένει και μετά τον αντιγονικό ερεθισμό. Η IgG περιλαμβάνει τις τέσσερις ακόλουθες υποομάδες αντισωμάτων IgG1, IgG2, IgG3 και IgG4. Η εκατοστιαία αναλογία τους κατά τη γέννηση είναι 70%,20%, 7% και 3% αντίστοιχα. Στα διάφορα αντιγόνα απαντούν διαφορετικές υποομάδες αντισωμάτων (π.χ στα πολυσακχαριδικά αντιγόνα παράγονται κυρίως IgG2 (7).

IgA-Ανοσοσφαιρίνη

Η IgA ανοσοσφαιρίνη αποτελεί το 15-20% της ποσότητας των ανοσοσφαιρινών και είναι το κύριο αντίσωμα του σιέλου, των δακρύων και του μητρικού γάλακτος. Υπάρχει στο ρινικό, στο βρογχικό και στο εσωτερικό βλεννογόνο όπου παρέχει τοπική ανοσία και παράλληλα παρεμποδίζει τη συστηματική είσοδο ξένων πρωτεϊνών στον οργανισμό. Η εκκριτική IgA διαφέρει από την IgA ορού διότι διαθέτει το λεγόμενο εκκριτικό συστατικό και μια βραχεία πολυπεπτιδική αλυσίδα J.(Εικόνα 4) Στο πλάσμα των ανθρώπων βρίσκεται σχετικά σε υψηλές συγκεντρώσεις της μονομερούς μορφής ο ρόλος της οποίας δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί τελείως (8).



Εικόνα 4. Η δομή της ανθρώπινης εκκριτικής IgA ανοσοσφαιρίνης.

IgD-Ανοσοσφαιρίνη

Η IgD ανοσοσφαιρίνη αποτελεί λιγότερο του 1% της συνολικής ποσότητας των ανοσοσφαιρινών. Όλες οι βιολογικές της ιδιότητες δεν είναι ακόμη γνωστές. Εμφανίζεται στην επιφάνεια των Β λεμφοκυττάρων μαζί με τους υποδοχείς (9).

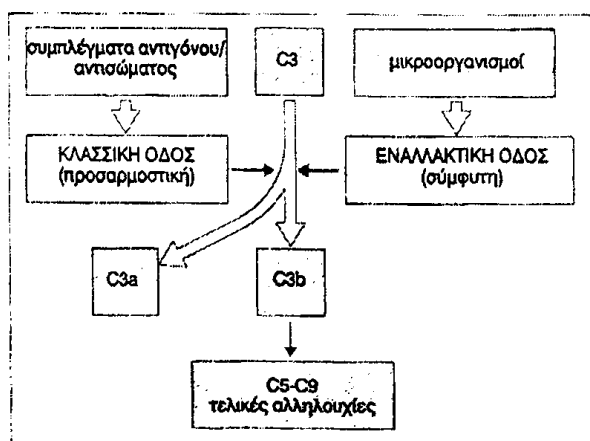
IgE-Ανοσοσφαιρίνη

Η IgE ανοσοσφαιρίνη υπάρχει στον ορό σε πολύ μικρές ποσότητες αλλά αποτελεί τον κυριότερο μεσολαβητή στις αντιδράσεις άμεσης υπερευαισθησίας. Πιθανόν, επίσης να συμμετέχει στην ανοσία κατά των παρασίτων. Η IgE βρίσκεται στην επιφάνεια των μαστοκυττάρων και των βασεόφιλων και ανιχνεύεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στον ορό αλλεργικών ατόμων. Η παραγωγή της IgE ρυθμίζεται από τα Τ- λεμφοκύτταρα κυρίως (10).

3. ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑ

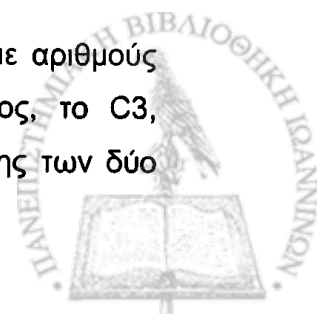
Το συμπλήρωμα διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη μη ειδική άμυνα του οργανισμού αλλά και στην ανάπτυξη της μη ειδικής ανοσίας. Με βάση τις σημερινές αντιλήψεις ο όρος συμπλήρωμα περιγράφει μια ομάδα πρωτεϊνών που όταν ενεργοποιηθούν παράγουν πεπτιδία και πρωτεϊνικά συμπλέγματα που παίζουν σημαντικό ρόλο σε μηχανισμούς άμυνας και πιθανώς επίσης στην παθογένεση ορισμένων νόσων. Το συμπλήρωμα περιλαμβάνει περίπου 30 πρωτεΐνες. Στη φυσική μορφή τους οι πρωτεΐνες αυτές είναι είτε διαλυτές στον ορό είτε συνδεδεμένες με μεμβράνες κυττάρων (11).

Το σύστημα του συμπληρώματος αποτελείται από δύο παράλληλες αλλά ανεξάρτητες μεταξύ τους οδούς (την κλασσική και την εναλλακτική) που οδηγούν στην ενεργοποίηση παραγόντων με αποτέλεσμα την προαγωγή διαφόρων βιολογικών ικανοτήτων όπως η φαγοκυττάρωση. (Εικόνα 5)

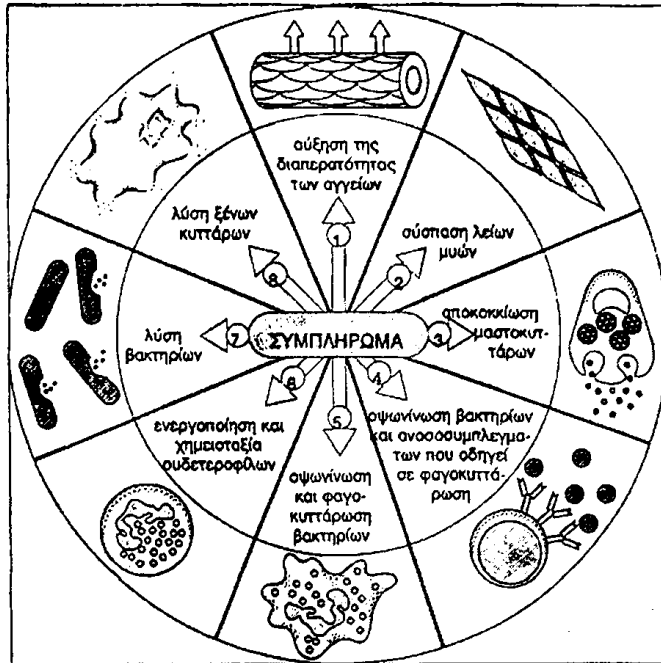


Εικόνα 5. Κλασσική και εναλλακτική οδός του συμπληρώματος.

Τα συστατικά του συμπληρώματος στην κλασσική οδό επισημαίνονται με αριθμούς και στην εναλλακτική με γράμματα. Το τρίτο συστατικό του συμπληρώματος, το C3, απαντάται σε μεγαλύτερη πυκνότητα στο αίμα και αποτελεί τον άξονα σύνδεσης των δύο



οδών. Το σύστημα του συμπληρώματος επιτελεί διάφορες λειτουργίες στις οποίες συμπεριλαμβάνονται – η λύση κυττάρων στόχων, επεξεργασία και απομάκρυνση ανοσοσυμπλεγμάτων, η τροποποίηση της οψωνινοποίησης και της φαγοκυττάρωσης και η συγκέντρωση και ενεργοποίηση ανοσολογικά ενεργών κυττάρων σε θέσεις φλεγμονής. Σπουδαίες λειτουργίες επιτελούν και τα προϊόντα διάσπασης των πρωτεϊνών του συμπληρώματος (12) (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Κύριες δράσεις του συμπληρώματος και ο ρόλος του στην οξεία φλεγμονώδη αντίδραση.

4. ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Η διαδικασία της φαγοκυττάρωσης είναι ο βασικότερος μη ειδικός αμυντικός μηχανισμός εναντίων ξένων «εισβολέων». Διακρίνουμε δύο συστήματα φαγοκυττάρωσης (13).

4α. Το μονοπύρρηνο φαγοκυτταρικό σύστημα (γνωστό παλαιότερα ως δικτυοενδοθηλιακό σύστημα) απαρτίζεται από τα μονοπύρρηνα του αίματος και τα μακροφάγα των ιστών, ελεύθερα ή ακίνητα. Τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα είναι μεγάλα κύτταρα με νεφροειδή πυρήνα και ωχρά αζουρόφιλα κοκκία, όπως φαίνεται στην εικόνα 7.

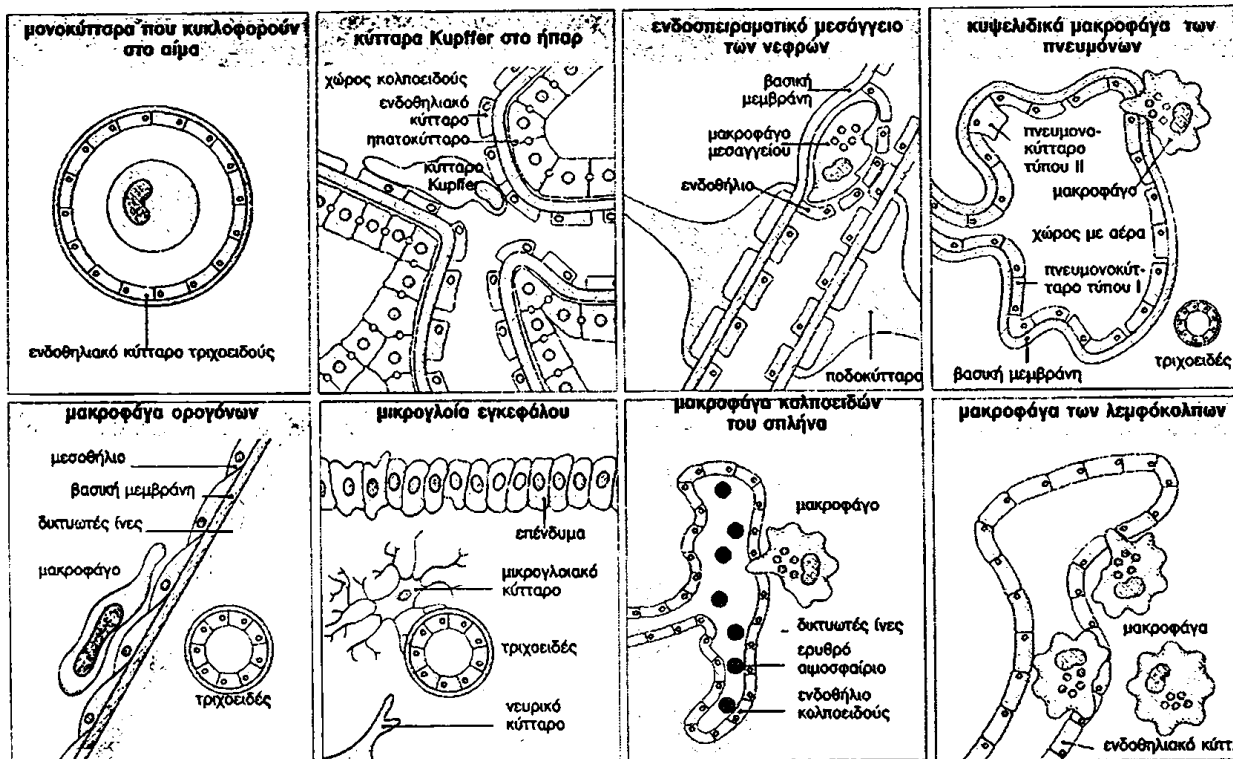


Εικόνα 7.

Μορφολογία του μονοκυττάρου



Προέρχονται από το μυελό των οστών, κυκλοφορούν για 24-48 ώρες στο περιφερικό αίμα και στη συνέχεια μετακινούνται προς τους διάφορους ιστούς όπου εγκαθίστανται και διαφοροποιούνται σε μακροφάγα τα οποία ζουν επί μήνες ή χρόνια. Τα μακροφάγα έχουν διάφορες ονομασίες ανάλογα με τον ιστό στον οποίο βρίσκονται (13), όπως φαίνεται στην Εικόνα 8



Εικόνα 8 .Το σύστημα των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων.

Τα μονοπύρηννα αλλά και τα μακροφάγα συμβάλουν σημαντικά στην ακεραιότητα του αμυντικού συστήματος του οργανισμού γιατί επιτελούν λειτουργίες κρίσιμης σημασίας όπως:

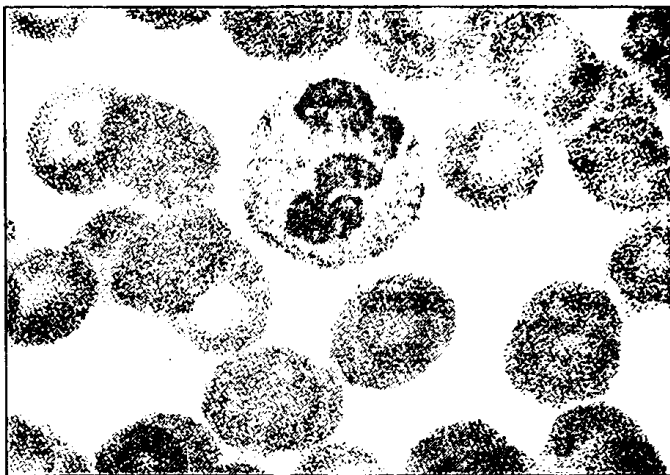
- φαγοκυττάρωση
- παρουσίαση αντιγόνων στα λεμφοκύτταρα
- έκκριση βιολογικά δραστικών ουσιών (κυτταροκίνες) με απώτερο σκοπό την απομάκρυνση των παθογόνων από το αίμα και τους ιστούς.

Η πιο σημαντική λειτουργία του συστήματος των μονοπύρηνων/μακροφάγων είναι η φαγοκυττάρωση και η καταστροφή των παθογόνων μικροοργανισμών καθώς και των γερασμένων και καρκινικών κυττάρων. Η φαγοκυτταρική δραστηριότητα των μακροφάγων δεν εξυπηρετεί μόνο τη λειτουργία της μη ειδικής ανοσίας αλλά αποτελεί και το έναυσμα για την επαγωγή μιας σειράς άλλων σημαντικών αμυντικών λειτουργιών:



- παρουσίαση των αντιγόνων στα T και B –λεμφοκύτταρα με τέτοιο τρόπο, ώστε να κινητοποιηθεί η διαδικασία της αναγνώρισής του
- έκκριση πάνω από δέκα κυτταροκινών και άλλων βιοδραστικών μορίων που επηρεάζουν την πορεία της έκφρασης και ρύθμισης των αμυντικών μηχανισμών.

4β. Το **πολυμορφοπύρηνιο φαγοκυτταρικό σύστημα** που αποτελείται από τα πολυμορφοπύρηνια του περιφερικού αίματος. Τα πολυμορφοπύρηνια χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη ενός μεγάλου πολύλοβου πυρήνα και μεγάλου αριθμού κοκκίων στο κυτταρόπλασμα. (Εκόνα 9) Παράγονται στον μυελό των οστών και ζουν 2-4 ημέρες. Χωρίζονται σε ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα και βασεόφιλα με βάση την χρώση των κοκκίων τους. Τα ουδετερόφιλα κοκκιοκύτταρα (neutrophil granulocytes) αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό των κοκκιοκυττάρων (περίπου το 90%) και έχουν χρόνο ημιζωής 6-12 ώρες στο αίμα και 4-5 ημέρες στους ιστούς (13) (Εικόνα 9).

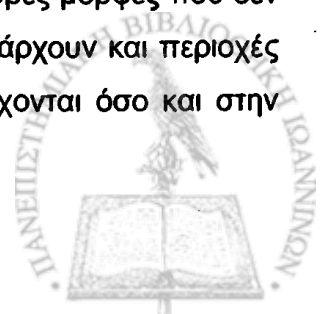


Εικόνα 9. Μορφολογία του ουδετερόφιλου

Στο κυτταρόπλασμά τους έχουν 3 ειδών κοκκία:

- α) τα πρωτογενή η αζουρόφιλα κοκκία
- β) τα δευτερογενή «ειδικά» κοκκία
- γ) τα τριτογενή κοκκία (λυσσώματα).

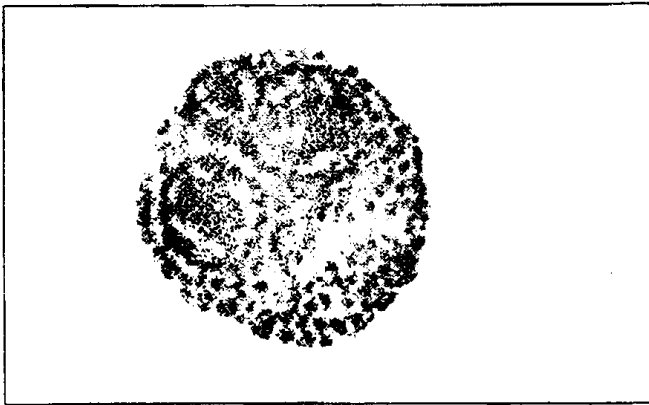
Τα ουδετερόφιλα δεν διαιρούνται περαιτέρω γιατί είναι η τελική κυτταρική μορφή μετά την μυελική διαφοροποίηση. Έχουν κοινή καταγωγή με τα μακροφάγα και κοινή βιολογική αποστολή, την φαγοκυττάρωση. Αν και μόνο τα ώριμα ουδετερόφιλα φαγοκυττάρωνουν, είναι δυνατόν σε αυξημένες ανάγκες του οργανισμού για φαγοκυττάρωση να παίρνουν μέρος και πιο άωρες μορφές. Στην περίπτωση αυτή επιδρά ένας παράγοντας «ο παράγοντας απελευθέρωσης ουδετερόφιλων» που δρα στα ενδοθήλια των αγγείων και αυξάνει την διαπερατότητά τους ώστε να μπορούν να περάσουν από αυτά και οι άωρες μορφές που δεν διαθέτουν αρκετή ευκινησία (ραβδοπύρηνια, μυελοκύτταρα). Επίσης υπάρχουν και περιοχές αποθήκευσης των ουδετερόφιλων τόσο στον μυελό από όπου προέρχονται όσο και στην



περιφέρεια, ώστε σε μια επικείμενη λοίμωξη να μπορεί να ανταπεξέλθει ο οργανισμός σε μια μαζική ζήτηση φαγοκυττάρων.

Ηωσινόφιλα

Τα ηωσινόφιλα κοκκιοκύτταρα (eosinophil granulocytes) έχουν πιο ασθενή φαγοκυτταρική ικανότητα από τα ουδετερόφιλα. Αποτελούν το 2-3% των λεμφοκυττάρων μη αλλεργικών ατόμων. Τα ηωσινόφιλα του ανθρώπινου αίματος συνήθως έχουν μόνο δίλοβο πυρήνα και πολλά κυτταροπλασματικά κοκκία. (Εικόνα 10)



Εικόνα 10. Μορφολογία του ηωσινόφιλου.

Φαγοκυτταρώνουν ανοσοσυμπλέγματα κυρίως αυτά που έχουν IgE αντισώματα ενώ δεν μπορούν να φαγοκυτταρώσουν βακτήρια. Τα καταστρέφουν εκλύοντας το περιεχόμενο των κοκκίων τους. Αν και η λειτουργία τους δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί, βρέθηκε ότι αυξάνονται σε παρασιτικές ασθένειες και κατά τη διάρκεια αλλεργικών αντιδράσεων (13).

Βασεόφιλα

Τα βασεόφιλα κοκκιοκύτταρα (basophil granulocytes) που αποτελούν το 0,9% των λεμφοκυττάρων περιέχουν αδρά κυανόμαυρα κοκκία πλούσια σε αγγειοδραστικές αμίνες (ισταμίνη, σεροτονίνη), ηπαρίνη και υαλουρονικό οξύ που τις απελευθερώνουν όταν έρθουν σε επαφή με αντισώματα του τύπου IgE και αλλεργιογόνα (Εικόνα 11).



Εικόνα 11. Μορφολογία του βασεόφιλου.

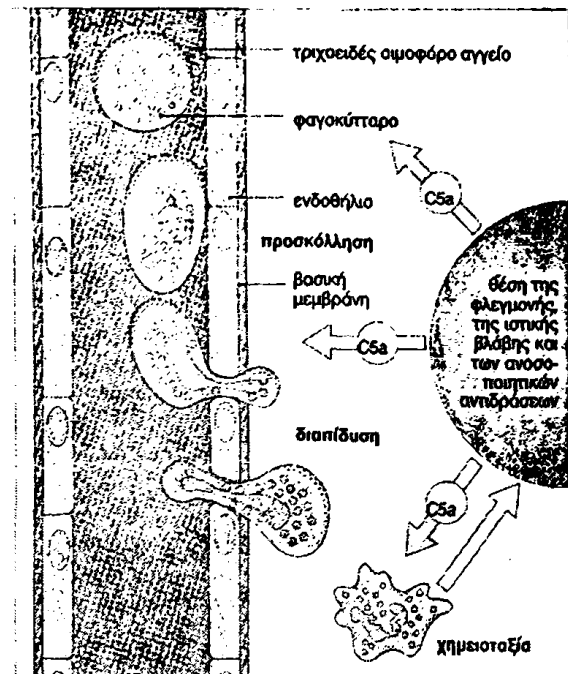
Τα φαγοκύτταρα που ανήκουν στα δύο συστήματα (μονοπυρηνικό και πολυμορφοπυρηνικό) αποτελούν τα «επαγγελματικά» φαγοκύτταρα. Υπάρχουν όμως και «μη επαγγελματικά» φαγοκύτταρα όπως είναι τα ενδοθηλιακά, επιθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες κ.α, τα οποία φαγοκυτταρώνουν περιστασιακά μόνο αντιγονικό υλικό και διαφέρουν από τα «επαγγελματικά» διότι δεν φέρουν υποδοχείς για το Fc τμήμα των IgG και για το C3 (13).

5. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΗΣ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗΣ

Η λειτουργία της φαγοκυττάρωσης πραγματοποιείται σε 4 στάδια:

Εικόνα 12. Χημειοταξία

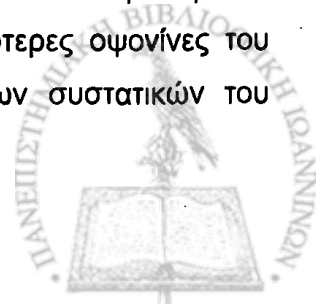
5α. Στάδιο 1. ΧΗΜΕΙΟΤΑΞΙΑ


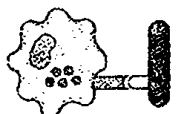
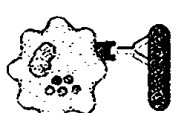



Στη φάση αυτή, που αποτελεί ένα από τα σπουδαιότερα στάδια της φαγοκυττάρωσης, τα φαγοκύτταρα προσελκύονται στις θέσεις εισβολής των παθογόνων μικροοργανισμών. Τα φαγοκύτταρα υπό την επίδραση των χημειοτακτιών παραγόντων μεταναστεύουν και προσκαλούνται αρχικά στο αγγειακό ενδοθήλιο. Στη συνέχεια μέσω των ιστών φτάνουν με αμειβαδοείς κινήσεις και συναθροίζονται στην περιοχή που εντοπίζεται η φλεγμονή. Τα χημειοτακτικά ερεθίσματα που επιδρούν στα φαγοκύτταρα μπορούν να προκαλέσουν αλλαγές τόσο στη μορφολογία όσο και στον μεταβολισμό του κυττάρου (14) (Εικόνα 12).

5β. Στάδιο 2. ΟΨΩΝΙΝΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΓΚΟΛΠΩΣΗ

Στο στάδιο αυτό ορισμένες ουσίες του ορού που ονομάζονται οψωνίνες εγκαθίστανται στην επιφάνεια των σωματίων που πρόκειται να φαγοκυτταρωθούν με αποτέλεσμα την πιο εύκολη αναγνώριση και εγκόλπωσή τους από φαγοκύτταρα. Οι κυριότερες οψωνίνες του οργανισμού είναι οι ανοσοσφαιρίνες της τάξης IgG και τμήματα των συστατικών του συμπληρώματος C3 και C4 (Εικόνα 13).

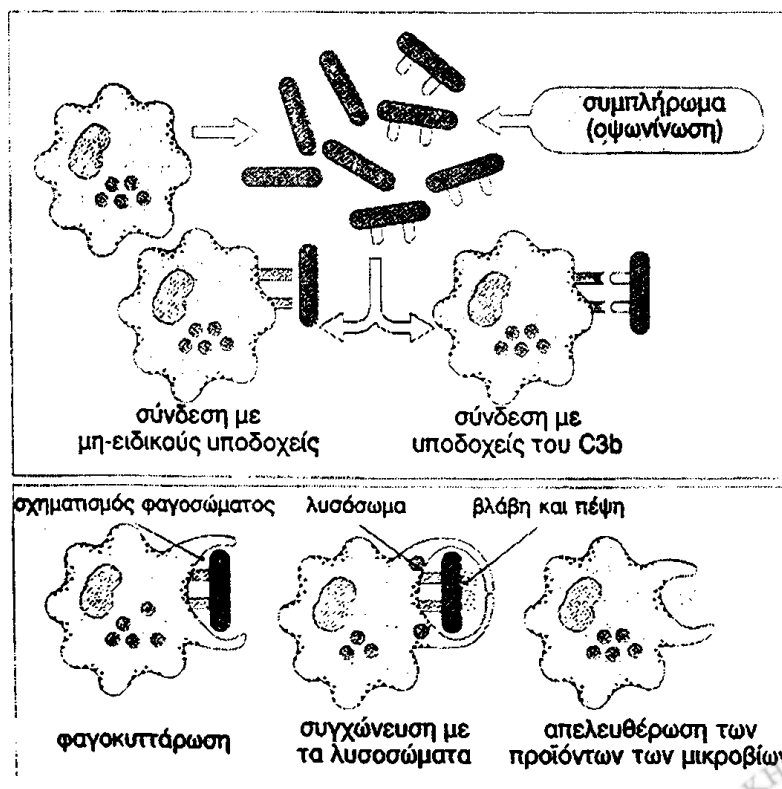


φαγοκύτταρο	οψωνίνη	σύνδεση
1 	-	±
2 	συμπλήρωμα C3b	++
3 	αντίσωμα	++
4 	αντίσωμα και συμπλήρωμα C3b	++++

Εικόνα 13. Οψωνινοποίηση

5γ. Σταδιο 3. ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΚΟΚΚΟΠΟΙΗΣΗ

Κάθε οψωνινοποιημένο σωματίο που καθιλώνεται στην επιφάνεια των φαγοκυττάρων δεν ενδοκυτταρώνεται αν δεν ενεργοποιηθεί το σύστημα ακτίνης-μυοσίνης. Από τη στιγμή που δρα το σύστημα δημιουργούνται οι κυτταροπλασματικές προεκβολές (ψευδοπόδια) και πραγματοποιείται η εγκόλπωση και στη συνέχεια η ενσωμάτωσή τους μέσα στο φαγοκύτταρο με τη δημιουργία διαδοχικών συνδέσεων (Εικόνα 14).



Εικόνα 14. Ενσωμάτωση και αποκοκκιοποίηση.

Μέσω αυτών των συνδέσεων πλησιάζουν η πλασματική μεμβράνη του κυττάρου με τη μεμβράνη του σωματίου και συγχωνεύονται. Η διεργασία αυτή έχει σαν αποτέλεσμα το

σωμάτιο να περικλείεται μέσα στο πρωτογενές φαγόσωμα. Μετά το σχηματισμό του πρωτογενούς φαγοσώματος προσκολλώνται στην επιφάνειά του τα κοκκία των φαγοκυττάρων (λυσοσώματα). Στη συνέχεια επέρχεται σύντηξη της μεμβράνης του φαγοσωματίου με αυτή των λυσοσωματίων οπότε τα υδρολυτικά και οξειδωτικά ένζυμα που περιέχουν εισέρχονται στο φαγόσωμα και αρχίζει η διαδικασία της ενζυμικής διάσπασης των σωματιδίων που έχουν φαγοκυτταρωθεί. Το φαγοκύτταρο στο στάδιο αυτό χάνει τα κοκκία του και οδηγεί στην εκφύλιση και στο θάνατό του και στη μετατροπή του σε πυοσφαίριο (14).

5δ.Σταδιο 4. ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΑ ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΤΟΝΙΑ ΚΑΙ ΠΕΨΗ

Αποτελεί το τελευταίο στάδιο της φαγοκυττάρωσης. Από τη στιγμή που το σωματίο ή ο μικροοργανισμός θα έρθει σε επαφή με τη μεμβράνη του φαγοκυττάρου και θα σχηματιστεί το πρωτογενές φαγόσωμα, αρχίζει η κινητοποίηση ενζυματικών μηχανισμών που οδηγεί στη συγχώνευση με τα λυσοσώματα και τη δημιουργία δευτερογενούς φαγοσώματος.

Ακολουθεί η ενδοκυττάρια πέψη με τη βοήθεια των πεπτικών ενζυμων των φαγοκυττάρων.

Τα προϊόντα αποδομής απελευθερώνονται στον εξωκυττάριο χώρο. Υπολείμματα που δεν «πέπτονται» μπορούν να παραμείνουν στο φαγολυσόσωμα; για αρκετό διάστημα. Τα φαγοκύτταρα έχουν την ικανότητα όταν δεν γίνεται πλήρης πέψη να αποθηκεύουν τα υπολείμματα που προέρχονται από τη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης ώσπου να καταστραφούν και τα ίδια από την συσσώρευση άχρηστων υλικών και να φαγοκυτταρωθούν με τη σειρά τους από άλλα μακροφάγα (15).

6. ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ

Οι κυτταροκίνες είναι διαλυτές εξωκυττάριες πρωτεΐνες και γλυκοπρωτεΐνες οι οποίες παράγονται ως απόκριση σε ερέθισμα από όλα τα εμπύρρηνα κύτταρα σε αντίθεση με τις ορμόνες που παράγονται από ομάδες κυττάρων που είναι οργανωμένα σε αδένες. Οι κυτταροκίνες έχουν την τάση να δρουν τοπικά σε κύτταρα, τα οποία παράγουν συμπληρωματικούς υποδοχείς, ασκώντας αυτοκρινή και παρακρινή δράση, ενώ φαίνεται να έχουν και συστηματική δράση. Ο όρος «κυτταροκίνη» συμπεριλαμβάνει τις ιντερλευκίνες (IL-1 μέχρι IL-25), τον παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNF) και τις πρωτεΐνες που σχετίζονται με αυτόν, τις ιντερφερόνες, τους ενδο-αγγειακούς παράγοντες, τους παράγοντες διέγερσης των αποικιών (colony-stimulating factors), τις χημειοκίνες και τις ενδοθηλίνες. Συνδέονται σταθερά στους ειδικούς υποδοχείς της μεμβράνης των κυττάρων-στόχων και ενεργοποιούν διαδικασίες προώθησης μηνυμάτων σε γονιδιακό επίπεδο, που αφορούν τη συγγενή και την επίκτητη ανοσία, τη φλεγμονή, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση στην περίπτωση του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση).



Χαρακτηριστικά των κυτταροκινών είναι ο πλειομορφισμός (διαφορετικός τρόπος δράσης σε διαφορετικά κύτταρα) η επαναληπτικότητα (δύο η περισσότερες κυτταροκίνες ασκούν παρόμοια δράση), η συνέργεια (η συνδυασμένη δράση δύο κυτταροκινών είναι μεγαλύτερη από την αθροιστική τους δράση) και η ανταγωνιστικότητα (η δράση μιας κυτταροκίνης αναστέλλει τη δράση μιας άλλης).

Στη συνέχεια θα γίνει αναφορά στις κυτταροκίνες που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία.

6α. Ιντερλευκίνη 1 (IL- 1)

Η IL-1 είναι όνομα που χρησιμοποιείται για δύο διαφορετικές πρωτεΐνες, την IL-1α και την IL-1β, που θεωρούνται οι πρώτες από μια μικρή, αν και συνεχώς αυξανόμενης οικογένειας ρυθμιστικών και φλεγμονωδών κυτταροκινών (16). Παίζουν σημαντικό ρόλο στην ευόδωση και καταστολή της οξείας φλεγμονής (7-19). Στο ανοσολογικό σύστημα η IL-1 οδηγεί σε φλεγμονή. Η IL-1β και ο TNF-α είναι οι βασικότερες προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (17-23). Οι επιδράσεις της IL-1 ωστόσο δεν περιορίζονται στη φλεγμονή, αφού η κυτταροκίνη αυτή έχει επίσης συσχετισθεί με τη δημιουργία και την ανακατασκευή του οστίτη οστού (24,25), την έκκριση ινσουλίνης (26,27) τη ρύθμιση της όρεξης (28, 29) την αύξηση του πυρετού (30-32) και την ανάπτυξη του νευρικού φαινοτύπου και την υπερπλασία του μέσου χιτώνα των αγγείων (33,34). Η IL-1 είναι επίσης γνωστή με μια πληθώρα εναλλακτικών ονομασιών, όπως, παράγοντας ενεργοποίησης των λεμφοκυττάρων (lymphocyte activating factor), ενδογενές πυρετογόνο, καταβολίνη, αιμοποιητίνη-1, παράγοντας αναστολής ανάπτυξης του μελανώματος (melanoma growth inhibition factor) και παράγοντας ενεργοποίησης οστεοκλαστών.

Η IL-1 εκφράζεται από πολλά κύτταρα και έχει πολλαπλές λειτουργίες συμπεριλαμβανομένης της τοπικής φλεγμονής. Κύτταρα που είναι γνωστό ότι παράγουν IL-1α είναι μεταξύ άλλων τα αστροκύτταρα (35), οι ινοβλάστες (36), τα ηπατοκύτταρα (37), τα κερατινοκύτταρα (38), τα T-λεμφοκύτταρα και τα ηωσινόφιλα (39), τα δενδριτικά κύτταρα (40), τα μακροφάγα (41) και τα μονοκύτταρα (42). Κύτταρα που είναι γνωστό ότι παράγουν IL-1β είναι τα αστροκύτταρα (35), κύτταρα του φλοιού επινεφριδίων (43), NK κύτταρα (44), μακροφάγα και μονοκύτταρα (45), ενδοθηλιακά κύτταρα (46), κερατινοκύτταρα (47), μεγακαρυοκύτταρα και αιμοπετάλια (48,49) ουδετερόφιλα (50), T-λεμφοκύτταρα και ινοβλάστες (21). Μετά από τη σύνδεση βακτηρίου η ανοσοσφαιρίνης στους υποδοχείς CD14 ή CD64 των μονοκυττάρων/μακροφάγων, η IL-1 απελευθερώνεται σε ένα τοπικό περιβάλλον (51). Σε αυτό το περιβάλλον, η IL-1 επηρεάζει ένα μεγάλο αριθμό κυττάρων. Πρώτον, ενεργοποιεί τα ενδοθηλιακά τριχοειδή κύτταρα για την έκκριση χημειοκινών (52) και δεύτερον ευοδώνει την έκφραση προσκολλητικών μορίων (53).



6β. Ιντερλευκίνη-6 (IL-6)

Η IL-6 είναι το αρχέτυπο των πλειοτρόπων κυτταροκινών (54,55). Αυτό αντανακλάται και από την πληθώρα των ονομάτων με τα οποία ήταν αρχικά γνωστή βάσει των λειτουργιών της, όπως ιντερφερόνη B2, παράγοντες ενεργοποίησης των ηπατοκυττάρων (hepatocyte stimulating factor), παράγοντας διαφοροποίησης των κυτταροστατικών T-λεμφοκυττάρων, παράγοντας διαφοροποίησης των B-λεμφοκυττάρων (B cell differentiation factor) (56).

Η IL-6 παράγεται από πληθώρα κυττάρων: CD8+ ,T-λεμφοκύτταρα (57), ινοβλάστες (58,59), κύτταρα του αρθρικού υμένα (60), κύτταρα του λιπώδους ιστού (61), οστεοβλαστών (62), μεγακαρυοκύτταρα (63), ενδοθηλιακά κύτταρα (64), νευρώνες του συμπαθητικού (65), μαστοκύτταρα (66), κύτταρα Langerhans (67), ουδετερόφιλα (68,69), μονοκύτταρα (70), ηωσινοφίλα (68,69) και B-λεμφοκύτταρα (71).

Η IL-6 ανευρίσκεται στον ορό φυσιολογικών ατόμων σε επίπεδα μέχρι 1pg/ml (72,73), ενώ παρατηρείται ελαφρά αύξηση κατά τη διάρκεια του εμμηνορυσιακού κύκλου (74), μέτρια αύξηση σε ορισμένους καρκίνους (π.χ. μελάνωμα, 10pg/ml) (75) και μεγάλη αύξηση μετά από χειρουργείο (30-430 pg/ml) (76). Οι επιδράσεις της IL-6 σε διάφορα κύτταρα είναι πολλαπλές και ποικίλες. Η IL-6 έχει περιγραφεί τόσο ως προφλεγμονώδες αλλά και ως αντιφλεγμονώδες μόριο, ως ενισχυτικός παράγοντας της αιμοποίησης αλλά και ως υποκινητής της ανάπτυξης των πλασματοκυττάρων (77-79). Η IL-6 επιδρά στα B-λεμφοκύτταρα και προκαλεί την διαφοροποίησή τους και παραγωγή αντισωμάτων, ενώ η επίδραση της IL-6 στα T-λεμφοκύτταρα οδηγεί στην παραγωγή της IL-2 και του υποδοχέα της (53, 80-83). Ευοδώνει την παραγωγή πρωτεϊνών οξείας φάσης από τα ηπατοκύτταρα (84), τον πολλαπλασιασμό των πλασματοκυττάρων, των κερατινοκυττάρων και των μεσαγγειακών κυττάρων (77,85-87). Οι πολλαπλές δράσεις της IL-6 υποδηλώνουν ότι είναι ένας σημαντικός μεσολαβητής φλεγμονής και ανοσολογικής απόκρισης σε λοίμωξη ή τραύμα. Αυξημένα επίπεδα της IL-6 έχουν αναφερθεί σε μία πληθώρα νόσων, συμπεριλαμβανομένων των αυτοάνοσων νοσημάτων, όπως η αρθρίτιδα και η νόσος του Castleman, (63,77,85,88), η μεσαγγειο-υπερπλαστική σπειραματονεφρίτιδα (77,85), η ψωρίαση (65), τα φλεγμονώδη νοσήματα του εντέρου και κακοήθειες όπως τα πλασματοκυττώματα (77), το πολλαπλό μυέλωμα (55-57), τα λεμφώματα και λευχαιμίες (77,90).

6γ. Παράγοντας νέκρωσης των όγκων (Tumor Necrosis Factor, TNF)

Ο TNF-α (καχεκτίνη) και ο TNF-β (λεμφοτοξίνη) είναι δύο συγγενείς πρωτεΐνες που ενώνονται με τους ίδιους κυτταρικούς υποδοχείς και έχουν μεγάλο εύρος παρόμοιων, αλλά όχι ταυτόσημων δράσεων (91). Παρ' όλες τις παρόμοιες βιολογικές τους ιδιότητες, οι δύο παραπάνω κυτταροκίνες υπόκεινται σε διαφορετική ρύθμιση και έκφραση (92).



Ο TNF-α παράγεται από ουδετερόφιλα, ενεργοποιημένα B- και T- λεμφοκύτταρα, NK-κύτταρα, αστροκύτταρα, ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα, ενώ ο TNF-β παράγεται κυρίως από λεμφοκύτταρα (92). Η πλειοτρόπος δράση των TNF-α και TNF-β οφείλεται στην ποικιλία των υποδοχέων τους, στην ικανότητά τους να ενεργοποιούν πολλαπλές οδούς κυτταρικής μετάδοσης σημάτων και στην ιδιότητά τους να επιδρούν ανασταλτικά ή κατασταλτικά σε μεγάλο αριθμό γονιδίων, όπως είναι τα γονίδια άλλων κυτταρικών και αυξητικών παραγόντων, μεσολαβητών της φλεγμονής, πρωτεϊνών οξείας φάσης (92,93). Ο TNF-α και TNF-β παίζουν βασικό ρόλο στην άμυνα του οργανισμού έναντι των λοιμώξεων καθώς και στην ανάπτυξη κακοηθειών. Η αυξημένη, όμως παραγωγή TNF-α και TNF-β εμπλέκεται στην παθογένεση πολλών παθολογικών καταστάσεων, όπως είναι η καχεξία (91,93), αυτοάνοσα νοσήματα (94), η μηνιγγιτιδικοκκική σηψαιμία (95).

7. ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΝΕΟΓΝΟΥ

Με την γέννηση το έμβρυο μεταφέρεται ξαφνικά από το υπερπροστατευτικό ενδομήτριο περιβάλλον σε ένα εχθρικό κόσμο όπου περιβάλλεται από ξένα αντιγόνα. Η ικανότητα του νεογνού να προστατεύεται από τα αντιγόνα αυτά εξαρτάται από την ετοιμότητα των αμυντικών του μηχανισμών. Το νεογνό είτε πρόωρο είτε τελειόμηνο έχει ξεχωριστή ανοσία. Στη διάρκεια της κύησης το ανοσολογικό σύστημα του εμβρύου ωριμάζει προοδευτικά έτσι ώστε στο τέλος της κύησης υπάρχουν όλοι οι ειδικοί και μη ειδικοί αμυντικοί μηχανισμοί. Ωστόσο, ορισμένα τμήματα των μηχανισμών αυτών δεν έχουν φθάσει ακόμη σε πλήρη λειτουργική ωριμότητα, κυρίως λόγω έλλειψης αντιγονικών ερεθισμάτων στην ενδομήτρια ζωή. Για το λόγω αυτό τα νεογνά έχουν αυξημένο κίνδυνο για σοβαρές ιογενείς και μηκυτιασικές λοιμώξεις. Στα νεογνά η βακτηριακή λοίμωξη δεν περιορίζεται σε κάποιο όργανο και υπάρχει προδιάθεση για συστηματική διασπορά. Σαν αποτέλεσμα, οι λοιμώξεις είναι η κύρια αιτία μείζονος νοσηρότητας και θνητότητας (96).

7α. Μη ειδικοί αμυντικοί μηχανισμοί

Οι μη ειδικοί αμυντικοί μηχανισμοί αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας κατά των εισβολέων και συμπεριλαμβάνουν τους ανατομικούς φραγμούς του δέρματος και των βλεννογόνων, τους χυμικούς φραγμούς (δάκρυα, ιδρώτας, γαστρικό οξύ, βλέννα, πεπτικό ένζυμο, βακτηριοστατικά λιπαρά οξέα), το πολυμορφοπυρηνικό και μονοπυρηνικό φαγοκυτταρικό σύστημα και τις οψονίνες του ορού (97).



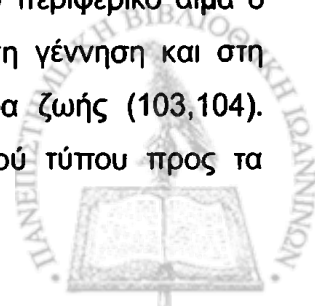
Ανατομικοί και χυμικοί φραγμοί

Οι ανατομικοί και χυμικοί φραγμοί δεν είναι καλά μελετημένοι στα νεογνά. Το pH του γαστρικού υγρού είναι λιγότερο όξινο τις πρώτες ημέρες ζωής, ενώ οι μηχανισμοί που προστατεύουν από τις λοιμώξεις του αναπνευστικού όπως βήχας και οι κινήσεις του κροσσώτου επιθηλίου πιθανώς δεν είναι πλήρως αναπτυγμένοι (98). Επιπλέον, στα πρόωρα, το δέρμα είναι λεπτό και εύκολα διαπερατό από μικρόβια. Τέλος, στα χαμηλού βάρους γέννησης πρόωρα που νοσηλεύονται στις μονάδες εντατικής νοσηλείας, οι ανατομικοί φραγμοί παραβιάζονται καθημερινά από την χρήση διαφόρων καθετήρων, ενδοαγγειακών ή ενδοτραχειακών, την επικόλληση διαφόρων ηλεκτροδίων, φλεβοκεντήσεις κ.α.

Πολυμορφοπυρηνικό φαγοκυτταρικό σύστημα

Τα πολυμορφοπύρρηνα (ΠΜΠ) είναι οι «καμικάζι» του αίματος, τα κύτταρα που θα τρέξουν πρώτα στον τόπο εισβολής για να εξουδετερώσουν τους εισβολείς με τίμημα την ίδια τους τη ζωή. Για να είναι αποτελεσματικό το πολυμορφοπυρηνικό φαγοκυτταρικό σύστημα απαιτείται επαρκής αριθμός και ικανοποιητική λειτουργία των ΠΜΠ. Μελέτες των Christensen et al. (99-101) έδειξαν σημαντικές ποσοτικές διαταραχές στις πρόδρομες σειρές των ΠΜΠ στο νεογνικό μυελό των οστών. Βρέθηκε ότι στα νεογνά οι δεξαμενές των βλαστικών κυττάρων CFU-GM (colony-forming unit granulocyte macrophage) είναι ελαττωμένες και φθάνουν μόλις το 10-20% εκείνων που υπάρχουν στους ενήλικες. Αντίθετα ο αριθμός πολλαπλασιασμού τους είναι υψηλός στα νεογνά (περίπου 74-80% των μέγιστων επιπέδων των CFM-GM), ενώ στους ενήλικες είναι μόνο 25% (101,102). Επίσης, οι αποθήκες των ΠΜΠ στο μυελό (ώριμα ΠΜΠ, ραβδοπύρρηνα και μεταμυελοκύτταρα) είναι ελαττωμένος στα νεογνά, πρόωρα και τελειόμηνα και φθάνουν μόλις στο 25% των αποθηκών των ΠΜΠ στο μυελό των οστών ενηλίκων (101). Τα αναπτυξιακά αυτά χαρακτηριστικά της κοκκιώδους σειράς στο μυελό δείχνουν ότι στα νεογνά είναι ελαττωμένες τόσο οι αποθήκες όσο και οι πηγές των ΠΜΠ. Οι τελευταίες μάλιστα εμφανίζουν ένα μέγιστο ρυθμό υπερπλασίας, ακόμη και σε φυσιολογικές καταστάσεις.

Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, σε περιπτώσεις αυξημένης κατανάλωσης των ΠΜΠ, όπως συμβαίνει στις λοιμώξεις, να αδυνατεί το νεογνό να αυξήσει περαιτέρω τον ήδη αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμό των βλαστικών κυττάρων με συνέπεια την εξάντληση των αποθηκών ΠΜΠ στο μυελό και την εμφάνιση ουδετεροπενίας στην περιφέρεια (99,100). Η εμφάνιση ουδετεροπενίας κατά τη διάρκεια της νεογνικής σηψαιμίας είναι πιο συχνή στα πρόωρα και αποτελεί δυσμενές προγνωστικό σημείο (99,100,103). Στο περιφερικό αίμα ο αριθμός των ΠΜΠ αυξάνει απότομα τις πρώτες δώδεκα ώρες μετά τη γέννηση και στη συνέχεια ελαττώνεται βαθμιαία φθάνοντας σε πλατό την 4^η-6^η ημέρα ζωής (103,104). Επιπλέον, στα νεογνά παρατηρείται στροφή του πολυμορφοπυρηνικού τύπου προς τα



αριστερά με εμφάνιση προδρόμων μορφών προμυελοκυττάρων και μυελοκυττάρων στην περιφέρεια (104). Στις πρώτες 4 ώρες ζωής είναι χαρακτηριστικές οι μεγάλες διακυμάνσεις των ΠΜΠ ($16,2$ και $31,5 \times 10^9$, ή 10^n και 90^n εκατοστιαία θέση αντίστοιχα) και της αναλογίας των αώρων προς ολικά ΠΜΠ ($0,05$ και $0,27$, ή 10^n και 90^n εκατοστιαία θέση, αντίστοιχα) (105). Η αύξηση της αναλογίας αώρων προς ολικά ΠΜΠ $>0,25$ αναφέρεται ως σοβαρή ένδειξη μικροβιακής λοίμωξης στη νεογνική ηλικία, ενώ από τις μεταβολές του αριθμού των ΠΜΠ αξιολογείται κυρίως η μεγάλη πτώση τους ($<4000/\text{mm}^3$) (97).

Οι μεταβολές του αριθμού των ΠΜΠ τις πρώτες ημέρες ζωής έχουν σχέση με τα επίπεδα G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) στην ηλικία αυτή. In vitro μελέτες έδειξαν ελαττωμένη παραγωγή του G-CSF από τα μονοκύτταρα των νεογνών (106,107) και ιδίως των πρόωρων (107). Ωστόσο τα επίπεδα του G-CSF στα νεογνά είναι υψηλότερα από εκείνα στους ενήλικες (108-111). Αναφορικά με τη σχέση των επιπέδων του G-CSF με την ηλικία κύησης δεν υπάρχει ομοφωνία. Οι περισσότεροι ερευνητές αναφέρουν ότι τα επίπεδα του G-CSF στα πρόωρα είναι υψηλότερα (110-113), ενώ μόνο σε μία μελέτη βρέθηκαν υψηλότερα στα τελειόμηνα νεογνά (109). Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τα επίπεδα του G-CSF είναι οι περιγεννητικές επιπλοκές και οι λοιμώξεις (109,111,114,115) Μετά τη γέννηση παρατηρείται βαθμιαία ελάττωση των επιπέδων του G-CSF μέχρι την 7^η ημέρα ζωής, που συμβαδίζει με την πτώση του αριθμού των ΠΜΠ (113,116).

7β. Η λειτουργία των πολυμορφοκυττάρων στη νεογνική ηλικία.

Η διαδικασία της φαγοκυττάρωσης αρχίζει μετά την είσοδο του εισβολέα στον οργανισμό με την έκλυση χημειοτακτικών παραγόντων (προϊόντα μικροβίων, προϊόντα ενεργοποίησης του συμπληρώματος, κ.α). Οι χημειοτακτικοί αυτοί παράγοντες ενεργοποιούν τα ΠΜΠ, που μετακινούνται στον τόπο της φλεγμονής μετά την προσκόλληση και διέλευση δια μέσου του τοιχώματος των αγγείων. Στον τόπο της φλεγμονής, το ΠΜΠ ενσωματώνει τους καλυμμένους με οψωνίνες μικροοργανισμούς και ακολουθεί ενεργοποίηση του ενδοκυττάρου οξειδωτικού μηχανισμού (respiratory burst) του ΠΜΠ και ακολουθεί ενδοκυττάρια καταστροφή του μικροβίου (117). Σημαντικό ρόλο στη λειτουργία των ΠΜΠ παίζουν τα επιφανειακά μόρια προσκόλλησης των ΠΜΠ (LFA-1, Mac-1, L-selectin, κ.α) και των ενδοθηλιακών κυττάρων, (E-selectin κ.α), η έκφραση των οποίων ενεργοποιείται με την επίδραση χημειοτακτικών παραγόντων. Τα μόρια προσκόλλησης συμμετέχουν στην εκδήλωση πολλών λειτουργιών του ΠΜΠ, όπως είναι η διέλευσή τους από το ενδοθήλιο, η ενσωμάτωση των μικροβίων και η ενεργοποίηση του ενδοκυττάρου οξειδωτικού μηχανισμού (118,119). Αν και η λειτουργία των ΠΜΠ έχει μελετηθεί εκτεταμένα στα νεογνά, το θέμα εξακολουθεί να προκαλεί το ενδιαφέρον των ερευνητών.

Στα νεογνά έχουν περιγραφεί ποικίλες λειτουργικές διαταραχές των ΠΜΠ, που είναι ιδιαίτερα έντονες σε πρόωρα και σε νεογνά με λοίμωξη, αναπνευστική δυσχέρεια,



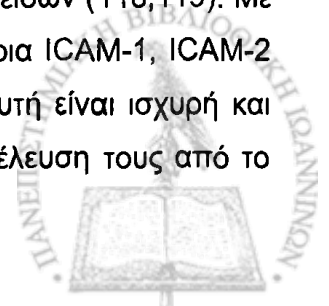
περιγεννητική ασφυξία κ.α. Οι διαταραχές αυτές περιλαμβάνουν ελαττωμένη ικανότητα των νεογνικών ΠΜΠ να ενεργοποιούνται μετά την επίδραση χημειοτακτικών παραγόντων και να αυξάνουν την έκφραση των επιφανειακών μορίων προσκόλλησης, μειωμένη χημειοταξία, περιορισμένη προσκόλληση και διέλευση από το ενδοθήλιο των αγγείων και ελαττωμένη δραστηριότητα του ενδοκυττάριου οξειδωτικού μηχανισμού και της ενδοκυττάριας μικροβιοκτονίας (120).

Κινητικότητα

Η μετακίνηση των ΠΜΠ επιτυγχάνεται με τη σύσπαση των μικροινιδίων του κυτταροπλάσματος και είναι αποτέλεσμα μιας σειράς διεργασιών, που ξεκινούν μετά από σύνδεση των υποδοχέων της μεμβράνης με διαφόρους χημειοτακτικούς παράγοντες (C5a, ενδοτοξίνες, ιντερφερόνη-γ, TNFα) (120,121). Στις διεργασίες αυτές σημαντικό ρόλο παίζουν οι μεταβολές της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του ελεύθερου ασβεστίου και τα ενεργειακά αποθέματα του κυττάρου (ATP) (120). Από αυτά εξαρτάται η ικανότητα των μικροινιδίων του πρωτοπλάσματος να συσπώνονται και να μεταβάλλουν το σχήμα του κυττάρου, μεταβολή που είναι απαραίτητη προϋπόθεση για τη μετακίνηση του ΠΜΠ (117). Η τυχαία κινητικότητα των ΠΜΠ στα υγιή νεογνά είναι παρόμοια με εκείνη στους ενήλικες, αλλά στα νεογνά με stress είναι ελαττωμένη (122,128). Αντίθετα, η κινητικότητα των ΠΜΠ μετά από επίδραση χημειοτακτικών παραγόντων (χημειοταξία) είναι ελαττωμένη σε όλα τα νεογνά, ιδιαίτερα στα πρόωρα (122-127) και ελαττώνεται ακόμη περισσότερο σε νεογνά με stress (122,128). Η ελαττωμένη χημειοταξία των νεογνικών ΠΜΠ αποδίδεται στην αδυναμία τους να αυξήσουν επαρκώς τη συγκέντρωση του ελεύθερου ενδοκυττάριου ασβεστίου μετά το χημειοτακτικό ερέθισμα (120,121) καθώς και σε χαμηλά αποθέματα ATP (120). Συνέπεια αυτών των μεταβολικών διαταραχών είναι η ελαττωμένη σύσπαση των μικροινιδίων και αδυναμία των νεογνικών ΠΜΠ να μεταβάλλουν το σχήμα τους και να κινηθούν.

Επιφανειακή έκφραση των μορίων προσκόλλησης των ΠΜΠ

Από τα μόρια προσκόλλησης που εκφράζονται στην επιφάνεια των ΠΜΠ πολύ σημαντικά για τη λειτουργία τους είναι ορισμένα μόρια που ανήκουν στις β2-ιντεγκρίνες και τις L-σελεκτίνες (118,119). Στις β2-ιντεγκρίνες ανήκουν 3 ομάδες μορίων, το CD11a/CD18, CD11b/CD18 και το CD11c/CD18. Κατά τη διέλευση των ΠΜΠ δια μέσου του ενδοθηλίου, οι L-σελεκτίνες συνδέονται μέσω της πρωτεΐνης LewisX με αντίστοιχα μόρια των ενδοθηλιακών κυττάρων, τις E-σελεκτίνες. Η σύνδεση αυτή είναι χαλαρή και έχει ως αποτέλεσμα την επιβράδυνση των ΠΜΠ, τα οποία κυλούν πάνω στο ενδοθήλιο των τριχοειδών (118,119). Με τον τρόπο αυτό διευκολύνεται η σύνδεση των β2 ιντεγκρινών με τα μόρια ICAM-1, ICAM-2 και ICAM-3 της επιφάνειας των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η σύνδεση αυτή είναι ισχυρή και ακολουθείται από ισχυρή προσκόλληση των ΠΜΠ στο ενδοθήλιο, τη διέλευση τους από το



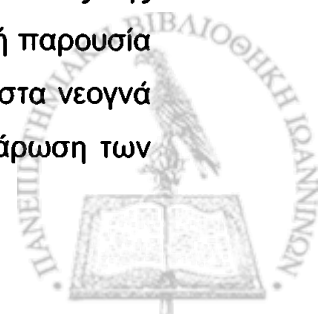
τοίχωμα των τριχοειδών και τη μετανάστευση τους στον τόπο φλεγμονής (118). Επίσης, στα ΠΜΠ εκφράζονται υποδοχείς για την ινωδεσμίνη, οι οποίοι παίζουν σημαντικό ρόλο στην προσκόλληση στο ενδοθήλιο και στην ενσωμάτωση των μικροβίων που είναι καλυμμένα με την ινωδεσμίνη (118,119,129).

Στους ενήλικες, με την επίδραση διαφόρων χημειοτακτικών παραγόντων (λιποπολυσακχαριδικά αντιγόνα, παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, κυτταροκίνες) αυξάνεται σημαντικά (μέχρι 10 φορές) η έκφραση των μορίων προσκόλλησης και προάγεται η προσκόλληση των ουδετερόφιλων στο ενδοθήλιο (126). Τα νεογνικά ΠΜΠ σε κατάσταση ηρεμίας έχουν αριθμό επιφανειακών υποδοχών παρόμοιο με τους ενήλικες (125,126,130,131) αν και ορισμένοι συγγραφείς αναφέρουν ανεπαρκή έκφραση του CD11a/CD18 στα ΠΜΠ των προώρων νεογνών (132). Όμως η ικανότητα των νεογνικών ΠΜΠ να αυξάνουν την έκφραση των μορίων προσκόλλησης μετά από επίδραση χημειοτακτικών παραγόντων είναι ελαττωμένη και δεν ξεπερνά το 75% της αύξησης που παρατηρείται στα ΠΜΠ των ενηλίκων. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τα ελαττωμένα επίπεδα ινωδεσμίνης πλάσματος μπορούν να εξηγήσουν την ελαττωμένη ικανότητα των ΠΜΠ των νεογνών να προσκολλώνται στο ενδοθήλιο και να μεταναστεύουν στον τόπο της φλεγμονής (122,130,133,136). Έτσι, το νεογνό αδυνατεί να περιορίσει τη φλεγμονή στον τόπο εισόδου των μικροβίων με αποτέλεσμα την εμφάνιση γενικευμένης λοίμωξης.

Φαγοκυττάρωση

Οι μικροοργανισμοί που έχουν καλυφθεί με οψωνίνες (Fc κλάσμα των ανοσοσφαιρινών, C3b και C3bi συστατικά του συμπληρώματος και ινωδεσμίνη) ενσωματώνονται από το ΠΜΠ. Για τη λειτουργία αυτή, όπως και για τη χημειοταξία, είναι απαραίτητη η ύπαρξη στην επιφάνεια του ΠΜΠ υποδοχέων ειδικών για τις οψωνίνες, όπως είναι ο C3b υποδοχέας (CR-1 receptor), Cb3i υποδοχέας (CR-3 receptor) και ο υποδοχέας της ινωδεσμίνης. Οι υποδοχείς αυτοί συνδέονται με τα αντίστοιχα τμήματα των οψωνινών που καλύπτουν την επιφάνεια των μικροοργανισμών και ακολουθεί ενσωμάτωσή τους από το ΠΜΠ.

Η μειωμένη ικανότητα των νεογνών να αυξάνουν την έκφραση των υποδοχέων της μεμβράνης μετά από διέγερση με χημειοτακτικούς παράγοντες θα μπορούσε να οδηγήσει σε ελαττωμένη ικανότητα ενσωμάτωσης του αντιγόνου από τα νεογνικά ΠΜΠ. Ωστόσο, βρέθηκε ότι η ικανότητα των ΠΜΠ, τελειόμηνων και προώρων, να φαγοκυτταρώνουν διάφορους μικροοργανισμούς είναι παρόμοια με εκείνη των ενηλίκων, εφόσον η εξέταση γίνεται σε ορό ενήλικα, δηλαδή παρουσία επαρκούς ποσότητας οψωνινών (120). Αντίθετα, μελέτες της ικανότητας ενσωμάτωσης των νεογνικών ΠΜΠ παρουσία νεογνικού ορού, δηλαδή παρουσία οψωνινών του ίδιου του νεογνού, έδειξαν ότι η λειτουργία αυτή είναι ελαττωμένη στα νεογνά και ιδίως τα πρόωρα (120). Τα ευρήματα αυτά δείχνουν ότι η χαμηλή φαγοκυττάρωση των



νεογνικών ΠΜΠ οφείλεται κυρίως στην ανεπαρκή περιεκτικότητα του νεογνικού ορού σε οφονίνες και όχι στη σχετική αδυναμία τους να αυξάνουν την έκφραση των επιφανειακών μορίων προσκόλλησης.

Ενδοκυτάρια μικροβιοκτονία και δραστηριότητα των οξειδωτικών μηχανισμών των ΠΜΠ

Η ενδοκυτάρια μικροβιοκτονία αποτελεί την τελευταία φάση της εξουδετέρωσης των εισβολέων, κατά την οποία επέρχεται καταστροφή των μικροβίων που ακολουθείται από το θάνατο του ΠΜΠ. Στην ενδοκυτάρια μικροβιοκτονία συμμετέχουν οξυγονοεξαρτώμενοι μηχανισμοί (παραγωγή ενεργών παραγωγών οξυγόνου κατά την αναπνευστική έκρηξη) και μη οξυγονοεξαρτώμενοι μηχανισμοί (λυσοζύμη, λακτοφερρίνη, χαμηλό pH) (117,120). Για τη μελέτη της λειτουργίας αυτής έχουν χρησιμοποιηθεί διάφοροι μέθοδοι, που στηρίζονται στη μέτρηση του ποσοστού των μικροβίων που φαγοκυτταρώνονται και καταστρέφονται από το ΠΜΠ ή στη μελέτη των ενδοκυττάρων οξειδωτικών μηχανισμών με την εκτίμηση της δραστηριότητας της αναπνευστικής έκρηξης (respiratory burst) και της ικανότητας παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου.

Στα τελειόμηνα υγιή νεογνά, η ενδοκυτάρια μικροβιοκτονία του σταφυλόκοκκου και της E.Coli και ο ενδοκυττάριος οξειδωτικός μηχανισμός είναι φυσιολογικά (120,123,134,135). Η φυσιολογική λειτουργία του ενδοκυττάρου οξειδωτικού μηχανισμού διαπιστώθηκε από μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία αναγωγής του κυανού του τετραζολίου (NBT test) (123) και η μέθοδος της χημιφωταύγειας (134). Με την τελευταία μέθοδο μετριέται η ενέργεια που παράγεται κατά την αναπνευστική έκρηξη (134). Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και από μελέτες με τη χρήση τα κυτταρομετρίας ροής (111). Με την τεχνική αυτή μετριέται η ενδοκυτάρια οξείδωση φθοριζουσών χρωστικών, όπως της διϋδροροδαμίνης, από το υπεροξειδίου του υδρογόνου, που απελευθερώνεται κατά την αναπνευστική έκρηξη (136). Στα πρόωρα νεογνά η ενδοκυτάρια μικροβιοκτονία και η δραστηριότητα της αναπνευστικής έκρηξης είναι ελαττωμένες (111,137,138) όμως δεν υπάρχει ομοφωνία σχετικά με τις λειτουργίες αυτές σε νεογνό με stress. Ορισμένοι συγγραφείς αναφέρουν ελαττωμένη ενδοκυτάρια μικροβιοκτονία και δραστηριότητα της αναπνευστικής έκρηξης από τα ΠΜΠ νεογνών με stress ή/και με λοίμωξη (111,128), ενώ άλλοι διαπίστωσαν αυξημένη παραγωγή υπεροξειδίου σε νεογνά με stress ή/και λοίμωξη (135,139). Οι διαφορές αυτές οφείλονται στη χρησιμοποίηση διαφορετικών μεθόδων, οι οποίες ελέγχουν διαφορετικές φάσεις του ενδοκυττάρου οξειδωτικού μηχανισμού των ΠΜΠ.

Συμπερασματικά, από την προσιτή βιβλιογραφία φαίνεται ότι η ενδοκυτάρια μικροβιοκτονία και η δραστηριότητα των οξειδωτικών μηχανισμών των ΠΜΠ στα υγιή τελειόμηνα νεογνά είναι παρόμοια με τη λειτουργία αυτή στους ενήλικες, αλλά φαίνεται ότι τα πρόωρα και στα νεογνά με stress να υπολείπεται (111,137).



Μονοπυρηνικό φαγοκυτταρικό σύστημα

Το μονοπυρηνικό φαγοκυτταρικό σύστημα αποτελείται από τα μονοπύρρηνα του αίματος και τα μακροφάγα των ιστών. Η λειτουργία των μονοπύρρηνων είναι παρόμοια με εκείνη των ΠΜΠ (χημειοταξία, φαγοκυττάρωση, ενδοκυττάρια μικροβιοκτονία). Επιπλέον όμως, το μονοπυρηνικό φαγοκυτταρικό σύστημα παίζει σημαντικό ρόλο στην ανοσιακή απάντηση του οργανισμού χάρις σε δύο ακόμη λειτουργίες του:

- α) επεξεργάζεται το αντιγόνο και το παρουσιάζει στα Τ-κύτταρα, ώστε να το αναγνωρίσουν και να κινητοποιηθεί η ανοσιακή απάντηση και
- β) εκκρίνει διάφορες ουσίες, όπως κυτταροκίνες (IFN- γ , TNF- α , IL-6) και αυξητικούς παράγοντες (GM-CSF, G-CSF, M-CSF) με τις οποίες ρυθμίζει πολλούς μηχανισμούς της ανοσιακής απάντησης (97).

Τα μονοπύρρηνα του νεογνού παρουσιάζουν φυσιολογικό αριθμό, αλλά υστερούν ως προς ορισμένες λειτουργίες σε σύγκριση με τα μονοπύρρηνα του ενήλικα. Συγκεκριμένα, εμφανίζουν φυσιολογική χημειοταξία, φαγοκυττάρωση, ενδοκυττάρια μικροβιοκτονία και παρουσίαση του αντιγόνου (140) ενώ, όπως έδειξαν πρόσφατες μελέτες, η ικανότητα παραγωγής κυτταροκινών και η έκφραση επιφανειακών αντιγόνων και μορίων προσκόλλησης από τα νεογνικά μονοπύρρηνα είναι ελαττωμένα (106-108,141-144).

Οψωνίνες

Για τη φαγοκυττάρωση των μικροοργανισμών από τα ΠΜΠ και τα μονοκύτταρα είναι απαραίτητες οι οψωνίνες που συνδέονται με το αντιγόνο μεταβάλλοντας την επιφανειακή του δομή, ώστε να υπάρχει δυνατότητα σύνδεσης των οψωνινών με αντίστοιχους υποδοχείς των φαγοκυττάρων. Η οψωνική δραστηριότητα του ορού εξαρτάται από την ύπαρξη ειδικών αντισωμάτων, από τη δραστηριότητα της κλασικής και εναλλακτικής οδού του συμπληρώματος και από την παρουσία μη ειδικών οψωνινών, από τις οποίες σημαντικότερη είναι η ινοδεσμίνη (97).

Τα συστατικά του συμπληρώματος δεν περνούν τον πλακούντα, αλλά αρχίζουν να συντίθεται από το έμβρυο από την 6^η με 14^η εβδομάδα κύησης (145). Στη γέννηση η δραστηριότητα και τα επίπεδα των συστατικών της κλασικής οδού του συμπληρώματος είναι χαμηλά και φθάνουν περίπου το 50% των επιπέδων του ενήλικα (133,145). Μετά τη γέννηση, τα επίπεδά τους αυξάνουν βαθμιαία και φθάνουν εκείνα του ενήλικα κατά τον 3^ο (C3) έως 6^ο μήνα (C4) της ζωής (133). Στα πρόωρα, τα επίπεδα των συστατικών του συμπληρώματος είναι ακόμη χαμηλότερα και φθάνουν τα επίπεδα του ενήλικα μετά τον 6^ο μήνα της ζωής (127,140). Ακόμη εντονότερη είναι η ανεπάρκεια στη δραστηριότητα και τα συστατικά της εναλλακτικής οδού του συμπληρώματος (127,140). Ακόμη εντονότερη είναι η ανεπάρκεια στη δραστηριότητα και τα συστατικά της εναλλακτικής οδού του συμπληρώματος (145,146).



Η σημαντικότερη μη ειδική οφονίνη είναι η ινοδεσμίνη της οποίας τα επίπεδα κατά τη γέννηση είναι χαμηλά, περίπου 50% των επιπέδων των ενηλίκων, και διαφέρουν σημαντικά μεταξύ προώρων και τελειόμηνων νεογνών (111). Μετά τη γέννηση, παρατηρείται βαθμιαία αύξηση των επιπέδων της ινοδεσμίνης, τα οποία όμως εξακολουθούν να είναι χαμηλότερα από τα επίπεδα του ενήλικα τουλάχιστον μέχρι τον 6^ο μήνα της ζωής (111).

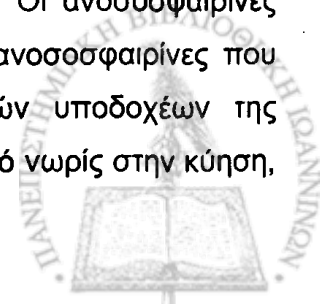
Τα χαμηλά επίπεδα των συστατικών του συμπληρώματος και της ινοδεσμίνης στα νεογνά, σε συνδυασμό και με το χαμηλό επίπεδο των ανοσοσφαιρινών στα πρόωρα, έχουν ως αποτέλεσμα την ελαττωμένη οφονική δραστηριότητα του νεογνικού ορού. Έτσι εξηγείται το γεγονός ότι η φαγοκυτταρική ικανότητα των νεογνικών ΠΜΠ παρουσία ορού του νεογνού είναι χαμηλή και αποκαθίσταται όταν ο έλεγχος της γίνει σε ορό ενήλικα (120,130).

7γ. Ειδικοί αμυντικοί μηχανισμοί

Τους ειδικούς αμυντικούς μηχανισμούς αποτελούν η χυμική και η κυτταρική ανοσία. Το σημαντικότερο μειονέκτημα που χαρακτηρίζει τα δύο αυτά σκέλη των ειδικών αμυντικών μηχανισμών του νεογνού είναι η έλλειψη ανοσολογικής μνήμης. Οι Erkeller και συν. (147) προσδιόρισαν τους υποπληθυσμούς των λεμφοκυττάρων σε διάφορες ηλικίες, από την νεογνική μέχρι την ενήλικη, και διαπίστωσαν ότι το ποσοστό των παρθένων T-κυττάρων, δηλαδή των T-κυττάρων που στερούνται ανοσολογικής μνήμης (CD45Ra) είναι πολύ υψηλό στο αίμα του ομφάλιου λώρου (91%) και ελαττώνεται με την ηλικία φθάνοντας το 40% μετά το 18^ο χρόνο ζωής.

8. ΧΥΜΙΚΗ ΑΝΟΣΙΑ

B-λεμφοκύτταρα υπάρχουν στο εμβρυικό ήπαρ ήδη από την 8^η εβδομάδα της κύησης, ενώ από τη 15^η-18^η εβδομάδα ο αριθμός των B-κυττάρων που φέρουν ανοσοσφαιρίνες IgM και IgG είναι παρόμοιος με τον αριθμό τους στους ενήλικες. Για να μετατραπούν αυτά τα B-κύτταρα σε πλασματοκύτταρα ικανά να εκκρίνουν ανοσοσφαιρίνες, απαιτούνται αντιγονικά ερεθίσματα και φυσιολογική λειτουργία των T-κυττάρων. Όμως, το ενδομήτριο περιβάλλον σαν φυσιολογική κατάσταση δεν επιτρέπει την επαφή του εμβρύου με ξένα αντιγόνα. Επιπλέον, τα εμβρυϊκά T-κύτταρα δεν είναι αρκετά ώριμα, ώστε να υποστηρίξουν τη λειτουργία των B-κυττάρων (140). Για τους λόγους αυτούς, το έμβρυο σε φυσιολογικές συνθήκες δεν παράγει δικές του ανοσοσφαιρίνες, αν και έχει ώριμα B-κύτταρα ικανά να παράγουν ανοσοσφαιρίνες. Έτσι, κατά τη γέννηση, το παιδί έχει μόνο τις ανοσοσφαιρίνες που πήρε από τη μητέρα του δια μέσου πλακούντα. Οι ανοσοσφαιρίνες αυτές ανήκουν αποκλειστικά στην τάξη των IgG, που είναι οι μόνες ανοσοσφαιρίνες που μπορούν να περάσουν τον πλακούντα χάρη στην ύπαρξη ειδικών υποδοχέων της τροφοβλάστης για το Fc κλάσμα τους (148). Η διέλευση αυτή αρχίζει από νωρίς στην κύηση,



αλλά αυξάνει σημαντικά μετά την 32^η εβδομάδα της κύησης, ώστε τα επίπεδα της ολικής IgG στο νεογέννητο να εξαρτώνται από την ηλικία κύησης. Στα πρόωρα είναι χαμηλά, ενώ στα τελειόμηνα φθάνουν ή ακόμη, ξεπερνούν τα επίπεδα των ενηλίκων (111). Τα αντισώματα του νεογέννητου αντικατοπτρίζουν τα αντισώματα της μητέρας του και δεν προστατεύουν επαρκώς από μικροοργανισμούς, όπως ο στρεπτόκοκκος της ομάδας B (GBS) ή E, Coli και άλλα Gram αρνητικά βακτήρια, εναντίον των οποίων η μητέρα συχνά δεν έχει ειδικά αντισώματα (148). Επιπλέον, τα αντισώματα κατά των μικροοργανισμών αυτών ανήκουν κυρίως στην τάξη των IgM ανοσοσφαιρινών, που δεν περνούν τον πλακούντα, καθώς και στις υποτάξεις 2 και 4 της IgG, των οποίων η δίοδος από τον πλακούντα υπολείπεται σε σύγκριση με τις υποτάξεις 1 και 3 (149). Για αυτό, οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι από τους σημαντικότερους παθογόνους παράγοντες κατά τη νεογνική ηλικία (Πίνακες 1, 2).

Οι IgA και IgM δεν περνούν τον πλακούντα, με αποτέλεσμα τα επίπεδά τους στα νεογνά να είναι πολύ χαμηλά. Έτσι, το 99% των νεογέννητων έχει μη ανιχνεύσιμα επίπεδα IgA. Αργότερα παρατηρείται βαθμιαία αύξηση της IgA, αλλά τα επίπεδα της εξακολουθούν να είναι χαμηλότερα απ' ό,τι στους ενήλικες τουλάχιστον μέχρι τον 6^ο μήνα της ζωής (111).

Παρομοίως, η IgM είναι πολύ χαμηλή στη γέννηση και παραμένει σε επίπεδα χαμηλότερα απ' ό,τι στους ενήλικες τουλάχιστον μέχρι τον 6^ο μήνα της ζωής (111).

Δυνατότητα για αντισωματική απάντηση υπάρχει ήδη από την εμβρυϊκή ηλικία, όπως φαίνεται από την ανάπτυξη ειδικών αντισωμάτων μετά από συγγενή λοίμωξη. Έτσι, τα νεογνά, τελειόμηνα αι πρόωρα είναι ικανά να παράγουν ειδικά αντισώματα μετά από εμβολιασμούς ή λοιμώξεις. Τα αντισώματα αυτά αρχικά είναι IgM και αργότερα αντικαθιστούνται από IgG αντισώματα όπως και στους ενήλικες. Ωστόσο, ο τίτλος των παραγόμενων αντισωμάτων αυξάνεται με ρυθμό πιο αργό απ' ό,τι στους ενήλικες και ο χρόνος μετάπτωσης της παραγωγής των IgM αντισωμάτων σε IgG καθυστερεί, ώστε 20-30 ημέρες μετά τον εμβολιασμό να υπάρχουν ακόμη IgM αντισώματα (145,150). Αυτό το φαινόμενο παρατηρείται μέχρι τον 6^ο περίπου μήνα της ζωής. Στα πρόωρα, η ικανότητα για αντισωματική απάντηση δεν διαφέρει σημαντικά από εκείνη των τελειόμηνων νεογνών.

9. ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΝΟΣΙΑ

Τα T- λεμφοκύτταρα ασκούν ειδικές ανοσολογικές λειτουργίες, βοηθητική, κατασταλτική και κυτταροτοξική, ρυθμίζοντας ταυτόχρονα τη λειτουργία άλλων κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος με τις κυτταροκίνες που εκκρίνουν (97).

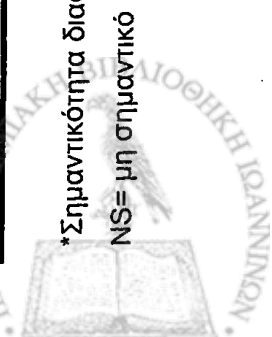
Στον εμβρυϊκό θύμο βρίσκονται άωρα προ-θυμοκύτταρα ήδη από την 8^η εβδομάδα της κύησης. Τα πρώτα αυτά κύτταρα αρχικά έχουν πολύ ανώριμο φαινότυπο αλλά βαθμιαία ωριμάζουν, ώστε τη 12^η-14^η εμβρυϊκή εβδομάδα η αναλογία των κυττάρων του θύμου είναι παρόμοια με εκείνη των ενηλίκων (140).



Πίνακας 1. Εκποσπασίες θέσεις των συγκεντρώσεων ανοσοσφαιρινών στις 3 ομάδες νεογνών [Ομάδα I: πρόωρα ηλικίας κύησης 26-30 εβδ., ΜΗΚ 28.37(±1.4), Ομάδα II: βρέφη ΗΚ 31-37 εβδ, ΜΗΚ 33.4±1.9 εβδ και Ομάδα III: τελειόμηνα ΜΗΚ 39.5 (±1.0)] (133).

Χρονολογική ηλικία	Ομάδα	v=	IgG ΕΘ					IgM ΕΘ					IgA ΕΘ					
			5	25	30	75	95	5	25	30	75	95	5	25	30	75	95	
Γέννηση	I	99	2.80	3.88	4.96	5.93	7.53	0.0	0.06	0.08	0.16	0.36						
	II	207	5.08	6.64	8.02	9.87	12.19	0.0	0.07	0.09	0.15	0.31						
	III	260	6.90	9.65	11.40	12.85	15.32	0.07	0.09	0.13	0.17	0.28						
	p*				<0.001					<0.001								
1 μήνας	I	54	2.25	3.21	3.75	4.22	5.60	0.25	0.41	0.48	0.68	0.89	0.0	0.08	0.12	0.17	0.26	
	II	104	2.84	3.71	4.50	5.36	7.56	0.22	0.39	0.47	0.65	0.88	0.0	0.0	0.09	0.15	0.29	
	III	75	4.16	5.35	6.23	7.44	10.17	0.21	0.39	0.59	0.79	1.05	0.0	0.10	0.12	0.21	0.32	
	p*				<0.001					NS					<0.05			
3 μήνες	I	54	1.07	1.94	2.50	3.27	4.48	0.28	0.45	0.58	0.77	1.30	303	0.13	0.19	0.23	0.35	
	II	104	1.20	2.11	3.09	3.83	5.80	0.35	0.52	0.69	0.97	1.41	0.01	0.09	0.19	0.24	0.41	
	III	60	2.75	3.76	4.06	4.82	7.06	0.43	0.68	0.86	2.09	1.46	0.11	0.18	0.24	0.32	0.39	
	p*				<0.001					<0.01					NS			
6 μήνες	I	35	2.03	3.40	3.97	4.65	6.71	0.57	0.79	0.96	1.26	1.77	0.06	0.17	0.27	0.35	0.44	
	II	79	2.05	2.97	4.17	5.08	7.51	0.42	0.67	0.99	1.30	1.72	0.01	0.15	0.22	0.39	0.62	
	III	33	3.47	4.30	4.91	6.09	7.30	0.60	0.80	0.95	1.15	1.62	0.16	0.22	0.26	0.35	0.43	
	p*				NS					NS					NS			
Ενήλικες		230	8.74	10.80	12.30	14.20	16.90	0.64	1.03	1.40	1.86	2.99	1.03	1.60	2.05	2.54	3.47	

*Σημαντικότητα διαφοράς μεταξύ των τριών ομάδων χρησιμοποιώντας την Kruskal-Wallis one way analysis of variance
NS= μη σημαντικό



Πίνακας 2. Εκατοστιαίες θέσεις της αναλογίας εμβρύου προς μητέρα των C3 και C4 στις 3 ομάδες νεογνών: [Ομάδα I: πρόωρα ΗΚ 26-30 εβδ., ΜΗΚ 28.37(±1.4), Ομάδα II: βρέφη ΗΚ 31-37 εβδ, ΜΗΚ 33.4±1.9 εβδ και Ομάδα III: τελειόμηνα ΜΗΚ 39.5 (±1.0)] (133).

Χρονολογική ηλικία	Ομάδα	n=	C3 ΕΘ						C4 ΕΘ					
			5	25	30	75	95	5	25	30	75	95		
Γέννηση	I	68	0.13	0.26	0.37	0.64	0.77	0.04	0.06	0.11	0.15	0.24		
	II	131	0.28	0.37	0.47	0.58	0.51	0.08	0.12	0.13	0.17	0.24		
	III	260	0.35	0.45	0.53	0.62	0.74	0.10	0.13	0.15	0.18	0.24		
	p*				<0.001					<0.001				
1 μήνας	I	37	0.30	0.37	0.53	0.69	0.85	0.10	0.12	0.17	0.23	0.32		
	II	68	0.32	0.44	0.50	0.62	0.81	0.11	0.13	0.16	0.22	0.34		
	III	76	0.41	0.54	0.64	0.72	0.90	0.12	0.19	0.22	0.27	0.36		
	p*				<0.001					NS				
3 μήνες	I	35	0.35	0.49	0.64	0.73	0.95	0.11	0.13	0.16	0.25	0.31		
	II	61	0.48	0.59	0.70	0.77	0.92	0.11	0.16	0.22	0.28	0.37		
	III	60	0.55	0.69	0.76	0.87	1.02	0.16	0.22	0.26	0.32	0.47		
	p*				<0.001					<0.01				
6 μήνες	I	19	0.75	0.80	0.85	0.97	1.12	0.18	0.21	0.23	0.27	0.32		
	II	38	0.68	0.71	0.82	0.94	1.05	0.16	0.23	0.31	0.39	0.47		
	III	33	0.64	0.76	0.87	1.01	1.24	0.18	0.23	0.31	0.40	0.55		
	p*				NS					NS				
Ενήλικες		230	0.49	0.64	0.72	0.81	1.03	0.15	0.22	0.26	0.32	0.41		

*Σημαντικότητα διαφοράς μεταξύ των τριών ομάδων χρησιμοποιώντας την Kruskal-Wallis one way analysis of variance
NS= μη σημαντικό

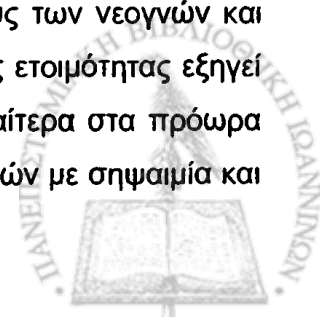
Στο περιφερικό αίμα ο φαινότυπος των περιφερικών T-κυττάρων είναι ανώριμος στη γέννηση. Συγκεκριμένα τα νεογνικά λεμφοκύτταρα, σε αντίθεση με του ενήλικα, δεν εκφράζουν το επιφανειακό μόριο CD3, ενώ εκφράζουν το CD1 και ορισμένα CD38. Τα τελευταία αυτά επιφανειακά μόρια χαρακτηρίζουν τις άωρες μορφές των T-κυττάρων οι οποίες στον ενήλικα υπάρχουν μόνο μέσα στον θυμό και συνδυάζονται με ελαττωμένη λειτουργικότητα. Επιπλέον, το 12-15% των νεογνικών T-κυττάρων του αίματος εκφράζουν ταυτόχρονα το CD4+ και CD8+ (134). Η αναλογία CD4+ και CD8+ στο αίμα του ομφάλιου λώρου είναι παρόμοια με των ενηλίκων, περίπου 1:2 (151).

Η T-βοηθητική λειτουργία είναι παρόμοια η ελαφρά ελαττωμένη έτσι ώστε τα νεογνικά T-κύτταρα είναι ικανά να υποστηρίζουν την παραγωγή ανοσοσφαιρινών από τα B-κύτταρα (152). Ωστόσο, η T-βοηθητική λειτουργία είναι αυξημένη στα νεογνικά T-κύτταρα συγκριτικά με τους ενήλικες (153). Η κυτταροτοξική λειτουργία είναι κατά 30-60% μικρότερη από ότι στους ενήλικες (153).

Οι απόψεις για την παραγωγή κυτταροκινών από τα νεογνικά T-κύτταρα είναι αντικρουόμενες στη βιβλιογραφία. Οι περισσότεροι συγγραφείς συμφωνούν ότι η παραγωγή του παράγοντα που αναστέλλει τη μετανάστευση των μακροφάγων είναι ελαττωμένη (153,154), ενώ αναφέρεται φυσιολογική η ελαττωμένη παραγωγή της λεμφοτοξίνης (140,155). Επίσης, πολλοί συγγραφείς αναφέρουν φυσιολογική παραγωγή IL-2 (156), ενώ άλλες μελέτες δίνουν ενδείξεις ελαττωμένης παραγωγής IL-2 από τα νεογνικά T-κύτταρα (153). Τέλος, αντικρουόμενα είναι και τα βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με την παραγωγή ιντερφερόνης-γ από τα νεογνικά λεμφοκύτταρα (153,154,157). Θεωρείται πιθανό ότι τα αποτελέσματα αυτά επηρεάζονται από τη λειτουργία του μακροφάγου καθώς και από την διεγέρση που χρησιμοποιείται για την *in vitro* διέγερση των λεμφοκυττάρων (158-160).

Τα νεογνικά T-κύτταρα μετά διέγερση με μιτογόνα είναι ικανά να αυξάνουν την έκφραση των HLA-DR των υποδοχέων της IL-2, αλλά η αύξηση που παρατηρείται είναι μικρότερη απ' ό τι στους ενήλικες (161). Η λειτουργική ανεπάρκεια των νεογνικών T-κυττάρων μπορεί να επηρεάσει τα αποτελέσματα των λειτουργικών δοκιμασιών ελέγχου της κυτταρικής ανοσίας. Οι δοκιμασίες επιβραδυνόμενης υπερευαισθησίας με διάφορα αντιγόνα (*andida albicans*, στρεπτοκινάση, τοξοειδές του τετάνου κα) είναι αρνητικές στα νεογνά (140). Αυτό αποδίδεται κυρίως σε έλλειψη ευαισθητοποίησης. Θεωρείται όμως πιθανό ότι σε αυτό συμμετέχει και η ελαττωμένη φλεγμονώδης αντίδραση, δεδομένου ότι οι αντιδράσεις επιβραδυνόμενης υπερευαισθησίας εξακολουθούν να είναι σημαντικά ελαττωμένες ακόμη και μετά προηγούμενη ευαισθητοποίηση σε ορισμένα αντιγόνα (140).

Η ανωριμότητα ορισμένων από τους ανοσολογικούς μηχανισμούς των νεογνών και κυρίως η έλλειψη ανοσολογικής μνήμης και κατά συνέπεια ανοσολογικής ετοιμότητας εξηγεί κατά ένα μέρος τη μεγάλη συχνότητα και βαρύτητα των λοιμώξεων, ιδιαίτερα στα πρόωρα (98). Παρά τις σημαντικές βελτιώσεις στην υποστηρικτική θεραπεία νεογνών με σηψαιμία και



την χρησιμοποίηση νέων, ισχυρών αντιμικροβιακών στην αντιμετώπισή της, οι νεογνικές λοιμώξεις εξακολουθούν να αποτελούν σημαντική αιτία νεογνικής νοσηρότητας και θνησιμότητας. Η νεογνική σηψαιμία συχνά καταλήγει σε σηπτικό shock και σε πολυοργανική ανεπάρκεια (162).

Οι κυτταροκίνες είναι οι πιο συχνά αναφερόμενοι μεσολαβητές που εμπλέκονται στην έναρξη των παθολογικών φαινομένων που οδηγούν στο σύνδρομο του σηπτικού shock, ιδιαίτερα η υπερβολική παραγωγή των προφλεγμονωδών κυτταροκινών IL-1β, TNF-1α και IL-6 (163-164). Διάφορες μελέτες σε ενήλικες (166,167) παιδιά (168) και νεογνά με σηψαιμία (169-173) έχουν αποδείξει ότι τα επίπεδα των IL-1β TNF-α και IL-6 στον ορό είναι αυξημένα κατά την διάρκεια της νόσου. Επιπλέον, ορισμένες μελέτες δείχνουν ότι η μεγάλη αύξηση των επιπέδων των κυτταροκινών αυτών είναι δυνατό να σχετίζεται με τη βαρύτητα και έκβαση της σήψης (168,170) Ωστόσο δεν έχουν μελετηθεί οι διαδοχικές μεταβολές του επιπέδου των προφλεγμονωδών κυτταροκινών κατά τη διάρκεια της νεογνικής σήψης και δεν έχουν εκτιμηθεί σε σχέση με την πρόγνωση της λοίμωξης.

Τα τελευταία χρόνια η έρευνα έχει στραφεί στις κυτταροκίνες τα μόρια που συμμετέχουν στη φλεγμονή και ανοσία, και έχουν δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν σαν δείκτες λοίμωξης. Από τις σημαντικότερες κυτταροκίνες έχουν μελετηθεί, είναι οι TNF-α και IL-6 και η IL-8. Ο TNF-α είναι ο κυριότερος εναρκτήριο παράγων συστηματικής φλεγμονής και μαζί με την IL-6 ενεργοποιεί την CRP (171). Ως εκ τούτου αυξημένες συγκεντρώσεις αυτών των 2 μπορεί να είναι ανιχνεύσιμες προ της αύξησης της CRP. Υπάρχουν 31 μελέτες μέχρι το 2000 που έχουν αναφερθεί στη σήψη σε νεογνά και βρέφη (172). Οι 11 από αυτές μέτρησαν τη συγκέντρωση TNF-α, IL-6 και/ή IL-8 χωρίς να καθορίσουν την ακρίβεια των TNF-α, και IL-6 ή/και IL-8 σαν δείκτες της λοίμωξης: από αυτές οι 7 εκτίμησαν την IL-6 σαν δυνητικό δείκτη, οι 6 ανέφεραν τη συμβολή του TNF-α και 5 εκτίμησαν την IL-8.

Οι Ng και συν ανέφεραν ότι η ευαισθησία του TNF-α (ταχείας αντίδρασης παράγων) σε συνδυασμό με την CRP (βραδύτερης αντίδρασης) βελτίωσε την ευαισθησία αλλά η ειδικότητα είναι χαμηλή (173). Η IL-6 θεωρείται ευαίσθητος δείκτης για τις πρώιμες έναρξης (48-72 ώρες) λοιμώξεις στα νεογνά (173). Τα αποτελέσματα, όσον αφορά την ευαισθησία για όψιμες λοιμώξεις, είναι αντιφατικά (174) και απαιτείται μεγαλύτερος αριθμός παιδιών προτού χρησιμοποιηθεί στην κλινική πράξη. Η IL-6 είναι ταχείας αντίδρασης με βραχύ χρόνο ημίσειας ζωής. Ως εκ τούτου 24 ώρες μετά την έναρξη της λοίμωξης μπορεί να μην είναι πλέον ευαίσθητη. Η IL-8 δεν φαίνεται να υπερέχει της CRP ως εκ τούτου δεν θεωρήθηκε απαραίτητη να περιληφθεί.

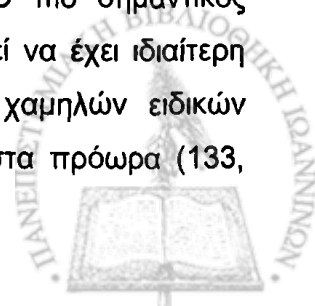
Αναφέρεται από τη βιβλιογραφία ότι η IL-6 είναι καλύτερος δείκτης από τη CRP τις πρώτες 24 ώρες, ενώ ο συνδυασμός τους θεωρείται ότι έχει καλύτερη ευαισθησία. Τα



περιορισμένα στοιχεία για το TNF- α και IL-8, δείχνουν μια δυνατότητα, αλλά χαμηλής ειδικότητας, για τη διάγνωση της νεογνικής σήψης (175).

Είναι εμφανής η ανάγκη για περαιτέρω μελέτες που να αποδείξουν επιπλέον πλεονεκτήματα των κυτταροκινών έναντι της CRP και των δεικτών των ουδετερόφιλων. Η λοίμωξη σε νεογνά που νοσηλεύονται στη Μονάδα Εντατικής Νοσηλείας Νεογνών (MENN) ανέρχεται σε 25-50% (176, 177) με ψηλή θνητότητα παρά τη χρήση αποτελεσματικής αγωγής. Ο λόγος έχει αποδοθεί στην ανωριμότητα των βακτηριογόνων μηχανισμών. Η κλινική απόδειξη είναι ο τύπος των βακτηριακών λοιμώξεων που προσομοιάζει με αυτή των ασθενών με ουδετεροπενία (178), όπως και την ανάπτυξη ουδετεροπενίας σε απάντηση στη βακτηριακή σήψη (179). Εντούτοις έχει παρατηρηθεί ότι ακόμη και πολύ ανώριμα νεογνά έχουν αριθμούς ουδετεροφίλων παρόμοια με παιδιά και ενήλικες (103, 180). Οι ενήλικες αναπτύσσουν σταθερή ουδετεροφιλία, απελευθερώνοντας ουδετερόφιλα από το μυελό στην κυκλοφορία και επιστρατεύοντας περισσότερα πρόδρομα κοκκιοφιλα (*Granulocyte-macrophage colony forming units (GM-CFU)* στον κυτταρικό κύκλο, ενώ τα πρόωρα καθίστανται ουδετεροπενικά (181). Η γνώση μας για την κινητική ουδετεροφίλων σε πρόωρα προέρχεται από τα ποντίκια. Οι πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι η συνολική δεξαμενή των GM-CFU είναι <10%/kg βάρους σώματος των ενηλίκων. Αντίθετα με τους ενήλικες με μεγάλη δεξαμενή ήσυχων προδρομικών κυττάρων, που έχουν τη δυνατότητα να ενεργοποιηθούν σε περίπτωση σήψης, πάνω από το 75% των GM-CFU ευρίσκονται ενεργοποιημένα σε νεογνά ποντίκια χωρίς λοίμωξη (103, 182). Παρόμοια ευρήματα αναφέρουν μελέτες σε τελειόμηνα ή σχεδόν τελειόμηνα νεογνά (102). Επίσης, η εμφάνιση ουδετεροφίλων από το μυελό των οστών, σε ουδετεροπενικά νεογνά με σήψη έχουν συνδεθεί με υψηλή θνητότητα (183). Έχει αναφερθεί από μελέτες σε ποντίκια ότι ο ΑΑΠ ανά kg βάρους σώματος είναι μόλις το ¼ στα νεογνά σε σύγκριση με τους ενήλικες, τα επίπεδα των οποίων επιτυγχάνει 4 εβδομάδες μετά τη γέννηση (189). Πρόσφατα ευρήματα σε ανθρώπινα πρόωρα με ΗΚ <32 εβδομάδων έχουν δείξει επίπεδα ΑΑΠ στο 20% των ενηλίκων (185), ενώ στα ΤΜ έχουν αποθήκες ουδετεροφίλων παρόμοιες με τους ενήλικες (186). Η φαγοκυττάρωση και η φονική δράση των ουδετεροφίλων επίσης εξαρτάται από την επαρκή οψονοποίηση μέσω υποδοχέων για το συμπλήρωμα και την Fc περιοχή των ανοσοσφαιρινών.

Η οψονική δράση του συμπληρώματος ευρίσκεται στα τμήματα C3:C3b συνδεδεμένα στην επιφάνεια, το οποίο αναγνωρίζεται από τον υποδοχέα 1 του συμπληρώματος (CR1) και το πιο σταθερό iC3b που αναγνωρίζεται από τον υποδοχέα 3 του συμπληρώματος (CR3). Ο υποδοχέας 1 έχει βρεθεί φυσιολογικός στα νεογνικά ουδετερόφιλα. Ο πιο σημαντικός υποδοχέας για τη φαγοκύτωση φαίνεται να είναι ο CR3. Ο CR3 μπορεί να έχει ιδιαίτερη σημασία για τη φαγοκύτωση των νεογνικών ουδετεροφίλων λόγω χαμηλών ειδικών αντισωμάτων και οψονινών σε τελειόμηνα και μειωμένο συμπλήρωμα στα πρόωρα (133,



187, 188) (Πίνακες 1 και 2). Η απενεργοποίηση CR1 δεν φαίνεται να επηρεάζει τη λειτουργία ουδετερόφιλων ενώ η απενεργοποίηση CR3 CR1 εμποδίζει πλήρως την πρόσληψη στρεπτόκοκκου B III. Επιπλέον, το CR3 συνδέεται με E. Coli χωρίς οψονοποίηση με απευθείας αντίδραση με το λιποπολυσακχαρίτη (189). Η ικανότητα του CR3 για την ενεργοποίηση της φαγοκυττάρωσης χωρίς επαρκή ανοσοφαιρίνη και επιπέδων συμπληρώματος δείχνει ότι η χαμηλή έκφρασή του στα ουδετερόφιλα των προώρων αποτελεί σημαντικό παράγοντα για τη μειωμένη άμυνά τους στη βακτηριακή σήψη.

Fc γάμμα υποδοχείς και φαγοκυττάρωση

Τα ουδετερόφιλα έχουν 2 τάξεις Fcγ υποδοχέων, που εισάγουν τη σύνδεση, πέψη και φόνο των βακτηρίων. Το Fcγ RII έχει διαμεμβρανική δομή και ενεργοποιεί την IgG-προκαλούμενη φαγοκυττάρωση, δημιουργία υπεροξειδίων και την αναπνευστική έκρηξη (respiratory burst). Το Fcγ RIII είναι δομή συνδεδεμένη με φωσφοϊνοσιτόλη (PI, phosphoinositol) χωρίς επαφή με μεμβράνη ή κυτόπλασμα, εντούτοις ενεργοποιεί την εξοκύτωση ουδετερόφιλων κοκκίων (190). Φαίνεται ότι λόγω PI παρουσιάζει έξτρα κινητικότητα στην κυτταρική μεμβράνη και φέρνει σε επαφή σωματίδια IgG-οψονοποιημένα σε επαφή με Fcγ RII ή CR3 υποδοχείς (156,191) με επακόλουθο την ενεργοποίηση βακτηριοφονικών μηχανισμών. Fcγ RIII όπως και ο CR3 αποκτά ιδιαίτερη σημασία σε νεογνά με χαμηλή οψονική ικανότητα. Σε TM νεογνά Fcγ RII και Fcγ RIII υποδοχείς είναι παρόντες σε φυσιολογικά επίπεδα ενώ στα πρόωρα <32 εβδ. είναι 80-88% και 50% αντίστοιχα. Μετά τη γέννηση αυξάνουν εντός 2 εβδομάδων σε φυσιολογικά επίπεδα (192,193).

Η πλειονότητα των μελετών που εξετάζουν την ικανότητα νεογνικά ουδετερόφιλα να φαγοκυττάρωνουν βακτήρια in vitro, χρησιμοποιούν κύτταρα χώρια από το πλάσμα και βακτήρια στόχους οψονοποιημένα με ανοσοφαιρίνη ενηλίκων και συμπλήρωμα και έχουν βρεθεί φυσιολογικά. Η φαγοκυττάρωση της *Candida* βρέθηκε μειονεκτική σε σύγκριση με τους ενήλικες (194).

Επίδραση της προωρότητας και του stress στη φαγοκυττάρωση

Υπάρχουν δύο μελέτες ουδετερόφιλων από σταθερά πρόωρα νεογνά, χρησιμοποιώντας κύτταρα και πλάσμα ενήλικα για οψονοποίηση. Η φαγοκύτωση του χρυσίζοντα σταφυλόκοκκου (*Staph. aureus*) βρέθηκε παρόμοια σε πρόωρα με ΗΚ 28-36 εβδομάδες με των ενηλίκων και TM νεογνών (194,195). Η δεύτερη μελέτη εξέτασε τη φαγοκύτωση της E.Coli χρησιμοποιώντας ολόκληρο αίμα. Τα πρόωρα με ΗΚ 23-33 εβδ., χωρίς σήψη ή αναπνευστική νόσο είχαν σημαντικά μειωμένη ικανότητα φαγοκύτωσης (αριθμός κυττάρων που ανέλαβαν βακτήρια, αριθμός βακτηρίων που καταστράφηκαν από



ενεργά κύτταρα και χρόνος πρόσληψης) (131). Αυτή η μειωμένη αντίδραση ήταν παρούσα 2 μήνες αργότερα.

1. Ουδετερόφιλα ενηλίκων με ορό νεογνών: μειωμένη φαγοκύτωση
2. πρόωρα ουδετερόφιλα λειτουργούν επαρκώς στο σταφυλόκοκκο εφόσον προστεθεί ορός ενηλίκων
3. μετά ενδοφλέβια ένεση ανοσοσφαιρινών σε πρόωρα ώστε η ανοσοφαιρίνη G να φτάσει επίπεδα ενηλίκων.

Λοίμωξη ή όχι, μελέτες έχουν δείξει ότι ουδετερόφιλα από πρόωρα ή τελειόμηνια φαγοκυττώνουν φυσιολογικά, εφόσον υπάρχει επαρκής οψονοποίηση (196).

Αναπνευστική έκρηξη (Respiratory burst – RB)

Η ΑΕ (Αναπνευστική Έκρηξη) αποτελεί μείζονα μηχανισμό για το φόνο βακτηρίων από τα ουδετερόφιλα. Ο επιδερμικός σταφυλόκοκκος δεν φονεύεται σε πειραματικές συνθήκες έλλειψης οξυγόνου, που απαλείφει την ΑΕ, που μπορεί να σχετίζεται με τη νεογνική πρακτική, όπου ο *Staph. epidermidis* είναι συχνό αίτιο στις όψιμες λοιμώξεις. Τα τελειόμηνια νεογνά (TM) έχουν φυσιολογική ΑΕ σε σύγκριση με τους ενήλικες ενώ τα πρόωρα (28-34 εβδ. ΗΚ) μειωμένη (138) που επιβεβαιώνεται και από πειραματικές μελέτες.

TM σκοτώνουν ενδοκυττάριο *S. aureus* και *E. Coli* ενώ πρόωρα με ΒΓ <2000 g δεν μπορούν να σκοτώσουν σταφυλόκοκκους (197). Οι Δρόσου και συν (198) έδειξαν ότι και στα TM με λοίμωξη ή άλλο stress η ΑΕ μειώνεται σε αντίθεση με τους ενήλικες που αξάνεται. TM με GBS III μειώνουν την ΑΕ έως και 50-75% σε σύγκριση με TM χωρίς σήψη, και κατά 10 φορές τη φονική τους ικανότητα για οψονοποιημένο GBS in vitro (139) και φαινόμενο μειωμένης έντασης παρατηρήθηκε σε νεογνά με αναπνευστική δυσχέρεια (139). Μετά τη γέννηση η ΑΕ σε πρόωρα βελτιώνεται την 1^η εβδομάδα περισσότερο στα 29-35 εβδ. ΗΚ σε σύγκριση με 24-28 εβδ. κύησης (137). Στο τέλος των 2 μηνών παρέμεινε χαμηλότερο των ενηλίκων. Παρόμοια ευρήματα βρήκε ο Usmani, εντούτοις πιο υγιή νεογνά δεν παρακολούθηθηκαν επί μακρόν.

Παραγωγή υπεροξειδίου

Αν και η δημιουργία βακτηριοκτόνων ριζών υδροξυλίου είναι μειωμένες (199,200), η αρχική φάση της ΑΕ όπως ελέγχεται με τη δημιουργία υπεροξειδίου (O_2^-) είναι αυξημένη στο νεογνό σε σύγκριση με ενήλικες (201). Ποιοτικά η κινητική του NADPH οξειδωμένου συστήματος που παράγει O_2^- είναι διαφορετική στα νεογνά σε σύγκριση με τους ενήλικες (202). Επιπλέον, το O_2^- στα ουδετερόφιλα κύτταρα του ομφάλιου είναι αυξημένη μετά τον τοκετό σε αντίθεση με την καισαρική τομή που δείχνει priming για τον τοκετό (135).



Λακτοφερρίνη και μυελοπεροξειδάση

Η λακτοφερρίνη είναι βακτηριοφονικό συστατικών των ειδικών κοκκίων στα ουδετερόφιλα. Έχει απευθείας βακτηριοστατικές ιδιότητες (203) και όταν είναι κεκορεσμένη με σίδηρο αυξάνει ιόντα υδροξειδίου (204).

Τα νεογνικά κύτταρα έχουν τη μισή ποσότητα λακτοφερρίνης των κυτάρων του ενήλικα και τα πρόωρα ακόμη μικρότερη (104,125).

Ένας εναλλακτικός και σημαντικός καταλύτης είναι η μυελοπεροξειδάση που συμμετέχει στην παραγωγή υποχλωρικού οξέος από υπεροξειδίο υδρογόνου. Ευρίσκεται σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις σε ΤΜ (104), ενώ είναι σημαντικά χαμηλότερα σε πρόωρα (205).

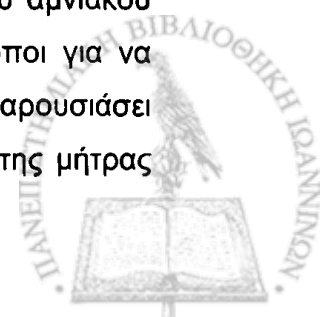
10. ΝΕΟΓΝΙΚΕΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

Ο ορισμός «αποκλεισμός λοίμωξης» παραμένει μια κοινότυπη διάγνωση στη νεογνολογία. Στις ΗΠΑ 400.000 έως 600.000 νεογνά εκτιμώνται με ολικό αριθμό λευκών και καλλιέργειες αίματος κάθε χρόνο και είναι η πιο συχνή διάγνωση για την εισαγωγή σε μονάδες νεογνών. Ο αριθμός των πιθανών λοιμώξεων είναι 6.3% ενώ ο αριθμός των λοιμώξεων επιβεβαιωμένων με κ/α αίματος είναι 3.7% (206). Δεν υπάρχει αντίρρηση για τη χορήγηση αντιβίωσης σε νεογνά με κλινικά σημεία λοίμωξης. Σε δύο πεδία υπάρχει ακόμη αντίφαση;

- 1) ως προς το είδος των εξετάσεων που επιτρέπει τη γρήγορη και αξιόπιστη διάγνωση της λοίμωξης. Με την εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων είναι αρκετά αργά.
- 2) η αντιμετώπιση νεογνών με παράγοντες κινδύνου από τη μήτρα που αρχικά είναι ασυμπτωματικά: ποια είναι τα κατάλληλα κριτήρια για την έναρξη αντιβίωσης. Το σύνολο της βιβλιογραφίας είναι αντιφατικό και δεν δίνει ικανοποιητικές απαντήσεις.

Η ανάγκη για άμεση έναρξη θεραπείας σε υποψία σήψης είναι επείγουσα. Η νεογνική σήψη αποτελεί σοβαρή απειλή για το νεογνό. Η επιβεβαίωση της διάγνωσης μπορεί να καθυστερήσει. Υπάρχουν περιπτώσεις που ενώ υπάρχει λοίμωξη, οι εργαστηριακές εξετάσεις είναι αρνητικές. Σε άλλες περιπτώσεις η κλινική εικόνα του νεογνού είναι καλή και ένα θετικό αποτέλεσμα δεν αυξάνει την πιθανότητα το νεογνό να έχει λοίμωξη. Όπως υπάρχουν και καταστάσεις που η κλινική εικόνα δημιουργεί αμφιβολίες στο θεράποντα για πιθανή λοίμωξη και οι εργαστηριακές εξετάσεις μπορεί να αποδειχθούν χρήσιμες.

Το έμβρυο είναι σχετικά προστατευμένο από τη μικροβιακή χλωρίδα της μητέρας με τις χοριακές μεμβράνες, τον πλακούντα και με αντιμικροβιακούς παράγοντες του αμνιακού υγρού, για τους οποίους δεν γνωρίζουμε πολλά (207). Υπάρχουν πολλοί τρόποι για να προσβληθεί το έμβρυο ή το νεογνό από λοιμογόνους παράγοντες και να παρουσιάσει λοίμωξη. Μέθοδοι όπως η αμνιοπαρακέντηση (208), η περίδεση του τραχήλου της μήτρας



(209), η διατραχηλική λήψη λαχνών (210), η διαδερμική λήψη αίματος (208,211), επιτρέπουν την είσοδο των μικροοργανισμών είτε από το δέρμα είτε από τον κόλπο προκαλώντας αμνιονίτιδα και δευτεροπαθώς λοίμωξη του εμβρύου. Επίσης, ορισμένα βακτήρια, ιδιαίτερα *Treponema pallidum* και *Listeria monocytogenes* μπορεί να φτάσουν από τη μητέρα στο έμβρυο αιματογενώς προκαλώντας διαπλακουντιακή λοίμωξη.

Αρχικά, ο αποικισμός των νεογνών γίνεται συνήθως μετά τη ρήξη των μεμβρανών. Στις πιο πολλές περιπτώσεις τα νεογνά αποικίζονται με τη χλωρίδα από το γεννητικό κανάλι κατά τη διάρκεια του τοκετού. Βέβαια, όταν έχουμε ρήξη μεμβρανών πέρα από 24 ώρες οι μικροοργανισμοί του κόλπου μπορούν να προκαλέσουν φλεγμονή των εμβρυϊκών μεμβρανών, ομφάλιου λώρου και του πλακούντα (212,213). Η εμβρυϊκή λοίμωξη μπορεί να είναι αποτέλεσμα της εισρόφησης του μολυσμένου αμνιακού υγρού (214) και μπορεί να οδηγεί στη γέννηση νεκρού νεογνού, σε πρόωρο τοκετό ή σήψη νεογνού (208,213,215,216). Οι μικροοργανισμοί που συχνά απομονώνονται από το μολυσμένο αμνιακό υγρό είναι αναερόβια βακτήρια, GBS, *E.coli* και μυκόπλασμα (208,215). Λοίμωξη της μητέρας την ώρα της γέννησης, ιδιαίτερα γεννητική λοίμωξη, είναι ο κυριότερος τρόπος μετάδοσης από τη μητέρα στο έμβρυο (207,217). Διαπλακουντιακή αιματογενής λοίμωξη κατά τη διάρκεια ή λίγο πριν τον τοκετό (περιλαμβανομένης της περιόδου του αποχωρισμού του πλακούντα) είναι πιθανή αν και φαίνεται πιο πιθανό το νεογνό να μολύνεται κατά τη δίοδο από το γεννητικό κανάλι. Οι τοκετοί με μαιευτικές επιπλοκές αυξάνουν τον κίνδυνο των λοιμώξεων στα νεογνά. Μεταξύ αυτών είναι ο πρόωρος τοκετός, η παράταση ρήξης των μεμβρανών, η υψηλή εμβρυουλκία και ο πυρετός της μητέρας (218).

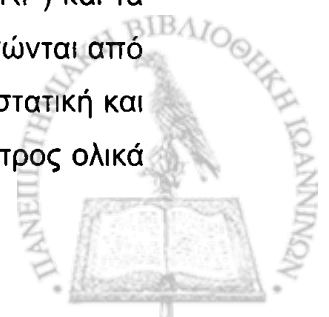
Επεμβατικές υποστηρικτικές τεχνικές στα άρρωστα νεογνά όπως καθετηριασμός ομφαλικής αρτηρίας, κεντρικοί φλεβικοί καθετήρες, περιφερειακοί αρτηριακοί και φλεβικοί σωλήνες, ουρικοί καθετήρες, υπερθερμιδικές εγχύσεις και υποστηρικτικός αερισμός παρέχουν τεράστια ευκαιρία στα παθογόνα μικρόβια να εισβάλουν στον ξενιστή και να προκαλέσουν λοίμωξη (218).

Πολλαπλασιασμός μικροοργανισμών στο ανώτερο αναπνευστικό σύστημα ή σε άλλες εστίες μπορεί να ακολουθηθεί από εισβολή του μικροοργανισμού στο αίμα. Από τη στιγμή που τα βακτήρια έχουν πρόσβαση στο αίμα, ενεργοποιούνται οι μηχανισμοί του ξενιστή για να περιορίσουν την μικροβιακή παρουσία με το σύστημα μονοκύτταρα-μακροφάγα μετά οψονινοποίηση με αντίσωμα και συμπλήρωμα. Έτσι, η βακτηριαιμία παράγει μόνο βραχεία νόσο. Βακτηριαιμία διαπιστώθηκε σε νεογνά στα οποία έγινε ενδοτραχειακή αναρρόφηση. Αυτή ήταν παρούσα αμέσως μετά τη διαδικασία αλλά το αποτέλεσμα της κ/ας ήταν αρνητικό στα 10 λεπτά (219). Η φλεγμονώδης απάντηση εξαρτάται από την ηλικία του αρρώστου, τη λοιμογόνο δράση του μικροβίου, τον αριθμό των παθογόνων στο αίμα, τη διατραχηλική και την αναοσολογική κατάσταση του ξενιστή, το χρόνο και το είδος θεραπευτικής παρέμβασης (220,221).



Λοιμώξεις που εκδηλώνονται νωρίς την πρώτη εβδομάδα ζωής συνήθως αποδίδονται στους μικροοργανισμούς που μεταδίδονται από τη μητέρα στο βρέφος και έχουν επιδημιολογική διαφορά από τις επίκτητες λοιμώξεις της νεογνικής περιόδου (222). Εκεί δεν διακρίνεται καθαρά ο χρόνος μετάδοσης μεταξύ λοίμωξης από τη μητέρα και λοίμωξης από το περιβάλλον (223). Σε επιδημιολογικές μελέτες των νεογνικών λοιμώξεων συνήθως διαχωρίζονται οι πρώιμης έναρξης από τις όψιμης έναρξης λοιμώξεις μεταξύ 3^{ης} και 7^{ης} ημέρας ζωής. Οι όψιμες λοιμώξεις θεωρούνται ότι μεταδίδονται από το περιβάλλον (222-221). Συνεπώς, οι μελέτες των νέων δοκιμασιών για τη διάγνωση της νεογνικής σήψης θα πρέπει να εκτιμηθούν λαμβάνοντας υπόψη τα αυθαίρετα χρονικά σημεία που χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό της πρώιμης λοίμωξης από την όψιμη. Μόνο όταν τα σημεία τα χρονικά για το διαχωρισμό των δύο μορφών της νόσου είναι ομοιόμορφα μπορούμε να αναμένουμε συνέπεια σε όλες τις μελέτες και είμαστε μακριά από αυτό (232-234). Νεογνική σήψη ή νεογνική σηψαιμία είναι όροι που έχουν χρησιμοποιηθεί για να περιγράψουν τη συστηματική απάντηση του νεογνού στη λοίμωξη. Το 1991, το American College of Chest Physicians and the Society of Critical Care Medicine έδωσε τον ορισμό του συνδρόμου της συστηματικής αντιφλεγμονώδους απάντησης (SIRS) που χρησιμοποιείται για να περιγράψει ένα κλινικό σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από δύο ή περισσότερα από τα παρακάτω: (α) πυρετός ή υποθερμία, (β) ταχυκαρδία, (γ) ταχύπνοια ή υποαερισμός και (δ) παθολογική λευκοκυττάρωση ή αύξηση των ανώριμων μορφών ΠΜΠ (235). Το SIRS είναι αποτέλεσμα ποικίλων παραγόντων, ανοσολογικών, ενδοκρινολογικών, τραυματικών – χειρουργικών, χημειοθεραπευτικών και λοιμογόνων. Πολύ πρόσφατα, μια ομάδα ειδικών αναθεώρησε τις κατευθυντήριες οδηγίες του 1991 για τη σήψη, αλλά πέρα από μια αύξηση της λίστας των συμπτωμάτων και σημείων της σήψης που είναι αντανάκλαση της κλινικής εμπειρίας, καμμία ουσιαστική αλλαγή δεν έγινε στον ορισμό. Η εφαρμογή των παραπάνω οδηγιών πρέπει να εφαρμόζονται με προσοχή στα νεογνά (π.χ. παράμετροι όπως αρτηριακή πίεση, καρδιακός ρυθμός, αναπνευστική συχνότητα, αριθμός λευκοκυττάρων πρέπει να εκτιμώνται σε σχέση με την ηλικία).

Με τη μετάβαση από την ενδομήτρια στην εξωμήτρια ζωή συμβαίνουν πολλές φυσιολογικές και μεταβολικές αλλαγές για την επιβίωσή του στο εξωτερικό περιβάλλον. Οι μεταβολές αυτές διαφέρουν μεταξύ της πρώιμης νεογνικής περιόδου και ως εκ τούτου η αξιοπιστία των εργαστηριακών μετρήσεων για τη διάγνωση της σήψης μπορεί να επηρεάσει την εκτίμηση της φυσιολογικής τιμής για ένα συγκεκριμένο τεστ. Η μόνη συμφωνία από όλες τις δημοσιεύσεις είναι ότι χρειάζονται τιμές αναφοράς. Αυτό είναι ιδιαίτερα αληθινό για τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα τεστ της C-reactive protein (C-αντιδρώσα πρωτεΐνη, CRP) και τα ολικά λευκά (complete blood cell count - CBC). Έχει τεκμηριωθεί ότι τα CBC εξαρτώνται από την ηλικία, εάν το δείγμα είναι αρτηριακό ή φλεβικό και αν κλαίει. Η τιμή δεν είναι στατική και υπάρχει μεγάλη διαφορά μεταξύ διαφόρων ατόμων. Επιπλέον, ο λόγος ανώριμα προς ολικά



ουδετερόφιλα έχει βρεθεί να διαφέρει σημαντικά μεταξύ διαφόρων παρατηρητών, ως εκ τούτου έχει αποκλειστεί από τις εξετάσεις επαγγελματικής ικανότητας από το Αμερικανικό Κολλέγιο Παθολόγων. Επίσης, η CRP μεταβάλλεται τις πρώτες 48 ώρες, ως εκ τούτου το «αληθινά αρνητικό» ή «αληθινά θετικό» περιορίζει τη διαγνωστική ικανότητα του τεστ για νεογνική σήψη (Πίνακας 3).

Πίνακας 3. Μεταβολές των μετρήσεων CRP, IL-6 και PCT στις 0, 24 και 48 ώρες για πρώιμη νεογνική σήψη (Chiesa et al, 2003) (171).

	Cutoff	Ευαισθησία (95% CI)		Ειδικότητα (95% CI)(%)
		Θετική κ/α (v=11)	Όλοι οι ασθενείς (v= 19)	
CRP, mg/L				
Στη γέννηση	≥4	73 (43-90)	74 (51-88)	83 (75-89)
Στις 24 ώρες	≥10	91 (62-98)	89 (69-97)	87 (80-92)
Στις 48 ώρες	≥10	91 (62-98)	89 (69-97)	84 (77-90)
IL-6, ng/ml				
Στη γέννηση	≥200	73 (43-90)	74 (51-88)	89 (82-93)
Στις 24 ώρες	>30	64 (35-85)	63 (41-81)	71 (63-79)
Στις 48 ώρες	>20	54 (28-79)	53 (32-73)	70 (62-78)
PCT, μg/L				
Στη γέννηση	≥1	82 (52-95)	79 (57-92)	95 (89-98)
Στις 24 ώρες	≥100	100 (74-100)	95 (75-99)	96 (91-99)
Στις 48 ώρες	≥50	91 (62-98)	84 (62-95)	100 (97-100)

Οπωσδήποτε, κάθε αρνητική κ/α αίματος δεν είναι απαλλαγμένη από λάθος, μπορεί να είναι ψευδώς αρνητική, όπως αποδεικνύεται από μεταθανάτιες κ/ες ή λόγω ανεπαρκούς ποσότητας δείγματος αίματος ή χαμηλής πυκνότητας βακτηρίων ή καταστολής της ανάπτυξης των βακτηρίων λόγω πρώιμης χορήγησης αντιβιοτικών (π.χ. κατά τη διάρκεια του τοκετού). Μια δεκαετία πριν, οι Roucygous et al (236) έδειξαν ότι το 83% των καλλιιεργειών που είχαν μικροοργανισμούς με χαμηλό βαθμό μολυσματικότητας ήταν αποτέλεσμα επιμόλυνσης κατά τη διάρκεια της συλλογής. Οπωσδήποτε, πρέπει να τονιστεί ότι δεν υπάρχει γενική ομοφωνία για τον ορισμό της νεογνικής κλινικής σημασίας. Τα τελευταία χρόνια μερικοί συγγραφείς έχουν προτείνει την παρουσία ενός κλινικού σημείου (συμβατού με λοίμωξη) με παράλληλη αύξηση της CRP σε επίπεδα >10 mg/L είναι επαρκής για τη διάγνωση της πρώιμης ή όψιμης νεογνικής κλινικής σημασίας. Άλλοι έχουν συσχετίσει νεογνά μόνο με μητρικούς παράγοντες κινδύνου για λοίμωξη ώστε να θεσπίσουν κριτήρια



επαρκή για κλινική πρακτική. Σε άλλες μελέτες, η παρουσία 2 ή 3 κατηγοριών (από το σύστημα οργάνων) κλινικών σημείων λοίμωξης σε νεογνό έχει δώσει ισχυρή υποστήριξη στη διάγνωση της σήψης.

Αν και η ταξινόμηση ανάλογα με το βάρος γέννησης (ΒΓ), ηλικία κύησης (ΗΚ) μπορεί να είναι επαρκής για κάποιους σκοπούς δεν εξηγούν την ποικιλότητα της βαρύτητας της νόσου. Αρχικά το Apgar score χρησιμοποιήθηκε για τον εντοπισμό νεογνών που χρήζουν άμεσης διασωλήνωσης. Εν τούτοις το χαμηλό Apgar score μπορεί να αντανακλά ΗΚ, ΒΓ, χορήγηση ηρεμιστικού στη μητέρα ή συγγενείς ανωμαλίες.

Η εργασία του Chiesa et al (171) ξεφεύγει από το σύνολο της βιβλιογραφίας που προσπαθεί να βρει την «μαγική μέθοδο» διάγνωσης και οδηγεί την έρευνα σε νέα κατεύθυνση. Προσπάθησε να τεκμηριώσει την επίδραση της βαρύτητας της νόσου σε διάφορους βιοχημικούς δείκτες CRP, IL-6 και προκαλσιτονίνη.

Με αυτό τον τρόπο ο κλινικός χρησιμοποιεί την αρχική κλινική εξέταση για την ταξινόμηση των ασθενών και μετά να εκτιμήσει την προστιθέμενη αξία του κάθε τεστ. Μόνο τότε μπορεί να αξιολογηθεί η χρησιμότητα του κάθε τεστ στην καθημερινή πράξη.



ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Οι έρευνες και τα δεδομένα των πλέον πρόσφατων μελετών δείχνουν ότι δεν υπάρχει συμφωνία στον ορισμό της νεογνικής κλινικής σηψαιμίας και αυτό δεν βοηθά τον κλινικό νεογνολόγο και παιδίατρο στον αποτελεσματικό χειρισμό νεογνών με λοίμωξη/σήψη. Τα λευκά δεν αναφέρονται σαν αξιόπιστοι δείκτες λοίμωξης. Οι πιο αξιόπιστοι δείκτες λοίμωξης σε πρόωρα και τελειόμηνα νεογνά έχουν αναφερθεί να είναι η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη και η IL-6. Επίσης, υπάρχουν ελάχιστες μελέτες για τους υποπληθυσμούς λεμφοκυττάρων στη νεογνική ηλικία και κυρίως σε τελειόμηνα νεογνά. Η μόνη συμφωνία από όλες τις δημοσιεύσεις είναι ότι χρειάζονται τιμές αναφοράς των παραμέτρων της λοίμωξης.

Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν :

1. Να προσδιοριστούν οι τιμές αναφοράς σε φυσιολογικά πρόωρα και τελειόμηνα νεογνά τον πρώτο μήνα ζωής και
2. Να μελετηθούν οι δείκτες λοίμωξης και η αξιοπιστία τους σε πρόωρα (ΠΝ) και τελειόμηνα νεογνά με πιθανή λοίμωξη
3. Να συγκριθούν οι δείκτες λοίμωξης σε νεογνά, πρόωρα και τελειόμηνα με σήψη.
4. Να βρεθεί η συσχέτιση (αν υπάρχει) ηλικίας κύησης και δεικτών λοίμωξης
5. Να προσδιοριστούν δείκτες (αν υπάρχουν) για δυσμενή έκβαση.



ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

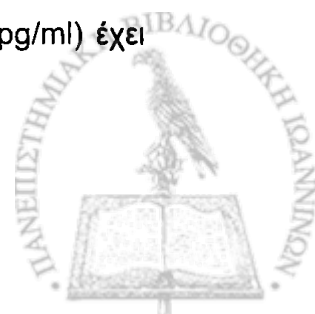
ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η μελέτη είναι προοπτική και περιλαμβάνει πρόωρα (<37 εβδομάδων κύησης) και τελειόμηνα νεογνά (>37 εβδομάδων). Η ηλικία κύησης (ΗΚ) εκτιμήθηκε βάσει της υπερηχογραφικής εκτίμησης κατά Ballard και Parkin score. Νεογνά με ηλικία κύησης <37 εβδομάδων θεωρούνται πρόωρα. Σε περίπτωση που υπήρχε διαφορά >2 εβδομάδων λήφθηκε υπόψη η ηλικία κύησης σύμφωνα με τα νεογνικά score. Για την είσοδο στη μελέτη αποκλείστηκαν νεογνά με συγγενείς ανωμαλίες και ενδείξεις περιγεννητικής ασφυξίας, συνδρόμου αναπνευστικής δυσχέρειας και ενδομήτριας λοίμωξης.

Για τον προσδιορισμό των τιμών αναφοράς πάρθηκαν δείγματα την 1^η, 3-4^η ημέρα ζωής και την 27^η ημέρα ζωής σε φυσιολογικά νεογνά. Στα ΠΝ και TMN που εισήχθησαν στη Μονάδα Εντατικής Νοσηλείας Νεογνών (MENN) του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων με τη διάγνωση της λοίμωξης πάρθηκαν δείγματα την ημέρα εισόδου (1^η αιμοληψία) στη MENN, 48-72 ώρες μετά την έναρξη της αντιβίωσης (2^η αιμοληψία) και 48 ώρες μετά τη διακοπή της αγωγής (3^η αιμοληψία). Η διάρκεια της αντιβιοτικής αγωγής για τις πιθανές λοιμώξεις σύμφωνα με τα κριτήρια του Rodwell (237) ήταν 7 ημέρες ενώ για τις επιβεβαιωμένες (σήψεις, θετική καλλιέργεια αίματος) 14 ημέρες.

Η λήψη αίματος για την καλλιέργεια αίματος λαμβάνονταν με φλεβοκέντηση μετά από κατάλληλο καθαρισμό του δέρματος και μεταφέρονταν σε αποστειρωμένα φιαλίδια στο μικροβιολογικό εργαστήριο. Τα απομονωθέντα μικρόβια ταυτοποιήθηκαν με τις κλασσικές μεθόδους και ελέγχθηκε η ευαισθησία τους έναντι των αντιβιοτικών. Πρώιμη θεωρήθηκε η λοίμωξη των 3 πρώτων ημερών ζωής (72 ώρες) και όψιμη μετά την τρίτη ημέρα.

Ο TNF-alpha θεωρείται ο κύριος παράγων εισαγωγής συστηματικής φλεγμονής και μαζί με την IL-6 ενεργοποιούν την παραγωγή CRP από το ήπαρ (174). Η IL-6 επίσης θεωρείται χρήσιμος δείκτης για πρώιμες (238) και όψιμες λοιμώξεις (239) ακόμη και για μηνιγγίτιδα (240). Επίσης, ο παράγων TNF (>70 pg/ml) μαζί με την IL-6 (>500 pg/ml) έχει θεωρηθεί ότι αυξάνει την ευαισθησία για τη διάγνωση νεογνικής σήψης (241).



Σε όλα τα νεογνά (τελειόμηνα 100 και πρόωρα 100) μετρήθηκαν λευκά, απόλυτος αριθμός πολυμορφοπύρηνων (ΑΑΠ), απόλυτος αριθμός λεμφοκυττάρων (ΑΑΛ), αιμοπετάλια (ΑΜΠ), C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP), CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, NK (natural killer), Β-κύτταρα, ιντερλευκίνη 1b (IL-1b), ιντερλευκίνη 6 (IL-6), παράγοντας νέκρωσης όγκων (tumor necrosis factor α , TNF α), και ανοσοσφαιρίνες Α, Μ, G (immunoglobulins Α, Μ, G - IgA, IgM, IgG).

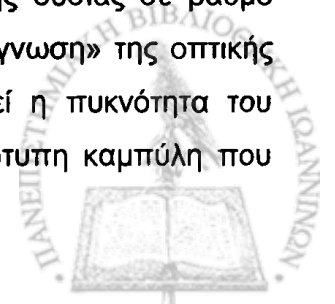
Ανοσοσφαιρίνες συμπληρώματος

Αμέσως μετά την αιμοληψία, γινόταν διαχωρισμός του ορού σε μικρές ποσότητες οι οποίες φυλάσσονταν σε θερμοκρασία -70° C. Οι μετρήσεις γίνονταν μετά την συγκέντρωση όλων των ορών σε δείγματα ορού, μετά από ταυτόχρονη απόψυξή τους. Σε όλα τα δείγματα μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις της IgA, IgM, IgG, C3, C4 με ανοσονεφελομετρία και με τη χρήση του νεφελόμετρου BNA (Behring Nephelometer Analyzer) της εταιρείας Behring. Για τη μέτρηση των συγκεντρώσεων όλων των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της κινητικής νεφελομετρίας (rate nephelometry). Οι αντιοροί, τα πρότυπα διαλύματα (standards) και τα διαλύματα ελέγχου, που χρησιμοποιήθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ανοσοσφαιρινών και των παραγόντων του συμπληρώματος ήταν της εταιρείας Behringwerke.

Μέτρηση των κυτταροκινών - Αρχή της μεθόδου.

Οι αιμοληψίες έγιναν με φλεβοκέντηση, κάτω από άσηπτες συνθήκες και στη συνέχεια το περιφερικό φλεβικό αίμα συλλέχθηκε σε μη ηπαρινισμένο αποστειρωμένο σωληνάριο. Μέσα σε διάστημα μιας ώρας γινόταν φυγοκέντρηση των διεγμάτων στις 1.600 στροφές/λεπτό για 30 λεπτά. Το υπερκείμενο διήθημα αποθηκευόταν στους -80° C μέσα σε αποστειρωμένα σωληνάρια Eppendorf, μέχρι την ώρα της μέτρησης. Η μέτρηση γινόταν με τη μέθοδο ELISA και χρησιμοποιήθηκαν αντιδραστήρια από την εταιρεία R&D Systems, USA.

Η μέθοδος ELISA είναι μια ποσοτική «σάντουιτς» ανοσοενζυμική τεχνική. Ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό για την κάθε κυτταροκίνη έχει επιστρωθεί από την κατασκευαστική εταιρεία στις κυψέλες του πλακιδίου. Τα δείγματα των ορών των νεογνών καθώς και τα αντίστοιχα δείγματα των προτύπων (για τον καθορισμό της πρότυπης καμπύλης) τοποθετούνται στις κυψέλες εις διπλούν. Εάν υπάρχουν μόρια κυτταροκίνης, αυτά ενώνονται με το ακινητοποιημένο αντίσωμα στο έδαφος των κυψελών. Στη συνέχεια, αφού γίνει πλύσιμο με σκοπό την απομάκρυνση των μη συνδεδεμένων ουσιών, προστίθεται ένα πολυκλωνικό αντίσωμα ειδικό για την εκάστοτε κυτταροκίνη, το οποίο είναι συνδεδεμένο με ένα ένζυμο. Ακολούθως προστίθεται ένα υπόστρωμα του ενζύμου. Η επερχόμενη αντίδραση ενζύμου-υποστρώματος έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή χρωστικής ουσίας σε βαθμό ανάλογο με την ποσότητα της εκάστοτε κυτταροκίνης. Ακολουθεί «ανάγνωση» της οπτικής πυκνότητας στα 450 nm μέσα σε 30 λεπτά, ώστε να προσδιοριστεί η πυκνότητα του χρώματος και ακολούθως να υπολογιστούν οι τιμές με βάση την πρότυπη καμπύλη που



εξάγεται από τις μετρήσεις των προτύπων δειγμάτων που διαθέτει η εταιρεία. **Ευαισθησία της μεθόδου:** Η ελάχιστη ανιχνεύσιμη ποσότητα για την κάθε κυτταροκίνη ήταν: IL-1b <1.1 pg/ml, IL-6 <1.6 pg/ml, TNF-a <1.5 pg/ml. **Διακύμανση:** Ο συντελεστής διακύμανσης για την ίδια μέτρηση και μεταξύ μετρήσεων (Intra- and interassay coefficient of variation, CV) ήταν <10% για τις κυτταροκίνες.

CRP (C-reactive protein)

Η μέτρηση της CRP έγινε με νεφελομετρία ροής, με νεφελόμετρο και αντιδραστήρια από την εταιρεία Dade-Behring (ΗΠΑ). Η νεφελομετρία ροής στηρίζεται στο φαινόμενο της σκέδασης του φωτός και μετρά το ποσό του φωτός που σκεδάζεται υπό ορισμένη γωνιά προς το προσπίπτον φώς, όταν αυτό συναντά τα αιωρούμενα σωματίδια αντιγόνου-αντισώματος.

Η **κυτταρομετρία ροής** είναι η τεχνολογία με την οποία γίνονται ποικίλες μετρήσεις και προσδιορισμοί σε κατάλληλα προετοιμασμένα κύτταρα ή οργανίδια κυττάρων (πυρήνες, χρωμοσώματα, κλπ). Η προετοιμασία των κυττάρων ή οργανιδίων αυτών έγκειται στη σήμανσή τους με φθορίζουσες χρωστικές, όπως θα περιγραφεί παρακάτω. Τα υπό έλεγχο σωματίδια ρέουν με τη μορφή εναωρήματος μπροστά από μια φωτεινή ακτίνα Laser, δια μέσου θαλάμου με ταχύτητα αρκετών χιλιάδων ανά δευτερόλεπτο. Η μέτρηση, αναγνώριση και η διαλογή γίνεται με βάση τον εκπεμπόμενο φθορισμό και τη σκέδαση του φωτός. Τα εκπεμπόμενα φωτεινά σήματα από το κάθε κύτταρο ή οργανίδιο αναλύονται, κατευθύνονται στους ανιχνευτές και στη συνέχεια μετατρέπονται σε ηλεκτρικά σήματα. Αυτά τα σήματα ενισχύονται, μετρούνται και τέλος διοχετεύονται υπό μορφή ψηφιακών ενδείξεων σε ηλεκτρονικό υπολογιστή, ο οποίος με ειδικό software τα επεξεργάζεται και τα παρουσιάζει. Στο κάθε κύτταρο ή οργανίδιο μετρούνται το μέγεθος, η κοκκίωση και τα άλλα χαρακτηριστικά της ενδοκυττάριας ή εξωκυττάριας επιφάνειας που έχουν σημειωθεί με τις φθορίζουσες χρωστικές. Με βάση αυτά τα δεδομένα, τα κύτταρα ή τα σωματίδια ταξινομούνται σε σύνολα και υποσύνολα και στη συνέχεια γίνεται η στατιστική επεξεργασία τους.

Στην **κυτταρομετρία ανάλυσης εικόνας** τα κύτταρα βρίσκονται ακινητοποιημένα σε κατάλληλα επεξεργασμένο επίχρισμα ενώ πάνω στα κύτταρα έχουν δεσμευτεί οι φθορίζουσες χρωστικές. Ο στόχος επιλέγεται είτε αυτόματα, είτε από τον παρατηρητή και κάθε κύτταρο εξετάζεται από το όργανο ξεχωριστά με ταχύτητα μετρικών εκατοντάδων κυττάρων ανά δευτερόλεπτο.



ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΗΤΗ ΡΟΗΣ

Ένας κυτταρομετρητής ροής αποτελείται από τρία συστήματα (Σχήμα 1).

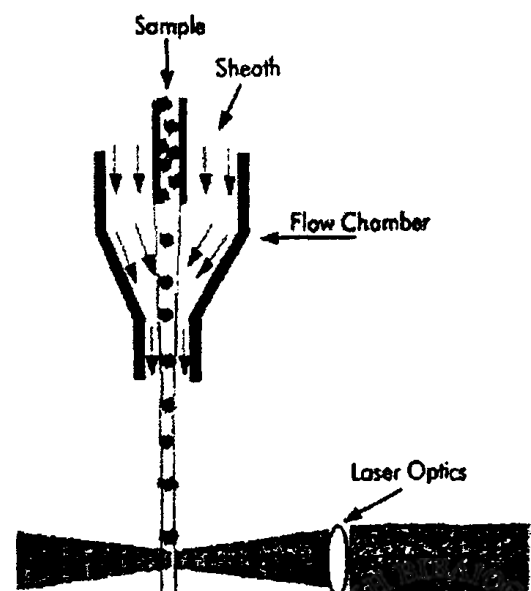
1. Σύστημα ροής
2. Οπτικό σύστημα
3. Σύστημα ανίχνευσης, επεξεργασίας και μετατροπής σε ηλεκτρονικό σήμα

1. Σύστημα ροής

Πρόκειται για ένα υδραυλικό σύστημα που εξαναγκάζει τα κύτταρα ή τα σωματίδια να ρέουν το ένα μετά το άλλο μπροστά από την ακτίνα Laser (από τα αρχικά *Light Amplification of Stimulated Emission of Radiation*), απορροφώντας τα από το εναιώρημα εργασίας. Αυτό επιτυγχάνεται με την εισαγωγή του δείγματος στο κέντρο ενός καναλιού, στο οποίο ρέει ένα αδρανές υγρό (Sheath fluid). Το κανάλι είναι κατάλληλα σχεδιασμένο προκειμένου το δείγμα να ρέει κατά μήκος του κεντρικού του άξονα, περιβαλλόμενο από το αδρανές υγρό χωρίς να αναμιγνύεται, δηλαδή σαν να βρίσκεται μέσα σε μια θήκη (sheath). Το κανάλι τοποθετείται μέσα στο θάλαμο ροής (flow chamber). Εκεί, ανάλογα με τις υδροδυναμικές ρυθμίσεις, επιτυγχάνεται και η υδροδυναμική εστίαση, έτσι ώστε το κύτταρο ή το σωματίδιο να έρχεται σε επαφή με την ακτίνα Laser σε προσέγγιση $+1\mu\text{m}$.

Οι θάλαμοι ροής διακρίνονται σε θαλάμους νηματικής ροής (laminar flow) και σε θαλάμους στροβιλώδους ορίου (turbulent boundary), ανάλογα με την υδροδυναμική τους αρχή (Σχήμα 1). Επίσης, οι θάλαμοι ροής διακρίνονται και σε θαλάμους ανάλυσης (analytical chambers), για κυτταρομετρητές μέτρησης της σκέδασης και του φθορισμού, και σε θαλάμους διαλογής (shorting chambers), γι' αυτούς που διαθέτουν και σύστημα διαλογής κυττάρων ή σωματιδίων.

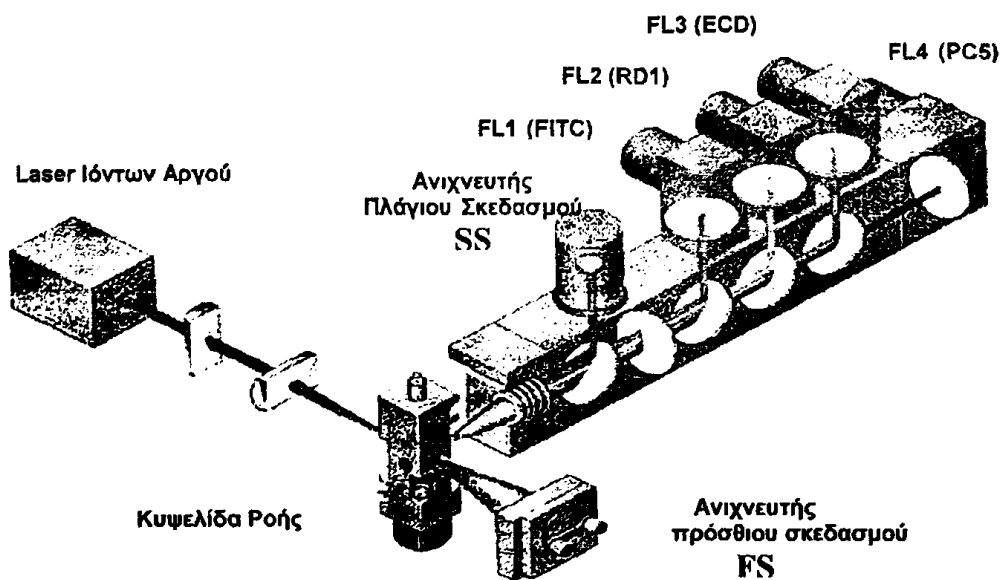
Σχήμα 1. Διάταξη κυψελίδας σε Κυτταρομετρητή ροής. Διακρίνεται η κεντρική ροή του δείγματος, η περιβάλλουσα ροή (sheath), προερχόμενη από laser φωτεινή δέσμη ακτινοβολίας και η σκέδαση της ακτινοβολίας μετά από πρόσπτωση σε ένα κύτταρο.



2. ΟΠΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Το σύστημα αυτό συλλέγει τα φωτεινά σήματα που εκπέμπονται από τα κύτταρα ή τα σωματίδια όταν προσπίπτει πάνω τους η φωτεινή δέσμη φωτός της λυχνίας. Στη συνέχεια αναλύεται η συλλεγόμενη ακτινοβολία, η οποία αντιστοιχεί στη *σκέδαση* του φωτός και στον εκπεμπόμενο *φθορισμό* καθορισμένης έντασης με βάση το φθοριόχρωμα.

Η *σκέδαση* του φωτός δημιουργείται όταν το κύτταρο ή το σωματίδιο δέχεται την κάθετη προς τη διεύθυνση ροής δέσμη της λυχνίας. Η προσπίπτουσα ακτινοβολία απορροφάται κατά ένα μέρος από το κύτταρο και κατά το υπόλοιπο σκεδάζεται προς όλες τις κατευθύνσεις. Η ακτινοβολία που σκεδάζεται στην κατεύθυνση της προέκτασης (ευθεία γραμμή) της ακτίνας Laser, με γωνία $1^\circ - 20^\circ$, ονομάζεται πρόσθια σκεδαζόμενη ακτινοβολία (Forward light scatter, FSC) και είναι ανάλογη προς το μέγεθος του κυττάρου ή του σωματιδίου. Η ακτινοβολία που σκεδάζεται σε κατεύθυνση κάθετη προς τον άξονα της ακτίνας Laser, με γωνία 90° , ονομάζεται κάθετη ή πλάγια σκεδαζόμενη ακτινοβολία (right angle scatter, ή Side Scatter, SSC) και είναι ανάλογη προς την κοκκίωση (granularity) του κυτταροπλάσματος του κυττάρου ή του σωματιδίου (Σχήμα 2).



Σχήμα 2. Σχηματική απεικόνιση της οπτικής διάταξης ενός κυτταρομετρητή ροής. Διθέτει μια φωτεινή Laser ιόντων Αργού (488 nm) και τέσσερις φωτοπολλαπλασιαστές για την ταυτόχρονη ανίχνευση φθοριοχρωμάτων (FITC, PE, ECD/PI, και PC5/PercP/PC5.5).

3. ΣΥΣΤΗΜΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ, ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗΣ ΣΕ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟ ΣΗΜΑ.

Στους κυτταρομετρητές χρησιμοποιούνται δύο συστήματα ανίχνευσης των φωτεινών δεδομένων που προέρχονται από την σκέδαση και το φθορισμό α) οι φωτοдиодοι (PIN diodes) και β) οι φωτοπολλαπλασιαστές (photomultiplier tubes, PMTs). Οι PIN έχουν



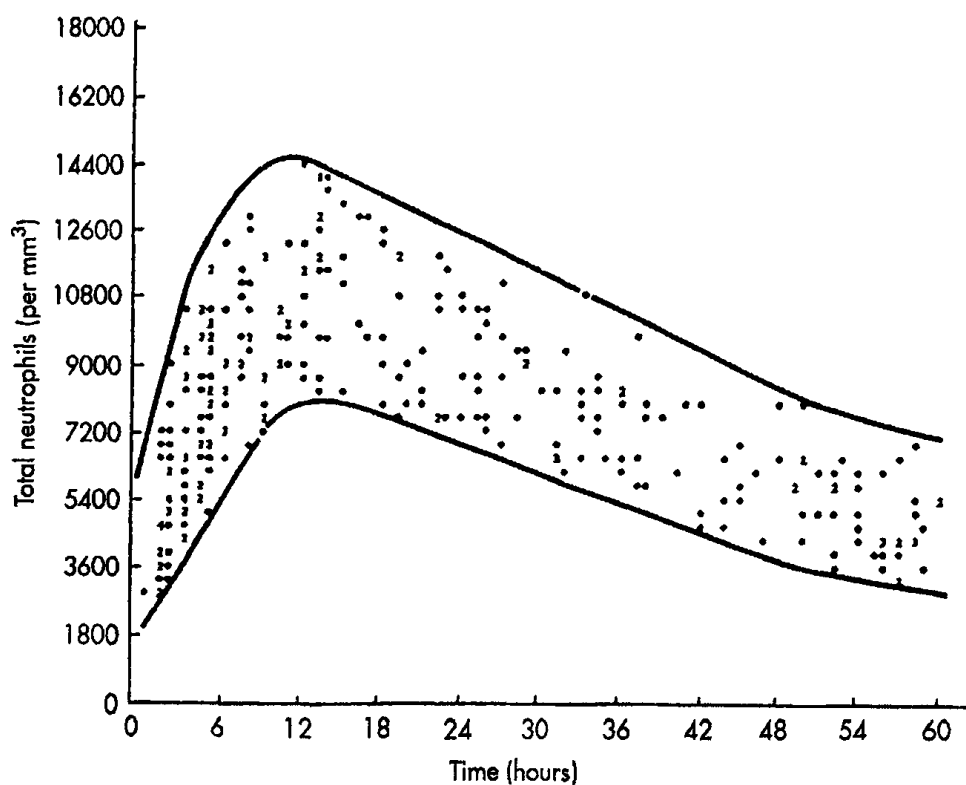
ευαισθησία στις μετρήσεις FSC και SSC, ενώ παρουσιάζουν μειωμένη ευαισθησία στον φθορισμό. Οι PTMs, αν και μικρότερου φάσματος, διαθέτουν, συγκρινόμενες με τις PIN, μεγαλύτερη ευαισθησία, όχι μόνο στις μετρήσεις FSC και SSC, αλλά και στον φθορισμό. Το παλμικό σήμα που παράγεται μένει στην έξοδο για 15-20 μsec . Κατά τη διάρκεια αυτού του χρονικού διαστήματος, το οποίο λέγεται νεκρός χρόνος, δεν καταγράφονται άλλα σήματα στο σύστημα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ο παρατεταμένος χρόνος να επηρεάζει κυρίως τη διαλογή και σε μικρότερο βαθμό την αναλυτική ικανότητα του Κυτταρομετρητή. Το παλμικό σήμα αναλύεται ως προς το ύψος, το πλάτος και την επιφάνεια, δίνοντας έτσι πληροφορίες για το μέγεθος, την κοκκίωση και τον φθορισμό των κυττάρων ή σωματιδίων. Η επεξεργασία μπορεί να γίνει είτε γραμμικά, είτε λογαριθμικά με χρήση ενισχυτή (amplifier). Με αυτόν τον τρόπο έχουμε ενίσχυση των ασθενών σημάτων και ταυτόχρονα περιορισμό των ενδείξεων που αντιστοιχούν στα ισχυρά σήματα. Έτσι όλες οι τιμές λαμβάνονται στην ίδια κλίμακα. Τα δυαδικά αυτά σήματα μεταβιβάζονται στη μνήμη ηλεκτρονικού υπολογιστή, ώστε να ακολουθήσουν οι ανάλογες επεξεργασίες δεδομένων.

Ορισμοί

Μικροβιολογικά κριτήρια χρησιμοποιήθηκαν για τον ορισμό βακτηριαιμίας (242,243) και νεογνά με θετική καλλιέργεια αίματος θεωρήθηκαν ως έχοντα σήψη. Κριτήρια για να συμπεριλάβουμε τη σταφυλοκοκκική κοαγκουλάση αρνητικών σηψαιμιών θεωρήθηκε η ανάπτυξη θετικών καλλιέργειών εντός 48ωρου και/ή ≥ 2 θετικές καλλιέργειες (244).

Πρώιμες λοιμώξεις είναι αυτές που εμφανίζονται τις πρώτες 3 ημέρες ζωής και όψιμες λοιμώξεις από την 3^η ημέρα μέχρι και την 6^η εβδομάδα. Οι πιθανές λοιμώξεις διαγνώστηκαν βάσει των κριτηρίων Rodwell (237), που περιλαμβάνουν ανώμαλο αριθμό λευκοκυττάρων, ανώμαλο αριθμό ουδετεροφίλων, άωρα πολυμορφοπύρρηνα (και δείκτες αυτών σε σχέση με τα ολικά και ώριμα ΠΜΠ) όπως και εκφυλιστικές αλλαγές και αιμοπετάλια $<150.000/\text{mm}^3$. Παθολογικά λευκά θεωρήθηκαν τα $\leq 5.000/\text{mm}^3$ ή $\geq 20.000-30.000$, $31.000/\text{mm}^3$ και $14.500/\text{mm}^3$ στη γέννηση, 12 ώρες, και 72 ώρες αντίστοιχα για τελειόμηνα. Για τα πρόωρα οι αντίστοιχες ανώτερες τιμές είναι $19.000/\text{mm}^3$, $21.000/\text{mm}^3$ και $14.000/\text{mm}^3$. Η μεταβολή του εύρους των ουδετερόφιλων φαίνεται τις πρώτες 60 ώρες ζωής βασίστηκε στην καμπύλη Manroe (Σχήμα 3). Στις 72 και 144 ώρες χρονολογικής ηλικίας οι φυσιολογικές τιμές ουδετεροφίλων κυμαίνονται από $2000-3000/\text{mm}^3$ οι κατώτερες τιμές έως $6000-7000/\text{mm}^3$ οι ανώτερες τιμές (245). Σαν εκφυλιστικά φαινόμενα αναφέρονται τα κενοτόπια, τοξική κοκκίωση και Döhle σωματίδια. Δεν περιελήφθηκαν νεογνά με κλινικά σημεία χωρίς θετική καλλιέργεια αίματος γιατί τα κλινικά κριτήρια είναι υποκειμενικά και δεν υπάρχει διεθνώς ένα score σύστημα που να εκτιμά τη βαρύτητα της κλινικής νόσου.





Σχήμα 3. Καμπύλη του Manroe για τα πολυμορφοπύρηνα (J Pediatr 1979).

Μικροβιολογία

Τα δείγματα καλλιεργειών μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένες φιάλες (Bacter, Becton, Dickinson) σε μικροβιολογικό εργαστήριο του Νοσοκομείου και καλλιεργήθηκαν για αερόβια και αναερόβια μικρόβια. Απομονωθέντα βακτήρια ταυτοποιήθηκαν με κλασσικές μεθόδους και η ευαισθησία στα αντιβιοτικά βασίστηκε στη μέθοδο Bauer-Kirby.

Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση και επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγιναν σε υπολογιστή με τη χρήση του προγράμματος StatView SE+Graphics της SAS Institute Inc.

Η σύγκριση των μέσων τιμών των παραμέτρων που μελετήθηκαν έγιναν με τη μέθοδο της «ανάλυσης της μεταβλητότητας κατά μία διεύθυνση» (one way ANOVA test). Χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία Fisher PLSD για τη σύγκριση των μέσων όρων των μετρήσεων των παραμέτρων μεταξύ των ομάδων (φυσιολογικά τελειόμηνα και πρόωρα, τελειόμηνα και πρόωρα με λοίμωξη). Η δοκιμασία un-paired t-test εφαρμόστηκε για τη σύγκριση των τιμών των παραμέτρων στην ίδια ομάδα για τη διερεύνηση πιθανής στατιστικής διαφοράς μεταξύ λοίμωξης και σήψης, με όριο στατιστικής σημαντικότητας το 5%. Οι συντελεστές συσχέτισης μεταξύ των παραμέτρων που μελετήθηκαν, υπολογίστηκαν με τη μέθοδο της γραμμικής συµμεταβολής (linear regression). Εκτιμήθηκε ο συντελεστής συσχέτισης μεταξύ ηλικίας κύησης και όλων των παραμέτρων.



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στον Πίνακα 4 φαίνονται η μέση ηλικία κύησης \pm σταθερή απόκλιση (ΜΗΚ \pm SD) και το μέσο (\pm SD) βάρος γέννησης (ΒΓ) σε 4 ομάδες νεογνών: I (φυσιολογικά τελειόμηνα), II (φυσιολογικά πρόωρα), III (τελειόμηνα με λοίμωξη), IV (πρόωρα με λοίμωξη).

Πίνακας 4. Μέση ηλικία κύησης \pm σταθερά απόκλιση (ΜΗΚ \pm SD) και μέσο βάρος γέννησης \pm σταθερά απόκλιση (ΜΒΓ \pm SD) σε 4 ομάδες νεογνών: I (φυσιολογικά τελειόμηνα), II (φυσιολογικά πρόωρα), III (τελειόμηνα με λοίμωξη), IV (πρόωρα με λοίμωξη).

Ομάδες	n	ΜΗΚ (εβδομάδες)	ΜΒΓ (g)
I	50	39.0 \pm 1.0	3304.0 \pm 381
II	50	33.2 \pm 2.6	1903.0 \pm 687
III	50	39.2 \pm 1.3	3312.7 \pm 480
IV	50	28.7 \pm 2.7	1139.7 \pm 481

Ο αριθμός των νεογνών που περιλήφθηκαν στη μελέτη ήταν 200 νεογνά. Στον Πίνακα 5 φαίνονται τα απομονωθέντα μικρόβια στην κ/α αίματος του μελετηθέντος πληθυσμού.

Πίνακας 5. Μικρόβια που απομονώθηκαν από τις πρώιμες και όψιμες λοιμώξεις.

Μικρόβια	Πρώιμες λοιμώξεις	Όψιμες λοιμώξεις		Θάνατοι
		Τελειόμηνα	Πρόωρα	
E.coli	2	1	–	–
Staph. Aureus	2	–	–	–
GBS (Strep.Group B)	1	1	–	–
Corynobacter	1	–	–	–
Listeria	1	–	–	–
Strep. Viridans	1	–	–	–
Klebsiella	–	1	–	–
CNS (Staph.Coag. Neg.)	3	5	–	–
			Πρόωρα	
Group B Strep	1	–	–	–
Listeria	1	–	–	–
Staph. Aureus	1	–	–	–
Candida	2	4	–	4
Serratia	1	–	–	1
CNS	–	7	–	–
E.coli	–	2	–	1



Η μέση χρονολογική ηλικία (\pm SD) έναρξης για τις πρώιμες λοιμώξεις ήταν για τα τελειόμηνα 1.3 ± 0.7 και για τα πρόωρα 1.4 ± 0.8 ημέρες. Νεογνά με εντοπισμένες λοιμώξεις όπως πνευμονία, μηνιγγίτιδα, ουρολοίμωξη δεν περιελήφθηκαν στη μελέτη. Από τα τελειόμηνα με τη διάγνωση λοίμωξης, τα 12/50 (22%) ήταν όψιμης έναρξης (>3 ημερών), μέση χρονολογική ηλικία έναρξης (\pm SD) 5.7 ± 2.4 ημέρες και εξ' αυτών τα 3 είχαν ουρολοίμωξη και αποκλείστηκαν. Από τα πρόωρα, τα 21 (36%) είχαν όψιμη λοίμωξη και μέση χρονολογική ηλικία (\pm SD) έναρξης ήταν 11.9 ± 7.8 ημέρες.

Ο πίνακας 6 δείχνει τους θανάτους και τα αίτια στα νεογνά της μελέτης.

Πίνακας 6. Θάνατοι και αίτια σε πρόωρα νεογνά που πέθαναν κατά τη διάρκεια της μελέτης.

ΗΚ	Ημερ. θανάτου	Πρώιμη	Όψιμη	κ/α αίματος
26 ⁺³	19 ημερών	1 ημέρα		—
26 ⁺³	32 ημερών		4 ημέρα	E. Coli
27	45 ημερών		5 ημέρα	—
27	28 ημερών	3 ημέρα		
28	10 ημερών		4 ημέρα	—
28	17 ημερών		4 ημέρα	
28	20 ημέρα		10 ημέρα	Candida
29	15 ημερών	1 ημέρα		—
30	7 ημερών	1 ημέρα		—
32	20 ημερών	3 ημέρα		Serratia
24	22 ημερών	1 ημέρα		—
24	19 ημερών	2 ημέρες		Candida
24 ⁺³	25 ημερών	1 ημέρα		Candida
24 ⁺⁵	14 ημερών	1 ημέρα		—
24 ⁺⁵	19 ημερών	1 ημέρα		—
26	30 ημερών		18 ημέρες	Candida

Τα 13 (81,2%) από τα 16 νεογνά που κατέληξαν είχαν ΗΚ <28 εβδομάδες. Η μέση (\pm ΣΑ) χρονολογική ηλικία για τις πρώιμες λοιμώξεις (πιθανές και σήψη) ήταν 1.5 ± 0.5 ημέρες και τα τις όψιμες (πιθανές λοιμώξεις και σήψη) 7.5 ± 5.6 ημέρες.

Οι μέσες τιμές λευκών αιμοσφαιρίων, απόλυτου αριθμού ουδετερόφιλων (ΑΑΠ), απόλυτου αριθμού λεμφοκυττάρων (ΑΑΛ) και αιμοπεταλίων (ΑΜΠ) στις 4 ομάδες νεογνών φαίνονται στον Πίνακα 7.



Πίνακας 7Α. Σύγκριση τιμών των λευκών, απόλυτου αριθμού πολυμορφοκυττάρων (ΑΑΠ) απόλυτου αριθμού λεμφοκυττάρων (ΑΑΛ) (μέσος όρος \pm SD) μεταξύ των 2 ομάδων νεογνών (κάθε ομάδα συμπεριλαμβάνει 50 νεογνά): I (φυσιολογικά τελειόμηνα) και II (φυσιολογικά πρόωρα).

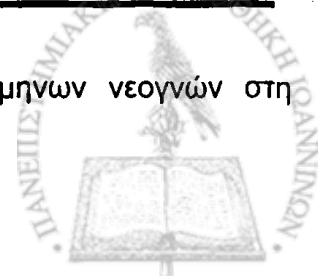
Ημέρες ζωής	1 ^η	4 ^η	27 ^η
Ομάδες			
1	Λευκά αιμοσφαίρια/mm ³		
I	19387 \pm 3986	10635 \pm 2973	9799 \pm 2507
II	11634 \pm 5240*	9588 \pm 4480	9873 \pm 2830
2	ΑΑΠ/mm ³		
I	12654 \pm 2509	4592 \pm 2306	2782 \pm 1453
II	7565 \pm 9439***	3806 \pm 2209	2692 \pm 1369
3	ΑΑΛ/mm ³		
I	4741 \pm 1592	4236 \pm 1280	5749 \pm 2150
II	4397 \pm 1797	3933 \pm 1904	5902 \pm 2113
4	ΑΜΠ/mm ³		
I	264.220 \pm 61.913	293.980 \pm 65.623	319.480 \pm 82.348
II	246.640 \pm 74.736	288.000 \pm 72.505	336.120 \pm 99.034

Πίνακας 7Β. Σύγκριση τιμών των λευκών, απόλυτου αριθμού πολυμορφοκυττάρων (ΑΑΠ) απόλυτου αριθμού λεμφοκυττάρων (ΑΑΛ) (μέσος όρος \pm SD) μεταξύ των 2 ομάδων νεογνών με λοίμωξη (κάθε ομάδα συμπεριλαμβάνει 50 νεογνά): III (τελειόμηνα με λοίμωξη) και IV (πρόωρα με λοίμωξη). Οι μετρήσεις του απόλυτου αριθμού των κυττάρων είναι /mm³.

αιμοληψία	1 ^η	2 ^η	3 ^η
Ομάδες			
1	Λευκά αιμοσφαίρια/mm ³		
III	16950 \pm 7196	11996 \pm 3901	10133 \pm 3028
IV	13680 \pm 8170*	9604 \pm 3746**	9958 \pm 2818
2	ΑΑΠ/mm ³		
III	10639 \pm 5975	5503 \pm 3082	3365 \pm 1806
IV	8036 \pm 7129	4726 \pm 3163	3190 \pm 2058
3	ΑΑΛ/mm ³		
III	6399 \pm 2813	4604 \pm 1591	5075 \pm 1866
IV	4005 \pm 2355*	3907 \pm 1653	5094 \pm 2299
4	ΑΜΠ/mm ³		
III	285.740 \pm 85.497	327.180 \pm 133.514	347.820 \pm 116.682
IV	206.560 \pm 78.726*	269.163 \pm 82.842**	332.428 \pm 113.639

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, + $p < 0.0001$

Το ρ αφορά συγκρίσεις παραμέτρων πρόωρων και τελειόμηνων νεογνών στη διάρκεια της μελέτης.



Τα ολικά λευκά και ο απόλυτος αριθμός ΠΜΠ ήταν σημαντικά χαμηλότερα την 1^η ημέρα μεταξύ φυσιολογικών ΤΜ και φυσιολογικών πρόωρων. Ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων ήταν σημαντικά χαμηλότερα μεταξύ ΤΜ νεογνών με λοίμωξη και πρόωρων με λοίμωξη στην 1^η και 2^η αιμοληψία.

Ο αριθμός των αιμοπεταλίων (ΑΜΠ) ήταν σημαντικά μειωμένος ($p < 0.0001$) την 1^η και 2^η αιμοληψία στα πρόωρα με λοίμωξη σε σύγκριση με τα τελειόμηνα με λοίμωξη. Η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη ήταν απύσση στις φυσιολογικές ομάδες νεογνών και η μέση της τιμή (\pm SD) στα ΤΜ και στα πρόωρα με λοίμωξη την 1^η ημέρα ήταν 30(\pm 40 mg/L), και 20(\pm 28 mg/L) αντίστοιχα.

Στους Πίνακες 8 και 9 συγκρίνονται οι μετρηθείσες τιμές στις 4 ομάδες νεογνών και φυσιολογικών και με λοίμωξη. Στους Πίνακες 10 και 11 φαίνονται οι μεταβολές ανοσοσφαιρινών και συμπληρώματος τον 1^ο μήνα ζωής ανάλογα με την ηλικία κύησης σε νεογνά χωρίς λοίμωξη.



Πίνακας 8Α. Μέσες τιμές ± SD (απόλυτος αριθμός κυττάρων/mm³) CD3+, CD4+, CD8+, NK, B-cell, C3 (g/L) και C4 (g/L) στις 2 ομάδες νεογνών (κάθε ομάδα έχει 50 νεογνά): I (φυσιολογικά τελειώμενα) και II (φυσιολογικά πρόωρα).

Ημέρες ζωής Ομάδες	1 ^η		27 ^η		1 ^η		27 ^η		1 ^η		27 ^η	
	4 ^η	27 ^η	1 ^η	4 ^η	27 ^η	1 ^η	4 ^η	27 ^η	1 ^η	4 ^η	27 ^η	
	CD3+/mm ³				CD4+/mm ³				CD8+/mm ³			
I	1678±1281	1824±1179	3481±1266	1144±873	1253±945	2463±1516	526±525	571±412	1282±869			
II	1279±1026	1548±1402	3427±1507	771±708	1057±1018	2445±1379	486±508	470±394	1176±1087			
	NK/mm ³				B-cell/mm ³				C3 (g/L)			
I	169±169	178±161	255±148	208±202	165±147	258±199	46.8±17.0**	47.5±17.6**	66.5±15.1 [†]	15.3±6.3**	17.5±6.4**	23.8±12.0
II	156±171	198±304	393±3557	169±189	215±284	357±286	35.7±17.0	38.5±18.5	50.5±16.7	11.5±6.6	13.2±8.7	20.9±20.1

Πίνακας 8Β. Μέσες τιμές ± SD (απόλυτος αριθμός κυττάρων/mm³) CD3+, CD4+, CD8+, NK, B-cell, C3 (mg/dl) και C4 (mg/dl) στις 2 ομάδες νεογνών (κάθε ομάδα έχει 50 νεογνά): III (τελειώμενα με λοίμωξη) και IV (πρόωρα με λοίμωξη).

Αιμοληψία Ομάδες	1 ^η		2 ^η		3 ^η		1 ^η		2 ^η		3 ^η	
	2 ^η	3 ^η	1 ^η	2 ^η	3 ^η	1 ^η	2 ^η	3 ^η	1 ^η	2 ^η	3 ^η	
	CD3+/mm ³				CD4+/mm ³				CD8+/mm ³			
III	3528±2034	3178±1564	3544±1314	2196±1292	2043±1200	2363±968	1122±276	1030±774	1120±481			
IV	1402±1672 [*]	1941±1360 [†]	3032±1639	857±990 [*]	1423±1243**	2086±1359	520±667 ⁺	643±456**	875±481			
	NK/mm ³				B-cell/mm ³				C3 (mg/dl)			
III	332±257	276±170	317±256	431±487	372±249	336±268	48.2±14.8	44.2±13.7	50.1±18.1	18.6±7.4**	18.0±6.7	21.3±11.9
IV	197±203***	207±195	235±129	177±211 [*]	233±264 [*]	297±189	44.3±17.5	41.5±15.5	54.1±16.5	14.3±7.1	16.1±9.9	22.4±10.7

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, + p<0.0001

Οι συγκρίσεις αφορούν πρόωρα και τελειώμενα νεογνά στη διάρκεια της μελέτης. Το C3 είναι ψηλότερο όλο το μήνα ζωής στα φυσιολογικά τελειώμενα, ενώ το C4 τις πρώτες μέρες ζωής.

Πίνακας 9Α. Μεταβολές στις IL-1b (pg/ml) και IL-6 (pg/ml), TNF (pg/ml), IgA (mg/dl), IgM (mg/dl) και IgG (mg/dl) στις 2 ομάδες φυσιολογικών νεογνών (κάθε ομάδα έχει 50 νεογνά): I (φυσιολογικά τελειώμενα) και II (φυσιολογικά πρόωρα).

Ομάδες	Ημέρες ζωής			TNF (pg/ml)			IgA (mg/dl)			IgM (mg/dl)			IgG (mg/dl)									
	1 ^η	4 ^η	27 ^η	1 ^η	4 ^η	27 ^η	1 ^η	4 ^η	27 ^η	1 ^η	4 ^η	27 ^η	1 ^η	4 ^η	27 ^η							
I	IL-1b (pg/ml)			IL-6 (pg/ml)			TNF (pg/ml)			IgA (mg/dl)			IgM (mg/dl)			IgG (mg/dl)						
	1.00±0.00	1.020±0.09		3.79±4.88	2.92±3.50	4.18±4.98	2.46±0.30	2.04±0.00	2.40±0.00	2.40±0.00	2.40±0.00	2.40±0.10	3.85±1.70	3.84±1.51	9.81±6.55**	13.72±8.43	14.09±8.85	34.48±15.98**	928±277***	889±279**	603±187	
II	1.02±0.08	1.000±0.00		2.06±1.57	1.54±0.90	1.30±0.00	2.40±0.00	2.40±0.00	2.40±0.00	2.40±0.00	2.40±0.10											
I	3.85±1.70	3.84±1.51	9.81±6.55**	13.72±8.43	14.09±8.85	34.48±15.98**	928±277***	889±279**	603±187													
II	3.58±0.00	3.58±0.00	6.76±4.89	10.20±5.98	12.54±8.39	24.81±25.98	724±292	709±285	574±222													

Πίνακας 9Β. Μεταβολές στις IL-1b (pg/ml) και IL-16 (pg/ml), TNF (pg/ml), IgA (mg/dl), IgM (mg/dl) και IgG (mg/dl) σε τελειώμενα και πρόωρα με λοίμωξη (κάθε ομάδα έχει 50 νεογνά): III (τελειώμενα με λοίμωξη) και IV (πρόωρα με λοίμωξη).

Ομάδες	Αιμοληψία			IL-1b (pg/ml)			IL-6 (pg/ml)			TNF (pg/ml)			IgA (g/L)			IgM (g/L)			IgG (g/L)			
	1 ^η	2 ^η	3 ^η	1 ^η	2 ^η	3 ^η	1 ^η	2 ^η	3 ^η	1 ^η	2 ^η	3 ^η	1 ^η	2 ^η	3 ^η	1 ^η	2 ^η	3 ^η	1 ^η	2 ^η	3 ^η	
III	IL-1b (pg/ml)			IL-6 (pg/ml)			TNF (pg/ml)			IgA (g/L)			IgM (g/L)			IgG (g/L)						
	1.52±1.07	1.494±1.02*		84.02±75.60	46.32±36.95*	23.42±15.25*	52.04±41.16	43.98±39.41	16.47±19.36+	4.35±1.97**	4.43±375	5.55±5.11	12.34±7.52	19.14±10.17	22.04±12.11	647±296	504±245	439±183				
IV	1.60±1.62	1.000±0.00		91.02±106.00	88.55±96.73	80.01±96.11	57.00±40.28	51.51±36.17	31.66±18.53	3.59±0.08	4.57±3.98	5.91±4.30	10.01±4.37	16.62±19.74	19.50±8.74	676±312	567±315	507±244				
III	4.35±1.97**	4.43±375	5.55±5.11	12.34±7.52	19.14±10.17	22.04±12.11	647±296	504±245	439±183													
IV	3.59±0.08	4.57±3.98	5.91±4.30	10.01±4.37	16.62±19.74	19.50±8.74	676±312	567±315	507±244													

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, + p<0.0001

Οι συγκρίσεις αφορούν πρόωρα και τελειώμενα νεογνά στη διάρκεια της μελέτης.

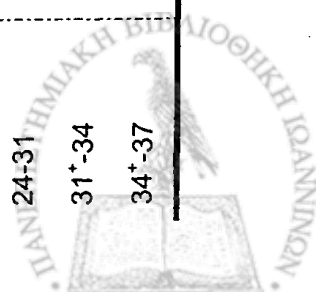


Πίνακας 10. Μέσες τιμές (±SD) (απόλυτος αριθμός/mm³) και μέσες τιμές (±SD) (mg/dl) IgA, IgM και IgG ανάλογα με την ΗΚ σε φυσιολογικά πρόωρα (24-31 v=10, 31⁺-34 v=20, 34⁺-37 v=20).

Ημέρες ζωής ΗΚ	Λευκά/mm ³			ΑΑΠ/mm ³			ΑΑΛ/mm ³		
	1 ^η	4 ^η	27 ^η	1 ^η	4 ^η	27 ^η	1 ^η	4 ^η	27 ^η
24-31	9139±5196	9864±6737	9325±1573	4673±3824	3201±2076	2646±1199	3479±1707	3752±1891	5016±1472
31 ⁺ -34	12000±5034	10118±4829	10256±3250	6204±2997	4249±2782	3042±1397	4606±2009	3865±2064	6199±1992
34 ⁺ -37	12511±5333	8971±2936	9763±2932	10390±1415	3667±1544	2366±1398	4648±1534	4091±1879	6048±2446

Ημέρες ΗΚ	CD3+/mm ³			CD4+/mm ³			CD8+/mm ³		
	1 ^η	4 ^η	27 ^η	1 ^η	4 ^η	27 ^η	1 ^η	4 ^η	27 ^η
24-31	748±787	1377±1238	2977±1114	430±479	979±929	2201±573	390±608	396±328	961±404
31 ⁺ -34	1415±1156	1553±1630	3702±1470	967±904	1185±1318	2754±1695	408±307	417±347	1445±1553
34 ⁺ -37	1410±949	1627±1288	3378±1709	745±516	968±704	2257±1308	611±608	560±454	1015±638

Ημέρες ΗΚ	IgA (mg/dl)			IgM (mg/dl)			IgG (mg/dl)		
	1 ^η	4 ^η	27 ^η	1 ^η	4 ^η	27 ^η	1 ^η	4 ^η	27 ^η
24-31	3.58±0.0	3.58±0.0	8.13±5.2	10.74±9.00	17.21±11.60	27.5±10.8	666±421	644±336	523±256
31 ⁺ -34	3.58±0.0	3.58±0.0	7.21±6.0	9.80±3.90	10.48±5.26	30.3±38.8	664±219	630±247	531±163
34 ⁺ -37	3.58±0.0	3.58±0.0	5.63±3.0	10.34±6.19	12.26±8.58	17.9±9.6	822±274	820±271	641±249



Πίνακας 11. Μέσες τιμές (\pm SD) συμπληρώματος (C3, C4) στις 3 ομάδες προώρων νεογνών (24-31, 31⁺¹-34, 34⁺¹-37) και τελειόμηνα χωρίς λοίμωξη τον 1^ο μήνα ζωής.

ΗΚ (εβδ)	v	C3 (mg/dl)			C4 (mg/dl)		
		1 ^η ημέρα	4 ^η ημέρα	27 ^η ημέρα	1 ^η ημέρα	4 ^η ημέρα	27 ^η ημέρα
24-31	10	26.9 \pm 10.8	30.7 \pm 9.0	44.0 \pm 17.0	80.0 \pm 3.8	10.2 \pm 3.0	19.6 \pm 10.5
31 ⁺¹ -34	20	33.6 \pm 17.7	34.8 \pm 20.2	48.1 \pm 17.0	11.0 \pm 6.2	13.2 \pm 10.6	21.8 \pm 30.7
34 ⁺¹ -37	20	42.9 \pm 16.8	46.1 \pm 18.3	55.9 \pm 15.3	13.8 \pm 70.4	14.8 \pm 8.5	20.6 \pm 6.7
>37	50	46.8 \pm 17.0	47.5 \pm 17.6	66.5 \pm 15.0	15.32 \pm 6.3	17.5 \pm 6.4	23.8 \pm 12.0

Σύγκριση ΤΜ (v=28) και πρόωρων (v=31) με πιθανή λοίμωξη (Πίνακας 12)

Υπήρχε σημαντική διαφορά ($p < 0.01$) στον απόλυτο αριθμό λεμφοκυττάρων την 1^η ημέρα μεταξύ ομάδων III (μέση τιμή \pm SD, 6776 \pm 2809/mm³) και IV (4583 \pm 2566/mm³) όπως και των ΑΜΠ την 2^η αιμοληψία + 2 ημέρες μετά την έναρξη αγωγής (282.928 \pm 85.155/mm³) στα ΤΜ σε σύγκριση με την ομάδα IV (211.129 \pm 87.432/mm³) ($p < 0.01$) και την 2^η αιμοληψία ($p < 0.05$) 335.571 \pm 126.397/mm³ και 263.500/mm³ αντίστοιχα. Η μέση τιμή CRP ήταν περίπου διπλάσια ($p < 0.05$) στα ΤΜ (ΜΟ \pm ΣΑ= 37 \pm 45 mg/L) σε σύγκριση με τα πρόωρα (17 \pm 23 mg/L) την πρώτη ημέρα λοίμωξης. Υπήρξε σημαντική διαφορά μεταξύ ΤΜ και πρόωρων την 1^η και 4^η ημέρα λοίμωξης με διπλάσια αύξηση στα ΤΜ σε σύγκριση με τα πρόωρα για τα CD3+ και CD4+ και για τα CD8+ μόνο την 1^η ημέρα. Στα NK και IL-1b δεν υπήρχε σημαντική διαφορά ενώ διέφεραν σημαντικά ($p < 0.01$) τα B-cell την 1^η ημέρα λοίμωξης. Η IL-6 και το TNF διέφεραν σημαντικά σε όλη τη διάρκεια της μελέτης. Το συμπλήρωμα ήταν παρόμοιο στις 2 ομάδες (Σχήματα 4, 5 και 6).

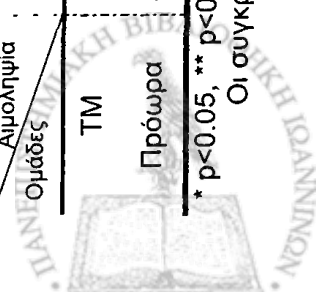


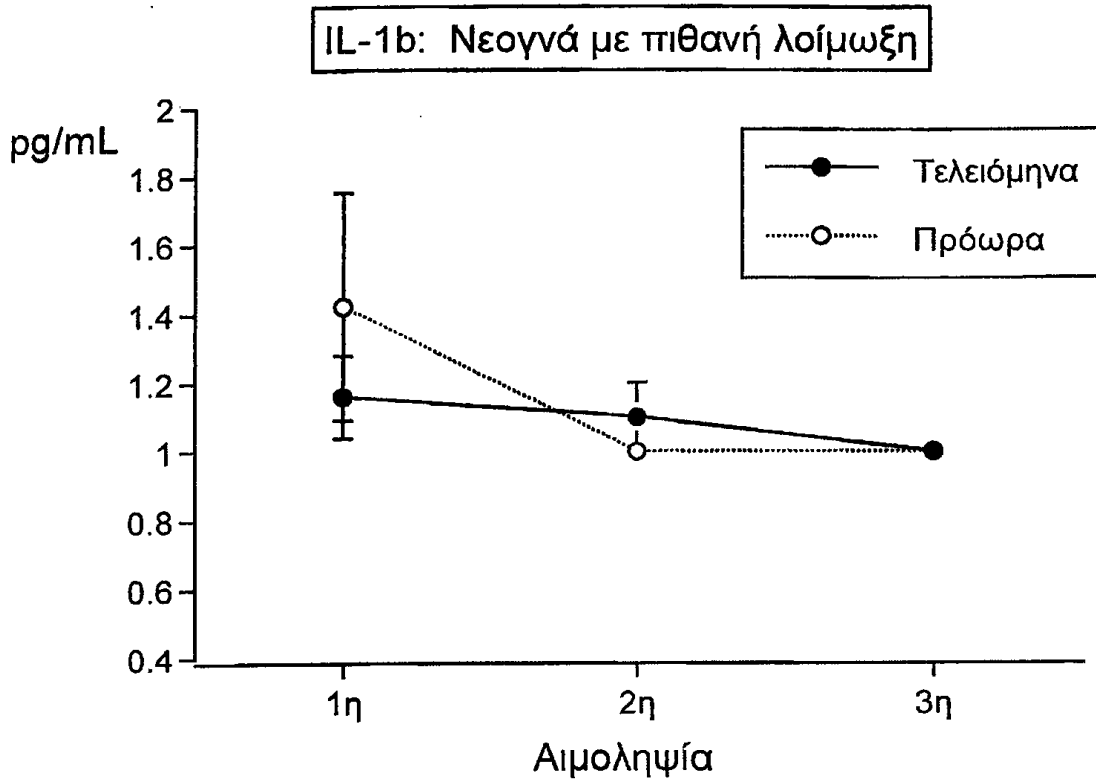
Πίνακας 12. Μέσες τιμές (±SD) (απόλυτος αριθμός κυττάρων/mm³) και TNF (pg/ml) σε νεογνά τελειόμηνα (n=28) και πρόωρα (n=31) με πιθανή λοίμωξη.

Αιμοληψία Ομάδες	Λευκά/mm ³			ΑΑΝ mm ³			ΑΑΠ/mm ³		
	1 ^η	2 ^η	3 ^η	1 ^η	2 ^η	3 ^η	1 ^η	2 ^η	3 ^η
TM	17.264±7.599	11.591±3.854	10.000±2.568	6.776±2.809	4.425±1.594	5.263±1.778	11.223±6.487	5.886±3.300	3.066±1.370
Πρόωρα	14.535±8.829	10.166±4.292	10.115±2.975	4.583±2.566	4.071±1.759	5.534±2.561	8.632±7.501	5.050±3.748	2.944±1.876
<hr/>									
Αιμοληψία Ομάδες	CD3+/mm ³			CD4+/mm ³			CD8+/mm ³		
	1 ^η	2 ^η	3 ^η	1 ^η	2 ^η	3 ^η	1 ^η	2 ^η	3 ^η
TM	4121±2049	3318±1669	3568±1289	2521±1361	2181±1352	2441±982	1330±974	990±752	1115±441
Πρόωρα	1478±1568+	2025±1414**	2428±1765	941±986*	1387±1045*	2473±1465	532±593*	689±457	887±532
<hr/>									
Αιμοληψία Ομάδες	NK/mm ³			B-cell/mm ³			IL-6 (pg/ml)		
	1 ^η	2 ^η	3 ^η	1 ^η	2 ^η	3 ^η	1 ^η	2 ^η	3 ^η
TM	332±270	290±207	353±299	505±590	352±238	330±260	34.75±13.83	23.42±6.03	15.9±9.0
Πρόωρα	208±209	230±221	241±127	163±183**	274±295	293±160	53.83±59.94	94.73±108***	64.86±86.15**
<hr/>									
Αιμοληψία Ομάδες	TNF (pg/ml)			ΑΜΠ/mm ³					
	1 ^η	2 ^η	3 ^η	1 ^η	2 ^η	3 ^η			
TM	24.07±12.5	17.89±10.33	6.67±9.62	282.928±85.155	335.571±26.000	326.321±97.335			
Πρόωρα	45.51±19.8***	48.94±33.43*	25.86±11.63*	211.129±87.432*	263.500±93.458*	338.100±122.736*			

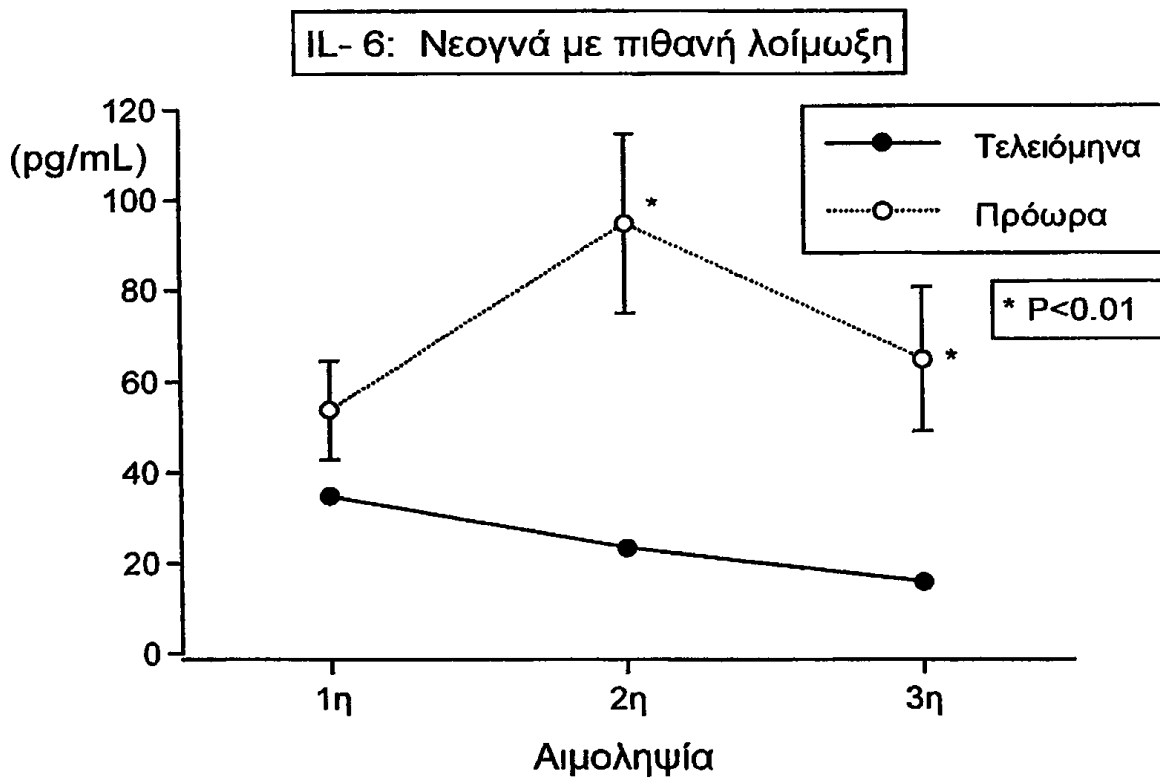
* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, + p<0.0001

Οι συγκρίσεις είναι μεταξύ πρόωρων και τελειόμηνων νεογμών με πιθανή λοίμωξη στη διάρκεια της μελέτης.





Σχήμα 4. Η IL-1b δεν διαφέρει μεταξύ προώρων και τελειομήνων νεογνών.
 1^η αιμοληψία-πρώτη μέρα λοίμωξη.
 2^η αιμοληψία 48-72ώρες μετά την έναρξη αντιβιοτικής αγωγής.
 3^η αιμοληψία 48-72 ώρες μετά την διακοπή της αντιβιοτικής αγωγής.



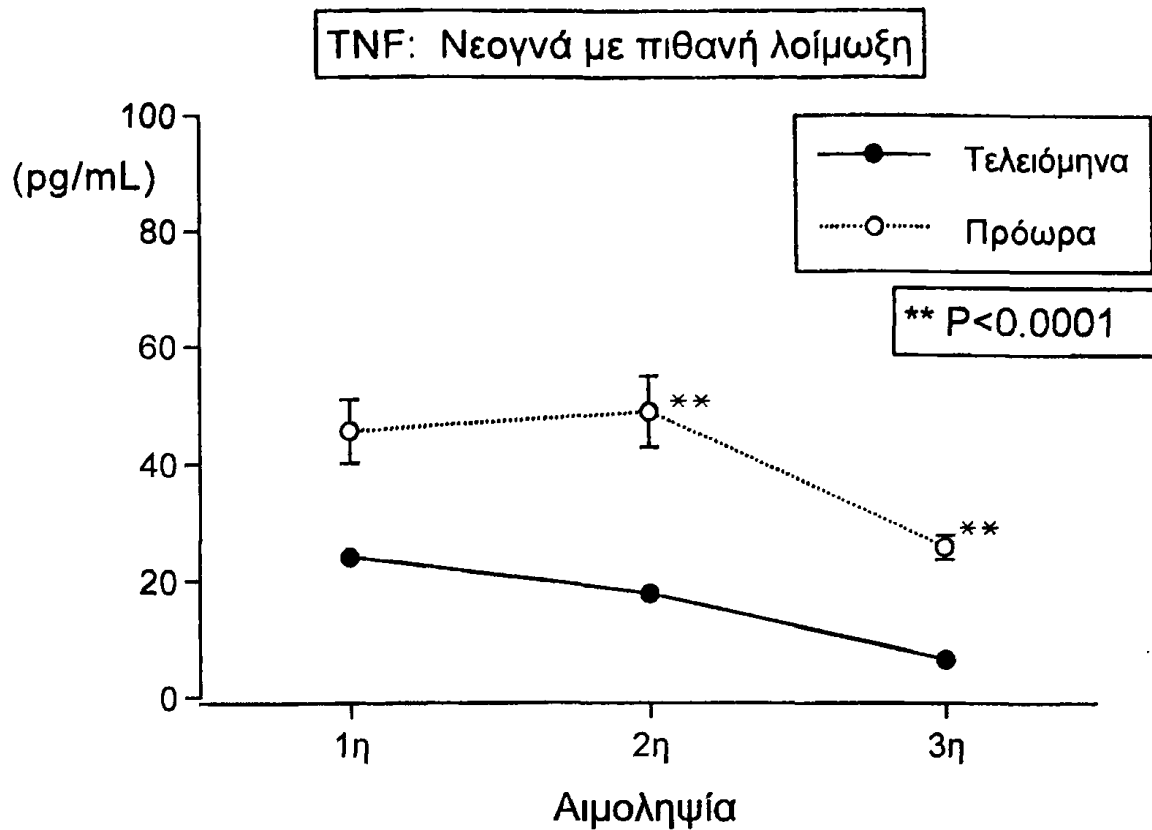
Σχήμα 5. Η IL-6 ήταν σημαντικά ψηλότερη στα πρόωρα ακόμη και μετά τη διακοπή της αγωγής (3^η αιμοληψία).

1^η αιμοληψία- 1^η ημέρα λοίμωξης.

2^η αιμοληψία 48-72 ώρες μετά την έναρξη αντιβιοτικής αγωγής.

3^η αιμοληψία 48-72 ώρες μετά την διακοπή της αντιβιοτικής αγωγής.





Σχήμα 6 .Το TNF ήταν επίσης σημαντικά ψηλότερο στα πρόωρα ακόμη και δύο μέρες μετά μετα τη διακοπή της αγωγής(3^η αιμοληψία)
1^η αιμοληψία- 1^η ημέρα λοίμωξης
2^η αιμοληψία 48-72 ώρες μετά την έναρξη αντιβιοτικής αγωγής.
3^η αιμοληψία 48-72 ώρες μετά την διακοπή αντιβιοτικής αγωγής.

Τελειόμηνα (n=22) και πρόωρα νεογνά (n=19) με σήψη (Πίνακας 13)

Ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων ήταν αυξημένος στα ΤΜ στη 2^η αιμοληψία της λοίμωξης(48-72 ώρες μετά την έναρξη της αντιβιοτικής αγωγής) σε σύγκριση με τα πρόωρα, όπως και ο ΑΑΛ ενώ ο ΑΑΠ δεν διέφερε σημαντικά στη διάρκεια της μελέτης. Τα ΑΜΠ στα πρόωρα με σήψη ήταν σημαντικά χαμηλότερα στον 1^ο έλεγχο (1^η ημέρα εισόδου με διάγνωση λοίμωξης). Τα CD3+ και CD4+ ήταν σημαντικά χαμηλότερα στα πρόωρα στη διάρκεια της μελέτης ενώ το CD8+ τη 2^η αιμοληψία από την είσοδο με διάγνωση της σήψης. Τα NK ήταν επίσης χαμηλότερα στα πρόωρα με σήψη της πρώτες ημέρες της λοίμωξης και τα B-cell στη 2^η αιμοληψία στα πρόωρα. Η IL-1b στα πρόωρα μειώθηκε στο ήμισυ από τη 2^η αιμοληψία (48-72 ώρες μετά την έναρξη της αγωγής) ($p < 0.01$) ενώ η IL-6 παρέμεινε τριπλάσια περίπου στα πρόωρα σε σύγκριση με τα τελειόμηνα και μετά τη θεραπεία. Η μέση τιμή (\pm ΣΑ) της CRP ήταν παρόμοια σε ΤΜ και πρόωρα (20 ± 29 και 25 ± 34 mg/L) προ της έναρξης (Σχήματα 7, 8 και 9).

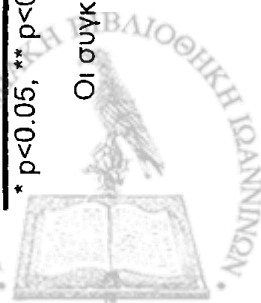


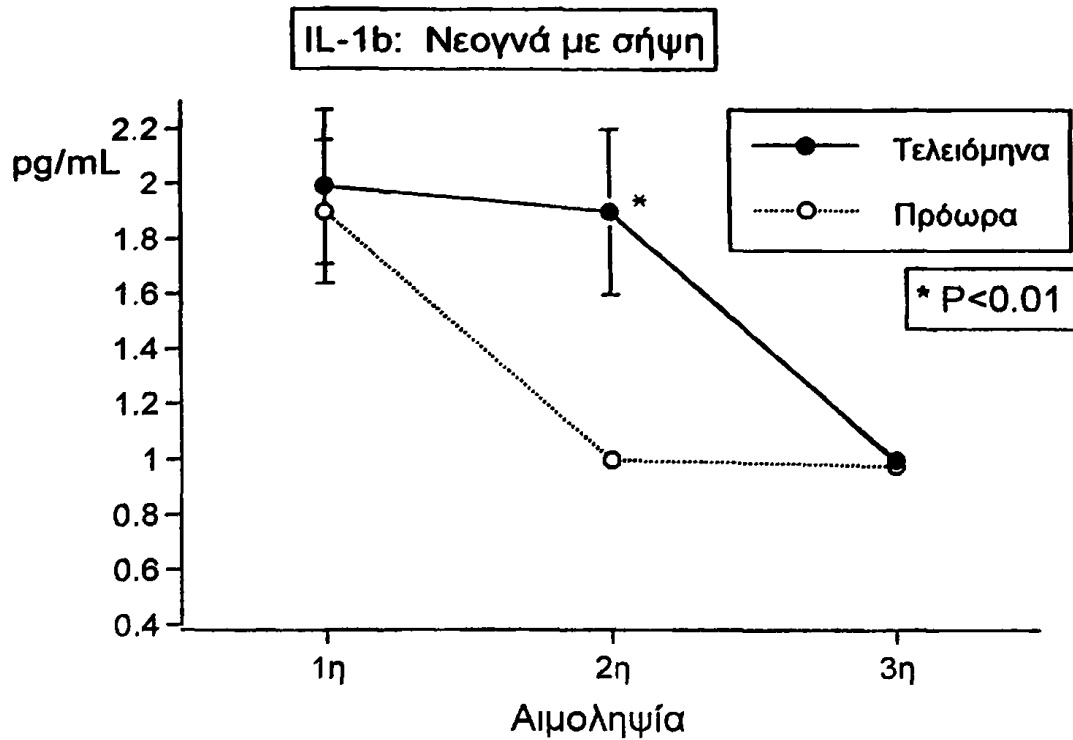
Πίνακας 13. Μέσες τιμές (± SD) (απόλυτος αριθμός κυττάρων/mm³) και IL-6 (pg/ml) σε τελειόμηνα και πρόωρα νεογνά με σήψη (TM n=22, πρόωρα n= 19)

Αιμοληψία Ομάδες		Λευκά/mm ³			ΑΑΠ/mm ³			ΑΑΛ/mm ³		
		1 ^η	2 ^η	3 ^η	1 ^η	2 ^η	3 ^η	1 ^η	2 ^η	3 ^η
TM		16.608±6.891	12.512±3.991	10.302±3.586	9896±5307	5016±2776	3746±2219	5918±2808	4832±1594	4835±1988
Πρόωρα		12.329±7.018	8.716±2526***	9.712±2.611	7065±6555	4214±1896	3579±2316	3063±1614***	3649±1478*	4399±1643
Αιμοληψία Ομάδες		CD3+/mm ³			CD4+/mm ³			CD8+/mm ³		
		1 ^η	2 ^η	3 ^η	1 ^η	2 ^η	3 ^η	1 ^η	2 ^η	3 ^η
TM		2775±1786	3000±1437	3513±1375	1782±1091	1867±975	2263±963	856±661	1081±816	1126±538
Πρόωρα		1278±1868*	1808±1296**	2391±1201**	720±1008**	1481±1534	1476±910**	500±790	570±457	855±400
Αιμοληψία Ομάδες		NK/mm ³			B cell/mm ³			IL-6 (pg/ml)		
		1 ^η	2 ^η	3 ^η	1 ^η	2 ^η	3 ^η	1 ^η	2 ^η	3 ^η
TM		332±246	259±109	271±184	337±300	397±266	343±285	146±75	75±39	33±16
Πρόωρα		180±197*	169±144*	225±135	201±255	169±196**	304±231	151±135	78±77	103±108
Αιμοληψία Ομάδες		TNF (pg/ml)			ΑΜΠ/mm ³					
		1 ^η	2 ^η	3 ^η	1 ^η	2 ^η	3 ^η			
TM		87.6±37.2	77.90±10.33	28.9±21.6	289.318±87.800	316.500±144.360	375.181±134.857			
Πρόωρα		75.8±48.4	55.60±40.74	40.8±23.6	199.105±63.535***	278.105±83.314	323.347±100.142			

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, + p<0.0001

Οι συγκρίσεις είναι μεταξύ πρόωρων και τελειόμηνων νεογμών στη διάρκεια της σήψης την ίδια ημέρα.



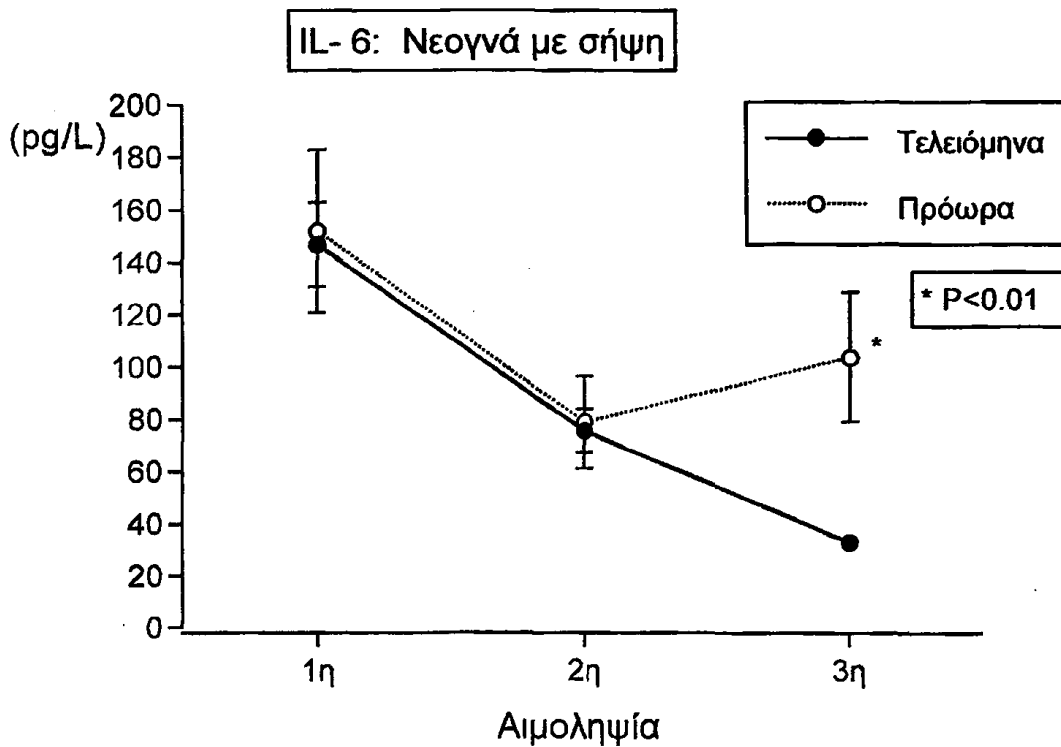


Σχήμα 7. Η IL-1b ήταν σημαντικά ψηλότερη στα τελειόμηνα 48 ώρες μετά την έναρξη της αγωγής (2^η αιμοληψία).

1^η αιμοληψία-1^η ημέρα λοίμωξης.

2^η αιμοληψία 48-72 ώρες μετά την έναρξη αντιβιοτικής αγωγής.

3^η αιμοληψία 48-72 ώρες μετά την διακοπή αντιβιοτικής αγωγής.



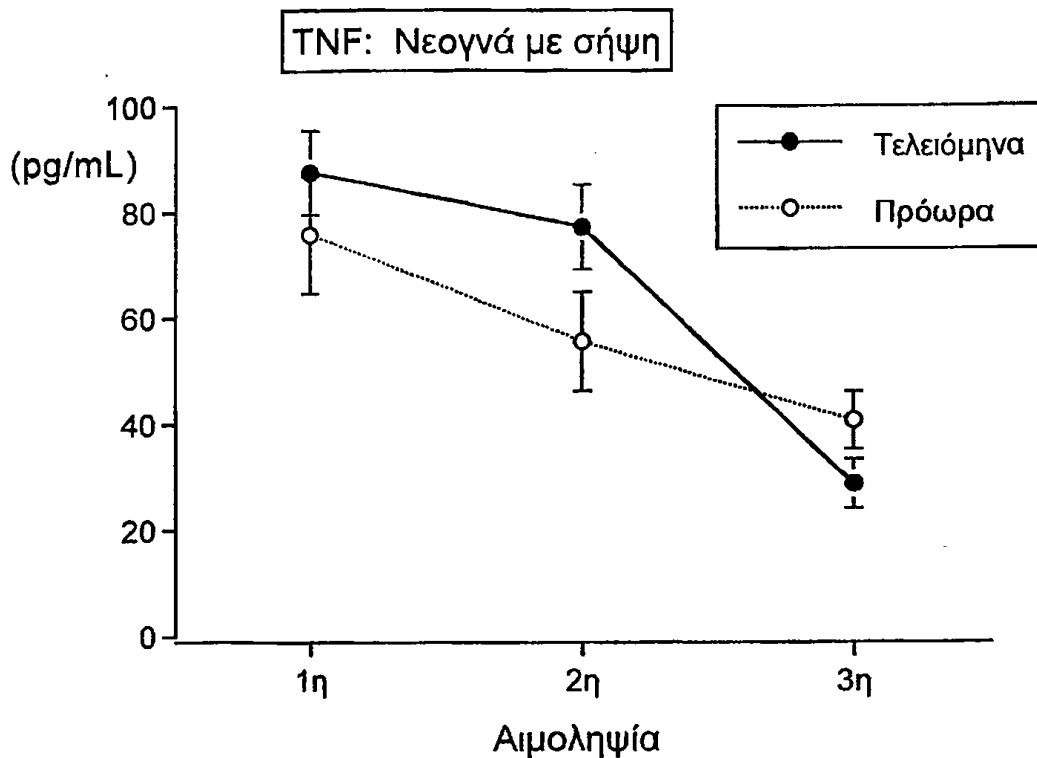
Σχήμα 8. Η IL-6 σε νεογνά με σήψη παρέμεινε σημαντικά ψηλότερη σε πρόωρα 48 ώρες μετά τη διακοπή της αγωγής

1^η αιμοληψία 1^η ημέρα λοίμωξης.

2^η αιμοληψία 48-72 ώρες μετά την έναρξη αντιβιοτικής αγωγής.

3^η αιμοληψία 48-72 ώρες μετά την διακοπή αντιβιοτικής αγωγής.





Σχήμα 9. Το TNF δεν διέφερε μεταξύ προώρων και τελειομήνων με Σηψη.
 1^η αιμοληψία- 1 ημέρα λοίμωξης.
 2^η αιμοληψία 48-72ώρες μετά την έναρξη αντιβιοτικής αγωγής
 3^η αιμοληψία 48-72 ώρες μετά την διακοπή αντιβιοτικής αγωγής.

Ο TNF ήταν παρόμοιος στις 2 ομάδες νεογνών με σήψη. Η IgA φαίνεται χαμηλότερη ($p < 0.05$) στα πρόωρα με σήψη ενώ στα ΤΜ μειώνεται σημαντικά η IgG την 4^η ημέρα. Στα πρόωρα 31-34 εβδ. ΗΚ με λοίμωξη (πιθανή και επιβεβαιωμένη σήψη) η IgM αυξάνει σημαντικά ($p < 0.05$) την 4^η ημέρα ενώ στα 24-31 εβδ. μετά τη λοίμωξη. Η ανοσοφαιρίνη ήταν περίπου διπλάσια ($p < 0.05$) στα ΤΜ με σήψη τις πρώτες 4 ημέρες και η IgG ήταν ψηλότερη στα πρόωρα με σήψη ($p < 0.05$) στο τέλος της αγωγής. Το C3 δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των 2 ομάδων ενώ το C4 ήταν περίπου διπλάσιο ($p < 0.001$) στα τελειόμηνα ($20 \pm 8 \text{mg/dl}$) σε σύγκριση με τα πρόωρα ($12 \pm 6 \text{mg/dl}$). Συσχέτιση CRP και IL-6 την 1^η και 3^η αιμοληψία στη διάρκεια της λοίμωξης δεν ήταν σημαντική ούτε σε νεογνά με πιθανή λοίμωξη ($r = 0.16$, $p = 0.37$) ούτε σε νεογνά με σήψη ($r = 0.19$, $p = 0.44$)

Ο Πίνακες 14 και 15 δείχνουν τα εργαστηριακά ευρήματα στα νεογνά με σήψη που κατέληξαν ή επιβίωσαν (αντίστοιχα). Όλα τα νεογνά πλύν ενός (Πίνακας 14) έδειξαν αύξηση της IL-6 στη 2^η αιμοληψία.



Πίνακας 14. Εργαστηριακά ευρήματα σε νεογνά με σήψη που πέθαναν, στην 1^η και 2^η αιμοληψία (προς της έναρξης της αγωγής και 48-72 ώρες μετά την αγωγή, αντίστοιχα).

N/N	ΗΚ (εβδ)	ΒΓ (g)	Στεροειδή προγεν.	Είδος τοκετού	Δίδυμη κύηση	Είδος μικροβίου	Λευκά (/mm ³)	ΑΜΓ (/mm ³)	CRP (mg/L) 1 ^η	IL-6 (pg/ml) 1 ^η	TNF (pg/ml) 1 ^η	CRP (mg/L) 2 ^η	IL-6 (pg/ml) 2 ^η	TNF (pg/ml) 2 ^η
1.	26,3	770	ΟΧΙ	ΦΤ	ΝΑΙ	E.Coli	9.040	150.000	95	87	32,5	3	120	30
2.	28	1045	ΝΑΙ	ΦΤ	ΝΑΙ	Candida	8.750	210.000	42	386	110	2	420	97
3.	32	1920	ΟΧΙ	ΦΤ	ΟΧΙ	Staph. aureus	7.330	250.000	21	38	34,2	5	84	34,3
4.	24	760	ΟΧΙ	ΚΤ	ΟΧΙ	Candida	8.440	250.000	8	54	180	1	140	175
5.	26	560	ΟΧΙ	ΦΤ	ΟΧΙ	Candida	5.170	190.000	5	58	52,7	1	120	112
6.	24,3	670	ΝΑΙ	ΦΤ	ΝΑΙ	Candida	14.235	253.000	2	471	175	2	226	25,1

Πίνακας 15. Εργαστηριακά ευρήματα σε νεογνά με σήψη που επιβίωσαν, στην 1^η και 2^η αιμοληψία (προς της έναρξης της αγωγής και 48-72 ώρες μετά την αγωγή, αντίστοιχα).

N/N	ΗΚ (εβδ)	ΒΓ (g)	Στεροειδή προγεν.	Είδος τοκετού	Δίδυμη κύηση	Είδος μικροβίου	Λευκά (/ mm^3)	ΑΜΠ (/ mm^3)	CRP (mg/L) 1 ^η	IL-6 (pg/L) 1 ^η	TNF (pg/L) 1 ^η	CRP (mg/L) 2 ^η	IL-6 (pg/L) 2 ^η	TNF (pg/L) 2 ^η
1.	26,3	1050	ΟΧΙ	ΦΤ	ΝΑΙ	CNS	18.490	216.000	4	175	75	2	135	65
2.	27,6	1090	ΟΧΙ	ΦΤ	ΟΧΙ	E.Coli	6.220	88.000	68	132	47,3	1	120	40,4
3.	28	1045	ΝΑΙ	ΦΤ	ΝΑΙ	CNS	8.760	250.000	69	187	38	1	97	38
4.	28,5	1165	ΟΧΙ	ΚΤ	ΝΑΙ	Candida	14.662	245.000	92	168	74	1	120	65
5.	29	1300	ΟΧΙ	ΚΤ	ΟΧΙ	CNS	10430	187.000	17	67	65,4	2	42	53
6.	29	1185	ΝΑΙ	ΚΤ	ΝΑΙ	CNS	11.850	155.000	3	53	38,4	1	21	38,4
7.	30	1500	ΝΑΙ	ΦΤ	ΟΧΙ	Candida	18.560	198.000	5	380	163	4	210	160
8.	30	1200	ΟΧΙ	ΦΤ	ΟΧΙ	CNS	11.650	240.000	1	56	48,3	6	34	45,3
9.	30	1130	ΝΑΙ	ΚΤ	ΝΑΙ	GBS	21.400	178.000	5	35	53,4	7	24	50,3
10.	30	1420	ΟΧΙ	ΦΤ	ΟΧΙ	Listeria	32.000↓	160.000	16	300	84,7	2	124	73,3
11.	31,5	860	ΟΧΙ	ΚΤ	ΟΧΙ	CNS	30.840	335.000	1	55	32,4	1	32	32,4
12.	32	1920	ΟΧΙ	ΦΤ	ΟΧΙ	CNS	4.344↓	200.000	21	45	41,3	4	29	34,3
13.	33	2250	ΝΑΙ	ΚΤ	ΟΧΙ	Serratia	15.930	50.000	62	138	93,7	5	120	86,3

Πρόωρα με πιθανή λοίμωξη (IV_Σ) και σήψη (IV_{ΠΛ})

Στην ομάδα προώρων με πιθανή λοίμωξη (IV_{ΠΛ}, v=31) και σήψη (IV_Σ, v=19) σημαντικές διαφορές βρέθηκαν στον απόλυτο αριθμό λεμφοκυττάρων την 1^η ημέρα λοίμωξης ($p < 0.05$) [μέση τιμή \pm SD: 4.583 ± 2.566 (IV_{ΠΛ}) και 3.063 ± 1.614 (IV_Σ)], στα CD3 και CD4+ ($p < 0.05$) στην 3^η αιμοληψία (πιθανή λοίμωξη και σήψη). Οι μέσες τιμές CD3 ήταν $3.438 \pm 1.765/\text{mm}^3$ (IV_{ΠΛ}) και $2.391 \pm 1.201/\text{mm}^3$ (IV_Σ). Οι μέσες τιμές των CD4+ ήταν $2.473 \pm 1.465/\text{mm}^3$ και $1.476 \pm 0.910/\text{mm}^3$, αντίστοιχα. Η τιμή της IL-6 την 1^η ημέρα ήταν 152 ± 135 (pg/ml) σε πρόωρα με σήψη περίπου τριπλάσια ($p < 0.001$) από τα πρόωρα με πιθανή λοίμωξη (53.83 ± 59.94 pg/ml), διαφορά που δεν ήταν σημαντική 48-72 ώρες και μετά το πέρας της αγωγής, αν και η IL-6 παρέμενε ψηλότερη σε πρόωρα με σήψη. Το TNF ήταν σημαντικά υψηλότερο ($p < 0.01$) την 1^η ημέρα (75 ± 48 vs 45 ± 29 pg/ml) και παρέμεινε ψηλότερο (40 ± 23 vs 26 ± 11 pg/ml, $p < 0.01$) μετά τη λοίμωξη στα πρόωρα με σήψη σε σύγκριση με αυτά με πιθανή λοίμωξη.

Σε πρόωρα 24-31 εβδ. ΗΚ (v=40) με λοίμωξη φαίνεται ότι τα NK (230 ± 152) δεν έχουν φθάσει τις τιμές των φυσιολογικών πρόωρων (v=10, 377 ± 307 , $p < 0.05$). Τα C3 και C4 την 1^η ημέρα της λοίμωξης ήταν διπλάσια ($p < 0.01$) στα πρόωρα 24-31 εβδ. ΗΚ με λοίμωξη. Στα πρόωρα >31 εβδ. ΗΚ το C3, C4 δεν φαίνεται να αλλάζει.

TM με πιθανή λοίμωξη (III_{ΠΛ}) και σήψη (III_Σ)

Στις ομάδες TM με λοίμωξη [πιθανή (TM_{ΠΛ}) και σήψη (T_Σ)] σημαντικά χαμηλότερα ($p < 0.05$) CD3+ και CD4+ είχαν τα νεογνά με σήψη (v=22, $2.775 \pm 1.786/\text{mm}^3$ και $1.782 \pm 1.021/\text{mm}^3$) σε σύγκριση με αυτά με πιθανή λοίμωξη (v=28, $4.121 \pm 2.049/\text{mm}^3$ και $2.521 \pm 1.361/\text{mm}^3$) αντίστοιχα. Η IL-1b ήταν περίπου διπλάσια ($p < 0.01$) σε TM με σήψη (1.99 ± 1.32 pg/ml) σε σύγκριση με TM με πιθανή λοίμωξη, διαφορά εξίσου σημαντική ($p < 0.01$) και την 4^η ημέρα της λοίμωξης (2^η αιμοληψία). Τα επίπεδα της IL-6 ήταν υπερτριπλάσια ($p < 0.0001$) σε νεογνά με σήψη την 1^η ημέρα (1^η αιμοληψία) (146 ± 75 vs 34 ± 14 pg/ml) και την 4^η ημέρα της λοίμωξης (2^η αιμοληψία) (75 ± 39 vs 23 ± 6 pg/ml) σε σύγκριση με τα έχοντα πιθανή λοίμωξη και παρέμενε διπλάσια ($p < 0.0001$) μετά τη σήψη (33 ± 16 pg/ml) σε σύγκριση με τα TM_{ΠΛ} (16 ± 9). Η αύξηση του TNF ήταν σχεδόν τετραπλάσια σε TM με σήψη ($p < 0.0001$) την 1^η ημέρα (87 ± 37 pg/ml), την 4^η ημέρα (77 ± 38 pg/ml) μετά τη λοίμωξη και (28 ± 21 pg/ml) σε σύγκριση με TM με πιθανή λοίμωξη (24 ± 12 , 17 ± 10 , 6 ± 9 pg/ml) τις αντίστοιχες ημέρες. Το C3 φαίνεται σημαντικά υψηλότερο την 1^η ημέρα στα TM με σήψη.

Οι παράγοντες που σχετίζονταν σημαντικά με την ΗΚ φαίνονται στον Πίνακα 16.



Πίνακας 16. Συσχέτιση της ηλικίας κύησης έδειξε σημαντικότητα ($r>0.30$) στον ολικό αριθμό λευκών, στον απόλυτο αριθμό πολυμορφοκυττάρων (ΑΑΠ), IgG, C3, C4 και IL-6

	v	r	p
			Ημέρα 1 ^η
Ολικός αριθμός λευκών	100	0.599	<0.0001
ΑΑΠ mm ³	100	0.409	<0.0001
IgG mg/dl	100	0.373	<0.0001
C3 mg/dl	100	0.371	<0.0001
C4 mg/dl	100	0.346	<0.001
			Ημέρα 4 ^η
IgG mg/dl	100	0.357	<0.001
C3 mg/dl	100	0.324	<0.001
C4 mg/dl	100		
			Ημέρα 27 ^η
C3 mg/dl	100	0.463	<0.001
IL-6 pg/ml	100	0.311	<0.01



ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η World Health Organization (WHO) αναφέρει το 2000 μεταξύ των 6 κύριων αιτιών θανάτου (73%) σε παιδιά <5 ετών (10.6 εκατομμύρια) τη νεογνική πνευμονία, τη σήψη να ανέρχεται στο 10% και τον πρόωρο τοκετό στο ίδιο ποσοστό (10%) (246). Στις αναπτυσσόμενες χώρες οι νεογνικές λοιμώξεις εκτιμάται ότι προκαλούν 1.6 εκατομμύρια θανάτων ή το 40% των νεογνικών θανάτων.

Η συχνότητα της νεογνικής σήψης στις αναπτυσσόμενες χώρες αναφέρεται ότι ποικίλλει από 1 έως 5 έως 10 ανά 1000 ζώσες γεννήσεις (247,248), γεγονός που έχει επιβεβαιωθεί και από προηγούμενη μελέτη στη MENN του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου είναι 3:1.000 ζώσες γεννήσεις (249). Ο μέσος αριθμός γεννήσεων είναι 1500 τοκετοί κατ'έτος. Η συχνότητα ήταν 3.4% των εισαγωγών στη MENN για τη χρονική περίοδο 1/1/997 έως 31-12-2005.

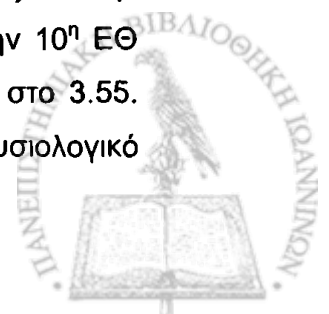
Η συχνότητα των λοιμώξεων σε νεογνά Μονάδας Εντατικής κυμαίνονται από 20% - 50% (250,251) και παρά την αντιβίωση η θνητότητα (15-20%) δεν αναφέρεται να έχει βελτιωθεί (252). Ο ολικός αριθμός λευκών δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ νεογνών (TM και Π) που δεν είχαν λοίμωξη μετά την 1^η ημέρα ζωής. Τα πολυμορφοπύρρηνα, λεμφοκύτταρα και αιμοπετάλια δεν διέφεραν επίσης. Επίσης δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στα μικρότερα (<34 εβδομάδων) και μεγαλύτερα (>34 εβδομάδων HK) όπως αναφέρεται και στη βιβλιογραφία (105,246). Ο φυσιολογικός αριθμός των λευκών έχει αμφισβητηθεί διότι οι παλαιότερες μελέτες έχουν βασιστεί σε πολύ μικρό αριθμό νεογνών (253). Υπάρχουν αναφορές στη βιβλιογραφία ότι, ενώ ο αριθμός των ουδετερόφιλων σε πρόωρα ή TM είναι παρόμοιος με τα παιδιά και τους ενήλικες, εντούτοις διαφέρουν όσον αφορά την απάντησή τους κατά τη σήψη (254). Η βακτηριοκτόνος δράση έχει βρεθεί μειονεκτική σε άρρωστα ή στρεσαρισμένα τελειόμηνα και πρόωρα νεογνά τις πρώτες 10 ημέρες ζωής μέχρι και τους 2 μήνες χρονολογικής ηλικίας σε πρόωρα μέσης HK 30.5 εβδ. (εύρος 24-35.5 εβδ) (137). Μειονεκτική έκφραση υποδοχέων που παρατηρείται σε πρόωρα <32 εβδομάδων και πρόωρα νεογνά της ίδιας HK με ΣΑΔ μπορεί επίσης να σχετίζεται με μειωμένη άμυνα στις νεογνικές λοιμώξεις. Η μελέτη του Manroe για λευκά είναι συγχρονισμένη μελέτη σε 108 βρέφη και έχει χρησιμοποιηθεί επί μακρόν. Πιο πρόσφατες μελέτες από το Schelonka (105) σε 193 τελειόμηνα νεογνά δείχνει μεγαλύτερο εύρος λευκών το 1^ο 24ωρο ζωής σε σύγκριση με την αναφορά του Manroe. Έχει τεκμηριωθεί ότι τα λευκά εξαρτώνται από την ηλικία του βρέφους, από το αν το δείγμα είναι αρτηριακό ή φλεβικό και αν κλαίει τη στιγμή της αιμοληψίας. Αυτό σημαίνει ότι η τιμή του τεστ δεν είναι σταθερή και υπάρχει μεγάλη ποικιλότητα. Ο λόγος άωρα/ολικά λευκά δεν είναι αξιόπιστος διότι εξαρτάται από τον παρατηρητή (255). Επιπλέον, η παρουσία άωρων και κερματισμένων κυττάρων δεν θεωρείται αξιόπιστη διότι εμφανίζονται στη διάρκεια της ωρίμανσης και ο διαχωρισμός από τα φυσιολογικά είναι υποκειμενικός. Λόγω των επιφυλάξεων για την αξιοπιστία τους, οι

συγκεκριμένοι δείκτες δέν χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Το πλεονέκτημα αυτής της μελέτης είναι οι διαδοχικές μετρήσεις σε διάφορες ηλικίες κύησης στο ίδιο νεογνό τον 1^ο μήνα ζωής. Αν και ο ολικός αριθμός των ουδετερόφιλων δεν διαφέρει σημαντικά έχει αναφερθεί ότι εξαιρετικά χαμηλού βάρους πρόωρα (μέσο ΒΓ 765 g) νεογνά έχουν μειωμένη λειτουργικότητα σε σύγκριση με τα τελειόμηνα, και τους ενήλικες (254). Και η παρούσα μελέτη υποστηρίζει περαιτέρω την άποψη ότι η διάγνωση της λοίμωξης βασισμένη στη λευκοκυττάρωση παραμένει δύσκολη. Μελέτες της λειτουργίας των πολυμορφοκυττάρων βοηθούν μόνο στην κατανόηση για αυξημένη τάση των πρόωρων για λοιμώξεις. Ο απόλυτος αριθμός ΠΜΝ δεν διέφερε σημαντικά στα ΤΜ και πρόωρα με σήψη ενώ τα λεμφοκύτταρα ήταν ψηλότερα τις πρώτες μέρες της σήψης στα ΤΜ. Τα λεμφοκύτταρα έχουν σχέση με την ανοσία του νεογνού και οι χαμηλότερες τιμές στα πρόωρα σε σύγκριση με τα τελειόμηνα ίσως σχετίζονται με την κακή έκβαση των πρόωρων ιδιαίτερα των πιο ανώριμων (<28 εβδομάδων ΗΚ).

Ο μειωμένος αριθμός αιμοπεταλίων (<150.000/mm³) επίσης έχει αναφερθεί σε σήψη για πολύ χαμηλού βάρους νεογνά (<1500 g) (256), εντούτοις στην παρούσα μελέτη μόνο στα πρόωρα με σήψη βρέθηκε σημαντικά χαμηλότερος ο μέσης όρος ΑΜΠ προ της έναρξης της αγωγής στο μελετηθέντα πληθυσμό. Αιμοπετάλια <150.000/mm³ είχαν 5 νεογνά εκ των οποίων ένα ήταν τελειόμηνο. Το 1993, οι Rodwell (237) και συν πρότειναν ένα νέο score που περιελάμβανε παθολογικό αριθμό ολικών λευκών, αυξημένα άωρα πολυμορφοκύτταρα, αυξημένη αναλογία άωρων προς ώριμα πολυμορφοκύτταρα ≥ 0.3 , παθολογικά αιμοπετάλια <150.000/mm³ και παρουσία εκφυλιστικών αλλοιώσεων στα ΠΜΠ. Και τα δύο σκορ έχουν χαμηλή θετική προγνωστική αξία ως προς τις μεμονωμένες μετρήσεις (12%) που αυξάνει με το συνδυασμό (86%) ενώ υψηλή αρνητική προγνωστική αξία έχει η κάθε παράμετρος (99%). Επισημαίνεται ότι πρέπει πάντοτε να συσχετίζονται τα κλινικά σημεία και εργαστηριακά ευρήματα. Οι μετρήσεις στη μελέτη του Rodwell έγιναν το 1^ο 24ωρο ζωής (81.5%) και διέφεραν μεταξύ πρόωρων (3%) και τελειόμηνων (8%) ως προς την πιθανότητα για σήψη και το υπόλοιπο των μετρήσεων κάλυπτε από το 2^ο 24ωρο ως το τέλος του 1^{ου} μήνα ζωής.(237)

Τα συχνότερα αναμενόμενα μικρόβια για τις πρώιμες λοιμώξεις (<72 ώρες) στις ΗΠΑ είναι ο Στρεπτόκοκκος Β και στη ΜΕΝΝ του ΠΓΝΙ ήταν τα Gram αρνητικά (249). Στις όψιμες λοιμώξεις παγκοσμίως προέχουν οι κοαγκουλάση αρνητικοί σταφυλόκοκκοι (224,249). Στην παρούσα μελέτη δεν υπήρχε επικρατούν μικρόβιο στις πρώιμες και όψιμες λοιμώξεις στα ΤΜ, ενώ στις όψιμες για τα πρόωρα επικρατούν μικρόβιο ήταν ο coagulase negative staphylococcus (CNS) όπως αναφέρεται διεθνώς.

Οι Escobar και συν (257) βρήκαν ότι η έλλειψη συμπτωμάτων δεν αυξάνει την πιθανότητα για λοίμωξη σε νεογνά με απόλυτο αριθμό πολυμορφοκυττάρων στην 10^η ΕΘ (κίνδυνος 0.36), ενώ σε συμπτώματα με προδιαθεσικούς παράγοντες ανεβαίνει στο 3.55. Δύο μελέτες (105) εμφανίστηκαν 6 χρόνια αργότερα που αμφισβήτησαν το φυσιολογικό



αριθμό λευκών σε φυσιολογικά τελειόμηνα νεογνά και βρήκαν σημαντική συσχέτιση μεταξύ αύξησης λευκών και ΠΜΠ και διάρκειας του 1^{ου} σταδίου τοκετού. Θεώρησαν το εύρος των λευκών $16.2-31.5 \times 10^9/L$ ως τη 10^η και 90^η ΕΘ με μέση τιμή $24 \times 10^9/L$. Η 1^η μελέτη του Mangoe (103) που χρησιμοποιείται στην αναφορά ως προς τα λευκά περιελάμβανε πολύ μικρό αριθμό δειγμάτων την 4^η ώρα ζωής εξού και η ανάγκη για χρήση αιματολογικών σκορ για τη διάγνωση σήψης. Επιπλέον δεν προσδιόρισε τα λευκά σε νεογνά με σήψη που μπορεί να έχουν φυσιολογικούς δείκτες (105).

Οι ίδιοι ερευνητές (257,258) ένα χρόνο αργότερα έδειξαν μεγάλη απόκλιση στην εκτίμηση ανώριμων ΠΜΠ και της αναλογίας τους προς ώριμα λευκά και τη χαμηλή εκτίμησή που οδήγησε στην εγκατάλειψή τους (255). Έκτοτε έχει εμφανιστεί πληθώρα μελετών που δείχνουν ότι τα λευκά μόνα ή σε συνδυασμό με άλλους δείκτες είναι αναξιόπιστοι δείκτες για τη διάγνωση της σήψης/λοίμωξης. Η ποιότητα των μελετών εντούτοις έχει προβλήματα ώστε μόνο 52 από τις 572 αναφορές της βιβλιογραφίας θεωρήθηκαν ικανές να μειώσουν την πιθανότητα συστηματικού σφάλματος και να αυξήσουν τη διαγνωστική χρησιμότητά τους (259). Εντούτοις δεν υπάρχουν μελέτες στη βιβλιογραφία που να έχουν εκτιμήσει με επαρκή αριθμό ελέγχων τις μεταβολές των λευκών σε συνάρτηση με την ηλικία κύησης όπως και τη χρονολογική ηλικία σε φυσιολογικά νεογνά και νεογνά με πιθανή λοίμωξη και επιβεβαιωμένη σήψη (απομόνωση μικροοργανισμών) στην καλλιέργεια αίματος.

Στην παρούσα μελέτη βρήκαμε συνάρτηση των λευκών στους μάρτυρες (πρόωρα και τελειόμηνα) με την ηλικία κύησης όσον αφορά τον απόλυτο αριθμό πολυμορφοκυττάρων την 1^η και 4^η ημέρα ζωής (Πίνακας 16). Οι τιμές λευκών, ΑΑΠ και ΑΜΠ δεν διέφεραν σημαντικά σε νεογνά με λοίμωξη. Τουναντίον, ήταν σημαντικά μειωμένος ο αριθμός των λεμφοκυττάρων στα σηπτικά πρόωρα σε σύγκριση με τα τελειόμηνα όπως και τα ΑΜΠ σε σύγκριση με τα ΤΜ αν και η μέση τιμή δεν ήταν $<150.000/mm^3$. Οι Guida και συν. (256) ανέφεραν πτώση των αιμοπεταλίων και συνέδεσαν τη σήψη από Gram-αρνητικά και τη μυκηταιμία με την εμφάνιση χαμηλότατων ΑΜΠ σε σύγκριση με τη σήψη από Gram-θετικά σε πολύ χαμηλού βάρους νεογνά.

Η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη έχει αποδειχτεί από τις πιο αξιόπιστες μεθόδους για τη διάγνωση πρώιμης και όψιμης λοίμωξης, και οι διαδοχικές μετρήσεις της έχουν αρνητική προγνωστική αξία έως και 99% (173,236). Οι Benitz και συν. (260) αναφέρουν ότι η θετική προγνωστική αξία, ιδιαίτερα για πρώιμες λοιμώξεις ήταν χαμηλή και μια φυσιολογική CRP δεν επαρκεί για τη μη έναρξη αντιβίωσης (260). Οι Philip και Mills (261) έδειξαν ότι η χρήση της CRP μπορεί να ελαχιστοποιήσει τη χρήση αντιβιοτικών για νεογνά με πιθανή λοίμωξη. Η διαδοχική μέτρηση CRP έχει χρησιμοποιηθεί σαν οδηγός για την θεραπεία πρώιμης έναρξης σήψης (262) και φαίνεται ότι τα ευρήματα της παρούσης μελέτης επιβεβαιώνουν την υψηλή ευαισθησία σε ΤΜ και πρόωρα νεογνά ακόμη με ηλικία κύησης <31 εβδομάδων. Πρόσφατα δεν υπάρχει δείκτης ρουτίνας μόνος του ή σε συνδυασμό [π.χ. C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP)

ή δείκτες ουδετερόφιλων όπως άωρα/ολικά όπως έχει ήδη αναφερθεί (255) και ο απόλυτος αριθμός ουδετερόφιλων (ΑΑΠ)] που να έχει ιδανική ευαισθησία για την έναρξη αντιβιοτικής θεραπείας (262). Επιπλέον, και οι μετρήσεις στο εργαστήριο παίρνουν ώρα (262) και στην πραγματικότητα τα αποτελέσματα δεν διατίθενται σε χρόνο λιγότερο της ώρας.

Η ανοσία του νεογνού διαφέρει από τα μεγαλύτερα παιδιά και έχουν αυξημένο κίνδυνο για σοβαρές βακτηριακές και μυκητιασικές λοιμώξεις. Στα νεογνά δεν εντοπίζεται η βακτηριακή λοίμωξη και υπάρχει προδιάθεση για συστηματική διασπορά. Σαν αποτέλεσμα, οι λοιμώξεις είναι η κύρια αιτία μείζονος νοσηρότητας και θνητότητας (263,264), ιδίως στα πολύ χαμηλού βάρους γέννησης νεογνά.

Τα Τ-λεμφοκύτταρα (CD3+) παίζουν κεντρικό ρόλο στην επίκτητη ανοσιακή απάντηση, είτε ως βοηθητικά/επαγωγικά κύτταρα (CD4+), είτε ως κυτταροτοξικά/κατασταλτικά κύτταρα (CD8+) (265,266). Η αξιολόγηση του επιπέδου της κυτταρικής ανοσίας στο νεογέννητο έχει περιορισμένες δυνατότητες. Μόνο λίγες μελέτες έγιναν για να καθοριστεί το ποσοστό των Τ-κυττάρων στα νεογνά. Επιπλέον, αυτές οι μελέτες δεν αναφέρουν το ποσοστό των Τ-κυττάρων σύμφωνα με την ηλικία κύησης και το βάρος γέννησης, όπως στην παρούσα μελέτη. Γενικά, ο ολικός αριθμός των Τ-κυττάρων είναι ίδιος ή και μεγαλύτερος αυτού των ενηλίκων. Αυτό οφείλεται στη λεμφοκυττάρωση που παρατηρείται στο νεογέννητο. Μικρές διαφορές υπάρχουν και στους υποπληθυσμούς των Τ-κυττάρων (267). Στην παρούσα μελέτη δεν υπάρχει διαφορά μεταξύ φυσιολογικών ΤΜ και πρόωρων νεογνών και δεν υπάρχει συσχέτιση με την ΗΚ. Αυτά τα αποτελέσματα συμφωνούν με τις μελέτες των Cambells και συν. (268) και Thomas και συν. (269) που αναφέρουν ότι δεν υπήρχε διαφορά μεταξύ ΤΜ και πρόωρων, ως προς τους υποπληθυσμούς. Έχει δειχθεί ότι οι υποπληθυσμοί λεμφοκυττάρων διαφέρουν από εκείνες των παιδιών και ως εκ τούτου δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν τιμές αναφοράς. Περιορισμένες είναι οι μελέτες που ελέγχουν λεμφοκυτταρικούς υποπληθυσμούς τη νεογνική περίοδο (0-27^η ημέρα). Οι Kotirama-Ainamo (270) υποστηρίζουν ότι το φυσιολογικό εύρος είναι μεγάλο και ότι η επιρροή της ηλικίας κύησης είναι πιο περιορισμένη από άλλους παράγοντες όπως βηταμεθαζόνη, προεκλαμψία και νεογνική λοίμωξη που συμφωνεί και με την παρούσα μελέτη. Εντούτοις ο αριθμός των προώρων σ' αυτές τις μελέτες ήταν μικρός και οι μετρήσεις έγιναν μόνο την 1^η ημέρα ζωής. Οι ίδιοι ερευνητές παρατήρησαν αύξηση των CD3+ και CD4+ με την παρουσία λοίμωξης, ενώ όταν η βηταμεθαζόνη αυξάνει τα CD3⁺ και μειώνει τα NK. Μελέτη σε φυσιολογικά νεογνά με ΗΚ ≥ 34 εβδ. τις πρώτες 3 ημέρες ζωής έδειξαν αυξημένα Τ cells και Τ-βοηθητικά κύτταρα ενώ τα Τ κυτταροτοξικά και NK cells ήταν μειωμένα συγκριτικά με των ενηλίκων (271). Οι περισσότερες μελέτες που αφορούν νεογνά δεν έχουν μεγάλο αριθμό περιστατικών. Οι De Vries (272) εξέτασαν υποπληθυσμούς CD3+, CD4+ στον ομφάλιο λόρο σε 15 τελειόμηνα σε σύγκριση με 9 ενήλικες. Παρατήρησαν χαμηλότερα Τ-κύτταρα, παρόμοια Β κύτταρα και ψηλότερα NK κύτταρα. Ο απόλυτος αριθμός λεμφοκυττάρων στην παρούσα μελέτη είναι

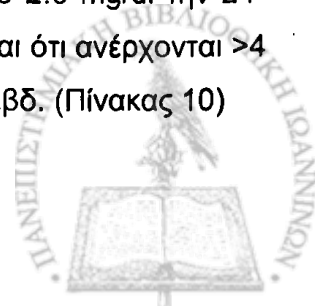


παρόμοιος με τα αναφερόμενα από την De Vries (272) και O'Gorman (271). Επίσης, το CD3⁺ και CD8⁺ είναι παρόμοια με τα αναφερόμενα με της De Vries. Παρόμοια επίπεδα CD3⁺ και CD4⁺ αναφέρονται σε νεογνά με σήψη στη μελέτη του Sofatsis και συν (273). Στην παρούσα μελέτη η παρουσία λοίμωξης στα πρόωρα μείωσε τα CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, NK και B cell στις ομάδες πρόωρων με λοίμωξη (σήψη και πιθανή λοίμωξη) (Πίνακες 12,13). Επίσης, τα CD3⁺ αυξάνονταν σ' όλη τη διάρκεια της πιθανής λοίμωξης στα TM σε σύγκριση με τα πρόωρα. Τα πρόωρα έχουν μειωμένα επίπεδα βοηθητικών (CD4⁺) και κυτταροτοξικών κυττάρων (CD8⁺). Τα CD3⁺, CD4⁺ και CD8⁺ ήταν μειωμένα στην ομάδα των προώρων με σήψη που δείχνουν ανωριμότητα στο ανοσοποιητικό. Στη διάρκεια της λοίμωξης τα CD3⁺, CD4⁺ και CD8⁺ είναι σημαντικά χαμηλότερα στα πρόωρα. Επίσης τα τελειόμηνα με λοίμωξη φαίνεται να αυξάνουν σημαντικά τα NK και B cell σε σύγκριση με τα πρόωρα (Πίνακας 8A και 8B) αν και η απευθείας σύγκριση δεν μπορεί να γίνει μεταξύ φυσιολογικών TM και προώρων διότι είναι διαφορετικοί οι χρόνοι. Στις λοιμώξεις τα ολικά CD3⁺ και οι υποπληθυσμοί λεμφοκυττάρων δεν διέφεραν μεταξύ των <31 και >31 εβδομάδων.

Οι μεταβολές IgA και IgM, IgG δεν φαίνεται να διαφέρουν στις διάφορες ηλικίες κύησης. Εκτός από τα αντισώματα που αποκτά το νεογέννητο από τη μητέρα του είναι και το ίδιο ικανό να παράγει αντισώματα κατά διαφόρων εξωγενών αντιγόνων (ιοί, μικρόβια, αντιγόνα εμβολίων). Τα αντισώματα αυτά ανήκουν κυρίως στην τάξη των IgM ανοσοσφαιρινών. Στα πρόωρα, η ικανότητα παραγωγής ειδικών αντισωμάτων δεν διαφέρει από αυτή των τελειομήνων, γι' αυτό και οι εμβολιασμοί των προώρων αρχίζουν στην ίδια ηλικία με τα TM (274,275).

Τα επίπεδα της IgA ήταν πολύ χαμηλά σ' όλα τα νεογνά. Τα επίπεδα της IgM ήταν σημαντικά χαμηλότερα, όπως άλλωστε αναμένονταν, δεδομένου ότι η IgM όπως και η IgA δεν μεταφέρονται από τη μητέρα στο κύημα. Οι IgG μεταφέρονται από τη μητέρα στο κύημα με τον πλακούντα χάρις στην ύπαρξη ειδικών Fc-υποδοχέων στην τροφοβλάστη. Κατά τη γέννηση ανιχνεύονται στο αίμα του νεογνού IgG ανοσοσφαιρίνες σε συγκεντρώσεις που φθάνουν ή και ξεπερνούν τις συγκεντρώσεις της IgG των ενηλίκων (276,277).

Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι οι IgA, IgM είναι σημαντικά ψηλότερες στο τέλος του 1^{ου} μήνα ζωής στα φυσιολογικά τελειόμηνα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά πρόωρα, αν και στα φυσιολογικά πρόωρα επίσης αυξάνουν σχεδόν στο διπλάσιο (Πίνακας 9A). Επίσης η IgA στα TM με λοίμωξη είναι αυξημένη προ της έναρξης της αγωγής. Το ότι η διαπλακουντιακή μεταφορά ανοσοσφαιρίνης G είναι χαμηλή στα πρόωρα <32 εβδ ΗΚ και είναι ένας από τους παράγοντες που αυξάνουν την επιρρέπεια των πρόωρων νεογνών σε λοιμώξεις. Η συγκέντρωση της IgG ορού έχει αναφερθεί ότι αυξάνει από 2.6 mg/dl την 24^η εβδ. ΗΚ σε 5.99 mg/dl. Μετά την 28^η εβδ. τα επίπεδα της IgG αναφέρονται ότι ανέρχονται >4 mg/dl (278). Στο μελετηθέντα πληθυσμό η IgG ήταν >6 mg/dl με ΗΚ <28 εβδ. (Πίνακας 10)



Στα πρόωρα νεογνά με ΠΛ και σήψη ο απόλυτος αριθμός λεμφοκυττάρων είναι σχεδόν ήμισυ του ΑΑΛ στα τελειόμηνα. Τα Β κύτταρα στα ΤΜ με πιθανή λοίμωξη ήταν περίπου 5πλάσια πριν από την έναρξη αγωγής (Πίνακας 12). Τα Β κύτταρα σε ΤΜ με σήψη ήταν ψηλότερα σε σύγκριση με τα πρόωρα.

Η ικανότητα του ορού του νεογνού να οψωνιοποιήσει παθογόνους οργανισμούς αποτελεί βασική αμυντική λειτουργία κατά τις πρώτες ημέρες ζωής. Η λειτουργία αυτή εξαρτάται, κατά κύριο λόγο, από την περιεκτικότητα στο νεογνικό πλάσμα ορισμένων πρωτεϊνών, των οψονινών. Οι κυριότερες μέχρι σήμερα γνωστές οψονίνες είναι οι ανοσοσφαιρίνες, τα συστατικά C3 και C4 του συμπληρώματος και η ινοδεσμίνη. Τα συστατικά του συμπληρώματος επίσης δεν περνούν τον πλακούντα και τα επίπεδα εξαρτώνται κυρίως από την ωρίμανση του εμβρυϊκού ήπατος, και κατά συνέπεια από την ηλικία κύησης (145,279). Το C3 και C4 φαίνεται σημαντικά ψηλότερο στα φυσιολογικά ΤΜ τον 1^ο μήνα ζωής (Πίνακας 8Α), εντούτοις στη διάρκεια λοίμωξης δεν φαίνεται να διαφέρουν σημαντικά (Πίνακας 8Β) ούτε στα πρόωρα ούτε στα τελειόμηνα με πιθανή λοίμωξη και σήψη. Αρα φαίνεται ότι τόσο τα πρόωρα όσο και τα τελειόμηνα συμπεριφέρονται με τον ίδιο στη διάρκεια της λοίμωξης πλην της ψηλότερης τιμής της C4 που παρατηρείται στα ΤΜ στην αρχή της λοίμωξης. Διαφαίνεται μια καθυστέρηση στην αντίδραση των προώρων ως προς την αύξηση του C4.

Οι κυτταροκίνες είναι οι πιο συχνά αναφερόμενοι μεσολαβητές που εμπλέκονται στην έναρξη της παθοφυσιολογικών φαινομένων που οδηγούν στο σύνδρομο του σηπτικού shock, ιδιαίτερα η υπερβολική παραγωγή των προφλεγμονωδών κυτταροκινών IL-1b, TNFα, και IL-6 (280-282). Διάφορες μελέτες σε ενήλικες (283,284), παιδιά (285) και νεογνά με σήψη (170,286-288) έχουν δείξει ότι τα επίπεδά τους στον ορό είναι αυξημένα κατά τη διάρκεια της νόσου. Επιπλέον, ορισμένες μελέτες δείχνουν ότι η μεγάλη αύξηση των επιπέδων των κυτταροκινών αυτών είναι δυνατό να σχετίζονται με τη βαρύτητα και έκβαση της σηψαιμίας (280,287-289). Και στην παρούσα μελέτη, τα νεογνά, και ειδικά πρόωρα με σήψη που είχαν αυξημένα επίπεδα των κυτταροκινών έχουν κακή πρόγνωση. Η IL-6 στην πορεία της νεογνικής σήψης παράγεται πρώιμα και είχε την υψηλότερη τιμή. Αυτή η ιδιότητα της IL-6 την έκανε χρήσιμη σαν ένα πολύ πρώιμο δείκτη λοίμωξης, αλλά εξαιτίας του βραχέος χρόνου ημίσειας ζωής δεν μπορούμε να βασιστούμε μόνο σ' αυτό το δείκτη για τη διάγνωση της λοίμωξης (238). Η IL-1b είναι λιγότερο ικανοποιητικός δείκτης. Αντίθετα με τα μεγαλύτερα παιδιά και ενήλικες, τα νεογνά ιδίως τα πρόωρα, δεν αντιδρούν με πυρετό στις λοιμώξεις. Τα δεδομένα μας δείχνουν ότι οι συγκεντρώσεις της IL-1b στα νεογνά με σήψη ήταν σημαντικά χαμηλές. Φαίνεται ότι τα μονοκύτταρα των προώρων είναι ανίκανα να εκκρίνουν αρκετή IL-1b για να προκαλέσουν πυρετό κατά τη σήψη και επομένως η IL-1b είναι ένα συγκριτικά μη ευαίσθητος δείκτης της νεογνικής λοίμωξης.



Προηγούμενες μελέτες (241) δείχνουν αύξηση TNF α και IL-6 σε πρόωρα με σήψη με μέση ΗΚ 33 εβδομάδες. Στην παρούσα μελέτη στα πρόωρα ο TNF- α είναι >70 pg/ml και η IL-6 είναι >150 pg/ml, χαμηλότερη από την αναφερθείσα μέση τιμή στην ανωτέρα μελέτη (>500 pg/ml). Αυτό μπορεί να οφείλεται στην βαρύτητα της σήψης ή στο ότι η μέση ηλικία κύησης σε εκείνη την μελέτη ήταν 33 εβδομάδες. Στην παρούσα μελέτη τόσο στα νεογνά με σήψη που επιβίωσαν όσο και σε αυτά που κατέληξαν, τα περισσότερα είχαν ΗΚ <28 εβδομάδων στην ομάδα που κατέληξαν και <30 εβδομάδες στην ομάδα που επιβίωσαν.

Υψηλές τιμές TNF- α και IL-6 αναφέρονται σε πολύ χαμηλού βάρους νεογνά με σήψη (173). Στην παρούσα μελέτη, νεογνά με ΗΚ <31 εβδομάδων (n=54), που το μέσο ΒΓ αντιστοιχεί σε 1500 g είχαν IL-6 76 pg/ml και 70 pg/ml τις πρώτες 72 ώρες σε σύγκριση με 11 pg/ml και 15 pg/ml σε νεογνά με ΗΚ >31 εβδομάδες (n=40, p<0.001 και <0.001 αντίστοιχα), διαφορά που επέμενε και μετά το πέρας της αγωγής: 67 pg/ml στα <31 εβδ. σε σύγκριση με 9 pg/ml (p<0.0001) στα >31 εβδ. Ο TNF- α ήταν επίσης ψηλότερος (p<0.0001): 46 pg/ml, 40 pg/ml και 26 pg/ml στα <31 εβδ. σε σύγκριση με 10.3 pg/ml, 10.3 pg/ml, 6.5 pg/ml στα >31 εβδ. Ίσως το φαινόμενο «λοίμωξη» σε πρόωρα να πυροδοτεί αντιδράσεις που λόγω ανωριμότητας ή έλλειψης ανασταλτικών παραγόντων είναι εντονότερη και διαρκεί περισσότερο. Σημειωτέον ότι η IL-1 β παραμένει αυξημένη 72 ώρες μετά την έναρξη αγωγής (2^η αιμοληψία) στα ΤΜ με λοίμωξη, ενώ η IL-6 και TNF- α έχουν αρχίσει να υποχωρούν 72 ώρες μετά την έναρξη της αγωγής. Τουναντίον, μετά την αγωγή τα επίπεδα IL-6 και TNF παραμένουν αυξημένα, και αυτό ίσως σημαίνει μη κατάλληλη αντίδραση ενός ανώριμου ανοσοποιητικού για τα πρόωρα, κατά την οποία τόσο η IL-6 και ο TNF- α εξακολουθούν να παραμένουν αυξημένα μετά το πέρας της αγωγής. Η IL-6 δεν φαίνεται να αυξάνει πολύ σε νεογνά με πιθανή λοίμωξη σε σύγκριση με τον TNF- α και την IL-6 στη νεογνική σήψη (241)

Υψηλές συγκεντρώσεις στο πλάσμα IL-6 και TNF- α αναφέρεται να δηλώνουν σοβαρή λοίμωξη, αν και όχι φτωχή πρόγνωση (173). Ο TNF- α είναι γνωστό ότι προάγει την κυτταρική ανοσία και τη φαγοκυτταρική δραστηριότητα ειδικά στις ενδοκυτταρικές λοιμώξεις. Τα Τ-βοηθητικά κύτταρα που παράγουν ιντερλευκίνες μεταξύ αυτών και την IL-6 υποστηρίζουν τη χυμική ανοσία και την παραγωγή αντισωμάτων και επιπλέον παίζουν ρόλο στις καταστάσεις stress. Εντούτοις ο μηχανισμός ρύθμισης και η επίδρασή τους στην έκβαση δεν είναι γνωστός (173). Τα επίπεδα TNF που παρατηρήθηκαν σε πρόωρα και ΤΜ με σήψη είναι περίπου διπλάσια από τα πρόωρα και ΤΜ με πιθανή λοίμωξη. Η δε IL-6 φαίνεται 5 φορές ψηλότερη προ της έναρξης αγωγής στα νεογνά με σήψη (Πίνακες 12 και 13). Σε όλα τα νεογνά που κατέληξαν (πλην ενός) η IL-6 φαίνεται να αυξάνεται. Η IL-6 θεωρείται ίδια με τον ενεργοποιό παράγοντα 2 των Β-κυττάρων (144). Επίσης, η IL-6, η IL-1 και ο TNF έχουν ενοχοποιηθεί ότι «εισάγουν» διάφορες ηπατικές πρωτεΐνες οξείας φάσης. Η IL-1 αυξάνει την IL-6 στα θυμοκύτταρα και αυξάνει την ευαισθησία τους στην IL-6. Και οι IL-1 και η IL-6



αυξάνουν την παραγωγή ανοσοσφαιρινών και ίσως έτσι εξηγείται η μεγαλύτερη αύξησή τους στα νεογνά πρόωρα και ΤΜ με σήψη (144).

Τουναντίον η CRP δεν φαίνεται να έχει προγνωστική αξία, εφόσον μειώθηκε τόσο στα νεογνά που κατέληξαν όσο και σ' αυτά που δεν κατέληξαν και ίσως αντανακλά «θέση μάχης» του οργανισμού σε μια δύσκολα ελεγχόμενη λοίμωξη. Η CRP και οι διαδοχικές μετρήσεις της έχουν βοηθήσει στη διάγνωση τόσο της πρώιμης όσο και της όψιμης λοίμωξης και για τη διακοπή της αγωγής με αντιβιοτικά της πιθανής λοίμωξης (236,262). Οι Dollner και συν.(290) ανέφεραν ότι η παρουσία IL-6 (>50 pg/ml) και η CRP (≥ 10 mg/L) αυξάνουν την ευαισθησία της διάγνωσης στο 96% και έχουν ισχυρότερη αρνητική προγνωστική αξία 99% παρά θετική προγνωστική που είναι χαμηλή (46%). Οι Messer και συν. (291) προτείνουν επίπεδα IL-6 >100 pg/ml και θεωρούν ότι η ευαισθησία της CRP αυξάνει μετά την 12^η ώρα για τη διάγνωση των πρόωρων λοιμώξεων.

ΣΗΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- ✓ Δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ φυσιολογικών πρόωρων και τελειόμηνων πλη των ολικών λευκών και του απόλυτου αριθμού πολυμορφοκυττάρων που είναι χαμηλότερος στα πρόωρα την 1^η ημέρα ζωής
- ✓ Οι υποπληθυσμοί λεμφοκυττάρων δεν διέφεραν μεταξύ φυσιολογικών τελειόμηνων και πρόωρων τον 1^ο μήνα ζωής
- ✓ Οι ανοσοσφαιρίνες IgA και IgM ήταν σημαντικά ψηλότερες σε φυσιολογικά τελειόμηνα σε σύγκριση με τα απρόωρα. Η IgG ήταν σημαντικά ψηλότερη σε φυσιολογικά τελειόμηνα τον 1^ο μήνα ζωής
- ✓ Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι δεν υπάρχει ένας αποκλειστικός δείκτης λοίμωξης
- ✓ Τα λευκά δεν είναι αξιόπιστος δείκτης λοίμωξης
- ✓ Τα αιμοπετάλια και ο απόλυτος αριθμός λεμφοκυττάρων αποτελούν ένδειξη για λοίμωξη.
- ✓ Τα C3, C4 είναι εξαρτώμενα από την ηλικία κύησης και είναι ψηλότερα στα φυσιολογικά ΤΜ αλλά πρόωρα και τελειόμηνα νεογνά ενώ στη διάρκεια της λοίμωξης είναι παρόμοια
- ✓ Για τον κλινικό νεογνολόγο φαίνεται ότι η ταυτόχρονη μέτρηση CRP και IL-6 μπορεί να βοηθήσουν καθοριστικά στη διάγνωση για την ύπαρξη της σήψης.
- ✓ Παραμονή IL-6 σε ψηλά επίπεδα 72 ώρες μετά την έναρξη της αντιβιοτικής αγωγής αποτελούν προγνωστικό σημείο κακής έκβασης.



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΥΛΙΚΟ - ΜΕΘΟΔΟΙ

Μελετήθηκαν συνολικά 200 νεογνά (πρόωρα και ΤΜ). Πενήντα τελειόμηνα και πενήντα πρόωρα δεν είχαν ούτε κλινικά ούτε εργαστηριακά στοιχεία λοίμωξης και αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου ή τα «φυσιολογικά νεογνά». Τα υπόλοιπα 100 ($n=50$ τελειόμηνα και 50 πρόωρα) είχαν εργαστηριακά ευρήματα συνηγορούντα για λοίμωξη (πιθανή ή επιβεβαιωμένη).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ο ολικός αριθμός λευκοκυττάρων και ουδετερόφιλων βρέθηκε σημαντικά χαμηλότερος ($p<0.01$) στα φυσιολογικά πρόωρα την 1^η ημέρα ζωής σε σύγκριση με τα φυσιολογικά ΤΜ. Στην περίπτωση λοιμώξεων επιπλέον των σημαντικά χαμηλότερων λευκών ($p<0.001$) προ της έναρξης αγωγής για λήμωξη στα πρόωρα ήταν σημαντικά χαμηλότερος σε σύγκριση με τα τελειόμηνα ο απόλυτος αριθμός λεμφοκυττάρων ($p<0.0001$) και ο αριθμός των αιμοπεταλίων ($p<0.001$). Το συμπλήρωμα C3, C4 βρέθηκε ψηλότερο στη διάρκεια του 1^{ου} μήνα ζωής στα φυσιολογικά ΤΜ σε σύγκριση με τα πρόωρα ενώ στην περίπτωση λοίμωξης δεν υπήρχε σημαντική διαφορά. Τα CD3+, CD4+, και CD8+, NK και B cells δεν διαφέρουν σημαντικά στα φυσιολογικά νεογνά πρόωρα και ΤΜ. Οι ίδιοι υποπληθυσμοί λεμφοκυττάρων ήταν χαμηλότεροι στα πρόωρα νεογνά με ΠΛ ($p<0.05$) και στα νεογνά με σήψη ($p<0.001$) σε σύγκριση με τα αντίστοιχα ΤΜ. Η αύξηση έως και 5 φορές της IL-6 και του TNF παρατηρήθηκε σε ΤΜ και πρόωρα νεογνά με σήψη.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη φαίνεται ότι τα λευκά δεν βοηθούν στην πρώιμη διάγνωση της σήψης, ενώ η IL-6, TNF και C-αντιδρώσα πρωτεΐνη βοηθούν στη διάγνωση. Η δε παραμονή αυξημένης IL-6 72 ώρες μετά την έναρξη της αγωγής φαίνεται να είναι κακό προγνωστικό σημείο.



SUMMARY

Function of immune system in preterms and fullterms the 1st month of life

Efthalia Hotoura
Paediatrician - Neonatologist

INTRODUCTION

PATIENTS AND METHODS

Two hundred neonates were included in the study (preterms and fullterms). Fifty fullterms and fifty terms had no clinical or laboratory evidence of infection and were considered to be the "normal" or control group. The rest 100 (50 preterms and 50 fullterms) had laboratory evidence for infection (suspected or confirmed).

RESULTS

Total white cell (WCC) count was lower ($p < 0.01$) in the normal preterms vs normal fullterms. In infected preterm neonates in addition to the lower WCC ($p < 0.0001$), absolute lymphocyte count ($p < 0.0001$) and platelet count ($p < 0.0001$) before initiation of therapy for infection were significant lower vs the fullterm.



Normal fullterms had higher serum complement level vs the preterms, while during infection there was no significant difference. T lymphocyte subpopulations (CD3+, CD4+ and CD8+), NK and B cells were similar in normal preterms and fullterms. Similar lymphocytes were lower in preterms with suspected infection ($p < 0.05$) and sepsis ($p < 0.01$) vs the respective fullterm groups, suggesting the immaturity of the immunity in the preterm infant. TNF and IL-6 in fullterms and preterms with sepsis was up to 5 fold higher vs the group with suspected infection.

CONCLUSIONS

In the present study appears that WCC are not helpful in the diagnosis of infection while the combination of IL-6, TNF and C-reactive protein are reliable for early diagnosis. Persistence of high IL-6 levels 72 hours after the initiation of therapy are indicative of an adverse outcome.

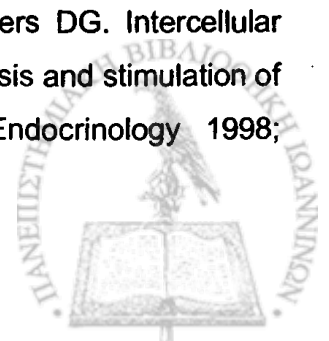


ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Escobar GJ, Fischer A, Li DK, Kremers R, Armstrong MA. Score for neonatal acute physiology: validation in three Kaiser permanent neonatal intensive care units. *Pediatrics* 1995; 96: 918-922.
2. Weir D.M, Stewart J. *Immunology*. Churchill Livingstone, London Ελληνική έκδοση ,Χ Ζεβελεκάκης 1993.Κεφαλαιο 1. Ανοσια. pp3-18
3. Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology*. Churchil Livingston, Edinburgh Gower Med, Publ., London 1993, Ελληνική έκδοση Μαρία Παρισιάνου 1995. Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή στο ανοσοποιητικό σύστημα. pp 1-1.12
4. Janeway C.A, Travers P. *Immunobiology: the immune system in health and disease*. Churchil Livingston Edinburgh Gower Med, Publ, London 1996, Ελληνική Εκδοση Π Χ Πασχαλίδης. Κεφάλαιο1. Βασικές αρχές Ανοσολογίας. pp1.1-1.32
5. Kuppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K. Cellular origin of human B-cell lymphomas. *The New England Journal of Medicine* 1999; 341: 1520-1529.
6. Brewer WJ, Randall DT, Parkhouse RE, Corley BR. IgM hexamers. *Immunology Today*, 1994; 15 (4):165-168.
7. van de Winkel J.G.J, Capel J.A.R Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. *Immunology Today* 1993; 14 (5):215-221.
8. Mazanec BM, Nedrud GJ, Kaetzel S.C, Lamm E.M. A threetiered view of the role of IgA in mucosal defence. *Immunology Today*, 1993; 14(9): 430-435
9. Moller G et all. Immunoglobulin D: structure, synthesis, membrane representation and function. *Immunol. Rev* 1977; 37.
10. Romagnani S.L. Regulation and deregulation of human IgE synthesis. *Immunol. Today*, 1990, 1:316-21.
11. Cambell RD. Law SKA, Reid KBM, Sim RB. Structure, organization and regulation of the complement genes. *Annu Rev Immunol* 1988;6:161-95.
12. Cooper NR. The classical complement pathway: activation and regulation of the first complement component. *Adv Immunol* 1985; 37:151-216.



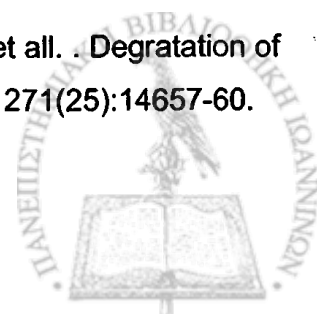
13. Lloyd AR, Popenheim SS. Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. *Immunol Today* 1992; 13: 169.
14. Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 1999;17:593-623
15. Imfor BA, Dagremont C, Deugnier MA, Dunn D. A chemotactic assay enabling recovery of cells after migration. *Immunological Methods* 1990;4:235-249.
16. Bazan JF, Timans JC, Kastelein RA. A newly defined interleukin-1. *Nature* 1996;379: 591.
17. Arend WP, Malyak M, Guthrie CJ, Gabay C. Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. *Annual Review of Immunology* 1998;16:27-55.
18. Kohno K, Kurimoto M. Interleukin 18, a cytokine which resembles IL-1 structurally and IL-12 functionally but exerts its effect independently of both. *Clin Immunol Immunopathol.* 1998; 86 (1): 11-5.
19. Burger D, Dayer JM. Cytokines, acute-phase proteins, and hormones: IL-1 and TNF- α production in contact-mediated activation of monocytes by T-lymphocytes. *Ann N Y Acad Sci.* 2002; 966: 464-73.
20. Dinarello CA. The biological properties of Interleukin-1. *Eur Cytokine Netw* 1994; 5(6):517-31.
21. Sporri B, Bickel M, Limat A, Waelti ER, Hunziker T, Wiesmann UN. Juxtacrine stimulation of cytokine production in cocultures of human dermal fibroblasts and T cells. *Cytokine* 1996;8(8):631-5.
22. Hu J, Cotgreave IA. Differential regulation of gap junctions by proinflammatory mediators in vitro. *J Clin Invest* 1997; 99 (10):2312-6.
23. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood.* 1996; 87(6):2095-147.
24. Kusano K, Miyaura C, Inada M, Tamura T, Ito A, Nagase H, et al. Regulation of matrix metalloproteinase MMP-2,-3,-9, and -13 by interleukin-1 and interleukin-6 in mouse calvaria: association of MMP induction with bone resorption. *Endocrinology* 1998; 139(3) 1338-1345.
25. Dodds RA, Merry K, Littlewood A, Gowen M. Expression of mRNA for IL-1b, IL-6 and TGF β 1 in developing human bone and cartilage. *J Histochem Cytochem* 1994; 42(6): 733-744.
26. Mandrup-Poulsen T. The role of Interleukin-1 in the pathogenesis of IDDM. *Diabetologia* 1996; 39(9): 1005-1029.
27. Ling Z, Chen MC, Smismans A, Pavlovic D, Eizirik DL, Pipeleers DG. Intercellular differences in Interleukin-1 β -induced suppression of insulin synthesis and stimulation of noninsulin protein synthesis by rat pancreatic beta-cells. *Endocrinology* 1998; 139(4):1540-1545.



28. Plata-Salaman CR, Ilyin SE. Interleukin-1beta-induced modulation of the hypothalamic IL-1beta system, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta mRNAs in obese (fa/fa) and lean Fa/Fa Zucker rats: implications to IL-1beta feedback systems and cytokine- cytokine interactions. *J Neurosci Res* 1999; 49(5):541-550.
29. Plata-Salaman CR. Meal patterns in response to the intracerebroventricular administration of Interleukin-1beta in rats. *Physiol Behav* 1994; 55(4): 727-733.
30. Hansen MK, Taishi P, Chen Z, Krueger JM. Vagotomy blocks the induction of interleukin-1beta (IL-1beta) mRNA in the brain of rats in response to systemic IL-beta. *J Neurosci* 1998;18 (6):2247-2253.
31. Goehler LE, Relton JK, Dripps D, Tartaglia N, Maier SF, Watkins LR. Vagal paraganglia bind biotinylated interleukin-1 receptor antagonist: a possible mechanism for immune-to-brain communication. *Brain Res Bull* 1997; 43(3):357-364.
32. Zheng H, Fletcher D, Kozak W, Jiang M, Hofman KJ, Conn CA et al. Resistance to fever induction and impaired acute-phase response in interleukin-1 beta-deficient mice. *Immunity* 1995;3 (1):9-19.
33. Ling ZD, Potter ED, Lipton JW, Carvey PM. Differentiation of mesencephalic progenitor cells into dopaminergic neurons by cytokines. *Exp Neurol* 1998; 149(2):411-23.
34. Shadiack AM, Hart RP, Carlson CD, Jonakait GM. Interleukin-1 induces substance P in sympathetic ganglia through the induction of leukemia inhibitory factor (LIF). *J Neurosci* 1993; 13(6): 2601-2609.
35. da Cunha A, Jefferson JA, Jackson RW, Vitkovic L. Glial cell-specific mechanisms of TGF-beta 1 induction by IL-1 in cerebral cortex. *J Neuroimmunol* 1993; 42(1):71-85.
36. Fini ME, Strissel KJ, Girard MT, Mays JW, Rinehart WB. Interleukin 1 alpha mediates collagenase synthesis stimulated by phorbol 12-myristate 13-acetate. *J Biol Chem* 1994; 269(15):11291-11298.
37. Tsukui T, Kikuchi K, Mabuchi A, Sudo T, Sakamoto T, Asano G et al. Production of interleukin-1 by primary cultured parenchymal liver cells (hepatocytes). *Exp Cell Res* 1994; 210(2):172-176.
38. Yu HS, Chang KL, Yu CL, Chen GS. Low-energy helium-neon laser irradiation stimulates interleukin-1 alpha and interleukin-8 release from cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1996; 107(4):593-596.
39. Krzesicki RF, Winterrowd GE, Brashler JR, Hatfield CA, Griffin RL, Fidler SF et al. Identification of cytokine and adhesion molecule mRNA in murine lung tissue and Isolated T cells and eosinophils semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 16(6):693-701.



40. Ghanekar S, Zheng L, Logar A, Navratil J, Borowski L, Gupta P et al. Cytokine expression by human peripheral blood dendritic cells stimulated in vitro with HIV-1 and herpes simplex virus. *J Immunol* 1996; 157(9):4028-4036.
41. Brody DT, Durum SK. Membrane IL-1:IL-1 alpha precursor binds to the plasma membrane via a lectin-like interaction. *J Immunol* 1989; 143(4):1183-1187.
42. Mallardo M, Giordano V, Dragonetti E, Scala G, Quinto I. DNA damaging agents increase the stability of interleukin-1 alpha, interleukin-beta, and interleukin-6 transcripts and the production of the relative proteins. *J Biol Chem* 1994; 269(21):14899-14902.
43. Gonzalez-Hernandez JA, Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Gschwend JE, Gwosdow A, Jirikowski G et al. IL-1 is expressed in human adrenal gland in vivo. Possible role in a local immune-adrenal axis. *Clin Exp Immunol* 1995; 99(1):137-141.
44. Jokhi PP, King A, Loke YW. Cytokine production and cytokine receptor expression by cells of the human first trimester placental-uterine interface. *Cytokine* 1997; 9(2):126-137.
45. Wewers MD, Dare HA, Winnard AV, Parker JM, Miller DK. IL-1 beta-converting enzyme (ICE) is present and functional in human alveolar macrophages: macrophage IL-1 beta release limitation is ICE independent. *J Immunol* 1997; 159(12): 5964-5972.
46. Warner SJ, Auger KR, Libby P. Interleukin 1 induces interleukin 1. II. Recombinant human interleukin-1 induces Interleukin1 production by adult human vascular endothelial cells. *J Immunol* 1987;139: 1911-1917.
47. Lundqvist EN, Egelrud T. Biologically active, alternatively processed interleukin-1 beta in psoriatic scales. *Eur J Immunol* 1997; 27(9):2165-2171
48. Jiang S, Levine JD, Fu Y, Deng B, London R, Groopman JE, et al. Cytokine production by primary bone marrow megakaryocytes. *Blood* 1994; 84(12):4151-4156.
49. Loppnow H, Bil R, Hirt S, Schonbeck U, Herzberg M, Werdan K et al. Platelet-derived interleukin-1 induces cytokine production, but not proliferation of human vascular smooth muscle cells. *Blood* 1998; 91(1):134-141.
50. Malyak M, Smith MF Jr, Abel AA, Arend WP. Peripheral blood neutrophil production of interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 beta. *J Clin Immunol* 1994; 14(1):20-30.
51. Bailie K.E.M, Irvine A.E, Bridges J.M, McClure BG. Granulocyte and granulocyte-macrophage colony-stimulating factors in cord and maternal serum at delivery. *Pediatric Research* 1994;35:164-168.
52. Ito A, Mykaiyama A, Itoh Y, Nagase H, Thogersen IB, Enghild JJ, et al. . Degradation of interleukin 1 beta by matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1996; 271(25):14657-60.



53. Kupper TS, Groves RW. The interleukin-1 axis and cutaneous inflammation. *J Invest Dermatol* 1995; 105(1 Suppl): 62S-66S.
54. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996; 87(6):2095-147.
55. Mosmann TR. Properties and functions of interleukin-10. *Adv Immunol* 1994; 56:1-26.
56. Kishimoto T. The biology of interleukin-6. *Blood* 1989; 74(1): 1-10.
57. Sad S, Marcotte R, Mosmann TR. Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8+Tcells into cytotoxic CD8+T cells secreting Th1 or Th2 cytokines. *Immunity* 1995; 2(3):271-279.
58. May LT, Helfgott DC, Sehgal PB. Anti-beta-interferon antibodies inhibit the increased expression of HLA-B7 mRNA in tumor necrosis factor-treated human fibroblasts: structural studies of the beta 2 interferon involved. *Proc Acad Sci USA* 1986; 83(23):8957-8961.
59. Cichy J, Rose-John S, Pryjma J, Travis J. Effect of soluble interleukin-6 receptor on interleukin-6 synthesis in human skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 227(2):318-321.
60. Miyazawa K, Mori A, Yamamoto K, Okudaira H. Constitutive transcription of the human interleukin-6 gene rheumatoid synoviocytes: spontaneous activation of NF-kappaB and CBF1. *Am J Pathol* 1998; 152(3):793- 803.
61. Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83(3): 847-850.
62. Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH, Akatsu T, Abe E, Nakamura Y, et al. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J Immunol* 1990; 145(10):3297-3303.
63. Punnonen J. The role of interleukin-2 in the regulation of proliferation and IgM synthesis of human newborn mononuclear cells. *Clin.exp. Immunol.* 1989; 75:421-426.
64. Xin X, Cai Y, Matsumoto K, Agui T. Endothelin-induced interleukin-6 production by rat aortic endothelial cells. *Endocrinology* 1995; 136(1):132-137.
65. Marz P, Cheng JG, Gadiant RA, Patterson PH, Stoyan T, Otten U et al. Sympathetic neurons can produce and respond to interleukin-6. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(6):3251-3256.
66. Gagari E, Tsai M, Lantz CS, Fox LG, Galli SJ. Differential release of mast cell interleukin-6 via c-kit. *Blood* 1997; 89(8):2654-2663.
67. Cumberbatch M, Dearman RJ, Kimber I. Constitutive and inducible expression of interleukin-6 by Langerhans cells and lymph node dendritic cells. *Immunology* 1996; 87(4):513-518.



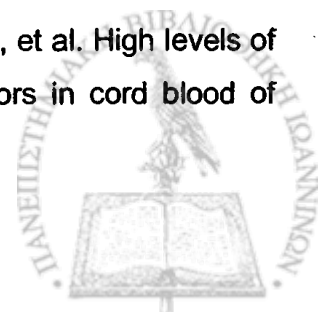
68. Ericson SG, Zhao Y, Gao H, Miller KL, Gibson LF, Lynch JP, et al. Interleukin-6 production by human neutrophils after Fc-receptor cross-linking or exposure to granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 1998; 91(6):2099-20107.
69. Melani C, Mattia GF, Silvani A, Care A, Rivoltini L, Parmiani G. Interleukin-6 expression in human neutrophil and eosinophil peripheral blood granulocytes. *Blood* 1993;81(10):2744-2749.
70. Kestler DP, Agarwal S, Cobb J, Goldstein KM, Hall RE. Detection and analysis of an alternatively spliced isoform of interleukin-6 mRNA in peripheral blood mononuclear cells. *Blood* 1995;86(12):4559-4567.
71. Spencer NF, Daynes RA. IL-12 directly stimulates expression of IL-10 by CD5+B cells and IL-6 by both CD5+ and CD5-B cells: possible involvement in age-associated cytokine dysregulation. *Int Immunol* 1997; 9(5):745-754.
72. D'Auria L, Bonifati C, Mussi A, D'Agosto G, De Simone C, Giacalone B. Cytokines in the sera of patients with pemphigus vulgaris: interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha levels are significantly increased as compared to healthy subjects and correlate with disease activity. *Eur Cytokine Netw* 1997;8 (4):383-387.
73. Yamamura M, Yamada Y, Momita S, Kamihira S, Tomonaga M. Circulating interleukin-6 levels are elevated in adult T-cell leukaemia/lymphoma patients and correlate with adverse clinical features and survival. *Br J Haematol* 1998;100(1):129-134.
74. Angstwurm MW, Gartner R, Ziegler-Heitbroc HW. Cyclic plasma IL-6 levels during normal menstrual cycle. *Cytokine* 1997;9 (5):370-374.
75. Mouawad R, Benhammouda A, Rixe O, Antoine EC, Borel C, Weil M, et al. Endogenous IL-6 levels in patients with metastatic malignant melanoma: correlation with tumor burden. *Clin Cancer Res* 1996; 2(8):1405-1409.
76. Sakamoto K, Arakawa H, Mita S, Ishiko T, Ikei S, Egami H. Elevation of circulating IL-6 after surgery: factors influencing the serum level. *Cytokine* 1994; 6(2):181-186.
77. Barton BE. IL-6: insights into novel biological activities. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 85(1):16-20.
78. Van Snick J. Interleukin-6 : an overview. *Annu Rev Immunol* 1990; 8:253-278.
79. Cerutti A, Zan H, Schaffer A, Bergsagel L, Harindranath N, Max EE, et al. CD40 ligand and appropriate cytokines induce switching to IgG, IgA, and IgE and coordinated germinal center and plasmacytoid phenotypic differentiation in a human monoclonal IgM+IgD+b cell line. *J Immunol* 1998; 160 (5):2145-157.
80. Hibi M, Nakajima K, Hirano T. IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system. *J Mol Med* 1995; 74(1): 1-12.



81. Haegeman G, Content J, Volckaert G, Derynck R, Tavernier J, Fiers W. Structural analysis of the sequence coding for an inducible 26-kDa protein in human fibroblasts. *Eur J Biochem* 1986; 159(3):2529-2537.
82. Zilberstein A, Ruggieri R, Korn JH, Revel M. Structure and expression of cDNA and genes for human interferon-beta 2, distinct species inducible by growth- stimulatory cytokines. *EMBO J* 1986; 5(10): 2529-2537.
83. Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T et al. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 1986; 324(6092): 73-76.
84. Nicholas J, Ruvolo VR, Burns WH, Sandford G, Wan X, Ciuffo D, et al. Kaposi sarcoma-associated human herpesvirus-8 encodes homologues of macrophage inflammatory protein-1 and Interleukin-6. *Nat Med* 1997; 3(3): 287-292.
85. Poupart P, Vandenabeele P, Cayphas S, Van Snick J, Haegeman G, Kruys V et al . B cell growth modulating and differentiating activity of recombinant human 26-kd protein (BSF-2, HuIFN-beta 2, HPGF). *EMBO J* 1987; 6(5):1219-1224
86. Northemann W, Braciak TA, Hattori M, Lee F, Fey GH. Structure of the rat interleukin 6 gene and its expression in macrophage –derived cells. *J Biol Chem* 1989; 264(27):16072-16082.
87. Coulie PG, Stevens M, Van Snick J. High- and low-affinity receptors for murine interleukin 6. Distinct distribution on B and T cells. *Eur J Immunol* 1989; 19(11):2107-2114.
88. Jung HC, Eckmann L, Yang SK, Panja A, Fierer J, Morzyska-Wroblewska E, et al. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J Clin Invest* 1995; 95(1):55-65.
89. Gadiant RA, Lachmund A, Unsicker K, Otten U. Expression of interleukin-6 (IL-6) and IL-6 receptor mRNA in rat adrenal medulla. *Neurosci Lett* 1995; 194 (1-2):17-20.
90. Kuppner MC, McKillop-Smith S, Forrester JV. TGF-beta and IL-1 beta act in synergy to enhance IL-6 and IL-8 mRNA levels and IL-6 production by human retinal pigment epithelial cells. *Immunology* 1995; 84(2):265-271.
91. Beutler B, Greenwald D, Hulmes JD, Chang M, Pan YC, Mathison J et al. Identity of tumor necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature* 1985; 316:552-554.
92. Ruddle NH. Tumor necrosis factor (TNF-alpha) and lymphotoxin (TNF-beta). *Curr Opin Immunol* 1992; 4(3): 327-332.
93. Vassalli P. The pathophysiology of Tumor Necrosis Factors. *Annu Rev Immunol* 1992; 10: 411-452 .



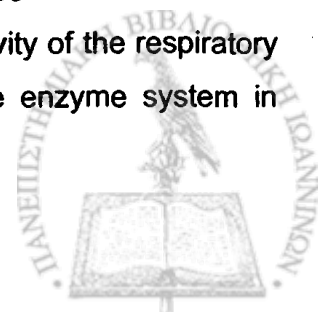
94. Pujol-Borell R, Todd I, Doshi M, Boltazzo GF, Sutton R, Grey D et al. HLA class II induction in human cells by interferon-gamma plus tumor necrosis factor or lymphotoxin. *Nature* 1987; 326: 304-306.
95. Waage A, Halstensen A, Espevic T. Association between tumor necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease. *Lancet* 1987 ;1: 355-357.
96. Polin R, Geme J. Neonatal sepsis. *Adv Ped Infect Dis* 1992; 7.
97. Carr Robert Neutrophil production and function in newborn infants. *Brit J Haematol* 2000; 110: 18-28.
98. Schelonka RL, Hall RB, Trippett TM. et al. Differentiation of segmented and band neutrophils during the early newborn period. *J Pediatr* 1995;127:298-300
99. Chiesa C, Panero A, Osborn JF, Simonetti AS, Pacifico L. Diagnosis of neonatal sepsis: A clinical and laboratory challenge. *Clinic Chemistry* 2004; 50 (2):279-287.
100. Christensen RD, Shigeoka AO, Hill HR, Rothstein G. Circulating and storage neutrophil changes in experimental type II group B streptococcal sepsis. *Pediatr Res* 1980; 14(6):806-808.
101. Christensen RD, Rothstein G. Pre- and postnatal development of granulocytic stem cells (CFUc) in the rat. *Pediatr Res* 1984;18: 599-602.
102. Christensen RD, Harper TE, Rothstein G. Granulocyte-macrophage progenitor cell (CFU-GM) in term and preterm neonates. *J Pediatr* 1986; 109:1047-1051.
103. Monroe BL, Weinberg AG, Rosenfeld CR, Browne R. The neonatal blood count in health and disease. I. Reference values for neutrophilic cells. *J Pediatr* 1979; 95(1):89-98.
104. Kjeldsen L, Sengelov H, Lollike K, Borregaard N. Granules and Secretory Vesicles in Human Neonatal Neutrophils. *Pediatric Research* 1996; 40:120-129.
105. Schelonka RL, Yoder BA, des Jardins SE, Hall RB, Butler JT. Peripheral leukocyte count and leucocyte indexes in healthy newborn term infants. *J Pediatr* 1994;125: 603-606.
106. Cairo MS, Suen Y, Knoppel B, Dana R, parc L, Clark S, et al. Decreased G-CSF and IL-3 production and gene expression from mononuclear cells of newborn infants. *Pediatr Res* 1992;31 :574-578.
107. Schibler KR, Liechty KW, White WL, Christensen RD. Production of granulocyte colony-stimulating factor in vitro by monocytes from preterm and term neonates. *Blood* 1993;82: 2478-2484.
108. Laver J, Duncan E, Abboud M, Gasparetto C, Sahden I, Warren D, et al. High levels of granulocyte and granulocyte-macrophage colony-stimulating factors in cord blood of normal full-term neonates *J Pediatr* 1990; 116:627-632.



109. Gessler P, Kirchmann N, Kientsch-Engel R, Haas N, Lasch P, Kachel W. Serum concentrations of granulocyte colony stimulating factor in healthy term and preterm neonates in those with various diseases including bacter infections. *Blood* 1993;82 :3177-3182.
110. Bailie KEM, Irving AE, Bridges GM, MacClure BG. Granulocyte and granulocyte-macrophage colony-stimulating factors in cord and maternal serum at delivery. *Pediatr Res* 1994; 35:164-168.
111. Drossou V, Kanakoudi F, Tzimouli V, Sarsfidis K, Taparkou F, Bougiouklis D, et al. Impact of prematurity, stress and sepsis on the neutrophil respiratory burst activity of neonates. *Biol Neonate* 1997; 72:201-209.
112. Cairo MS, Gillan ER, Buzby JS, van de Ven C, Suen Y. Circulating steel factor (CSF) and G-CSF levels in preterm and term newborn and adult peripheral blood. *Am J Pediatr Hemat/Oncol* 1993; 15 : 311-315.
113. Wolach B, Gavrieli R, Pomeranz A. Effect of Granulocyte and Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factors (G-CSF and GM-CSF) on Neonatal Neutrophil Functions. *Pediatr Reserch* 2000; 45: 369-373.
114. Ikeno K. Increased granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) levels in neonates with perinatal complications. *Acta Pediatr Jpn* 1994;36:366-370.
115. Kennon C, Overturf G, Bessman S, Sierra E, Smith KJ Brann B. Granulocyte colony-stimulating factor as a marker for bacterial infection in neonates. *J Pediatr* 1996; 128:765-769.
116. Bracho F, Goldman S, Cairo MS. Potential use of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in neonates. *Cur Opin Hematol* 1998; 5:215-220.
117. Yang KD, Hill HR. Neutrophil function disorders: Pathophysiology, prevention and therapy. *J Pediatr* 1991; 119 : 343- 354.
118. Williams TJ, Hellewell PG. Adhesion molecules involved in the mikrovaschlar inflammatory response. *Am Rev Respir Dis* 1992;146: 45-50.
119. Etzioni A. Adhesion molecules-their role in health and disease. *Pediatr Res* 1996; 39:191-198.
120. Hill HR. Biochemical, structural, and functional abnormalities of polymorhnuclear leukocytes in the neonate. *Pediatr Res* 1987; 22 : 375-382.
121. Korchak HM, Rutherford LE, Weissmann G. Stimulus response coupling in the human neutrophil. I. Kinetic analysis of changes in calcium permeability. *J Biol Chem* 1984;259: 4070-4075.



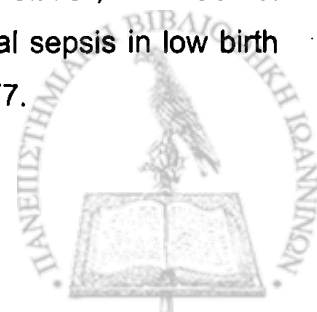
122. Krausse PJ, Herson VC, Boutin-Lebowitz J, Eisenfeld L, Block C, Lobello T, et al. Polymorphonuclear leucocyte adherence and chemotaxis in stressed and healthy neonates. *Pediatr Res* 1986; 20:296-300.
123. Ambruso DR, Stork LC, Gibson BE, Thurman GW. Increased activity of the respiratory burst cord blood neutrophils: Kinetics of the NADPH oxidase enzyme system in subcellular fractions. *Pediatr Res* 1987; 21:205-210.
124. Strauss RG, Snyder EL. Chemotactic peptide binding by intact neutrophils from human neonates. *Pediatr Res* 1984 18:63.
125. Anderson DC, Freeman KLB, Heerdt B. Abnormal stimulated adherence of neonatal granulocytes: Impaired induction of surface MAC-1 by chemotactic factors of secretagogues. *Blood* 1987; 70:740-750.
126. Bruce MC, Baley JE, Medvic KA, Berger M. Impaired surface membrane expression of C3bi but not C3b receptors on neonatal neutrophils. *Pediatr Res* 1987;21 :306-331.
127. Bektas S, Goetze B, Speer CP. Decreased adherence, chemotaxis and phagocytic activities of neutrophils from preterm neonates. *Acta Pediatr Scand* 1990; 79:1031-1038.
128. Chirico G, Motta M, Villani P, Cavazza A and Cardone ML. Late-onset neutropenia in very low birthweight infants. *Acta Pediatr* 2002 ; 438 :104-108.
129. Harris MC, Levitt J, Douglas SD, Gerdes JS, Polin RA. Effect of fibronectin on adherence of neutrophils from newborn infants. *J Clin Microbiol* 1985;21 :243-246.
130. Rebuc N, Gibson A, Finn A, Neutrophil adhesion molecules in term and premature infants: normal or enhanced leucocyte integrins but defective L-selectin expression and shedding. *Clin Exp Immunol* 1995 ; 101 :183-189.
131. Falconer AE, Carr R, Edwards SW. Neutrophils from preterm neonates and adults show similar cell surface receptor expression: analysis using a whole blood assay. *Biol Neonate* 1995 ; 67 :26-33.
132. McEnvoy LT, Zakem-Cloud H, Tosi MF. Total cell content of CR3 (CD11b/CD18) and LFA-1 (CD11a/CD18) in neonatal neutrophils: relationship to gestational age. *Blood* 1996 ; 87:3929-3933.
133. Drossou V, Kanakoudi F, Diamanti E, Tzimouli V, Konstantinidis T, Germenis A et al. Concentrations of main serum opsonins in early infancy. *Arch Dis Child* 1995; 72:F172-F175.
134. Shigeoka AO, Santos JI, Hill HR. Functional analysis of neutrophil granulocytes from healthy, infected, and stressed neonates. *J Pediatr* 1979;95:454-460
135. Ambruso DR, Stork LC, Gibson BE, Thurman GW. Increased activity of the respiratory burst in cord blood neutrophils: kinetics of the NADPH oxidase enzyme system in subcellular fractions. *Pediatr res* 1987; 21(2):205-210.



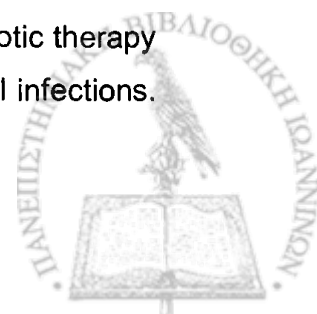
136. Rothe G, Emmendorffer A, Roesler J, Valet G. Flow cytometric measurement of the respiratory burst activity of phagocytes using dihydrhodamine 123. *J Immunol Methods* 1991;138:133-135
137. Driscoll MS, Thomas VL, Ramamurthy RS, Casto DT. Longitudinal evolution of polymorphonuclear leukocyte chemiluminescence in premature infants. *J Pediatr* 1990; 116:429-434.
138. Peden DB, VnDyke K, Ardekani A, Mullett MD, Myerberg DZ, VanDyke C. Diminished chemiluminescent responses of polymorphonuclear leukocytes in severely and moderately preterm neonates. *J Pediatr* 1987;111:904-6.
139. Shigeoka AO, Charette RP, Wyman ML, Hill HR. Defective oxidative metabolic responses of neutrophils from stressed neonates. *J Pediatr* 1981; 98: 392-398.
140. Hodge G, Hodge S, Han P, Haslam R. Multiple leucocyte activation markers to detect neonatal infection. *Clin Exp Immunol* 2004;135: 125-129.
141. English BK, Hammond WP, Lewis DB, Brown CB, Wilson CB. Decreased granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production by human neonatal blood mononuclear cells and T cells. *Pediatr Res* 1992; 31:211-216
142. El-Mohandes AA, Rivas RA, Klang E, Wahl LM, Katona IM. Membrane antigen and ligand receptor expression on neonatal monocytes. *Biol Neonate* 1995;68:308-317.
143. Gillan ER, Christensen RD, Suen Y, Ellis R, VandeVen C, Cairo MS. A randomized, placebo-controlled trial of recombinant human Granulocyte Colony-Stimulating Factor administration in newborn infants with presumed sepsis significant induction of peripheral and bone marrow neutrophilia. *Blood*. Vol 84 (5) 1994:pp1427-1433.
144. Schindler R, Mancilla J, Endres S, Ghorbani R, Clarc SC, Dinarello CA. Correlation and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood* 1990; 75 : 40-47.
145. Johnston RB, Altenburger KM, Atkinson AW, Curry RH. Complement of the newborn infant. *Pediatrics* 1979; 58: 781-786.
146. Zilow EP, Brussau J, Linderkamp O, Zilow G. In vitro activation of classical and alternative pathway of the complement system in term and preterm infants and adults. *Pediatr Res* 1995; 38: A462.
147. Erkeller-Yuksel FM, Deneys V, Yuksel B, Hannel I, Hulstaert F, Hamilton C, et al. Age-related changes in human blood lymphocyte subpopulations, *J Pediatr* 1992;120:216-222.
148. Chirico G, Rondini G, Piebani A, Chiara A, Massa M, Ugazio AG. Intravenous gammaglobulin therapy for prophylaxis of infection in high-risk neonates. *J Pediatr* 1987;110: 437-442.



149. Δρόσου-Αγακίδου Β, Διαμαντή Ε, Τζιμούλη Β, Κανακούδη-Τσακαλίδου Φ, Κρεμενόπουλος Γ. Επίπεδα των κυριότερων οφονινών του ορού σε ζευγάρια νεογνών/μητέρων. *Παιδιατρική* 1994;57: 438-442.
150. Solinger AM. Immature T- lymphocytes in human neonatal blood. *Cell Immunol* 1985 ; 92 :115-122.
151. Plebani A, Proserpio AR, Guarnert D, Buscaglia M, Cattoretti G. B and T lymphocyte subsets in fetal and cord blood: Age-related modulation of CD1cexpression. *Biol Neonate* 1993;63:1-7
152. Hayward A, Cosyns M. Proliferative and cytokine responses by human newborn T-cell stimulated with staphylococcal enterotoxin B. *Pediatr Res* 1994; 35:293-298.
153. Miyawaki T, Seki H, Taga K, Sato H, Taniguchi N. Dissociated production of interleukin-2 and immune (γ) interferon by phytohaemagglutinin stimulated lymphocytes in healthy infants. *Clin Exp Immunol* 1985; 59:505-511.
154. Wilson CB, Westall J, Johnson L, Lewis DB, Dower SK, Alpert AR. Decreased production of interferon-gamma by human neonatal cells. Intrinsic and regulatory deficiencies. *J Clin Invest* 1986;77: 80-867.
155. Wakasugi N, Virelizier JL. Defective IFN-gamma production in the human neoate. I. Dysregulation rather than intrinsic abnormality. *J Immunol* 1985;134;167-171.
156. McKenzie SE, Kline J, Douglas SD, Polin RA. Enhancement in vitro of the low interferon-gamma production of leukocytes from human newborn infants. *J Leukoc Biol* 1993; 53:691-697.
157. Bryan D, Hawkes JS, Gibson RA. Interleukin -12 in human milk. *Pediatric research* 1999; 45:858-859.
158. Yokoi T, Miyawaki T, Yachie A, Ohzeki S, Taniguchi N. Discrepancy in expression ability of Tac antigen and Ia determinants defined by monoclonal antibodies on activated or cultured cord blood T lymphocytes. *J Immunol* 1982 129:1441-1445.
159. Cairo MS. Neonatal neutrophil host defence. Prospects for immunologic enhancement during neonatal sepsis. *Am J Dis Child* 1989; 143:40-46.
160. Hayward A, Cosyns M. Proliferative and cytokine responses by human newborn T cells stimulated with staphylococcal enterotoxin B. *Pediatr Res* 1994 ;3:294-298.
161. Lacy JB, Ohlsson A. Administration of intravenous immunoglobulins for prophylaxis or treatment of infection in preterm infants: meta-analysis. *Arch Dis Child* 1995;72:F151-155.
162. Clapp DW, Kliegman RM, Baley JE, Shenker N, Kyllonen K, Fanaroff AA, et al. Use of intravenously administered immune globulin to prevent nosocomial sepsis in low birth weight infants: Report of a pilot study. *J Pediatr* 1989 ; 115: 973-977.



163. Roberts WL, Moulton L, Law TC, Farrow G, Cooper-Anderson M, Savory J. Evaluation of nine automated high-sensitivity C-reactive protein methods: implications for clinical and epidemiological applications. *Clinical Chemistry* 2001;47(3):418-425
164. Jonsson B, Tullus K, Brauner A, Lu Y, Noack G. Early increase of TNF α and IL-6 in tracheobronchial aspirate fluid indicator of subsequent chronic lung disease in preterm infants. *Arch Dis Child* 1997 ;77:F198-F201.
165. Kakkerla DK, Siddiq MM, Parton LA. Interleukin- 1 balance in the lungs of preterm infants who develop bronchopulmonary dysplasia. *Biol Neonate* 2005; 87:82-90.
166. Lisse MI, Aaby P, Whittle H, Jensen H, Engelmann M, Christensen LB. T-lymphocyte subsets in West African children: impact of age, sex, and season. *J Pediatr* 1997;130:77-85.
167. Leung TF, Ng PC, Tam WH, Li CY, Wong E, Ma TPY, et al. Helper T-lymphocyte-related chemokines in healthy newborns. *Pediatr Res* 2004; 55:334-338.
168. Berrington J.E, Barge D, Fenton A.C, Cant A.J and Spickett G.P. Lymphocyte subsets in term and significantly preterm UK infants in the first year of life analysed by single platform flow cytometry. *Clinical and Experimental Immunology*, 140:289-292.
169. Dinaello CA, Wolff SM. The role of interleukin in disease. *N Engl J Med* 1993; 328:106-113.
170. Miler LC, Isa S, LoPreste G, Schaller JG, Dinarello CA. Neonatal interleukin-1beta, interleukin-6, and TNF: cord blood levels and cellular production. *J Pediatric* 1992;117:961-965.
171. Chiesa C, Pellegrini G, Panero A, Osbron JF, Signore F, Assumma M, et al. C-reactive protein, interleukin-6 and procalcitonin in the immediate postnatal period: influence of illness severity, risk status, antenatal and perinatal complications and infection. *Clin Chem* 2003; 49:60-66
172. Berner R, Niemeyer CM, Leititis JU, Funke A, Schwab C, Rau U, Richter K, et al. Plasma levels and gene expression of Granulocyte Colony-Stimulating Factor, Tumor Necrosis Factor- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, and soluble intercellular adhesion molecule-1 in neonatal early onset sepsis. *Pediatr Res* 1998;4:469-477.
173. Ng DC, Cheng SH, Fok TF, Chui KM, Wong MY, Wong W, et al. Diagnosis of late onset sepsis with cytokines, adhesion molecule and C-reactive protein in preterm very low birth weight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1997;77:221-227.
174. Mehr S, Doyle LW. Cytokines as markers of bacterial sepsis in newborn infants: a review. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19:879-887.
175. Franz AR, Steinbach G, Kron M, Pohland F. Reduction of unnecessary antibiotic therapy in newborn infants using IL-8 and C-reactive protein as markers of bacterial infections. *J Pediatr* 1999; 104: 447-453.



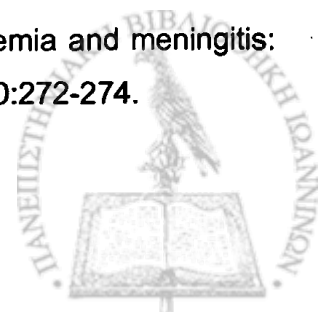
176. McIntire DD, Leveno KJ Neonatal mortality and morbidity rates in late preterm birth compared with birth at term. *Obstet Gynecol* 2008; 111:35-47.
177. Gerdes JS. Clinicopathologic approach to the diagnosis of neonatal sepsis *Clin Perinatol* 1991;18: 361-381.
178. Rodriguez-Weber MA, Lopez-Candiani C, Arredondo-Garcia JL, Gutierrez-Castrellon P, Sanchez-Arriaga F . Morbidity and mortality from neonatal sepsis in a tertiary care-level hospital. *Salud Publica Mex* 2003; 45: 90-95.
179. Gessler P, Neu S, Brockmann Y, Speer CP. Decreased mRNA expression of G-CSF receptor in cord blood neutrophils of term newborns. *Biol Neonat* 2000;77:168-173.
180. Munzinho A, Rosenfeld CR, Sanchez PJ, Risser R. Revised reference ranges for circulating neutrophils in very low birth weight neonates. *Pediatrics* 1994;94:76-82.
181. Christensen RD. Neutrophil kinetics in the fetus and neonat. *Am J Ped Hemat Onc* 1989;11:215-223.
182. Chrsstensen RD. Developmental changes in pluri-potent hematopoietic progenitors. *Early Hum Rev* 1988;16:195- 205.
183. Wheeler IG, Chauvenet AR, Johnson CA, Dillard R, Block SM, Boyle R, Abramson JS. Neutrophil storage pool depletion in sepsis neutropenic neonates. *Ped Inf Dis* 1984;3:407-409.
184. Erdman SH, Christensen RD, Bradley PP, Rothstein G. Supply and release of storage neutrophils. *Biol Neonate* 1982;41:132-137.
185. Carr R, Huringa TWJ. Low sFcRIII demonstrates reduced neutrophil reserves in preterm neonates. *Arch Dis Child Fetal Neonat* 2000;83
186. Carr R, Rumford D, Davies JM. Neutrophil chemotaxis and adhesion in preterm babies. *Arch Dis Childhood* 1992; 67:813-817.
187. Kovar I, Ajona NS, Hurley R. Serum complement and gestational age. *Obstet Gynecol* 1983;3:182-186.
188. Notarangelo LD, Chirico G, Chiara A, Colombo A, Rondini G, Plebani A, et al. Activity of classical and alternative pathways of complement in preterm and small for gestational age infants. *Ped Res* 1984;18:281-285.
189. Nupponen I, Andersson S, Jarvenpaa AL, Kautiainen H, Repo H. Neutrophil CD11b expression and circulating Interleukin-8 diagnostic markers for early onset neonatal sepsis. *Pediatrics* 2001;108:(1)
190. Huzinga TWJ, de Haas M, Kleijer M, Nuigens JH, Roos D, von dem Borne AEG. Soluble Fc gamma receptor III in human plasma originates from release by neutrophils. *J Clin Invest* 1990a;86:416-423.



191. Smith JB, Campbell DE, Ludomirsky A, Polin RA, Douglas SD, et al. Expression of the complement receptors CR1 and CR3 and the type III Fcγ receptor on neutrophils from newborn infants and from fetuses with Rh disease. *Pediatr Res* 1990;28:120
192. Takahashi N, Nishida H, Kuratsuji T. Fcγ RI and Fcγ RIII on polymorphonuclear leucocytes in cord blood. *Arch Dis Child* 1994; 70:F31-F35.
193. Nielsen CH, Antonsen S, Matthiesen SH, Leslie RGQ. The roles of complement receptors type 1(CR1SD35) and type3 (CR3, CD11b/CD18) in the regulation of the immune complex-elicited respiratory burst of polymorphonuclear leukocytes in whole blood. *Eur.J Immun* 1997;27:2914-2919.
194. Bectas S, Goetze B, Speer CA. Decreased adherence, chemotaxis and phagocytic activities of neutrophils from preterm neonates. *Acta Ped Scand* 1990;79:1031-1038.
195. Gahr M, Blanke R, Speer CR. Polymorphonuclear leukocyte function in term and preterm newborn infants *Biol Neonate* 1997;72:201-209.
196. Tennenberg SD. Solomkin JS. Neutrophil activation in sepsis. *Arch Surg* 1988;123:171-5.
197. Krediet TG, Beurskens FJM, Dijk HV, Gerards LJ, Fleer A. Antibody responses and opsonic activity in sera of preterm neonates with coagulase-negative Staphylococcal septicaemia and the effect of the administration of fresh frozen plasma. *Pediatr Reserch* 1998;43:5
198. Drossou V, Kanakoudi F, Tzimouli V, Taparkou A, Bougiouklis D, Petropoulou T and Kremenopoulos G. Impact of prematurity, stress and sepsis on the neutrophil respiratory burst activity of neonates. *Biol Neonate* 197;72:201-209.
199. Ambruso DR, Atenburger K, Johnston JR RB. Defective oxidative metabolism in newborn neutrophils: discrepancy between superoxide anion and hydroxyl radian generation. *Pediatrics* 1979;64:722-725.
200. Strauss PG, Snyder EL. Activation and activity of the superoxide generating system of neutrophils from human infants. *Ped res* 1983;17:662-664.
201. Yamazaki M, Matsuoka T, Yasui K, Komiyama A, Akabane T. Increased production of superoxide anion by neonatal polymorphonuclear leukocytes stimulated with a chemotactic peptide. *Am J Hematol* 1988;27:169-173.
202. Ambruso DR, Bentwood B, Henson PM, Jonston JRB. Oxidative metabolism of cord blood neutrophils, relationship to content and degranulation of cytoplasmic granules. *Ped Res* 1984;18:1148-1153.
203. Lehrer RI and Ganz T. Antimicrobial polypeptides of human neutrophils. *Blood* 1990;76:2196-2181.
204. Kjeldsen L, Sengelov H, Lollike K, Borregaard N. Granules and secretory vesicles in human neutrophils. *Ped Res* 1996;40:120-129.



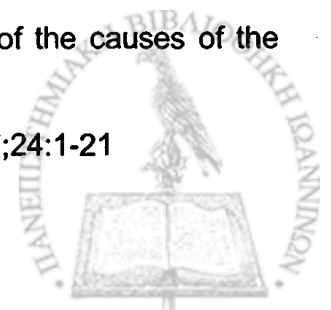
205. Rider ED, Christensen RD, Hall DC, Rothstein G. Myeloperoxidase deficiency in neutrophils of neonates. *J Pediatr* 1988;112:648-651.
206. Escobar GJ. The neonatal "sepsis work-up": personal reference on the development of an evidence-based approach toward newborn infections in a managed care organization. *Pediatr* 1999;103:S360-S373.
207. Dulkerian SJ, Kilpatrick L, Costarino AT, McCawley L, Fein J, Corcoran L, et al. Cytokine elevations in infants with bacterial and aseptic meningitis. *J Pediatr* 1995;126:872-876.
208. Gibbs RS, Duff P. Progress in pathogens and management of clinical intraamniotic infection. *Am J Obstet Gynecol* 1991;164:1317-1326.
209. Charles D, Edwards WR,. Infectious complication of cervical cerclage. *Am J Obstet Gynecol* 1981;141:1065-1071.
210. Fejgin M, AmielA, Kaneti H, Ben-Nun I, Beyth Y. Fulminant sepsis due to group B β -hemolytic streptococci following transcervical chorionic villi sampling (Letter). *Clin Infect Dis* 1993;17:142-143.
211. Wilkins I, Mezrow G, ynch L, Bottone EJ, Berkowitz RL. Amnionitis and life-threatening respiratory distress after percutaneous umbilical blood sampling. *Am J Obstet Gynec* 1989;160:427-428.
212. Bernirschke K. Routes and types of infection in the fetus and newborn. *Am J Dis Child* 1960;99:714-721.
213. St. Geme JM Jr, Murray DL, Carter J, Hobel CJ, Leake RD, Anthon BF, et all. Perinatal bacterial infection after prolonged rupture of amniotic membranes: an analysis of risk and management. *J Pediatr* 1961;59:473-496.
214. Blanc WA. Pathways of fetal and early neonatal infection:viral placentitis, bacterial and fungal chorioamnionitis. *J Pediatr* 1961; 58:473-496.
215. Baker CJ. Group B streptococcal infections. *Clin Perinatol*. 1997;24(1):59-70.
216. Yoder PR, Gibbs RS, Bianco JD,, Castaneda YS, St. Clair PJ. A prospective controlled study of maternal and perinatal outcome after intra-amniotic infection at term. *Am J Obset Gynecol* 1983;145:695-701.
217. Laborada G, Nesin M. Interleukin-6 and Interleukin-8 are elevated in the cerebrospinal fluid of infants exposed to chorioamnionitis. *Biol Neonate* 2005;88:136-44.
218. Hiller SL, Krohn MA, Kiviat NB, Watts DH, Eschenbach DA. Microbiologic causes and neonatal outcomew associated with chorioamnion infection. *Am J Obstet Gynecol*. 1991;165:955-61
219. Freedman RM, Baltimore R. Fatal *Streptococcus viridans* septicaemia and meningitis: a relationship to fetal sound electrode monitoring. *Perinatal* 1990;10:272-274.



220. Saez-Llorens X, McCracken GH Jr. Sepsis syndrome and septic shock in pediatrics: current concepts of terminology, pathophysiology and management. *J Pediatr* 1993;123:497-508.
221. Saez-Llorens X, Lagrutta F. The acute phase host reaction during bacterial infections in children. *Pediatr Infect Dis J* 1993;12:83-87.
222. Baltimore RS. Neonatal nosocomial infections. *Semin Perinatol* 1998;22:25-32.
223. Harris JAS, Goldmann DA. Infections acquired in the nursery: epidemiology and control. In: Remington JS, Klein JO eds. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. Philadelphia: WB Saunders 2001;1371-1418.
224. Stool BJ, Gordon T, Konores SB, Shankaran S, Tyson JE, Bauer CR, 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.
225. Stool BJ, Gordon T, Korones SB, Sancar S, Tyson JE, Bauer CR, et al. Late-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;129:63-71.
226. Yoder PR, Gibbs RS, Blanco JD, Castaneda YS, Clair PJ. A prospective, controlled study of maternal and perinatal outcome after intra-amniotic infection at term. *Am J Obstet Gynecol*, 1983;145 (6):695-701.
227. O'Reilly GC, Hitti JE, Benedetti TJ. Group B streptococcus infection in pregnancy :and update. *Fetal and Maternal Medicine Review* 1998;10:31-39.
228. Schrag SJ, Zywicki S, Farley MM, Reingold AL, Harrison LH, Lefkowitz LB, et al. Group B streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *N Engl J Med* 2000;342:15-20.
229. Wendel GD Jr, Leveno KJ, Sanchez PJ, Jackson GL, McIntire DD, Siegel JD. Prevention of neonatal group B streptococcal disease: a combined intrapartum and neonatal protocol. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186:618-26.
230. Schrag SJ, Zell ER, Lynfield R, Roome A, Arnold KE, Craig AS, et al. A population-based comparison of strategies to prevent early-onset group B streptococcal disease in neonates. *N Engl J Med* 2002;347:233-9.
231. Towers CV, Briggs GG. Antepartum use of antibiotics and early-onset neonatal sepsis: the next 4 Years. *Am J Obstet Gynecol* 2002;187:495-500.
232. Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA, et al. Changes in pathogens causing early-onset sepsis in very-low-birth-weight infants. *N Engl J Med* 2002; 347:240-7.



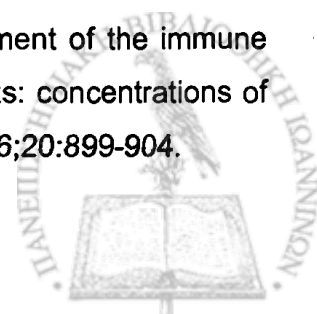
233. Fowlie PW, Schmidt B. Diagnostic tests for bacterial infection from birth to 90 days- a systematic review. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1998;78:F92-8.
234. Malik A, Hui CPS, Peennie RA, Kirpalani H. Beyond the complete blood cell count and C-reactive protein. A systematic review of modern diagnostic tests for neonatal sepsis. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2003;157: 511-6.
235. Members of the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care medicine Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992;20: 864-74.
236. Pourcyrus M, Bada HS, Korones SB, et al. Significance of serial C-reactive protein responses in neonatal infection and other disorders. *J Pediatrics* 1994;93: 693-4
237. Rodwell RI, Leslie AL, Tudehope DI. Early diagnosis of neonatal sepsis using a hematologic scoring system. *J Pediatr* 1988; 112:761-7
238. of Buck C, Bundschu J, Gallati H, Bartmann P, Pohlandt F. Interleukin-6: A sensitive parameter for the early diagnosis neonatal bacterial infection. *J Pediatr* 1994;93: 54-58.
239. Pan J, Du B, Chen D, Li Y. Serum procalcitonin and interleukin-6 may help to differentiate systemic inflammatory response of infectious and non-infectious origin. *J Chin Med* 2003; 116: 538-542.
240. Dulkerion SI, Kilpatrick L, Costarino AT, et al. Cytokine elevation in infants with bacterial and aseptic meningitis. *J Pediatr* 1995;126: 872-6.
241. Bont ESJM, Martens A, van Raan J, Samson G, Fetter WPF, Okken A, de Leij LHFM, Kimpen JLL. Diagnostic value of plasma levels of tumor necrosis factor α (TNF- α) and interleukine-6 (IL-6) in newborns with sepsis. *Acta Pediatr* 1994;83: 696-699.
242. Brodie SB, Sands KE, Gray JE, Parker RA, Goldman DA, DavisRB, et al. Occurrence of nosokomial bloodstream infections in six neonatal intensive care units. *Pediatr Infect Dis J* 2000;19:56-65.
243. Philip AG. The changing face of neonatal infection: experience at a regional medical center. *Pediatr Infect Dis J* 1994;13:1098-1102.
244. Weisman LE, Merenstein GB, Steenbarger JR. The effect of lumbar puncture position in sick neonates. *Am J Dis Child*. 1983;137:1077-1079.
245. Erkeller-Yuksel FM, Deneyw V, Yuksel B, Hannel I, Hulstaert F, Hamilton C et al. Age-related changes in human blood lymphocyte subpopulations. *J Pediatr* 1992;120:216-22.
246. Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Black RE. WHO estimates of the causes of the death in children. *Lancet* 2005; 365:1147-52.
247. Stool BJ. The global impact of neonatal infection. *Clin Perinat* 1997;24:1-21



248. Pezer EM, Weisman LE. Novel approaches to the prevention and therapy of neonatal bacterial sepsis. *Infect Perinatol* 1997; 24: 213-227.
249. Galanakis E, Krallis N, Levidiotou S, Hotoura E, Andronikou S. Neonatal bacteraemia: a population based study. *Scand J Infect Dis* 2002;34: 598-601.
250. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS international sepsis definitions conference. *Crit Care Med* 2003;31: 1250-1256.
251. Cook RWI, Nycyk JA, Okuonghuae H, Shah V, Damjanovic V, Hart CA. Low dose vancomycin prophylaxis reduces coagulase-negative staphylococcal bacteremia in very low birth weight infants. *J Hosp Infect* 1997; 37: 297-303.
252. Gladstone IM, Ehrenkranz RA, Edberg SC, Baltimore RS. A ten-year review of neonatal sepsis and comparison with the previous fifty-year experience. *Pediatr Inf Dis J* 1990;9: 819-825.
253. Schelonka RL, Yoder BA. The WBC count and differential: its uses and misuses. *Compliment Pediatr* 1996; 13: 124-41.
254. Shelonka RL, Yoder BA, Hall RB. Band neutrophil counts in neonates. *J Pediatr* 1995;126:505-506.
255. Alistair G.S. Philip and Jean R. Hewitt. Early diagnosis of neonatal sepsis. *J Pediatrics* 1980; 65:1036-1041.
256. Guida JD, Kunig AM, Leef KH, McKenzie SE, Paul DA. Platelet count and sepsis in very low birth weight neonates: Is there an organism-specific response? *Pediatrics* 2003; 111: 1411-1415.
257. Escobar GS, Li D, Armstrong MA, et al. Neonatal sepsis workups in infants >2000g at birth: a population based study. *Pediatr* 2000; 106:256-263.
258. Rodwell RL, Taylor KMCD, Tudehope DI, Gray PH. Hematologic scoring system in early diagnosis of sepsis in neutropenic newborns. *J Pediatr Infec Dis* 1993;12: 372-376.
259. Linderkamp O, Ruef P, Brenner B, Gulbins E, Lang F. Passive deformability of mature, immature, and active neutrophils in healthy and septicemic neonates. *Pediatr Research* 1998;44: 946-950.
260. Benitz WE, Han MY, Madan A, Ramachandra P. Serial serum C-reactive protein levels in the diagnosis of neonatal infection. *J Pediatrics* 1998;102:e41.
261. Philip AGS, Mills P. Use of C-reactive protein in minimizing antibiotic exposure: experience with infants initially admitted to a well-baby nursery. *J Pediatrics* 2000; 106:e4



262. Bomela HN, Ballot DE, Cory JB, Cooper PA. Use of C-reactive protein to guide duration of empiric antibiotic therapy in suspected early neonatal sepsis. *Pediatr. Infect. Dis J* 2000; 19:531-535.
263. Hill HR. Additional confirmation of the lack of effect of intravenous immunoglobulin in the prevention of neonatal infection. *J Pediatrics* 2000;137:595-597.
264. Fanaroff AA, Korones SB, Wright LL, Wright EC, Poland RL, Bauer CB, et al. A controlled trial of intravenous immune globulin to reduce nosocomial infections in very-low-birth-weight infants. *N Engl J Med* 1994;330:1107-1113.
265. Bonila FA, Oettgen HC. Normal ranges for lymphocyte subsets in children. *J Pediatr* 1977;130:347-349.
266. Notarangelo LD, Panina P, Imberti L, et al. Neonatal T4+ Lymphocytes: Analysis of the expression of 4B4 and 2H4 antigens. *Clinical immunology and immunopathology*. 1988;46:61-67.
267. Schultz C, Reiss I, Bucsky P, Gopel W, Gembruch U, et al. Maturation changes of lymphocyte surface antigens in human blood: comparison between fetus, neonates and adults. *Biol Neonate* 2000;78: 77-82.
268. Campbell AC, Waller C, Wood J, Aynsley-Green A, Yu V. Lymphocyte subpopulations in the blood of newborn infants *Clin Exp Immunol* 1974;18:469-82.
269. Thomas RM, Linch DC. Identification of lymphocyte subsets in the newborn using a variety of monoclonal antibodies. *Arch Dis Child* 1983;58:34-8.
270. Kotiranta-Ainamo A, Apajasalo M, Pohjavuori M, Rautonen N, Rautonen J. Mononuclear cell subpopulation in preterm and full-term neonates: independent effect of gestational age, neonatal infection, maternal pre-eclampsia, maternal betamethason therapy, and mode of delivery. *Clinical and Experimental Immunology* 1999;115: 1365-2249.
271. O'Gorman MRG, Millard DD, Lowder JN, Yogen R. Lymphocyte subpopulation in healthy 1-3 day old infants. *Comm Clin Cytometry* 1998;34: 235-241.
272. de Vries E, de Bruin-Versteeg S, Commans-Bitter WM, et al. Neonatal blood lymphocyte subpopulations: a different perspective when using absolute counts. *Biol Neonate* 2000;77: 230-235.
273. Sofatzis J, Driva I, Mexi Bournas P, Liossis G and Costalos C. Lymphocyte subpopulation in neonatal sepsis. *Prenat Neonat Med* 1998;3:353-357.
274. Conway SP, Dear PRF, Smith I. Immunoglobulin profile of the preterm baby. *Arch Dis Child* 1985;60:208-12.
275. Ballou M, Cates KL, Powe JC, Goetz C, Desbonnet C. Development of the immune system in very low birth weight (less than 1500g) premature infants: concentrations of plasma immunoglobulins and pattern of infections. *Pediatr Res* 1986;20:899-904.



276. Einhorn MS, Granoff DM, Nahm MH, Quinn A, Shackelford PG. Concentrations of antibodies in paired maternal infant sera: relationship to IgG subclass. *J Pediatr* 1987; 111:783-8.
277. Johnson PM, Brown PJ,. Review article. Fc γ receptors in the human placenta. *Placenta* 1981; 2:355-370.
278. Sandberg K, Sath A, Eibl M, Kristina J, Liscska A, Pollak A, Tessin I, et al. Preterm infants with low immunoglobulin G levels benefit from prophylactic immunoglobulin G. *J Pediatr* 2000;137:623-628
279. Valletta EA, Bonazzi L, Zuanazzi R, DelCol G, Andreoli A, et all. Plasma fibronectin concentrations in healthy newborns and children. *Eur J Pediatr* 1988;197:68-70.
280. Gogos CA, Drossou E, Bassaris HP, Skoytelis. Pro-versus antiinflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *J Infect Dis* 2000; 181(1): 176-180.
281. Meadow W, Rudinski B. Inflammatory mediators and neonatal sepsis. *Clin Perinatol* 1995;22:519-536.
282. Mehr S, Doyle L. Interleukin-6 concentrations in neonatal sepsis. *The Lancet* 1999;353:1798-1799.
283. Debets JMH, Kampmeijr R, van de Linden MPMH. Plasma tumor necrosis factor and mortality in critically ill septic patients. *Crit Care Med* 1989;17:489-494.
284. Waage A, Espevik T, Halstensen A. TNF, IL-1, and IL-6 in human septic shock. *Scand J Immunol* 1988;28:267-271.
285. Sullivan JS, Kilpatrick L, Costarino AT, Chi Lee S, Harris MC. Correlation of plasma cytokine elevations with mortality rate in children with sepsis. *J Pediatr* 1992;120:510-515.
286. De Bont ESJM, Martens A, Van Raan J, Samson G, Fetter WPF, Okken A, et all. TNF- α , IL-1 β , and IL-6 plasma levels in neonatal sepsis. *Pediatr Res* 1993 ;33 :380-383.
287. Girardin EP, Berner ME, Grau GE, Suter S, Lacourt G, Paunier L. Serum tumor necrosis factor in newborns at risk for infections. *Eur J Pediatr* 1990;149:645-647.
288. Harris MC, D'Angio CT, Gallagher PR, et all. Cytokine elaboration in critically ill infants with bacterial sepsis, necrotizing enterocolitis, or sepsis syndrome: correlation with clinical parameters of inflammation and mortality. *J Pediatr* 2005;147:462-8.
289. Roman J, Fernandez F, Velasko F, Roias R, Roldan MR, Torres A. Serum TNF in neonatal sepsis and septic chock. *Acta Pediatr* 1993;82:352-354.
290. Doellner H, Arntzen KJ, Haereid PE, Aag S, Austgulen R. Interleukin-6 concentrations in neonates evaluated for sepsis. *J Pediatr* 1998;132(2):295-299.



291. Messer J, Didier E, Donato L, Galatti H, Mattis J Simeoni U. Evaluation of IL-6 and soluble receptors of TNF for early diagnosis of neonatal infection. *J Pediatr* 1996;129:574-580.



