
Mihajlovski Mirjana¹, Perišić Zlatko¹, Raspopović Miloš¹,
Petrović Nataša²

SERUMSKI BIOMARKERI SEPSE

Sažetak: Sepsa je imunološki odgovor na sistemsku infekciju i širom sveta predstavlja sve veći problem u pogledu hospitalnog morbiditeta i mortaliteta. Brzi molekularni testovi, razvijeni da odgovore na potrebu brze i adekvatne dijagnostike, nisu uvek kadri da pruže jednoznačan odgovor. Izazovi sa kojim se suočavaju istraživači relevantnih biomarkera sepse leže u nedostatku jedinstvenog protokola i metodologije i nivoa dokaza. Pod sepsom se podrazumeva ceo skup poremećaja funkcije vitalnih organa i organskih sistema, koji dovode do multiorganske disfunkcije, otkazivanja funkcije osovine vitalnih organa i na kraju do smrti. Jedan od osnovnih problema u sepsi predstavlja činjenica da vrlo često nedostaju tipične i rane kliničke manifestacije. Za sada, ipak, zlatni standard dijagnoze sepse predstavlja tradicionalna upotreba mikrobnih kultura krvi (hemokultura).

Glavno ograničenje upotrebne vrednosti kulture krvi je u dužini vremena potrebnom za detekciju uzročnika sepse.

Biomarkeri bakterijske sepse: C-reaktivni protein je opšti protein reaktanta akutne faze **Prokalcitonin** je prekursor hormona kalcitonina i moćan je biomarker za bakterijske infekcije, **serumski amiloid A (SAA)** je važan apolipoprotein.

Biomarkeri za infekcije izazvane gljivicama: Antitela mannan i anati-mannan koriste se za otkrivanje gljivičnih infekcija zbog prisustva manna u ćelijskim zidovima invazivnih gljivičnih patogena. Glavni nedostatak dijagnostike upotrebom samo Mannan i Antimannan antitela je visoka stopa lažno pozitivnih i negativnih rezultata.

Biomarkeri za virusne infekcije: interferon Gamma inducible protein 10 (IP-10) proinflamatorni hemokin je važan biomarker za dijagnostiku virusnih infekcija.

Drugi biomarkeri (na raspolaganju ili u istraživanju): IL-10, proteinski vezani lipopolisaharid,

¹ Mihajlovski Mirjana, Klinika za urgentnu hirurgiju Urgentnog centra KCS

² Klinika za anesteziologiju i reanimatologiju KCS

rastvorljivi pokretački receptor (Soluble triggering receptor), tool-like receptors (TLRs), TLR-2 i neutrofilni CD64 receptori, CD163, mikro RNA (miRNA), SNP polimorfizam sa jednim nukleotidom, TNF alfa, IL-1 kinaza.

Dobar biomarker može da ima ključni značaj u dijagnostici i diferencijalnoj dijagnostici i ishodu sepse.

Ključne reči: sepsa, rana dijagnoza, biomarkeri, mortalitet, morbiditet

Uvod

Sepsa je imunološki odgovor na sistemsku infekciju i širom sveta predstavlja sve veći problem u pogledu hospitalnog morbiditeta i mortaliteta. Septično stanje zahteva trenutnu agresivnu terapiju, što podrazumeva pravovremenu, što raniju tačnu dijagnostiku.¹ Brzi molekularni testovi, razvijeni da odgovore na ovu potrebu, nisu uvek kadri da pruže jednoznačan odgovor. Najčešće se koriste serumski biomarkeri, sa različitom dijagnostičkom tačnošću. Najkorišćeniji biomarkeri su C reaktivni protein i nivo prokalcitonina (PCT); takođe je, mada nešto ređe, zastupljen nivo serumskog amiloida.² Već decenijama traje potraga za, po mogućnosti, pojedinačnim biomarkerom sepse. Za sada se ispostavlja da ne postoji idealan biomarker, pa se istraživanja nastavljaju u smislu pronalaženja grupe biomarkera, koji bi bili potentni u dijagnostici i praćenju toka septičnog stanja. Izazovi sa kojim se suočavaju istraživači relevantnih biomarkera sepse leže u nedostatku jedinstvenog protokola i metodologije, standardizacije ispitivanja i nivoa dokaza. Otkrivanje pouzdanog biomarkera ili grupe biomarkera imalo bi ogroman dijagnostički i prognostički značaj u lečenju sepse.²

Sepsa se smatra drugim najvažnijim uzrokom oboljevanja i smrtnosti u hospitalnim uslovima. Pod sepsom se ne podrazumeva samo infekcija krvi (pozitivna hemokultura), već ceo skup poremećaja funkcije vitalnih organa i organskih sistema, koji dovode do multiorganske disfunkcije, otkazivanja funkcije osovine vitalnih organa i na kraju do smrti. Jedan od osnovnih problema u sepsi predstavlja činjenica da vrlo često nedostaju tipične i rane kliničke manifestacije, tako da je potrebno pronalaženje markera ili seta markera koji bi bili potentni za pretkliničku dijagnozu sepse. Imunološki, sepsa predstavlja posledicu poremećaja regulacije urođenog imunog odgovora. Biomarkeri su stoga važni signalizatori prisustva i ozbiljnosti sepse u pretkliničkoj fazi, te bi njihovo protokolisanje imalo ogromnu prognostičku vrednost i značaj.^{1,2}

Veoma je važno napomenuti da sepsa nije jedno oboljenje i samo fiziološka manifestacija sistemskog imunog odgovora. Većina referentnih studija i publikacija definiše sepsu kao sistemski upalni odgovor na noksu koja je izaziva (primarna infekcija, trauma, oboljenje...). Za sada ne postoji jednoznačni biomarker za sepsu,

već se vrednosti serumskih nivoa poznatih biomarkera tumače u kontekstu simptomatologije. Uobičajena terapija septičnih pacijenata teži, s jedne strane, lečenju sistemske infekcije korišćenjem antimikrobnih sredstava širokog spektra, a s druge, sprečavanju otkazivanja vitalnih organa i organskih sistema. Za sada, ipak, zlatni standard dijagnoze sepse predstavlja tradicionalna upotreba mikrobnih kultura krvi (hemokultura).

Glavno ograničenje upotrebne vrednosti kulture krvi je u dužini vremena potrebnom za detekciju uzročnika sepse (za rezultat Bactek metode potrebno je čekati oko 48 h). Za to vreme sprovodi se terapija *ex iuvantibus*. Ova činjenica ilustruje važnost i potrebu za otkrivanjem ranih serumskih biomarkera. Treba napomenuti, takođe, da i kulture mogu biti negativne pod određenim okolnostima, npr. kada se radi o spororastućim izazivačima ili potentnim izazivačima u niskoj koncentraciji.

Dakle, u svetlu ovog problema razvijene su alternativne dijagnostičke metode pomoću metoda upotrebljivanih u molekularnoj biologiji da bi dijagnostika sepse na bazi potencijalno otkrivenih markera mogla da se radi brzo i automatizovano. Ovi testovi su u osnovi ELISA testovi, citometrijska detekcija specifičnih markerskih antigena, imunokolorimetrijski testovi, FISH metodologije i PCR i pojačana PCR tehnika. Dakle, sve metode imaju kao osnovni ishod detekciju proteina markera.³

Paralelno sa razvojem biomarkera, koji omogućava brže i osetljivije dijagnostičke metode za detekciju samog infektivnog agensa, razvijaju se istraživanja posleđičnih promena serumskih proteina, koji bi, što se brže menjaju i što im je koncentracija veća, bili bolji kandidati za serumske biomarkere sepse.

Biomarker se najbolje definiše kao merljiva komponenta, obično proteina, koja se može objektivno evaluirati kao indikator normalnog biološkog odgovora ili patološkog procesa. Ovaj rad je fokusiran na širok spektar biomarkera koji se koriste na bazi dijagnostičke validnosti (DA-diagnostic accuracy), koja se zasniva na osetljivosti, specifičnosti i prediktivnoj vrednosti.

Da bi bio klinički relevantan, biomarkeri treba da imaju veoma visok DA, odnosno osetljivost, specifičnost i prediktivne vrednosti (kako pozitivne – positive predictive values, PPV, tako i negativne – negative predictive values, NPV). U nekim studijama publikovani su načini izračunavanja koeficijenta verovatnoće, koji bi mogli da determinišu rezultat koji je posledica oboljenja ili je, pak, do njega dovela slučajnost. Vrednosti ovih koeficijenata su pomogle da se odrede granice dijagnostičkih preseka. Pošto je sepsa stanje uzrokovano bakterijskim, gljivičnim ili virusnim agensima, čijom kolonizacijom nastaje hemoinfekcija, takođe treba razmišljati o biomarkerima za specifične patogene, naročito kada postoji klinička sumnja na određeni agens. Za sada ne postoje apsolutni i specifični pojedinačni marker (koji zadovoljavaju ranije navedene kriterijume), ali se neki merljivi proteini široko koriste npr. za određivanje klase izazivača sepse, da bi se započela što više ciljana terapija antimikrobnim lekovima pre egzaktnog izdvajanja izazivača.⁴

Biomarkeri bakterijske seps

C-reaktivni protein

Ovo je opšti protein reaktanta akutne faze, čija koncentracija kao odgovor na infekciju i prateći inflamatorni proces u krvi raste do 1.000 puta.

Osetljivosti za CRP nalazi se u rasponu 30–97% sa vrednostima specifičnosti 75–100%, a PPV 31–100%. Upotreba različitih testova uzrokovala je varijaciju rezultata, pošto je svakom testu dodeljeno jedinstveno funkcionalno ograničenje. Nivoi CRP u serumu takođe variraju sa godinama starosti i kod zdravih pojedinaca. Granična vrednost od 10 mg/L koristi se za pacijente >65 godina starosti, dok se granična vrednost od 5 mg/L koristi za odrasle i novorođenčad od 3 do 7 dana starosti. Nivo CRP-a je viši kod starije, nego kod mlade dece.^{3,5} Studije su pokazale da je CRP vrlo osetljiv i veoma specifičan za infekciju. Pomoću CRP koncentracije u serumu mogu se razlikovati gram-pozitivne i gram-negativne, kao i bakterijske i gljivične infekcije, gde su nivoi iznad 100 mg/L specifični za bakterijske, a niži nivoi označavaju gljivične infekcije. Nivo koncentracije CRP takođe se može koristiti kao prognostički marker za nehospitalnu pneumoniju (stečenu u zajednici). Koncentracija nivoa 110mg/L sugeriše potrebu za hospitalizacijom. Međutim, dijagnostika virusne infekcije je nepouzdana.⁶

Prokalcitonin

PCT je prekursor hormona kalcitonina i moćan je biomarker za bakterijske infekcije. U serumu zdravih pojedinaca beleži se niska koncentracija od oko 0,33 ng/ml, koja se povećava oko 1.000 puta u uslovima inflamacije. Koncentracija raste u roku 2–4 sata od infekcije i dostiže vrhunac za 6–8 sati. Stalni povećani nivoi ukazuju na kontinuirano prisustvo bakterijske infekcije. Brza regulacija i održavanje seruma čini ga jedinstvenim biomarkerom. Kako je ovaj molekul veoma stabilan, on ostaje prisutan u uzorcima krvi i prilikom zamrzavanja, čak i nakon dugotrajnog skladištenja.⁷

PCT ima visoku DA i osetljivosti od oko 75–100, a vrednosti specifičnosti 70–100%. PPV vrednosti su 55–100. Većina referentnih studija predlaže CV PCT nivoa od 0,5 ng/mL. Većina autora smatra PTC egzaktnijim inflamatornim markerom od ostalih proinflamatornih markera. PCT, takođe, ima veoma prediktivnu prognostičku vrednost i njegovi nivoi su distinktivni za gljivične i virusne infekcije. Tokom virusnih infekcija vrednosti nivoa serumskih koncentracija PCT ostaju niske, često i u normalnim granicama. PCT se takođe koristi u laboratorijskoj diferencijalnoj dijagnostici bakterijskog i virusnog meningitisa. Suprotno tome, gljivične infekcije imaju tendenciju da izazivaju blago povišenje koncentracije PCT u poređenju sa nivoima koji se vide kod bakterijskih infekcija.

Istraživanja invazivne aspergiloze i invazivne kandidijaze su pokazale da postoji značajno viši nivo PCT kod pacijenata sa bakterijskom, nego sa gljivičnom sepsom.^{5,8}

PCT se takođe pokazao kao potencijalni biomarker za pneumonije, infekcije donjih disajnih puteva, abdominalnu sepsu, urosepsu, infarkt miokarda i kao biomarker za praćenje uspešnosti antibiotske terapije, naročito kada je data spekulativno, a ne na bazi antibiograma.

Serumski amiloid A (SAA)

Amiloid A je važan apolipoprotein, za koji u referentnoj literaturi postoje ozbiljni dokazi da ima potencijalnu vrednost u ranoj dijagnostici sepse. Nivo SAA je oko 1.000 puta višim nakon 8–24 sata od početka sepse. U poređenju sa nivoima CRP, izveštava se da nivo SAA raste brže i više nakon početka sepse i duže ostaje na višim relativnim vrednostima. Nivoi SAA u serumu ispod 15 mg/L za starije od 65 godina i manje od 10 mg/L za odrasle i novorođenčad u dobi 3–7 dana su granične vrednosti za utvrđivanje dijagnostičkih kriterijuma. Iako se SAA uglavnom koristi kao marker za bakterijske infekcije, u koncentraciji iznad 10 mg/L pokazao se potentnim i u dijagnostici virusnih infekcija. SAA nema veliku osetljivost u poređenju sa nekim markerima, pa je stoga vrednost njegove kliničke primene još uvek diskutabilna i, možda, precenjena od strane nekih autora.⁸

Biomarkeri za infekcije izazvane gljivicama

Antitela mannan i anitimannan koriste se za otkrivanje gljivičnih infekcija zbog prisustva manna u ćelijskim zidovima invazivnih gljivičnih patogena. Nivoi mannana i anitimannana ostaju povišeni u uslovima infekcije poput aspergiloze i kandidijaze, što ih čini korisnim markerima kod gljivične sepse. Postoji puno varijacija u DA, PPV vrednosti osetljivosti i specifičnosti, zbog različitih protokola kako u ispitivanju tako i u upotrebi markera u dijagnostici.⁹ Glavni nedostatak dijagnostike upotrebom samo Mannan i Antimannan antitela je visoka stopa lažno pozitivnih i negativnih rezultata testiranja. Ova činjenica zahteva da se upotreba ovih testova kombinuje sa drugim dijagnostičkim testovima, kao pr. sa beta-D glukan testovima, jer je beta-D glukan veoma osetljiv i specifičan za invazivnu mikozu, a nije specifičan za vrste.¹⁰

Biomarkeri za virusne infekcije

Interferon Gamma inducible protein 10 (IP-10)

IP-10 proinflamatorni hemokin je važan biomarker za dijagnostiku virusnih infekcija zbog njegove uloge u odgovoru domaćina na viremiju. Studija o bakterijskim infekcijama kod novorođenčadi sa vrlo niskom težinom na rođenju pokazala je da je IP-10 dobar biomarker tokom početnih merenja, kod koga se beleži značajno i

merljivo povišen nivo kod zaraženih pacijenata, inicijalno i tokom prva 24 sata, bez „preklapanja” ovih nivoa. Pokazano je da su nivoi IP-10 u korelaciji sa težinom sepse. IP-10 se oslobađa kao odgovor na viruse poput rinovirusa, respiratornog sincitijalnog virusa, hepatitisa B i virusa gripa, a zatim i hepatitisa C i H5N1. Takođe se pokazalo da predstavlja vrlo dobar prognostički marker kod pacijenata sa hepatitisom C.¹¹

Drugi biomarkeri (na raspolaganju ili u istraživanju)

IL-10

IL-10 je u studijama označen kao koristan biomarker sepse, posebno u dijagnostici u ranom (prekliničkom) i kasnom (ranom kliničkom) ispoljavanju sepse novorođenčadi. Vrednosti CV više od 17,3 pg/mL procenjene su kao “cut-off” vrednosti DA. Ovaj marker pokazuje osetljivost i specifičnost u rasponu od 80%. Glavni problem u njegovoj upotrebi je činjenica da cirkulišući citokini imaju vrlo kratak poluživot. Ovo dovodi do značajnog broja lažno negativnih rezultata, što ograničava njihovu vrednost DA, pa tako i upotrebnu vrednost.¹²

Proteinski vezani lipopolisaharid

Proteinski vezani lipopolisaharid takođe je koristan biomarker, specifičan za bakterijske infekcije. Poznato je da se nivo ovog proteina u serumu povećava tokom bakterijskih i gljivičnih, ali ne i kod virusnih infekcija.¹³

Rastvorljivi pokretački receptor (Soluble triggering receptor)

Pokretački receptori, koji pokazuju ekspresiju na mijeloidnim ćelijama – 1 TREM, su grupa receptora ćelijske površine koji pripadaju superfamiliji imunoglobulina. TREM-1 se pojavljuje uglavnom na makrofazima i neutrofilima i identifikovan je kao pojačavač imunog odgovora koji snažno osnažuje aktivaciju leukocita u prisustvu mikrobnih proizvoda. Poslednji rezultati sugeriraju da sTREM-1 može biti oslobođen širokim spektrom inflamatornih podražaja. Prvi obećavajući rezultat upotrebe sTREM-1 u plazmi u dijagnostici kod sepse kod pacijenata u Jedinici intenzivnog lečenja (JIL) pokazao je da bi sTREM-1 mogao biti odavno traženi savršen dijagnostički biomarker sepse. Rezultati se kreću u rasponu tačnosti od gotovo 100% (ROC-AUC od 0,97) za dijagnozu sepse u pacijenata koji se nalaze u JIL.¹⁴

Tool-like receptori (TLRs)

Rezultati referentnih studija sugerišu da TLR i drugi receptori koji se nalaze na ćelijskoj membrane mogu biti pobuđeni od strane neutrofila i imaju dinamičku modulaciju u toku sepse.

Pojavljujući se na makrofazima, dendritskim ćelijama i ostalim ćelijama, TLR igraju važnu ulogu u urođenim imunskim odgovorima na infekciju unakrsnom reakcijom i prepoznavanjem specifičnih bakterijskih antigena. Ekspresija TLR gena u mononuklearnim ćelijama naglo opada u težim oblicima sepse. TLR se dinamički modifikuju u raznim fazama sepse. TLR-4 je specifičan za prepoznavanje LPS, dok je TLR-2 koristan za prepoznavanje Gram-pozitivnih bakterijskih komponenti.

TLR-2 i neutrofilni CD64 receptori

(TLR-2) i neutrofilni CD64 receptori su dva važna biomarkera prisutna na ćelijskim površinama. Tokom infekcije pojačava se odgovor na stimulus na površini monocita i neutrofila od strane oba ova biomarkera.¹⁵ Ovaj odgovor je značajno pojačan kako tokom bakterijskih tako i virusnih infekcija. Vrednosti su značajno povišene u uslovima infekcije poput gripa A i B, respiratorno sincitijalnog virusa ili mumpsa, virusa herpes zoster, citomegalovirusne infekcije, što ukazuje da TLR-2 može biti potencijalni biomarker za virusne infekcije.^{5,15} Za sada se CD64 koristi kao marker bakterijskih infekcija. Na ekspresiju CD64 ne utiču blagi inflamatorni procesi i nema razlike u nivoima kod sistemskih i lokalnih bakterijskih infekcija, vrednosti DA, vrednosti osetljivosti i specifičnosti kod PPV u rasponu 71–100%, što ga čini značajnim biomarkerom.

CD163 je transmembranski molekul koji se nalazi na membrani mononuklearnih fagocita. Budući da je specifičan receptor za uklanjanje hema iz hemoglobina u organizmu, vrlo je specifičan za identifikaciju kompleksa haemoglobin–haptoglobin. CD163 reguliše ekspresiju antiinflamatornih molekula, poput citokina IL-10 i heme-oksigenaze-1. Rastvorljivi CD163 potiče iz molekula „zguljenih” sa ovih površina fagocita i veoma su dobri markeri sepse i teške sepse. Rezultati istraživanja pokazuju da su superiorniji od nivoa PCT i CRP.

Mikro RNA (miRNA) je vrsta endogenih nekodirajućih malih RNK dužine oko 22 nukleotida i igraju važnu ulogu u posttranskripcionoj regulaciji ekspresije gena. Značajna količina miRNA registrovana je ekstraćelijski, unutar različitih telesnih tečnosti. Slobodne miRNA u ćelijama su stabilne čak i u teškim uslovima. MiR-150 je naznačen kao biomarker za sepsu, a odnos plazme miR-150/interleukin 18 ispituje se kao pokazatelj težine sepse.

SNP Polimorfizam sa jednim nukleotidom

Polimorfizam pojedinačnih nukleotida (SNP) najčešći je izvor genetskih varijacija u humanom genomu i obuhvata oko 90% svih DNK polimorfizama.

Poznato je da je C-reaktivni protein (CRP) važan biomarker sepse. Nekoliko nukleotidnih polimorfizama (SNP) gena CRP može odrediti nivo CRP u plazmi, pa tako SNP postaje marker sepse. On se, takođe, istražuje i kao faktor rizika za mnoge bolesti (maligne, artritis i dijabetes). Najviše se upotrebljava kao marker infantilne sepse. Ne zna se, međutim, da li je njegov nivo povezan sa ishodom infantilne sepse.

TNF alfa – Faktor tumorske nekroze alfa

Ovo je pleiotropni citokin nastao aktivacijom makrofaga, koji ima ključnu ulogu kako u inflamatornom odgovoru tako i u progresiji autoimunih bolesti. Uočena je povezanost sepse sa ekspresijom genotipa TNF-2.¹⁶

IL-1 kinaza, povezana sa receptorima interleukina 1, važna je za TLR2 i TLR4 indukovanu aktivaciju kappa beta faktora jezgra, ključnog u regulaciji transkripcije mnogih proinflamatornih citokina u septičnim stanjima.

Sepsa je sve značajniji uzrok morbiditeta i mortaliteta kritično obolelih pacijenata u jedinicama intenzivnog lečenja. Ovo stanje zahteva brzo, ako je moguće pretkliničko postavljanje dijagnoze, kao i brzo ordiniranje adekvatne terapije, što značaj biomarkera stavlja u prvi plan. Dobar biomarker može da ima ključni značaj u dijagnostici i diferencijalnoj dijagnostici i ishodu sepse.¹⁶

Literatura

1. Kramer MS, Demissie K, Yang H, Platt RW, Sauve R, Liston R. The contribution of mild and moderate preterm birth to infant mortality. Fetal and Infant Health Study Group of the Canadian Perinatal Surveillance System. *JAMA*. 2000; 284: 843–9.
2. Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, et al. Sepsis occurrence in acutely ill patients investigators: sepsis in European intensive care units: results of the SOAP Study. *Crit Care Med*. 2006; 34: 344–53.
3. Kaus IAM, Grion CMC, Cardoso LTQ *et al*. The epidemiology of sepsis in a Brazilian teaching hospital. *Brazilian J. Infect. Dis*. 2010; 14(3), 264–270.
4. Wang P, Yang Z, He Y, Shu C. Pitfalls in the rapid diagnosis of positive blood culture. *Rev. Med. Microbiol*. 2010; 21(3), 39–43.
5. Papachristou GI, Clermont G, Sharma A et al. Risk and markers of severe acute pancreatitis. *Gastroenterol Clin N Am* 2007; 36: 277–96.
6. Rego MAC, Martinez FE, Elias J, Mussi-Pinhata MM. Diagnostic value of interleukin-6 and C-reactive protein on early onset bacterial infection in preterm neonates with respiratory distress. *J. Perinat. Med*. 2010; 38(5), 527–533.

7. Morris AC, Simpson AJ, Walsh TS. Hyperinflammation and mediators of immunosuppression in critical illness. In: Vincent JL, editor. Annual update in intensive care and emergency medicine. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2013; 135–44.
8. Cetinkaya M, Ozkan H, Koksall N, Celebi S, Hacimustafaoglu M. Comparison of serum amyloid A concentrations with those of C-reactive protein and procalcitonin in diagnosis and follow-up of neonatal sepsis in premature infants. *J. Perinatol.* 2009; 29(3), 225–231.
9. Méan M, Marchetti O, Calandra T. Bench-to-bedside review: Candida infections in the intensive care unit. *Crit Care.* 2008; 12: 204. doi: 10.1186/cc6212.
10. Vincent JL, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, Moreno R, Lipman J, Gomersall C, Sakr Y, et al. EPIC II Group of Investigators International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA.* 2009; 302: 2323–9. doi: 10.1001/jama.2009
11. Grebely J, Feld JJ, Applegate T, Matthews GV, Hellard M, Sherker A, Petoumenos K, Zang G, Shaw I, Yeung B, George J, Teutsch S, Kaldor JM, Cherepanov V, Bruneau J, Shoukry NH, Lloyd AR, Dore GJ. Plasma interferon-gamma-inducible protein-10 (IP-10) levels during acute hepatitis C virus infection. *Hepatology.* 2013 Jun; 57(6): 2124–34. doi: 10.1002/hep.26263.
12. Mehr S, Doyle LW. Cytokines as markers of bacterial sepsis in newborn infants: a review. *Pediatr Infect Dis J.* 2000; 19: 879–87.
13. Villar J, Perez-Mendez L, Espinosa E et al. Serum lipopolysaccharide binding protein levels predict severity of lung injury and mortality in patients with severe sepsis. *PLoS One* 2009; 4: e6818.
14. Barati M, Bashar FR, Shahrami R, et al. Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells 1 and diagnosis of sepsis. *J Crit Care.* 2010; 25: 362. e1–6.
15. Tsujimoto H, Ono S, Efron PA, Scumpia PO, Moldawer LL, Mochizuki H. Role of Toll-like receptors in the development of sepsis. *Shock.* 2008 Mar; 29(3): 315–21. doi: 10.1097/SHK.0b013e318157ee55.
16. De JW, te VH, Prakken BJ, Kuis W, Rijkers GT. Simultaneous detection of 15 human cytokines in a single sample of stimulated peripheral blood mononuclear cells. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003; 10: 133–9.