

ORIGINAL

Estudio comparativo de los niveles de procalcitonina en el plasma y las muestras de sangre seca mediante electroquimioluminiscencia (ECLIA)



Josefa Mora Vallellano*, Borja del Castillo Figueruelo y Luis Manuel Jiménez Jiménez

Unidad de Gestión Clínica de Laboratorios, Servicio de Bioquímica Clínica, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, España

Recibido el 27 de enero de 2016; aceptado el 2 de agosto de 2016

Disponible en Internet el 20 de octubre de 2016

PALABRAS CLAVE

Procalcitonina;
Fiebre;
Infección bacteriana;
Niños;
Muestra de sangre
seca

Resumen

Introducción: Los procesos febriles constituyen uno de los motivos de consulta más frecuentes en las urgencias pediátricas, siendo las infecciones bacterianas una de las principales causas responsables de los mismos. Su diagnóstico es un reto a superar pues representan una importante causa de morbilidad. Entre los biomarcadores séricos utilizados, es la procalcitonina la que aparece en el suero con anterioridad a otros biomarcadores inflamatorios agudos tales como el número de leucocitos en circulación periférica y la proteína c reactiva.

Material y métodos: Se utilizaron muestras de 135 pacientes pediátricos recogidas mediante punción en el dedo o talón. Las determinaciones se realizaron respectivamente en plasma y sangre seca recogida sobre papel (DBS), en la misma muestra de cada uno de ellos.

Resultados: El estudio estadístico comparativo realizado entre los resultados obtenidos en ambos tipos de muestras, nos indica la existencia de una correlación estadísticamente significativa entre muestras analizadas por ambas metodologías. El test U de Mann-Whitney aplicado asimismo, manifiesta la no existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los resultados.

Conclusiones: Las muestras DBS tienen una gran utilidad para la cuantificación de los niveles de procalcitonina en la población pediátrica donde, con frecuencia, la extracción de sangre venosa presenta dificultades. La obtención de este tipo de muestra por simple punción en el talón o yema del dedo evita este problema, contribuyendo al diagnóstico rápido de los procesos infecciosos.

No obstante, podría mejorarse la sensibilidad del método realizando determinaciones seriadas en aquellas muestras con valores iniciales bajos (menores de 0,650 ng/mL).

© 2016 AEBM, AEFA y SEQC. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: pmv-81@hotmail.com (J. Mora Vallellano).

KEYWORDS

Procalcitonin;
Febrile;
Bacterial infection;
Infants;
Dried blood specimen

A comparative study of procalcitonin levels in plasma and dried blood specimens using electrochemiluminescence (ECLIA)

Abstract

Introduction: Fever processes constitute one of the main reasons for pediatric emergency department visits, being bacterial infections one of the principal causes of this process. Its diagnosis represents a challenge to overcome, due to the high morbidity and mortality rates related to these infections. Among analyzed serum biomarkers, procalcitonin shows an earlier appearance in serum than others inflammatory biomarkers such as peripheral blood leukocytes number and C-reactive protein.

Materials and methods: Blood samples were collected by finger or heel puncture from 135 pediatric patients. Procalcitonin was measured in plasma and in dried blood specimen (DBS) for each blood sample.

Results: The comparative statistical analysis has revealed a significant correlation between the two procalcitonin assays. The Mann-Whitney U test has demonstrated that there was no difference on the procalcitonin results obtained by both techniques.

Conclusions: DBS represent a useful tool for quantifying procalcitonin levels in pediatric population, where venous blood collection is usually difficult. The extraction of this type of blood sample, by finger or heel puncture, avoids this problem, contributing to a rapid diagnosis of this kind of infectious processes. However, method sensitivity could be improved by performing serial measurements in samples with low basal levels (lower than 0.650 ng/mL).

© 2016 AEBM, AEFA y SEQC. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

La procalcitonina (PCT) es un péptido de 116 aminoácidos, uno de los precursores de la calcitonina¹, proteína codificada por el gen CALC1 (11p15.4) cuya función fisiológica permanece incierta. Las infecciones bacterianas inducen un incremento ubicuo en la expresión del gen CALC-1 y la subsecuente liberación de precursores de calcitonina en los diferentes tejidos del organismo².

Los procesos febriles constituyen uno de los motivos de consulta más frecuentes en las urgencias pediátricas, siendo las infecciones bacterianas una de las principales causas. Su diagnóstico es un reto a superar pues representan una importante causa de morbilidad^{3,4}.

El diagnóstico de las infecciones bacterianas es a veces complicado, debido a la similitud en la presentación clínica de procesos infecciosos originados por diferentes agentes causales (bacterias o virus), e incluso por otros estados inflamatorios de diferente etiología.

El diagnóstico preciso de las mismas se realiza mediante pruebas específicas bacteriológicas o inmunológicas que originan un retraso en el conocimiento de sus resultados. Así, es de especial interés el uso de biomarcadores séricos cuya rápida determinación evidencie, precozmente, la existencia del proceso infeccioso. Entre estos, es la PCT la que aparece en el suero de los pacientes con anterioridad a otros marcadores inflamatorios agudos tradicionalmente utilizados como el aumento en el número de leucocitos periféricos y/o la proteína C reactiva⁵.

El principal estímulo para la liberación de PCT durante un proceso infeccioso es la endotoxina bacteriana responsable, produciendo un incremento en las concentraciones séricas de PCT a las 3-4h del mismo, alcanzando concentraciones máximas a las 6-8h y permaneciendo

elevada al menos durante 24-30h⁶. La proteína C reactiva, por el contrario, requiere de 12 a 24 h para elevarse y de 20 a 72 h para llegar a una meseta, manteniéndose elevada durante 3 a 7 días⁷.

La PCT es un excelente biomarcador de infecciones bacterianas en niños, mostrando una buena correlación con la severidad de la enfermedad, pudiendo utilizarse asimismo como marcador pronóstico⁸⁻¹⁰, decreciendo inmediatamente tras la administración específica de antibióticos¹¹.

Es bien conocida la dificultad que aparece en la mayoría de los casos, de obtener un volumen adecuado de muestra en recién nacidos y niños pequeños, y la preocupación de realizar una extracción excesiva de sangre, pudiendo así provocar una anemia inducida por flebotomía. Este hecho está facilitando que se busquen y adopten otras alternativas para solucionar estos posibles problemas.

Las muestras de sangre seca recogida sobre papel (DBS) de pacientes con una posible infección constituyen un método accesible de toma, almacenaje y envío de muestras al laboratorio de referencia. La experiencia del cribado en neonatos empleando DBS, ha mostrado ser eficaz y sencilla¹². Las muestras DBS también han sido empleadas en el diagnóstico de diversas enfermedades genéticas, metabólicas e infecciosas^{12,13}.

El uso de este tipo de muestras presenta la misma precisión y reproducibilidad que las muestras líquidas, siendo muchos los metabolitos cuantificables en las mismas y, entre ellos, la PCT.

La determinación de PCT en DBS presenta muchas ventajas en relación con las muestras de sangre líquida¹⁴, empleándose volúmenes de sangre significativamente menores recogidos mediante una pequeña punción en el talón o en el dedo, evitando el uso de jeringuillas y reduciendo el gasto de infraestructuras, de material de laboratorio

y permitiendo, asimismo, el envío a los laboratorios mediante el correo ordinario.

Objetivo

Estudiar la posible aplicación de las muestras DBS en el diagnóstico y monitorización de infecciones bacterianas mediante la determinación del biomarcador PCT, comparándolo con el método tradicional de electroquimioluminiscencia (ECLIA) en plasma utilizado en nuestro laboratorio.

Material y métodos

Población de estudio

El trabajo de selección de los pacientes y de recogida de las muestras se realizó desde el laboratorio de urgencias de nuestro hospital. Se recogieron las muestras de sangre enviadas para determinación de PCT de aquellos pacientes con sospecha de infección bacteriana comprendidos entre 0 a 14 años de edad, procedentes en su mayoría del Servicio de Urgencias Pediátricas con fiebre como principal síntoma, y de la Unidad de Cuidados Intensivos.

Se distribuyeron en diferentes grupos según la interpretación clínica de sus resultados (tabla 1).

Se analizaron un total de 135 muestras de sangre recogidas en BD Microtainer® de 500 µL conteniendo EDTA-dipotásico, obtenidas mediante punción venosa y/o capilar en la yema del dedo o talón en el Hospital Infantil Virgen del Rocío de Sevilla. Estas se procesaron como muestras urgentes, en el mismo día.

Para la obtención de la muestra de DBS se usó papel cromatográfico Whatman 903® utilizado para la realización del programa de cribado neonatal.

Con la muestra, una vez extraída, se procedió del siguiente modo: tras la realización del hemograma en un autoanalizador Sysmex XE-2100™ se realizó la impregnación del papel con 60 µL de la sangre total en cada uno de los círculos de 1,5 cm de diámetro que contiene, teniendo especial cuidado en que se rellenasen completamente,

así como que la sangre traspasase a la cara posterior del papel. De este modo, aseguramos una buena homogeneidad de la muestra. Tras dejarse secar a temperatura ambiente durante 4 h se introdujeron, de modo individual, en bolsas de plástico perfectamente cerradas, guardándose preservadas de la humedad a 4°C hasta la determinación analítica.

A continuación, se procedió a la centrifugación de los microtainers a 3.500 rpm durante 5 min en centrífuga de microtainers. En el plasma obtenido, y conservado a 4°C hasta la determinación analítica, se llevó a cabo la determinación de PCT siguiendo el procedimiento normalizado para cualquier tipo de muestra, en el mismo día.

El procesamiento de las muestras de DBS se realizó del siguiente modo:

- 1) Se troquelaron cada una de ellas, utilizando un puncher de 3,2 mm de diámetro, obteniéndose 5 discos para cada una de las muestras. Cada disco contiene absorbido un volumen de sangre de 3,42 µL.
- 2) Los 5 discos de cada muestra se introdujeron en tubos de ensayo de 12 × 75 mm, añadiéndose 250 µL de agua destilada para la elución completa de los mismos.
- 3) El proceso de elución se realizó en un agitador orbital sometiendo a una agitación de 1.000 rpm durante 30 min. Posteriormente se centrifugaron a 3.500 rpm en centrífuga refrigerada a 4°C durante 5 min.
- 4) El sobrenadante obtenido se utilizó para cuantificar la PCT mediante un ensayo de ECLIA con el kit Elecsys BRAMMS PCT de Roche Diagnostics, en un autoanalizador cobas e601.
- 5) Los cálculos finales para obtener las concentraciones de PCT de nuestras muestras se realizaron de la siguiente forma:

Dado que utilizamos 5 discos por muestra, cada uno conteniendo 3,42 µL, el volumen final de sangre utilizado fue de 17,1 µL. No obstante, y puesto que la PCT es de localización extracelular, este volumen fue corregido teniendo en cuenta el valor hematocrito de cada una de ellas.

La elución se realizó siguiendo la metodología tradicional para la determinación de múltiples analitos e incluso DNA¹⁵⁻¹⁷ con 250 µL de agua destilada, calculándose el factor de dilución total a que fue sometida la muestra. El resultado obtenido en el eluido en nuestro autoanalizador fue multiplicado, en cada caso, por el factor de dilución final.

La determinación de la PCT en las DBS se realizó en tandas de 15 muestras, una vez por semana, para asegurar así un buen control del pretratamiento de las mismas y obtención del eluido final sobre el que se determinó el nivel de PCT mediante la metodología ECLIA.

El estudio estadístico se realizó mediante el programa SPSS v.20 (IBM).

Resultados

En este estudio se analizaron un total de 135 muestras de sangre, a las que se les determinaron los niveles de PCT en plasma y en sangre seca en papel, utilizando la metodología establecida en nuestro laboratorio (ECLIA).

Tabla 1 Interpretación de los resultados de PCT

Niveles de PCT	Interpretación
< 0,5 ng/mL	Individuo sano Proceso inflamatorio crónico Infecciones víricas y bacterianas localizadas
0,5 a 2,0 ng/mL	Infecciones víricas y bacterianas localizadas Posible sepsis Sepsis severa o shock séptico improbable
2,1 a 10,0 ng/mL	Infección bacteriana sistémica (sepsis) muy probable
> 10,0 ng/mL	Sepsis severa o shock séptico muy probables, existiendo riesgo de fallo multiorgánico

Tabla 2 Muestras de procalcitonina analizadas

Núm.	Edad	PCT plasma	PCT DBS	Núm.	Edad	PCT plasma	PCT DBS	Núm.	Edad	PCT plasma	PCT DBS
1	3	0,742	1,23	48	8	2,79	3,04	95	3	13,17	12,28
2	0,044	0,798	0,994	49	2	2,84	3,11	96	5	13,29	8,27
3	0,315	0,813	0,936	50	13	2,94	2,24	97	7	13,66	9
4	10	0,821	1,04	51	7	2,95	2,02	98	0,034	13,77	20,9
5	6	0,875	0,988	52	0,013	3,08	2,15	99	0,163	14,5	13,45
6	0,043	0,884	0,812	53	0,183	3,09	3,42	100	1	14,51	23,2
7	0,036	0,927	1,23	54	6	3,24	2,93	101	12	14,81	11,7
8	3	0,951	1,57	55	2	3,31	4,7	102	0,108	15,09	25,7
9	0,053	0,971	0,957	56	0,036	3,35	4,29	103	8	16,01	21,2
10	0,027	0,981	1,17	57	5	3,48	4,68	104	0,1	16,22	22,57
11	0,193	0,99	0,936	58	1	3,53	3,6	105	1	16,53	19,8
12	0,042	1	1,15	59	1	3,56	4,47	106	12	17,48	16,54
13	3	1,01	1,25	60	8	3,68	3,85	107	0,1	19,33	20,2
14	3	1,04	1,08	61	0,009	3,68	3,64	108	12	19,6	14,77
15	4	1,15	0,86	62	1	3,75	4,81	109	7	19,95	24,8
16	4	1,17	1,5	63	4	3,81	2,96	110	0,048	19,96	15,11
17	14	1,23	0,95	64	9	3,9	4,67	111	0,126	23,66	23,69
18	0,041	1,26	1	65	9	4,08	5,32	112	4	28,08	26,72
19	0,091	1,29	0,883	66	1	4,25	5,09	113	0,027	29,88	23,3
20	9	1,33	1,64	67	8	4,33	3,64	114	7	37,61	39,15
21	6	1,35	1,46	68	0,071	4,4	5,78	115	1	39,28	53,81
22	0,048	1,37	1,16	69	1	4,62	5,05	116	10	51,97	41,6
23	0,162	1,41	1,91	70	0,031	4,64	5,9	117	5	57,74	39,18
24	0,069	1,43	1,59	71	11	4,72	5,2	118	0,051	67,83	72,43
25	1	1,55	2,01	72	0,02	5,58	6,09	119	0,051	70,63	87,65
26	0,013	1,55	0,77	73	7	5,66	6,51	120	0,071	74,54	66,02
27	4	1,56	1,9	74	4	5,71	5,17	121	0,016	0,526	<0,002
28	6	1,59	2,1	75	0,315	5,86	5,93	122	0,03	0,56	<0,002
29	7	1,64	2	76	0,033	6,1	6,6	123	0,036	0,629	<0,002
30	0,027	1,7	1,7	77	2	6,45	7,61	124	0,053	0,344	<0,002
31	1	1,7	1,77	78	7	6,47	6,35	125	0,063	0,529	<0,002
32	2	1,74	1,68	79	0,259	6,71	7,85	126	1	0,402	<0,002
33	0,250	1,75	1,21	80	9	6,99	7,21	127	1	0,448	<0,002
34	0,069	1,76	2,31	81	0,254	7,18	6,5	128	1	0,413	<0,002
35	5	1,85	2,6	82	5	7,53	6,6	129	1	0,623	<0,002
36	0,009	1,95	2,21	83	10	7,83	8,31	130	3	0,555	<0,002
37	7	1,97	2,04	84	1	8,1	9,05	131	6	0,503	<0,002
38	0,032	1,97	2,13	85	0,078	8,2	7,5	132	6	0,502	<0,002
39	4	2,02	2,69	86	12	8,23	8,24	133	8	0,395	<0,002
40	1	2,02	1,05	87	0,011	8,39	8,2	134	13	0,620	<0,002
41	3	2,23	3,96	88	1	9,15	10,22	135	0,102	0,518	<0,002
42	5	2,31	3,2	89	0,049	9,6	7,2				
43	11	2,33	3,3	90	11	10,66	16,14				
44	0,282	2,52	2,53	91	1	11,16	15,46				
45	0,297	2,6	2,82	92	0,033	11,39	21,7				
46	10	2,64	3,76	93	0,039	12,72	7,85				
47	1	2,75	2	94	9	12,84	12,34				

Las muestras estudiadas fueron agrupadas en 4 grupos en función del nivel de PCT presentado. Grupo 1: <0,740 ng/mL (n=15), grupo 2: 0,740-1,99 ng/mL (n=38), grupo 3: 2-10 ng/mL (n=51) y grupo 4: > 10 ng/mL (n=31), comprendidos en el rango de edad de 0 a 14 años.

Aunque nuestra n total es de 135 muestras, pudimos observar que muestras con niveles de PCT inferiores a 0,650 ng/mL no pueden ser cuantificadas mediante la metodología en DBS ya que, en las 15 estudiadas, los valores estaban por debajo del límite de detección de la técnica tradicional cuyo valor es de 0,020 ng/mL. En la [tabla 2](#) se

Tabla 3 Resultados Passing-Bablok y correlación de Spearman

	Total Y= -0,0823 + 0,9520X	Grupo 2 Y= 0,2099 + 0,7339X	Grupo 3 Y= -0,1048 + 0,9464X	Grupo 4 Y= 2,3574 0,8992X
(Passing-Bablok)		x = DBS Y= PLASMA		
IC 95% Ordenada en el origen	(-0,2376 - 0,0875)	(-0,0750 - 0,3968)	(0,6691 - 0,4616)	(-3,3935 - 5,7089)
IC 95% Pendiente	(0,8909 - 1,0094)	(0,6000 - 0,9474)	(0,8349 - 1,0623)	(0,7117 - 1,1420)
Coefficiente de correlación de Spearman	0,982 (p < 0,001)	0,708 (p < 0,001)	0,870 (p < 0,001)	0,787 (p < 0,001)

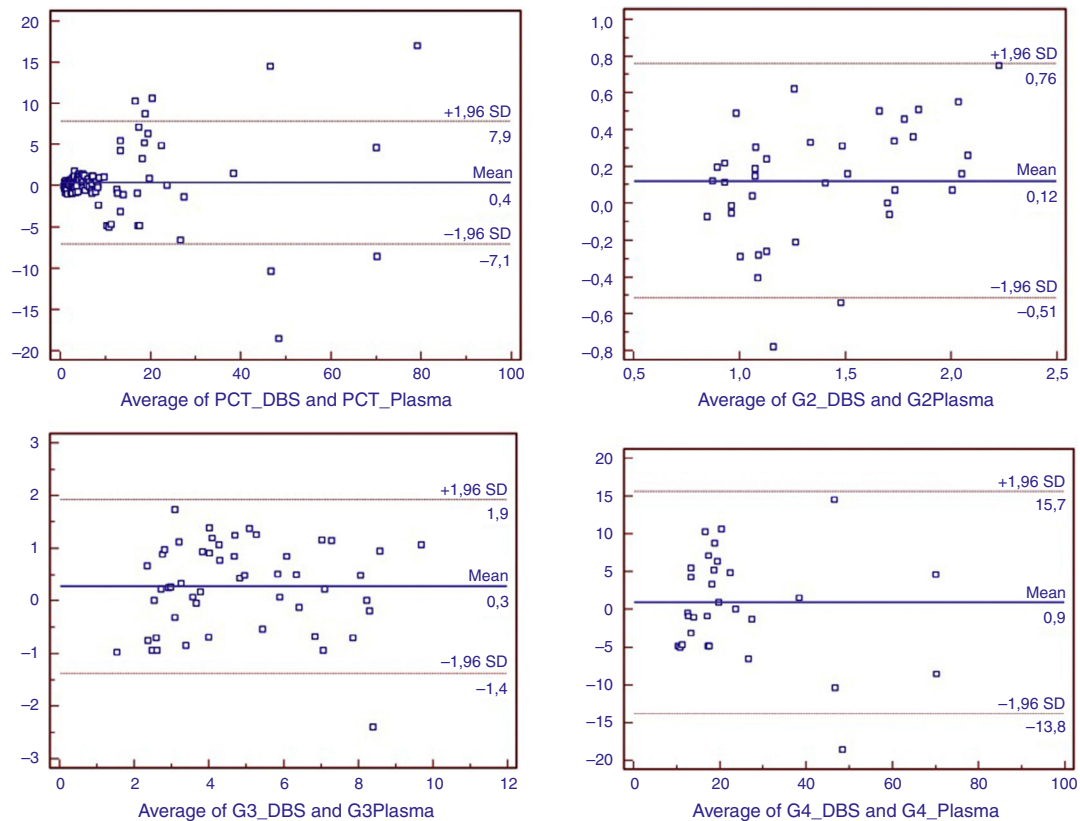


Figura 1 Análisis de Bland-Altman de la totalidad de muestras y distribuidas por grupos (2,3 y 4).

muestran los valores obtenidos por ambos métodos para la totalidad de las muestras.

Puesto que la muestra analizada no seguía una distribución normal (test de Kolmogorov-Smirnov, $p < 0,001$), y con el fin de explicar la variabilidad obtenida entre ambos métodos, se analizaron el coeficiente de correlación de Spearman, el método de regresión Passing-Bablok y el análisis de Bland-Altman para evaluar la concordancia entre ambos métodos.

Los resultados del coeficiente de correlación de Spearman y el análisis de Passing-Bablok se expresan en la [tabla 3](#).

Finalmente, y para comprobar si existían diferencias entre las medias de ambas poblaciones se aplicó el test U de Mann-Whitney mostrándonos ($p = 0,200$) la no existencia de diferencias entre las mismas.

En la [figura 1](#) se representa el análisis de Bland-Altman de la totalidad de las muestras así como distribuidas por grupos.

Discusión

El diagnóstico de los procesos infecciosos febriles presenta un especial interés ya que, hasta en un 30% de las ocasiones, pueden suponer una infección bacteriana masiva de la que deriven graves consecuencias¹⁸.

Entre los diferentes biomarcadores utilizados, la PCT es el parámetro más utilizado actualmente en las urgencias hospitalarias. La PCT es un compuesto estable en las muestras obtenidas¹⁹ y, su fácil determinación, su moderado coste, y la rapidez en la obtención de los resultados,

hacen que constituya una valiosa herramienta adicional para el diagnóstico y manejo de las infecciones bacterianas en pediatría^{20,21}.

Diferentes estudios señalan la gran sensibilidad y especificidad que presenta, mostrando mayor coste-efectividad que otros parámetros analíticos en diferentes procesos infecciosos^{22,23}. Aún no es considerado como el parámetro «gold standard» para este tipo de eventos debido a que su valor predictivo negativo no es siempre del 100%, pudiendo conducir, en algunas ocasiones, a interpretaciones erróneas.

Diferentes metaanálisis realizados para la evaluación de procesos febriles en poblaciones pediátricas^{24,25} concluyen que los niveles de PCT plasmáticos deben utilizarse en combinación con criterios de predicción clínica para aumentar la eficacia de los datos obtenidos. En nuestro estudio, puede observarse la utilidad del empleo de este biomarcador corroborado por el diagnóstico definitivo posterior. La excelente correlación existente entre los niveles de PCT analizados en ambos tipos de muestras (plasma/sangre seca en papel) en el mismo paciente, la concordancia entre las mediciones (según el análisis de Bland-Altman realizado) así como la falta de significación estadística entre sus resultados, es clara expresión de la utilidad de la muestra DBS. No obstante el estudio presenta una limitación cuando estamos ante valores bajos de PCT. Como se muestra anteriormente en los resultados, en 15 de nuestras muestras no se pudieron determinar los valores de PCT, siendo el valor mínimo medido en DBS de 0,650 ng/mL. Por ello, a pesar de la buena correlación que existe entre métodos, se deben manejar los resultados con cautela en estos casos para tomar decisiones clínicas siendo recomendable, en caso de valores iniciales bajos, el repetir la determinación pasadas 4-5 h, por si nos encontramos ante el inicio precoz de un proceso séptico grave²⁶.

El hecho de poder determinar este marcador mediante DBS tiene un especial interés para la población pediátrica donde, con frecuencia, la extracción de sangre venosa presenta dificultades. La obtención de la muestra por punción en el talón o yema del dedo evita este problema contribuyendo al diagnóstico rápido de este tipo de procesos infecciosos, permitiéndonos instaurar el tratamiento específico que disminuirá las complicaciones que estas pueden originar.

La obtención de valores de PCT en los niveles de la normalidad permitirá una mejor optimización de los recursos hospitalarios evitando ingresos, así como el uso inadecuado de antibióticos en procesos inflamatorios no infecciosos, donde no solo son ineficaces sino que contribuyen al desarrollo de resistencias, aumentan los costes, y añade los riesgos de toxicidad y reacciones alérgicas derivadas de su uso.

Podemos concluir de nuestro estudio la existencia de una buena correlación entre métodos, y las ventajas que aporta el uso de las muestras DBS. No obstante podría mejorarse la sensibilidad del método ya que no podría excluirse la presencia de infección en aquellas muestras con resultados bajos (inferiores a 0,650 ng/mL), siendo recomendable realizar determinaciones seriadas en estos casos.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Meisner M. Procalcitonin: a new, innovative infection parameter; biochemical and clinical aspects. 3.ª ed New York: George Thieme Verlag, Stuttgart; 2000.
2. Muller B, White JC, Nylen ES, Snider RH, Becker KL, Habener JF. Ubiquitous expression of the calcitonin-receptor-like receptor-1 gene in multiple tissues in response to sepsis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:396-404.
3. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*. 2001;29:1303-10.
4. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*. 2003;348:1546-54.
5. Andreola B, Bressan S, Callegaro S, Liverani A, Plebani M, da Dalt L. Procalcitonin and C-reactive protein as diagnostic markers of severe bacterial infections in febrile infants and children in the emergency department. *Pediatr Infect Dis J*. 2007;26:672-7.
6. Dandona P, Nix D, Wilson MF, Aljada A, Love J, Assicot M, et al. Procalcitonin increase after endotoxin injection in normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994;79:1605-8.
7. Patil VK, Morjaria JB, de Villiers F, Babu SK. Associations between procalcitonin and markers of bacterial sepsis. *Medicina (Kaunas)*. 2012;48:383-7.
8. Van der Kaay DC, de Kleijn ED, de Rijke YB, Hop WC, de Groot R, Hazelzet JA. Procalcitonin as a prognostic marker in meningococcal disease. *Intensive Care Med*. 2002;28:1606-12.
9. Casado-Flores J, Blanco-Quirós A, Asensio J, Arranz E, Garrote JA, Nieto M. Serum procalcitonin in children with suspected sepsis: a comparison with C-reactive protein and neutrophil count. *Pediatr Crit Care Med*. 2003;4:190-5.
10. Han YY, Doughty LA, Kofos D, Sasser H, Carcillo JA. Procalcitonin is persistently increased among children with poor outcome from bacterial sepsis. *Pediatr Crit Care Med*. 2003;4:21-5.
11. Ugarte H, Silva E, Mercan D, de Mendonca A, Vincent JL. Procalcitonin used as a marker of infection in the intensive care unit. *Crit Care Med*. 1999;27:498-504.
12. McCabe ER, Huang SZ, Seltzer WK, Law ML. DNA microextraction from dried blood spots on filter paper blotters: potential applications to newborn screening. *Hum Genet*. 1987;75:213-6.
13. Hope VD, Hickman M, Ngui SL, Jones S, Telfer M, Bizzarri M, et al. Measuring the incidence, prevalence and genetic relatedness of hepatitis C infections among a community recruited sample of injecting drug users, using dried blood spots. *J Viral Hepat*. 2011;18:262-70.
14. Lehmann S, Delaby C, Vialaret J, Ducos J, Hirtz C. Current and future use of «dried blood spot» analyses in clinical chemistry. *Clin Chem Lab Med*. 2013;51:1897-909.
15. Mei JV, Alexander JR, Adam BW, Hannon WH. Use of filter paper for the collection and analysis of human whole blood specimens. *J Nutr*. 2001;131:1631S-166S.
16. Camelier M, de Mari J, Burin M, Civallero G, Giugliani R. Extended use of dried-leukocytes impregnated in filter paper samples for detection of Pompe, Gaucher, and Morquio A diseases. *Clin Chim Acta*. 2015;446:218-20.
17. Bobillo Lobato J, Sánchez Peral BA, Durán Parejo P, Jiménez Jiménez LM. Detection of c. -32T>G (IVS1-13T>G) mutation of Pompe disease by real-time PCR in dried blood spot specimen. *Clin Chim Acta*. 2013;418:107-8.
18. Van der Bruel A, Thompson MJ, Haj-Hassan T, Stevens R, Moll H, Lakhnypaul M, et al. Diagnostic value of laboratory test in identifying serious infectious in febrile children: Systematic review. *BMJ*. 2011;342:d3082.

19. Milcent K, Poulalhon C, Fellous CV, Petit F, Bouyer J, Gajdos V. Stability of procalcitonin at room temperature. *Clin Lab*. 2014;60:1921–4.
20. Van Rossum AM, Wulkan RW, Oudesluys-Murphy AM. Procalcitonin as an early marker of infection in neonates and children. *Lancet Infect Dis*. 2004;4:620–30.
21. Pierce R, Bigham MT, Giuliano JS. Use of procalcitonin for the prediction and treatment of acute bacterial infection in children. *Curr Opin Pediatr*. 2014;26:292–8.
22. Michaelidis CI, Zimmerman RK, Nowalk MP, Fine MJ, Smith KJ. Cost- effectiveness of procalcitonin-guided antibiotic therapy for outpatient management of acute respiratory tract infections in adults. *J Gen Intern Med*. 2013;29:579–86.
23. Bell JM, Shields MD, Agus A, Dunlop K, Bourke T, Kee F, et al. Clinical and cost-effectiveness of procalcitonin test for prodromal meningococcal disease: A meta-analysis. *PLoS-One*. 2015;10:e0128993.
24. England JT, del Vecchio MT, Aronoff SC. Use of serum procalcitonin in evaluation of febrile infants: A meta-analysis of 2317 patients. *J Emerg Med*. 2014;47:682–8.
25. Lin SG, Hou TY, Huang DH, He SY, Lin YD, Zhang LY, et al. Role of procalcitonin in the diagnosis of severe infection in pediatric patients with fever and Neutropenia, a systemic review and meta-analysis. *Pediatr Infect Dis J*. 2012;3:e182–8.
26. Lin SG, Hou TY, Huang DH, He SY, Lin YD, Zhang LY, et al. Serum procalcitonin level and other biological markers to distinguish between bacterial and aseptic meningitis in children: a European multicenter case cohort study. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2008;162:1157–63.