

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko–technologická

Klinický význam procalcitoninu
Tereza Foltýnková

Bakalářská práce

2017

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Tereza Foltýnková**
Osobní číslo: **C14261**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Klinický význam prokalcitoninu**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

- 1) Přehledně zpracujte aktuální poznatky o klinickém významu prokalcitoninu.
- 2) Podrobněji se zaměřte na využití prokalcitoninu jako bílkoviny akutní fáze a tumormarkeru.
- 3) Zpracujte současné poznatky o stanovení prokalcitoninu v biologickém materiálu, včetně podmínek pro odběr, transport a uchování vzorku.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Pavla Královcová, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **28. listopadu 2016**

Termín odevzdání bakalářské práce: **7. července 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47 b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 30.6 2017

Tereza Foltýnková

Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat mé vedoucí bakalářské práce, paní Mgr. Pavle Královcové, Ph.D. za cenné rady, připomínky a vstřícnost při zpracování této bakalářské práce.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se zaměřuje na prokalcitonin, jako bílkovinu akutní fáze. Zabývá se také stanovením v biologickém materiálu pomocí vybraných imunologických metod a aktuálními poznatky o využití v klinické praxi. Bylo zjištěno, že prokalcitonin je nepostradatelným markerem současnosti a je stále předmětem mnoha studií. Má velký význam v diagnostice kardiovaskulárních onemocnění, pankreatitid, urosepsí, nádorových onemocnění a při transplantacích.

KLÍČOVÁ SLOVA

prokalcitonin, sepse, bílkoviny akutní fáze, zánět, C–reaktivní protein

TITLE

The clinical importance of procalcitonin

ANNOTATION

This thesis focuses on procalcitonin as an acute phase protein. It also deals with determination in biological material using selected immunological methods and current knowledge about use in clinical practice. Procalcitonin has been found to be an indispensable marker of the present and is still the subject of many studies. It is very important in the diagnosis of cardiovascular diseases, pancreatitis, urosepsis, cancer and transplantation.

KEYWORDS

procalcitonin, sepsis, acute phase protein, inflammation, C–reactive protein

Obsah

Seznam obrázků	9
Seznam tabulek.....	10
Seznam zkratk.....	11
Úvod.....	12
1. Zánět jako základní obranná reakce	13
1.1 Charakteristika zánětu	13
1.2 Buněčné mediátory zánětu	13
1.3 Lokální odpověď a systémová odpověď	14
1.4 Chemické zánětové mediátory	14
1.4.1 Cytokiny	15
1.4.2 Chemokiny	15
1.4.3 Interleukiny.....	16
1.4.4 Interferony	16
2. Markery zánětu	18
2.1 Reaktanty akutní fáze zánětu	18
2.2 C-reaktivní protein.....	18
3. Septické stavy	21
3.1 Klinické příznaky	22
3.2 Příčiny vzniku	22
3.3 Diagnóza	23
3.4 Patofyziologie	23
3.5 Diagnostika	24
4. Prokalcitonin.....	26
4.1 Historie.....	26
4.2 Biochemická charakteristika	27
4.3 Kinetika	28

4.4	Ukazatel septických stavů	29
4.5	Zdroje prokalcitoninu během sepse	31
4.6	Regulace	31
4.7	Prokalcitonin v diagnostice	32
4.7.1	Mnohočetný myelom	33
4.7.2	Interstinální ischemie	33
4.7.3	Neonatální a meningokokové infekce	34
4.7.4	Onkologická onemocnění	35
4.7.5	Nový biomarker pro kardiology	35
4.7.6	Zánětlivé onemocnění slinivky břišní a ledvin	36
4.8	Prokalcitonin versus CRP	37
5.	Stanovení prokalcitoninu	39
5.1	Metody stanovení prokalcitoninu	40
5.1.1	Semikvantitativní imunochromatografický test	40
5.1.2	Imunoluminiscenční test	41
5.1.3	Elektrochemiluminiscenční metody	42
5.1.4	Fluorescenční enzymová imunoanalýza	43
5.1.5	Latexová imunoturbidimetrie	44
5.2	Interpretace výsledků	44
	Závěr	46
	Seznam použitých informačních zdrojů	47

Seznam obrázků

Obrázek 1. Struktura C–reaktivního proteinu	19
Obrázek 2. Struktura prokalcitonu	27
Obrázek 3. Kinetické profily různých biomarkerů bakteriální infekce	29
Obrázek 4. Diagnostická destička ke stanovení PCT	41
Obrázek 5. Referenční karta pro porovnání výsledků	41
Obrázek 6. Luminometr LB 953	42
Obrázek 7. Cobas e411	43
Obrázek 8. Přístroj Vidas 30	44

Seznam tabulek

Tabulka 1. Typy cytokinů	16
Tabulka 2. Srovnání CRP a PCT.....	37
Tabulka 3. Srovnání CRP a PCT.....	38
Tabulka 4. Chyby při odběru krve.....	39
Tabulka 5. Chyby při transportu a skladování vzorku	40
Tabulka 6. Referenční hodnoty koncentrací PCT a jejich význam.....	45

Seznam zkratek

AMK	aminokyselina
APP	proteiny akutní fáze (i.e. acute phase proteins)
ARDS	syndrom akutní respirační tísně
ATB	antibiotika
CALC-I	gen kódující prokalcitonin
CGRP	peptid příbuzný kalcitoninu
CRP	C-reaktivní protein
ECLIA	elektro-chemiluminiscenční imunoanalýza
EDTA	ethylendiaminotetraoctová kyselina
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
IFN	interferon
IL-1-10	interleukin 1-10
LDL	lipoprotein o nízké hustotě
LPS	lipopolysacharid
MCD	meningokoková nemoc
MODS	syndrom multiorgánové dysfunkce (i.e. multiorgan dysfunction syndrome)
NFk β	transkripční faktor β
PCT	prokalcitonin
PMN	polymorfonukleární neutrofil
SAA	sérový amyloid A
SIRS	syndrom systémové zánětlivé odpovědi (i.e. systemic inflammatory response syndrome)
TNF- α/β	faktor nekrotizující tumory α/β (i.e. tumor necrosis factor)

Úvod

Zánětlivá onemocnění a septické stavy představují již odedávna závažný lékařský problém při komplikacích nejrůznějších onemocnění. I přes značné pokroky v medicíně a diagnostice stále patří mezi stavy ohrožující život a způsobující vysokou mortalitu.

Sepse je chorobný stav, který je těžké definovat, diagnostikovat a léčit. Je to řada procesů a změn v lidském organismu, způsobených celkovou reakcí těla na infekci, při které proniká patogenní mikroorganismus z místa svého původního ložiska do krevního oběhu a zaplaví celý organismus. Stav se může rozvinout do těžké sepse, která je pro většinu případů letální. Nejpravděpodobněji se sepsa vyvine u lidí, kteří jsou hospitalizováni kvůli závažným onemocněním. Dále pak velmi mladí či velmi staří pacienti, anebo v souvislosti s poraněními a rakovinou. Neexistuje žádný jasný laboratorní ukazatel nebo test, který by řádně sepsi diagnostikoval. Na sepsi umírá denně na celém světě asi 1400 lidí. Počet úmrtí následkem sepse je srovnatelný s počtem úmrtí na rakovinu plic, tlustého střeva a prsu dohromady. Postihuje všechny věkové kategorie.

Nejlepší způsob, jak zabránit komplikacím sepse je rychlá a účinná diagnostika. Za posledních deset let se podařilo najít hned několik parametrů, ale žádný z nich nedokázal specificky prokázat progresi onemocnění. Důležitými ukazateli, kromě klasických fyzikálně-anamnestických údajů, jsou také laboratorní testy. Dodnes není znám spolehlivý biochemický marker, který je objektivní a také specifický. Vyřešit obtížnou diagnózu pomáhají velmi podstatné markery zánětu, které jsou používány pravidelně. V současné době mezi tyto markery řadíme proteiny akutní fáze, cytokiny a prokalcitonin. Spíše jen ve výzkumném stádiu se používají adhezivní molekuly a solubilní receptory cytokinů. Nejdelší dobu je v diagnostice používán C-reaktivní protein, k jehož vzestupu dochází již za 6–12 hodin po zánětlivém stimulu. Dostupné je stanovení v séru i plasmě, avšak reakce je nespecifická vůči zánětlivému podnětu.

Tato práce se zaměřuje na jeden z markerů sepse, kterým je prokalcitonin. Patří k novějším parametrům používaným v diagnostice, jehož zvýšená plazmatická koncentrace koreluje se závažností zánětu a poukazuje na bakteriální nebo virový původ. Cílem této práce je shrnout nejnovější teoretické poznatky o klinickém významu prokalcitoninu, jakožto markeru septických stavů a také o jeho stanovení.

1. Zánět jako základní obranná reakce

Zánětlivý stav je odpovědí organismu na různá poškození tkáně. Fyziologicky zastává obrannou funkci, ale může být také poškozující reakcí organismu. Zánět je vyvoláván infekčními mikroorganismy, působením chemických a fyzikálních vlivů nebo ischemií tkáně.

1.1 Charakteristika zánětu

Místní i celkovou obrannou reakcí odpovídá organismus na bakteriální, virovou a parazitární infekci, na poškození tkání fyzikálními i toxickými látkami. Dále na lokalizovanou imunitní odpověď, tj. reakci antigenu s protilátkou nebo na setkání senzibilizované buňky s antigenem. Jde o fylogeneticky i ontogeneticky nejstarší obranný mechanismus. Jeho úlohou je likvidace, zředění nebo vyloučení škodliviny a poškozené tkáně nebo alespoň jejich ohraničení a současná reparace. Klíčovou úlohu v zánětové reakci sehrává endotel, krevní destičky, leukocyty, plazmatický koagulační systém a komplement. Akutní zánět lze považovat za fyziologický proces, protože na organismu nezanechá žádné následky a poškozená tkáň je zcela zhojena. Patologickým se stává zánět chronický, kdy dochází k poškození tkáně a následné nahrazení vazivem vede k poškození tkáně či orgánu. [1]

1.2 Buněčné mediátory zánětu

Cévní endotel je esenciální složkou regulace zánětové odpovědi. Za fyziologického stavu spočívá úloha endotelu především v lokální regulaci cévního tonu, regulaci permeability cévní stěny a také zajištění antitrombogenního povrchu cévy. Při zánětlivé reakci jsou endotelové buňky aktivovány cytokiny, především interleukinem-1 α (IL-1 α) a tumor necrosis factorem- β (TNF- β), produkovanými mononukleárními fagocyty, mezi které řadíme monocyty a makrofágy. Trombogenní potenciál je zvyšován aktivovaným endotelem a dochází k vazodilataci a také ke zvýšení permeability, což umožňuje proniknutí proteinů i migraci leukocytů do intersticia. Endoteliárními buňkami je uvolňována řada mediátorů vazodilatační či vazokonstrikční povahy.

Významnou složkou jsou trombocyty, jejichž úkolem je vytvořit primární hemostatickou zátku v místě porušení stěny cévní a uvolnit řadu mediátorů. Ve spolupráci s negativně nabitým

povrchem fosfolipidů aktivuje vnitřní koagulační systém. Kromě hemostázy také krevní destičky zasahují řadou mediátorů i do vlastního zánětlivého procesu. Polymorfonukleární leukocyty (PMN) představují první obrannou linii buněk působících proti infekci.

Mononukleární fagocyty jsou schopny fagocytózy a jsou podobnými mediátory jako neutrofilů. Dále sem řadíme lymfocyty, které mají také své místo při zánětlivé odpovědi. T-lymfocyty představují asi 70 % všech lymfocytů, které rozpoznávají cizí buňky prostřednictvím jejich povrchových antigenů. B lymfocyty tvoří asi 10–20 % všech lymfocytů, po jejichž kontaktu se specifickým antigenem dojde k jejich aktivaci, proliferaci a diferenciaci v plazmatické buňky, tvořící specifickou protilátku proti vyvolávajícímu antigenu.

Žírné buňky a bazofily obsahují cytoplasmatická granula se zánětovými mediátory (histamin, serotonin), které se při jejich stimulaci degradují a uvolňují svůj obsah do okolí. Tímto se stávají hlavními buňkami, které perivaskulárně spouštějí zánětovou odpověď.

V poslední řadě hovoříme o NK-buňkách, což jsou elementy velice podobné lymfocytům, ale s odlišnou povrchovou antigenní vlastností. Jsou to přirozeně cytotoxické buňky, jejichž úkolem je odstraňování nádorových buněk či buněk infikovaných virem. [2]

1.3 Lokální odpověď a systémová odpověď

Lokální zánět se klinicky projevuje zčervenáním (rubor) z důvodu velké dodávky krve do postižené tkáně. Charakteristická je zvýšená místní teplota (calor) dále otok (tumor), který je způsoben zvýšenou propustností kapilár pro tekutiny a bolestivost (dolor). Může také docházet ke ztrátě funkce postiženého orgánu (functio laesa) či jeho části. [3]

Typickým příznakem systémového zánětu je horečka. Celkový zánět s horečkami může vyústit až do zhroucení funkcí organismu. Při těchto procesech dochází k uvolňování velkého množství různých mediátorů, jako jsou cytokiny, kininy, složky komplementu, histamin. Další odpovědí na zánět je leukocytóza a produkce proteinů akutní fáze (IL-6, TNF- α , IL-1). Při masivním průniku mikroorganismů do krevního oběhu dochází k septickému šoku. [4]

1.4 Chemické zánětové mediátory

Průběh zánětu regulují i zvláštní chemické látky, mediátory zánětu. Patří mezi ně různé chemokiny, cytokiny, prostaglandiny, proteiny akutní fáze zánětu a další. Komunikace mezi

buňkami zánětové odpovědi je zajišťována několika mechanismy–kontaktem buněk přes povrchové membránové receptory a solubilními mediátory, z nichž nejdůležitější roli sehrávají cytokiny. [2]

1.4.1 Cytokiny

Jedná se o látky s nízkou molekulární hmotností, vylučované jak imunitním podnětem, tak i neimunitním, v reakci na různé stimuly. Jsou tedy základní regulátory imunitního systému. V organismu se vyskytují buď rozpuštěné v tekutině, jako je plazma, nebo vázané na membráně. Hlavním úkolem je přenos důležitých informací mezi jednotlivými buňkami a mají vliv na regulaci růstu buněk, diferenciaci, chemotaxi, aktivaci nebo zvýšenou cytotoxicitu. Většina cytokinů působí na několik různých druhů buněk a často působí kaskádovitě, kdy jeden cytokin indikuje tvorbu druhého. Také mohou být jednotlivé cytokiny nahrazeny jinými. Účinky různých cytokinů se vzájemně doplňují, jedná se o synergismus, ale mohou působit i antagonisticky. Existuje několik způsobů, jak třídit cytokiny na základě jejich struktury nebo funkce. Historicky byly tříděny podle typu buněk, kterými byly tvořeny. Například monokiny, produkované monocyty a makrofágy. Dále lymfokiny produkované lymfocyty. Protože jsou některé cytokiny produkovány oběma typy těchto buněk, používáme pro ně název interleukiny s číslováním podle pořadí, ve kterém byla jejich struktura popsána. Však i tento termín má svoji negativní stránku, protože bývají shodné s jinými skupinami, jako jsou chemokiny a interferony. [5]

1.4.2 Chemokiny

Jedná se o nízkomolekulární peptidy o hmotnosti 8–10 kDa a představují skupinu více než 50 malých cytokinů s chemotaktickým účinkem. Jsou primárně zapojeny do chemotaxe lymfocytů, monocytů a neutrofilů. Jejich sekrece je iniciována monocyty, makrofágy, ale i jinými buňkami včetně endoteliálních buněk, trombocytů, neutrofilů, T–buněk a fibroblastů. Jsou vyvolávány během imunitní odpovědi a regulují přísun imunitních buněk do místa infekce. [6]

1.4.3 Interleukiny

Hovoříme o heterogenní skupině cytokinů, regulujících především aspekty vývoje a aktivaci leukocytů. Dodnes bylo popsáno celkem 35 interleukinů a některé z těch lépe charakterizovaných jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1. Typy cytokinů [5]

Cytokin	Produkce	Aktivita
IL-1	Makrofágy	Aktivace endotelu Větší přístup efektorových buněk
IL-2	T-lymfocyty	Růstový faktor T-buněk NK
IL-3	T-lymfocyty	Stimulace hemopoetických prekurzorů
IL-4	TH2, bazofily	Stimulace B-lymfocytů
IL-6	TH2, makrofágy	Stimulace T,B
IL-10	TH2, makrofágy, neutrofilly	Indukce diferenciaci na plasmocyty
IL-12	Makrofágy, neutrofilly	Stimulace TH1 a NK
IFN- γ	TH1, NK buňky	Aktivace makrofágů
TNF- α	Monocyty, makrofág	Indukce místního zánětu, aktivace endotelií

1.4.4 Interferony

Jsou prozánětlivými molekulami, produkovanými řadou buněk, jako odpověď na virovou infekci. Svoji roli mají také při regulaci imunitního systému. Působí parakrinně, což znamená na buňky ve svém okolí. Vážou se na membrány okolních buněk a zvyšují jejich rezistenci k virové infekci. Antivirový stav je v buňce navozen stimulací syntézy dvou enzymů, proteinkinázy a oligoadenylátsyntetázy. Můžeme je rozdělit do dvou skupin podle typu I. Interferony (IFN), které dále dělíme na IFN- α a IFN- β . Dále podle typu II na IFN- γ .

Při rozdělení podle typu I. je IFN- α uvolňován makrofágy a produkován buňkami infikované některými viry. Navozuje v buňce antivirový stav. Další je IFN- β , k jehož uvolnění dochází pomocí fibroblastů a je také produkován buňkami infikovanými některými viry. Využíván v léčbě roztroušené sklerózy. A v poslední řadě také IFN- γ je uvolňován TH1 lymfocyty, indikuje syntézu enzymů směřující k potlačení replikace virů. Reguluje důležité aspekty imunitní reakce. [5]

2. Markery zánětu

Oblast markerů zánětu se na první pohled jeví jako jednoduchá problematika. Jsou velice často používány, takže by se zdálo, že jim každý rozumí. Bohužel není tomu tak. Každý marker má svá specifika, svou dynamiku, své záludnosti a je třeba o nich vědět, dát si na ně pozor a správně je využívat. Nároky na zánětlivé markery jsou takové: vysoká senzitivita a specifita, dostupnost statimového stanovení, cenová přijatelnost a možnost relevantní interpretace výsledků. V současné době mezi tyto markery řadíme proteiny akutní fáze jako jsou cytokiny, prokalcitonin a CRP. Spíše jen ve stádiu výzkumu se používají adhezivní molekuly a solubilní receptory cytokinů. [7]

2.1 Reaktanty akutní fáze zánětu

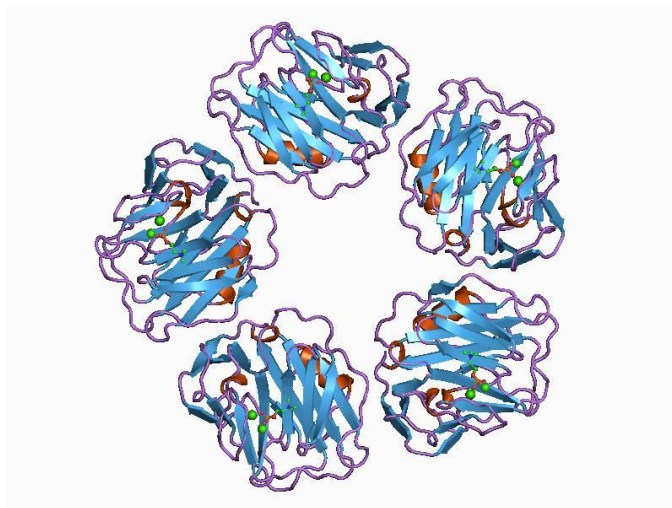
Zánětlivá reakce v organismu je provázena zvýšenou tvorbou proteinů akutní fáze zánětu. Nacházíme je v nízkých koncentracích v krevním séru i za fyziologických okolností. Jejich syntéza v jaterní tkáni je stimulována přítomností tkáňového poškození, nekrotických buněk různého původu. Příkladem může být bakteriální infekce, malignity, ischemie. Signál pro zahájení jejich tvorby se z místa poškození přenáší prostřednictvím mediátorů IL-1, IL-6, TNF α . [8]

Když v některém místě organismu vznikne zánět, jejich koncentrace se během několika hodin výrazně zvýší. Podle rozsahu tohoto zvýšení se proteiny akutní fáze (APP – acute phase proteins) rozdělují na hlavní a vedlejší. Hlavními APP u člověka jsou C-reaktivní protein (CRP) a sérový amyloid A (SAA), jejichž koncentrace se při zánětu zvyšuje až 1000 krát. Mezi vedlejší APP patří některé složky komplementu, inhibitory proteolytických enzymů jako jsou α_1 -antitrypsin, α_1 -antichymotrypsin. Jejich koncentrace v krevním séru se při zánětu zvyšuje pouze 2–3 krát. [9] Nově studovanými markery zánětu jsou elastasa z granulocytů, prokalcitonin a neopterin. [10]

2.2 C-reaktivní protein

C-reaktivní protein poprvé popsal v roce 1930 Tillet a Francis. Jeho jméno je díky schopnosti srážení a interakce s fosforylcholinovými zbytky polysacharidu C odvozeného

od kyseliny teichoové v buněčné stěně *Streptococcus pneumoniae*. Stejně jako jeho schopnost precipitovat ionty vápníku. Přestože je CRP považován za důležitý regulátor vrozeného imunitního systému a hlavní mediátor reakce akutní fáze, bývá taky spojován s různými chronickými zánětlivými procesy, jako jsou rakovina a kardiovaskulární onemocnění. [11] CRP, člen rodiny proteinů pentaxinu, je složen z 206 aminokyselin. CRP je vcelku starý a všudypřítomný protein u obratlovců i bezobratlých. Má charakteristickou strukturu, která se skládá z 5 identických globulárních polypeptidových podjednotek, které můžeme vidět na obrázku 1. Jedná se o pentagonálně uspořádaný protein, jehož molekulová hmotnost je 120 kDa. Vedle své role jako citlivého zánětlivého markeru také přispívá v diagnostice a léčbě řady nemocí. Je dobře známo, že CRP má velké prediktivní a prognostické hodnoty pro kardiovaskulární příhody, Hortonovu chorobu, Kawasakiho chorobu a revmatické polyomyaglie. [12]



Obrázek 1. Struktura C–reaktivního proteinu [13]

CRP je tvořen hepatocyty a následně vylučován do krevního oběhu. Cirkuluje v plasmě a může být lokalizován i v aterosklerotických lézích. CRP se váže na modifikované formy lipoproteinů s nízkou hustotou, tedy LDL. [14]

Je jedním z nejdůležitějších reaktantů akutní fáze, jehož koncentrace se při zánětu zvyšuje až tisíckrát a následně rychle klesá. Vrací se k normálním hodnotám během několika dnů po skončení zánětu. Fyziologicky bývá koncentrace menší než 2–8 mg/l. Působí jako opsonizující faktor pro fagocytózu bakterií, parazitů a imunokomplexů, váže chromatin i malé

částice nukleoproteinů. Nejvyšší hodnoty CRP se vyskytují v případě bakteriální infekce. Vyšetřením lze odlišit infekce bakteriální od virových. Stanovením lze i odhalit riziko pooperačních infekcí. Mírný vzestup CRP také provází infarkt myokardu. Obecně platí, že mírně zvýšené hladiny CRP, kolem 10 mg/l patří mezi známky kardiovaskulárního rizika, je indikátorem rozvoje aterosklerózy. Sledování CRP je užitečné i při monitorování autoimunitních onemocnění. CRP je široce používán jako rychlý, vhodný a cenově nenáročný ukazatel intenzity zánětu. Nevýhodou CRP je nízká specifita. [15]

3. Septické stavy

Sepse nepochybně provází lidstvo od nepaměti. Ať byla označována jako otrava krve, horečka omladnic, nebo byla vyvrcholením těžkého probíhajícího infekčního onemocnění. V posledních čtyřiceti letech se však na celém světě několikanásobně zvýšil počet sepsí vzniklých ve zdravotnických zařízeních. Sepsa jako primární onemocnění je vzácná (například urosepsa), ale při řadě různých onemocnění se objevuje jako komplikace. [16]

Definovat stavy, při nichž kolují v krvi mikroorganismy nebo jejich produkty, není snadné. Sepsa je klinický stav těžké infekce spojený s výskytem bakterií v krvi. V klasickém pojetí bývá charakterizována persistující nebo intermitentní bakteriemií, existencí brány vstupu a primárního ložiska. Ale také možným vznikem sekundárních metastatických ložisek a přítomností velmi těžké celkové symptomatologie. Tendence k tvorbě hnisavým metastáz se značně odlišuje podle druhu etiologického agens. Ke zdůraznění skutečnosti, že sepsa je spíše souhrn příznaků než specifická choroba, je často používán i výraz septický syndrom. [17]

V současnosti je sepsa chápána jako klinická manifestace odpovědi hostitele na infekci různými bakteriemi nebo jinými mikroorganismy. Tato generalizovaná septická odpověď bývá charakterizována uvolněním stejných mediátorů, které byly prokázány u řady dalších onemocnění, například u pankreatitid, popáleninového traumatu, chronické intoxikace salicyláty, fulminantního jaterního selhání a také u některých nádorových onemocnění. Hovoříme o syndromu systémové zánětlivé odpovědi – systemic inflammatory response syndrome – SIRS. Jako SIRS je označován stav charakteristický tělesnou teplotou 38°C , tepovou frekvencí nad 20 tepů/min a dále počtem leukocytů nad 12 000/ μl nebo pod 4 000/ μl . Jedná se o delokalizovaný a dysregulovaný zánět tak velké intenzity, že dochází k poruchám mikrocirkulace a následkem k perfúzi vitálních orgánů a tudíž k rozvoji sekundární poruchy funkce orgánů. [18]

V počátečním stavu SIRS převládá výskyt prozánětlivých markerů. V pokročilejším stádiu SIRS dochází k posunutí směrem k protizánětlivým pochodům. Pokud tento posun není monitorován, u pacienta se ve většině případů rozvine sekundární nemoc, která vede ke smrti pacienta. Příkladem je popálení, kdy se T-lymfocyty posouvají od zánětlivých Th1 (TNF- α , INF- γ) k protizánětlivým Th2 (IL-4, IL-10), to je spojován s horším přežíváním pacientů. Roger Bone definuje průběh SIRS k syndromu multiorganového selhání (MODS) v pěti krocích: lokální odpověď, počáteční systémová odpověď, masivní systémová odpověď,

nadměrná imunosuprese, imunitní nesoulad, kdy patofyziologická odpověď pacienta je nevhodná pro jeho biologické potřeby. [19]

3.1 Klinické příznaky

V časně fázi sepse mohou být klinické příznaky zcela nespecifické. Téměř všechny symptomy kardiální, zažívací, respirační, urinární či kožní, ale také změny chování mohou být první manifestací sepse. [17] Kromě příznaků, souvisejících s vyvolávající příčinou bývá sepse spojována buď s horečkou, nízkou tělesnou teplotou, rychlým dýcháním, zvýšenou srdeční frekvencí, leukocytózou a edémem. [20] Mezi rané znaky patří zrychlený tep, snížené močení a vysoký krevní cukr. Znamky sepse zahrnuje zmatenost, metabolickou acidózu, která může být doprovázena zrychleným dýcháním a vést k respirační alkalóze. Dále nízký krevní tlak, způsobený v důsledku snížené vaskulární rezistence, vyšší srdeční výdej a poruchy krevní srážlivosti, které mohou vést až k orgánovému selhání. Pokles krevního tlaku pozorovaný při sepsi, může vést k šoku. To může mít za následek závratě. Může se také objevit silné krvácení či podlitiny. [21]

3.2 Příčiny vzniku

Mezi nejčastější primární zdroje infekce vedoucí k sepsi řadíme plíce, břicho a močové cesty. Typicky, v 50 % všech případů, se sepse rozvíjí v plicích. Infekce vedoucí k sepsi jsou obvykle bakteriální, ale může se také jednat o plísňovou či virovou infekci. Dříve byly hlavní a nejčastější příčinou sepse gramnegativní bakterie, avšak v posledním desetiletí se hovoří o grampozitivních bakteriích. Nejčastěji se jedná o stafylokoky a předpokládá se, že způsobují více než 50 % případů sepse. Ostatní běžně se vyskytující bakterie při sepsi jsou *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, a některé druhy *Klebsiella*. Mykotické sepse představují přibližně 5 % případů těžké sepse a případů septického šoku. Nejčastějším původcem houbových infekcí je druh kvasinek *Candida* a také nosokomiální infekce, získané v nemocničních zařízeních. [22]

3.3 Diagnóza

Léčba vychází se znalosti etiologie, patogeneze i predisponujících činitelů při respektování jednotlivých stadií sepse. Léčba septického šoku je podstatně těžší než léčba traumatického, hemoragického či anafylaktického šoku. Jednotlivá opatření lze rozdělit do následujících kroků, které jsou: odstranění ložiska sepse, cílená a radikální antibiotická léčba, podpora a náhrada jednotlivých funkčních a orgánových systémů, ostatní opatření obecného rázu, speciální postupy u některých druhů sepsí a léčba základního onemocnění.

Musíme mít stále na paměti, že většina sepsí má v současné době nozokomiální původ, což m. j. znamená, že komplikuje řešení základní nemoci, pro kterou byl pacient původně diagnostikován a léčen. Na prvním místě stojí vždy odstranění nebezpečné hypoxémie a dosažení hemodynamické stability a tím i správné dodání kyslíku tkáním. Pak může následovat řada dalších opatření. Zahájení rychlé terapie je klíčové pro snížení úmrtnosti z důvodu těžké sepse. [21]

Během prvních tří hodin při podezření na sepsi by měla diagnostika zahrnovat vyšetření počtu bílých krvinek, měření sérového laktátu a získání náležitých kultur před zahájením antibiotické léčby. K identifikaci původce infekce by měly být získány alespoň dvě sady hemokultur, za použití lahví jak pro anaerobní, tak aerobní organismy. I přesto, že jsou bakterie v krvi přítomny asi jen v 30 % případů. Další možným způsobem detekce je pomocí polymerázové řetězové reakce. Jestliže máme podezření na další zdroje infekce, tak by měly být také získány hemokultury z těchto zdrojů. Může se jednat o moč, mozkomíšni mok, zranění nebo různé respirační sekrety. Dále při vyšetření zánětlivých markerů zjistíme zvýšenou koncentraci CRP, avšak nejcitlivější metodou je vyšetření hladiny prokalcitoninu (PCT). Bývá zvýšena nad 1,5 ng/l a odpovídá 100 % senzitivitě. Při laboratorním vyšetření nacházíme také hypoalbuminemii, hyponatremii, poruchu glukózové tolerance (pacient může mít i glykémii vyšší než 10, aniž by byl diabetik). Dalším znakem je také elevance jaterních testů a ledvinových ukazatelů. Zvýšená je i koncentrace cytokinů. [23]

3.4 Patofyziologie

Rané stádium těžkých sepsí je doprovázeno systémovou zánětlivou odpovědí. Sepse je charakterizovaná hemostatickou dysbalancí, endoteliální dysfunkcí ovlivňující kardiovaskulární systém a intercelulární homeostázu. Následkem těchto změn je buněčná hypoxie a apoptóza, která je projevem orgánové dysfunkce a dále následným orgánovým selháním.

V prvních hodinách po proniknutí infekce dochází ke zvýšení koncentrace cytokinů TNF- α a IL-1 β a také jsou aktivovány makrofágy. Dalším z kroků je aktivace komplementu, ke zvýšení C5 a dojde během prvních dvou hodin po započnutí sepsy. Jeho úkolem je stimulovat makrofágový systém a produkci prozánětlivých mediátorů. Následně jsou také produkovány antiinflatorní cytokiny. [24]

Významnou roli v sepsi hraje endotel, jehož hlavní funkcí je regulace cévního tonu, imunitní odpovědi a koagulace. Za normálních okolností má antikoagulační vlastnosti a produkuje vazoaktivní látky, včetně oxidu dusnatého, endotelinu a prostacyklinů. V případě poškození endotelu dojde ke zvýšené permeabilitě a následnému úniku intravaskulární tekutiny, což vede k rozvoji celotělových edémů. Důsledkem aktivace dalších látek dochází k systémové vazodilataci. Hypotenze a poškození endotelu se zvýšenou permeabilitou kapilár vede nejen ke ztrátě tekutin a hypovolemii, ale i ke ztrátám albuminu extracelulárně. [24]

V důsledku změn na úrovni mikrocirkulace aktivace proinflatorních cytokinů dochází k myokardiální dysfunkci. Proto pacienti v sepsi mohou mít nespecificky zvýšenou hladinu troponinu. Snížená aktivita dýchacího řetězce mitochondrií může být příčinou buněčné hypoxie a energetického selhání s rozvojem multiorgánového selhání u pacientů v septických stavech. Za fyziologických okolností je koagulační systém v rovnováze s přirozenými antikoagulačními systémy (antitrombin, protein C, protein S, inhibitor tkáňového faktoru). V sepsi dochází ke snížení plasmatických hladin přirozených antikoagulantů a v konečném bodě k převaze prokoagulačního stavu. [24]

3.5 Diagnostika

Významnými zánětlivými markery v krevním obraze jsou zvýšený nález neutrofilních granulocytů (40–70 %, z čehož 10 % jsou nezralé formy), leukocytóza nad 1×10^9 /l, leukopenie pod 4×10^9 /l. Odběry se provádějí do zkumavek s protisrážlivými činidly (EDTA). Hodnoty CRP stoupají hlavně při bakteriálních infekcích během 10 hodin, po adekvátní antibiotické léčbě rychle klesá k normálu. Odběr se provádí bez protisrážlivého roztoku. PCT, jehož hodnota normy se pohybuje pod 0,5 μ g/l je při sepsi až o 100–1000krát vyšší. Detekovatelný je do 2–3 hodin. Je dynamičtější než CRP a klesá zhruba po 20 až 24 hodinách. Slouží pro odlišení bakteriálního od virového původu a u zdravých jedinců jsou tyto koncentrace nedetekovatelné.

Cytokiny IL-6, IL-8, TNF jsou také významnými ukazateli. Hodnota normy IL-6 je do 11 ng/l. Je to prozánětlivý faktor, stoupá úměrně spolu se závažností sepse. Normální hodnoty IL-8 jsou do 9,1 ng/l, také se jedná o prozánětlivý faktor. TNF, jehož normální hodnotou je méně jak 8 mg/l, účastní se zvyšování permeability kapilár, aktivaci koagulace a komplementu. V septickém stavu jeho zvýšená hodnota přetrvává.

Koncentrace SAA se zvyšuje až 1000krát během 24 hodin. Je známkou infekce, nádorového bujení a u infekcí vykazuje větší vzestup než CRP. Další zvýšené proteiny akutní fáze jsou alfa-1-antitrypsin, orosomukoid, ceruloplasmin, haptoglobin. Odběry séra se provádějí bez protisrážlivého roztoku. Dalším parametrem je laktát, jehož normální hodnoty jsou mezi 1,2–2,2 mmol/l, odběry se provádějí z kapilární či arteriální krve.

Odběr hemokultur je prováděn při vzestupu tělesné teploty a to způsobem venepunkce. Provádí se 2–3x. Odebírané množství odpovídá 10–30 ml. Tento odběr je nutné provádět ještě před podáním antibiotik.

Odběr materiálu na bakteriologické vyšetření, například moč, je odebírána ze středního proudu suprapubickou punkcí nebo cévkováním. Používá se sterilní zkumavka a vzorek je nutné uchovávat při teplotě +4 °C a odeslat k vyšetření do 2 hodin. Mezi další postupy patří také vyšetření sputa, výtěr z konečníku a horních a dolních cest dýchacích. Výtěr z cest dýchacích se rutinně provádí nalačno nebo 2–3 hodiny po jídle. Výtěr z chorobných ložisek a ran je prováděn tamponem, který je napuštěný deoxycholatecitrátovým agarem za přísně sterilních podmínek. U těchto výtěrů je pravidlem neskladovat v lednici, vzorky je potřeba odeslat do 3 hodin. Punktát a hnis je odebírán do sterilních zkumavek, skladován při teplotě +4 °C a odeslán k vyšetření do 1 hodiny od odběru. [24]

4. Prokalcitonin

Rozvinuté bakteriální infekce mohou mít za následek sepsi. Sepse s akutní orgánovou dysfunkcí je velkou hrozbou pro život. Včasná diagnóza bakteriální infekce je nadmíru důležitá. Nicméně, někteří pacienti s infekcí mají minimální nebo dokonce žádné příznaky či známky tohoto onemocnění. Rozšířené podávání antibiotik všem těmto pacientům souvisí s problémem následné rezistence bakterií vůči antibiotikům. Je zapotřebí účinné a přesné biochemické diagnostiky. V tomto případě nastupuje před nedávnem objevený PCT, jako marker bakteriální infekce u kriticky nemocných, vyvolávaný sepsí a infekcí, který je detekovatelný v plasmě pacientů. [25]

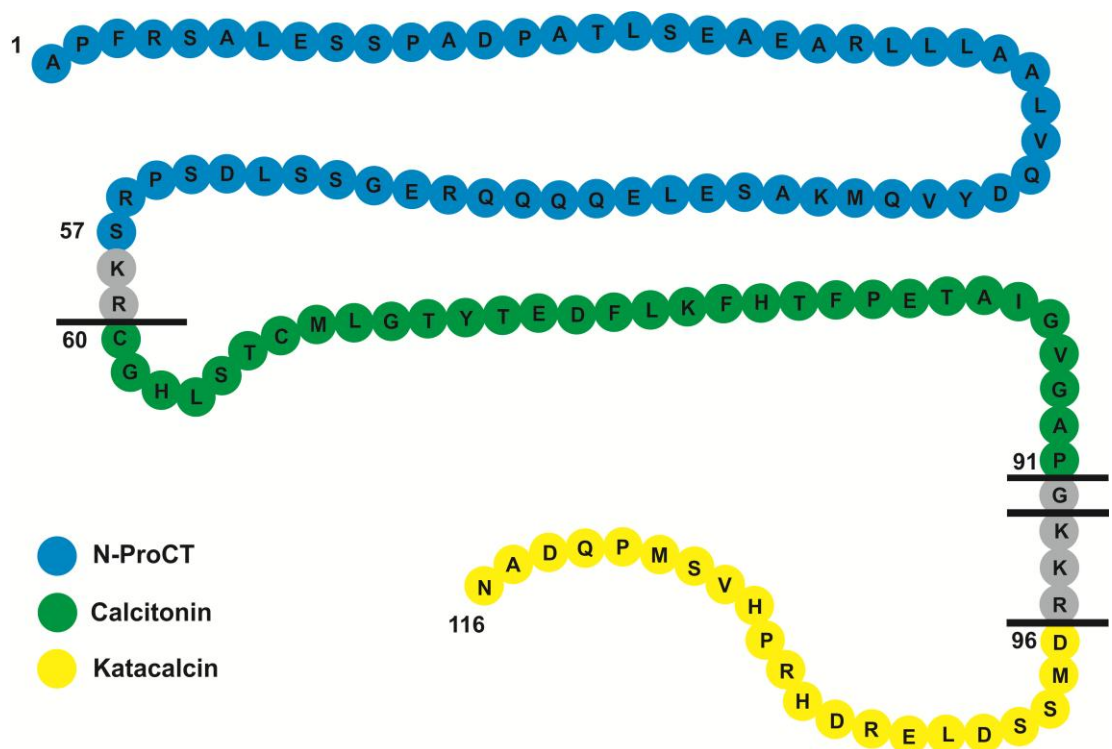
Tento protein za normálních okolností tvoří C-buňky štítné žlázy jako prekurzor hormonu kalcitoninu. PCT však nemá žádnou známou hormonální aktivitu. V okamžiku bakteriální infekce a sepsy se nachází v krvi. V tomto případě jej produkují i jiné další buňky jako jsou monocyty, neurokrinní buňky a makrofágy. Nejdůležitější je, že jeho hladina poukazuje na úroveň závažnosti sepsy. PCT je velice citlivý a specifický marker zánětu s porovnáním s CRP nebo hodnotou bílých krvinek. Význam tohoto markeru v této době velice rychle vzrůstá a vyšetření hladiny PCT patří k laboratorní rutině. [26]

4.1 Historie

V roce 1975 byl objeven intracelulární prekurzor kalcitoninu – preprokalcitonin a jeho štěpné produkty, jejichž součástí je právě PCT. Od roku 1981 popisujeme strukturu PCT jako glykoprotein. První publikace o využití PCT v akutní medicíně pocházejí z roku 1993, kdy Assicot a kol. zaznamenali extrémně vysoké hodnoty plasmatického PCT u pacientů se sepsí. V roce 1994 byl bakteriální lipopolysacharid (LPS) označen jako hlavní stimulátor tvorby PCT během zánětlivého onemocnění. Až v roce 2000 nastává objasnění hlavního zdroje zánětlivého PCT. Bylo zjištěno, že nejvyšší tvorba je v jaterních buňkách. V roce 2001 Weglohnen a kolektiv přišli na to, že záněťový cirkulující PCT není peptid složený ze 116 aminokyselin, jak se dříve domnívalo. Je tvořen jen 114 aminokyselinami a na jeho N-konci se nevyskytuje dvojice alanin–prolin. Tento fakt může mít svoji důležitost při dalších bádáních. [27]

4.2 Biochemická charakteristika

Jedná se o bílkovinu složenou ze 116 aminokyselin s molekulovou hmotností 13 kDa a je tvořena jako prekurzor hormonu kalcitoninu. Díky neenzymatickému štěpení je molekula PCT rozdělena na 3 následující části: kalcitonin (32 AMK), dále katakalcin (21 AMK) a N-terminální fragment, zvaný aminoprokalcitonin (57 AMK). Na 60. až 90. pozici řetězce PCT je zahrnuta sekvence kalcitoninu, kterou můžeme vidět na obrázku 2. [28]



Obrázek 2. Struktura prokalcitonu [29]

Roku 1989 byla tato sekvence popsána. Na 32-AMK úseku je sekvence aminokyselin v PCT shodná s kalcitoninem. [18]

Prokalcitonin řadíme do skupiny proteinů, které jsou příbuzné s kalcitoninem. Do této skupiny patří CGRP I a CGRP II (peptidy příbuzné kalcitoninu), amylin, adrenomedullin, kalcitonin s jeho prekurzory, z nichž jeden je prokalcitonin.

CGRP I a mRNA prekurzory kalcitoninu I a II jsou kódovány CALC-I genem na 11 chromosomu. Tento gen tedy kóduje produkci kalcitoninu, PCT-I, PCT-II [26]. S největší pravděpodobností je i zodpovědný za vznik PCT, jako markeru akutní fáze.

Informace, které jsou obsaženy v t-RNA (primární) jsou přenášeny do různých m-RNA podle aktuálního předepsaného exonu na CALC-I genu. CALC-I kóduje preprokalcitonin, jehož sekvence podléhá proteolytickému štěpení za vzniku prokalcitoninu. Jiný sestřih m-RNA z CALC-I by vedl ke vzniku rodiny peptidů CGRP, patřící mezi vazoaktivní peptidy. [30]

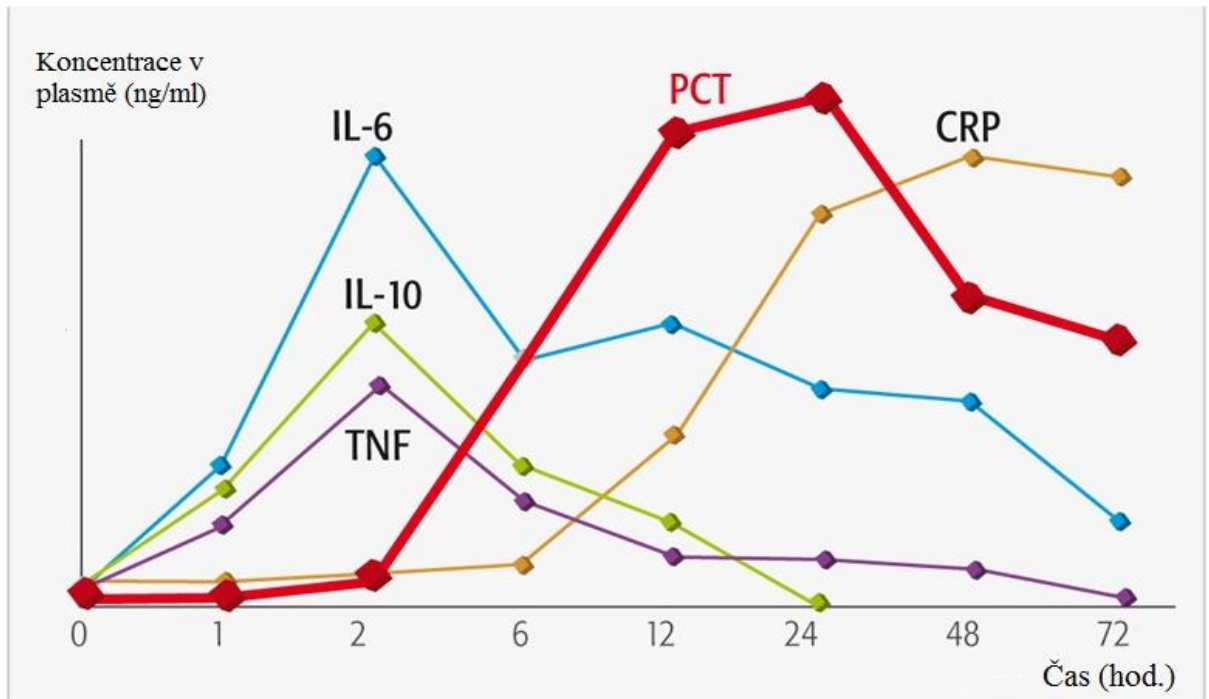
CGRP II vzniká z genu CALC-II, kódovaném na 11 chromosomu. Adrenomedullin je také kódován na chromosomu 11, zatímco amylin na 12. Produkce CGRP se zvyšuje při sepsi, podobně jako u PCT.

Všechny tyto proteiny jsou vylučovány k získání přístupu do Golgiho systému a zpočátku vyráběny v tzv. pro-pro formě, sestávající přibližně ze 100 AMK. Kromě toho obsahují 2 cysteinové zbytky, sloužící k vytvoření disulfidového můstku. Dále obsahují 2 místa ke štěpení proteinu a mohou být zpracovány za vzniku 35 aminů, které mohou být amidovány. Produkty štěpení jsou biologicky aktivní a vázané na specifické receptory. Pro PCT to však ještě doposud nebylo potvrzeno. Vzhledem k těmto společným znakům mohou být členové této skupiny bílkovin označovány jako kalcitoninová genová rodina. Tato kalcitoninová rodina je tvořena přinejmenším 4, v současné době známými geny s homologními sekvencemi nukleotidů. [26]

4.3 Kinetika

Bylo prokázáno, že bakteriální lipopolysacharid (LPS) je silným spouštěčem při uvolňování PCT do oběhového systému. Tohle vyloučení však není spojeno se zvýšením kalcitoninu. Hladina PCT se zvyšuje za 3–4 hodiny a vrcholné koncentrace dosahuje přibližně za 6 hodin. Hladina pak dále přetrvává až 24 hodin. Prokalcitonin je degradován specifickou proteázou a má sérový poločas rozpadu od 25 do 30 hodin. Naproti tomu, hladina CRP vzroste mezi 12–18 hodinou během bakteriální infekce. PCT reaguje rychleji než CRP. U zdravých jedinců jsou hladiny PCT velmi nízké, obvykle pod 0,1 ng/ml. U virových infekcí je hladina PCT mírně zvýšená až na 1,5 ng/ml, ale u bakteriálních infekcí může hladina překročit i 1000 ng/ml. PCT je ideální ukazatel bakteriální sepse [31]. Má vysokou stabilitu v séru a plasmě *ex vivo*, což ho činí zvláště vhodným pro rutinní laboratorní vyšetření. Hladina cirkulujícího PCT se sníží na polovinu denně, jestliže je infekce kontrolována imunitním systémem hostitele nebo antibiotickou terapií. PCT byl také doporučen pro sledování průběhu

onemocnění a odpovědi na léčbu. Porovnání různých biomarkerů zánětu můžeme vidět na obrázku 3. [32]



Obrázek 3. Kinetické profily různých biomarkerů bakteriální infekce [33]

4.4 Ukazatel septických stavů

Kriticky nemocní pacienti se často projevují SIRS. Jestliže dojde k systémové zánětové odpovědi organismu na přítomnost infekce, která je buď prokázána, nebo na ni máme podezření, tak tento stav lze označit jako sepsi. Vyšetření CRP či počtu bílých krvinek postrádá diagnostickou přesnost a mohou být někdy zavádějící. Většina klasických prozánětlivých cytokinů, např. TNF- α , IL-1, IL-6 se zvyšují pouze krátce nebo přerušovaně. Úmrtnost kvůli sepsi zůstává vysoká, z důvodu opožděné diagnózy a léčby. Diferenciální diagnóza infekce a sepsi má prvořadý význam. Nedávno, v pokusu o zlepšení současné definice SIRS a sepsi, bylo navrženo zahrnout PCT do další diagnostiky jako nástroj pro vylepšení a urychlení obtížnosti klinické diagnózy. V sepsi se zvyšují hodnoty PCT až několik tisíckrát a toto zvýšení koreluje se závažností onemocnění. Existuje celá řada studií a recenzí, které ukázaly vynikající diagnostickou přesnost PCT ve srovnání s jinými parametry. Tento diagnostický význam PCT

byl prokázán u různých infekcí, jakými jsou meningitidy, infekční endokarditidy, pankreatitidy, malárie, urosepsy a další. [34]

Variabilita v klinickém vyjádření infekční endokarditidy činí diagnózu výzvou. Použití současných zobrazovacích technik v diagnostice infekční endokarditidy je také dost neoptimální. Při akutní infekční endokarditidě jsou hodnoty PCT výrazně vyšší. Studie prokázaly, že PCT je jediným významným a nezávislým ukazatelem akutní infekční endokarditidy. Diagnostická přesnost byla srovnatelná s natriuretickým peptidem typu B, který je používán k diagnostice srdečního selhání. Použitím mezní hodnoty 2,3 µg/l pro diagnostiku akutní infekční endokarditidy měla citlivost 81 % a specifitu 85 %. [35]

Pacienti s edematózní nebo toxickou pankreatidou mají sníženou koncentraci PCT, zatímco pacienti s infekční pankreatidou mají hodnoty velmi vysoké. To je zvláště užitečné pro monitorování těchto pacientů. [36]

Údaje o klinickém použití PCT při divertikulitidě nebo jiné gastrointestinální infekci nejsou známy. U pacientů s lokalizovanou infekcí je PCT obvykle nižší ve srovnání s generalizovanou infekcí. Také zvýšení nalézáme u infekčních artritid u dospělých. [37]

PCT je také užitečným indikátorem závažnosti bakteriálních infekcí. Ve třech studiích byly hlášeny trvale zvýšené koncentrace PCT, spojené se selháním a mortalitou více orgánů u dětí s bakteriální sepsí. Nicméně, Hatherill a kol. uvedli, že jediné měření PCT je neadekvátním nástrojem pro prognózu, a že sériová měření PCT mohou mít větší hodnotu při sledování odpovědi na léčbu při septickém šoku. PCT je vynikajícím ukazatelem pro závažné, invazivní bakteriální infekce u dětí. [38]

Prokalcitonin má svoji nenahraditelnost zejména v terapii těžkých a život ohrožujících infekcích. Jako jsou například akutní a chronické peritonitidy, flegmóny, pneumonie a infekce měkkých tkání. Pneumonie je popisována jako zánět plicního parenchymu, který je často způsobený bakteriálním agens. Tyto bakterie lze odhalit rychlým nárůstem hladiny PCT. Následně musí být zahájena antibiotická léčba, protože při opoždění větší než 8 hodin, bývá spojena s vyšší mortalitou. [34]

PCT je také významným markerem u pacientů infikovaných virem HIV, jeho hladina nebyla zvýšena u pacientů zasažených sekundární infekcí jako je *Pneumocystis carinii*, virové infekce, cerebrální toxoplazmoza, plíšňové infekce, zhoubné nádory a mykobakteriální infekce ani během posledního stadia nemoci. K jeho zvýšení došlo pouze u těchto pacientů v bakteriální sepsi.

Infekce močových cest jsou běžným problémem dětí i dospělých a přesná diagnóza je obzvláště důležitá, aby se zabránilo tvorbě parenchymálních jizev. Tyto jizvy pak mohou způsobit hypertenzi nebo chronické renální selhání v dospělosti. Bylo prokázáno, že PCT koreluje se závažností renálních jizev u dětí. [31]

Pokud dojde k prodělání mechanického trauma, způsobí to zvýšenou hladinu PCT v závislosti na závažnosti tohoto stavu. Tato hladina následně klesá. PCT je citlivým markerem sepsy a syndromu MODS. Rutinní analýza PCT je velice užitečná pro včasné rozpoznání posttraumatických komplikací. Sekundární vzestup PCT by naznačoval nadměrnou bakteriální sepsi. [39]

4.5 Zdroje prokalcitoninu během sepsy

Za normálních okolností dochází k tvorbě prokalcitoninu v C-buňkách štítné žlázy. Prokalcitonin, který detekujeme v plasmě během zánětu, nepochází ze štítné žlázy. Dá se to vysvětlit tím, že u pacientů i po odstranění štítné žlázy PCT normálně detekujeme. Významné množství prokalcitoninu bylo vyvoláno během leukopenie u pacienta s imunosupresivou. Podobné množství bylo také detekováno v periferních leukocytech. Vzhledem k tomu, že poměrně vysoké hladiny PCT byly naměřeny v jaterní tkáni, považuje se za hlavní zdroj prokalcitoninu během sepsy a infekce. Mezi další zdroje PCT patří celá řada somatických buněk, jako jsou neuroendokrinní buňky plic a střev nebo monocyty a buňky parenchymatózních orgánů. [26]

4.6 Regulace

Regulace štítné žlázy a prokalcitoninu, jako bílkoviny akutní fáze, jsou zásadně odlišné. C-buňky štítné žlázy reagují na zvýšení hladiny vápníku. Stejně tak i na řadu dalších stimulů, jako jsou glukokortikoidy, CGRP, glukagon, gastrin nebo β -adrenergní stimulace. Somatostatin a vitamín D potlačují produkci kalcitoninu. Žádná hyperkalcémie ani jiné podněty z výše uvedených nevedou k uvolňování PCT během zánětu. Produkce PCT během zánětu je spojena s bakteriálním endotoxinem a zánětlivými cytokiny. To bylo prokázáno rychlým vzestupem hladiny PCT po aplikaci injekce s endotoxinem, jako nejvíce účinným stimulem uvolňování PCT do oběhu. Po podání endotoxinu se hladina TNF zvyšuje a dosahuje svého vrcholu za 90 minut a IL-6 maximální koncentrace za 180 minut. Na rozdíl PCT reaguje po 3–

6 hodinách a vrcholu dosahuje za 6–8 hodin. Díky dlouhému poločasu rozpadu jeho koncentrace přetrvává 12–48 hodin. Díky těmto studiím lze tedy říci, že PCT stoupá několik málo hodin po zvýšení TNF- α a IL-6, ale ještě před vzestupem CRP. Podávání TNF, IL-1, IL-2 a IL-6 vede také ke zvýšení PCT. Mechanismy odpovědné za tyto reakce nejsou známy. Pouze se předpokládá, že pomocí cytokinů dochází k blokaci proteolytického štěpení PCT na kalcitonin v endoplasmatickém retikulu. Nicméně, místo produkce cirkulujícího PCT je odlišné a možnosti její regulace jsou rozmanitější. [40]

4.7 Prokalcitonin v diagnostice

Ideální biomarker by měl rozlišovat mezi různými stadii bakteriální infekce, pomáhat při léčbě a poskytovat informace o prognóze. PCT není úplně dokonalým biomarkerem, ale nejlepším dostupným prostředkem pro individuální rozhodnutí o léčbě. Mezi hlavní role PCT v diagnostice patří [41]:

- Diferenciální diagnostika zánětlivých onemocnění a horeček neznámého původu, jako je ARDS bakteriální a nebakteriální etiologie, odlišení biliární a toxické pankreatitidy, odlišení zánětlivých komplikací pacientů SLE.
- Monitorování kriticky nemocných, pozorují se vysoké nebo rostoucí hladiny, bakteriální komplikace.
- Kontrola terapie a průběhu bakteriálních infekcí, vývoj hladiny odráží imunitní odpověď na infekci.
- Diagnóza bakteriální infekce u imunosuprimovaných osob.
- Hodnocení prognózy pacientů, maximální hladina PCT u MODS, sepse, nekrotizující pankreatitidy, doba zvýšení koreluje se špatnou prognózou pacienta.
- U novorozenců je po porodu vzestup PCT s maximem za 24 hodin a během 48 hodin dochází k poklesu hladiny na obvyklé hodnoty [42].

Velmi vysoké hladiny PCT lze pozorovat při medulárním karcinomu štítné žlázy a malobuněčného karcinomu plic. Tento test se k diagnostice ani k monitorování tohoto stavu nepoužívá. PCT test se nepovažuje za náhradu provedení jiných laboratorních testů.

Spíše poskytuje další informace, které umožňují rychlejší zahájení nebo ukončení léčby. Včasná detekce systémových bakteriálních infekcí, včetně bakteriální pneumonie je velice důležitá. Tyto stavy mohou být život ohrožující. Použitím ATB v ne bakteriálních podmínkách může způsobit zpoždění při správné léčbě a vést k většímu počtu bakteriální rezistence na ATB. [43]

4.7.1 Mnohočetný myelom

Rychlé rozlišení etiologie teplot u onkologických pacientů má důležitou roli, jelikož následně zvolené terapeutické postupy se zásadně liší a nesprávné rozhodnutí by mohlo vést k poškození nemocného. CRP je známý jako senzitivní marker zánětu, ale jeho využití omezuje nízká specifita. U pacientů s infekčními a neinfekčními teplotami není značný rozdíl v mediánu hodnoty CRP. Proto je tento parametr v tomto případě nevhodný pro diagnostiku. U hematoonkologických nemocných se nelze řídit běžnými laboratorními ukazateli, jako je například leukocytóza s posunem v diferenciálním rozpočtu a to vzhledem k jejich možnému ovlivnění. Příkladem je leukopenie po léčbě či leukocytóza při léčbě kortikoidy. PCT je vhodným markerem k odlišení původu teplot u hematoonkologických pacientů. Hodnota PCT u pacientů s neinfekčními febriliemi je velice nízká (pod 0,1 ng/ml) naopak velice vysoká v případě závažných infekcí (6–50 ng/ml). Podezření na neinfekční etiologii teplot je nutné zvážit vždy u pacientů s tumory, které mají velký buněčný obrat-typicky u maligních lymfomů, ale i u mnohočetných myelomů. Pokud je pacient v celkově dobrém stavu, bez známek infekce, je nutné popřemýšlet o možné souvislosti s aktivitou nádorového onemocnění. [44]

4.7.2 Interstinální ischemie

Hladina PCT v séru je klinicky významná pro diagnózu střevní ischemie a může být vysvětlena na základě patofyziologie tohoto stavu. Ischemie je definována jako pokles průtoku krve cévami. Zánětlivá reakce pak spouští uvolňování reaktivních druhů kyslíku, což naopak podporuje sekreci TNF- α a IL-6. Výsledný oxidační stres ovlivňuje střevní sliznici a enterocyty, čímž se snižuje propustnost střevní stěny. Původně prospěšné bakterie v gastrointestinálním traktu (*Escherichia Coli*, *Lactobacillus species*, *Klebsiella*) vytvářejí bakteriální endotoxiny, které nakonec podporují uvolňování prokalcitoninu do krevního oběhu. V současné době byl jako marker střevní ischemie navržen prokalcitonin. Podle uskutečněných

studii o použití v diagnostice střevní ischemie byla citlivost a specifita PCT vyšší než 70 % a jeho negativní prediktivní hodnota byla více než 80 %. Sérová hladina PCT poskytuje lékařům informace o přítomnosti reverzibilních ischemických poranění a možnosti identifikace pacientů, vyžadujících okamžitou léčbu nebo pečlivé sledování. [45]

4.7.3 Neonatální a meningokokové infekce

Novorozenecká sepe, klinická porucha vyvolaná bakteriální infekcí krevního oběhu u novorozenců je jedním ze závažných globálních problémů veřejného zdraví. Proto je velice důležité je řešit. Více než 1 milion odhadovaných úmrtí novorozenců za rok se vyskytlo v důsledku závažných infekcí. Klinické komplikace neonatální sepe mohou být spojeny s bronchopulmonální dysplazií, *ductus arteriosus* a nekrotizující enterokolitidou. Klinická diagnostika a léčba neonatální sepe je velmi komplikovaná. Během posledních let došlo k velkému rozvoji nového markeru – prokalcitoninu, který tuto diagnostiku velice usnadňuje. [46]

Hodnoty PCT jsou nezávislé na gestačním věku. Ukazuje 92 % citlivost a specifitu 97 %. Dále 94 % a 96 % pozitivních a negativních prediktivních hodnot [47]. Úrovně PCT se falešně zvyšují při neinfekčních podmínkách, jako je porodní asfyxie, neonatální hypoxémie a intrakraniální krvácení [48].

Navzdory zavedení nové konjugované vakcíny proti meningokokům typu C, zůstává meningokoková nemoc (MCD) příčinou velké úmrtnosti. Meningokok je bakterie, která se běžně vyskytuje v lidské populaci a způsobuje nejzávažnější infekční nemoc. Největší procento případů infekce je ve věkové kategorii 1–4 roky, ale výjimkou nejsou ani dospělí jedinci. Existují důkazy, že úmrtnost na tuto chorobu klesá, je však velice důležitá rychlá diagnóza a léčba. Přesná produkce PCT v těle není známa, ale za hlavní místo produkce jsou považována játra. Bylo prokázáno, že lidské hepatocyty produkují velké množství PCT po TNF- α a IL-6. Koncentrace v krvi jsou velice nízké. U virových infekcí jsou mírně zvýšeny, naproti tomu u bakteriálních mohou být koncentrace až 500 ng/ml. To z něj dělá ideální marker pro diferenciaci bakterií od virových infekcí. Prokalcitonin je velmi konkrétním a citlivým ukazatelem pro meningokokovou infekci u dětí, v porovnání například s CRP. [49]

4.7.4 Onkologická onemocnění

Neuroendokrinní nádory mohou vykazovat vysoké hladiny prokalcitoninu v séru. Byla stanovena souvislost mezi hladinou PCT a klinickým průběhem těchto nádorů. Matzaraki a kol. ve své studii zjistili, že zvýšené koncentrace PCT se nacházejí u pacientů s rakovinou, s metastatickým onemocněním. Významně zvýšené hladiny prokalcitoninu se nachází u těchto malignit: rakovina tlustého střeva, štítné žlázy, prostaty a urogenitálního traktu. Dále u leukémie, lymfomů a malobuněčného karcinomu plic. Dále bylo zjištěno, že vyšší hladiny PCT byly naměřeny u pacientů s hematologickými malignitami než u pacientů se solidními nádory. Zejména u pacientů s leukémií v porovnání s karcinomem prsu. [50]

Pacienti s rakovinou, kteří jsou léčeni chemoterapií, mají často období s neutropenií a sníženou imunitní odpovědí na bakteriální infekce. Doporučuje se, aby koncentrace PCT v plasmě byly měřeny a interpretovány v důsledku velké mortality a morbiditity tohoto onemocnění. [51]

4.7.5 Nový biomarker pro kardiology

Poslední dobou počet vyšetření prokalcitoninu roste u pacientů s kardiovaskulárními poruchami, včetně srdečních selhání, podezření na endokarditidu a akutní koronární syndromy. V těchto klinických situacích může PCT poskytnout diagnostické informace o pravděpodobných infekčních příčinách u kardiovaskulárních pacientů s akutními příznaky, jako je dyspnoe. Může mít také prognostickou hodnotu a vést k léčebné terapii. Pacienti s kardiovaskulárním onemocněním se často setkávají s nespecifickými příznaky, jako je bolest na hrudi, dušnost, pocení a úzkost. Zatímco tyto příznaky mohou souviset s řadou možných akutních kardiovaskulárních příhod, například s akutním koronárním syndromem nebo akutním srdečním selháním. Pro kardiologa, který posuzuje pacienty s výše uvedenými příznaky, zůstává prioritou včasné vyloučení bakteriální infekce. Důležité však je zjištění několika studií, že PCT má velkou souvislost s bakteriemi. Hlavní diagnostické kritérium pro endokarditidu. PCT je slibným markerem pro hodnocení pacientů s možnou endokarditidou, díky jeho vysoké citlivosti a specifitě. [52] Hodnoty PCT v séru po nekomplikovaném srdečním chirurgickém zákroku zvyšují a během 24 hodin dosahují vrcholu. Špičkové hodnoty měřené imunoluminiscenčním testem jsou v rozmezí 5–7 ng/ml. Dále byly i vyšší hodnoty zaznamenány po operaci chlopní a hrudní aorty než po operaci bypassu koronární arterie. [53]

4.7.6 Zánětlivé onemocnění slinivky břišní a ledvin

Pankreas orgán trávicí soustavy, který vylučuje několik pro život důležitých trávicích enzymů a hormonů. Akutní pankreatitida je náhlý zánět pankreatu, který může vést až k jeho destrukci, tzv. pankreatické nekróze. Vyšetření hladin PCT a CRP může být použito ke zjištění, zda osoba s akutní pankreatitidou má pankreatickou nekrózu. Je tedy velkým přínosem pro diagnostiku tohoto onemocnění. Nejčastějšími příčinami akutní pankreatitidy jsou žlučové kameny nebo konzumace alkoholu. [54] Po celém světě došlo k velkému nárůstu akutní pankreatitidy. Navzdory zlepšení přístupu k péči, vyšetřovacím a zobrazovacím technikám je akutní pankreatitida spojená s významnou morbiditou a mortalitou. [55]

Infekce močových cest patří mezi nejčastější bakteriální infekce nezávislé na věku. Až 150 milionů lidí během jednoho roku po celém světě onemocní touto chorobou. Nejčastější indikací v léčbě je předepisování antibiotik v primární péči, což vyvolává v klinické praxi problémy. Tyto problémy souvisí s vysokou prevalencí, recidivou a rezistencí na ATB. [56] Přesná diagnóza a časná léčba je rozhodující kvůli možnému vzniku septikémie. Jako sérový biomarker, používaný pro diagnostiku a hodnocení závažnosti infekce močových cest je PCT. Užitečnost sérového měření PCT spočívá v diferenciaci onemocnění dolního močového ústrojí od pyelonefritidy a byl předmětem několika nedávných studií. [57]

Prokalcitonin je také nejvíce studovaným biomarkerem v oblasti správy antibiotik. Byl testován jako pomoc při zahájení anebo přerušování léčby antibiotiky u dětí, tak i dospělých s odlišnými zdroji infekce. V kombinaci s dalšími klinickými markery může být PCT čím dál více užitečnější. [58]

4.8 Prokalcitonin versus CRP

Nejběžněji se v klinické praxi k diagnostice zánětu používají markery CRP a PCT. Oba parametry patří k reaktantům akutní fáze a působí jako regulátory zánětlivého procesu. Reakce akutní fáze je počátečním obdobím systémové zánětlivé odpovědi. Jde o reakci na poškození tkáně traumatem či infekcí.

CRP nejběžnější laboratorní marker, používaný k vyhodnocení systémové zánětlivé reakce na infekční agens. Rutinně se používá u pacientů s akutní sepsí jako diagnostický a monitorovací marker. Je syntetizován v játrech a je součástí imunitního obranného systému. CRP je citlivý parametr, ale nespecifický. Ke stimulaci sekrece CRP stačí poměrně malá zánětlivá reakce, nejen bakteriální, ale také virózy i neinfekční záněty. Patologické hodnoty jsou 100–200 mg/den, ale mohou být i vyšší. Maximálních hladin dosahuje za 24–48 hodin, zatímco u PCT během 6–14 hodin. CRP má tedy pomalou kinetiku s opožděným vzestupem a dlouhodobým přetrváváním zvýšených hladin. Nespornou výhodou je stabilita in vitro, umožňující rutinní stanovení v séru. Prokalcitonin je spolehlivějším parametrem než CRP, což umožňuje i lepší diferenciaci. PCT je užitečným včasným diagnostickým markerem pro detekci bakteriemií. Společné vyšetření hodnot CRP a PCT významně přispívá k úspěchu diferenciální diagnostiky i cílené terapii, zejména u kriticky nemocných. Rozdíly mezi PCT a CRP můžeme vidět v tabulce 2 a tabulce 3. [59]

Tabulka 2. Srovnání CRP a PCT [59]

Zánětlivý ukazatel	Lokální bakter. infekce	Virová infekce	SIRS	Sepse	Akutní rejekce	Operační trauma
CRP	++	++	++	+++	++	++
PCT	–	–	+	+++	–	+

Legenda: – normální koncentrace, + mírně zvýšená koncentrace, ++ středně zvýšená koncentrace, +++ velmi vysoká hladina

Tabulka 3. Srovnání CRP a PCT [59]

Zánětlivý ukazatel	Biologický poločas	Čas max. vzestupu hladin	Farmakokinetické vlastnosti	Stabilita <i>in vitro</i>
CRP	48 hodin	24–48 hodin	Přetrvává i po odeznění zánětu	Dobrá
PCT	25–30 hodin	6–14 hodin	Po odeznění stimulace klesá o 30–50 % za den	Dobrá

5. Stanovení prokalcitoninu

Stanovení PCT se provádí ze séra nebo plasmy, odebraného standardním odběrem venózní krve s použitím antikoagulačních prostředků jako je EDTA, citrónan nebo heparin. Jiné lidské vzorky nelze použít. Při pokojové teplotě dojde k rozložení 2 % vzorku během dvou hodin a 10 % během prvních 24 hodin od odběru vzorku krve. Vzorek PCT lze skladovat až 4 týdny při -20°C a dlouhodobě při -80°C . K transportu se používají zkumavky se separačním gelem. [60]

Odběr žilní krve se provádí většinou ráno, nejlépe nalačno. Po desinfekci a vpichu jehly obvykle do loketní jamky zdravotní sestra odebere podle ordinovaných vyšetření potřebné množství krve. Po ukončení odběru krve je potřeba ranku po vpichu překrýt sterilním tamponem a mírným tlakem prstu na loketní jamku zabránit dalšímu krvácení. Před odběrem je nutno dodržet následující pokyny. Před odběrem je nutné alespoň 12 hodin lačnit a večer je vhodná lehká večeře bez masa a mléčných výrobků. Dodržujeme normální pitný režim a nekonzumujeme alkoholické nápoje a nekouříme. Vyhneme se nadměrné fyzické námaze. Ráno, před odběrem je vhodné vypít šálek neslazeného čaje či vody. Také po domluvě s ošetřujícím lékařem případně vynechejte ráno v den odběru léky, které však lze vynechat. [61]

Hemolýza vadí většině biochemických vyšetření – řada látek přejde z erytrocytů do séra či plasmy nebo zbarvení často interferuje s vyšetřovacím postupem. Aby nedošlo k hemolýze je nutno předejít těmto situacím uvedeným v tabulce 4.

Tabulka 4. Chyby při odběru krve [62]

Chyby při odběru krve
Znečištění jehly nebo pokožky stopami ještě tekutého desinfekčního prostředku
Použití úzké jehly, kterou je krev násilně odebírána
Krev se nechala stékat po povrchu kůže a pak se chytala do zkumavky
Prudké třepání krve ve zkumavce
Při nešetrném transportu vzorku
Uskladnění plné krve v lednici
Zmrznutí vzorku krve
Prodloužení doby mezi odběrem a dodáním do laboratoře
Použití nesprávné koncentrace protisrážlivého prostředku

Tabulka 5. Chyby při transportu a skladování vzorku [62]

Chyby při transportu a skladování vzorku
Použity nevhodné zkumavky
Použilo se nesprávné protisrážlivé činidlo nebo nesprávný poměr v plné krvi
Zkumavky s materiálem byly nedostatečně označeny
Zkumavka s materiálem byla potřísněna krví
Uplynula dlouhá doba mezi odběrem a oddělením krevního koláče od séra nebo plasmy

5.1 Metody stanovení prokalcitoninu

Požadavky na vyšetření PCT přicházejí z různých oddělení. Značnou část tvoří pacienti z jednotek intenzivní péče. Největší procentuální zastoupení stanovení PCT podle diagnózy tvoří nádorová onemocnění, dále pankreatitidy a jiná střevní onemocnění, horečky, pneumonie, infekční onemocnění a v poslední řadě také úrazy a popáleniny. Pro stanovení PCT existuje řada komerčně dostupných diagnostických souprav, založených na principu imunoanalýzy. Protilátka dostupná na trhu je patentována výrobcem BRAHMS (Henningsdorf, Německo). Při stanovení slouží dvě protilátky proti oblasti 90–106 aminokyselinového řetězce (katakalcinu) a oblasti 70–76 aminokyselinového řetězce (kalcitoninu). [63]

5.1.1 Semikvantitativní imunochromatografický test

Jako POCT (point-of care testing) technika stanovení se využívá orientační PCT-Q test. Stanovení se provádí ze séra či plasmy. Jde o semikvantitativní stanovení. Tento test trvá přibližně 30 minut a množství PCT lze stanovit dle intenzity zbarvení vzniklého imunokomplexu jako < 0,5 ng/ml, 0,5–2 ng/ml, 2–10 ng/ml a nad 10 ng/ml. Spolehlivost testu se uvádí 85 %. [63]

Tento test je prováděn na speciální destičce (viz. obrázek 4 a obrázek 5), vyráběné firmou BRAHMS. V systému jsou použity dvě protilátky, první je monoklonální protilátka s koloidním zlatým konjugátem myši-anti-katakalcin-protilátkou (Tracer). Druhou polyklonální protilátkou je anti-kalcitonin. Po aplikaci vzorku na destičku dochází ke vzniku imunokomplexu s Tracerem. Dále dochází k jeho vzlínání do testovacího prostoru, kde dojde k jeho fixaci na polyklonální protilátku za vzniku sendvičového imunokomplexu. Intenzita zbarvení testovací

zóny se odečítá proti referenční barevné škále. O správnosti měření se můžeme přesvědčit díky kontrolnímu proužku. [64]

Do kulaté dutinky napipetujeme 200 μ l séra nebo plasmy. Inkubujeme při pokojové teplotě. Určíme koncentraci PCT podle vzniklého zabarvení testovací zóny vůči referenčním hodnotám. [65]



Obrázek 4. Diagnostická destička ke stanovení PCT [66]



Obrázek 5. Referenční karta pro porovnání výsledků [67]

5.1.2 Imunoluminiscenční test

Nejčastěji používaný test využívá sendvičové imunoluminiscenční metody. Principem této metody je použití dvou specifických monoklonálních protilátek, z nichž jedna váže C-koncovou oblast (katakalcin) a druhá je luminiscenčně značená esterem akridinia a váže se na kalcitonin. Vnitřní povrch zkumavky je předem potažen katakalcitoninovou protilátkou, která se navazuje na PCT v pacientově vzorku. Vytváří se sendvičový komplex. Intenzita signálu je měřena pomocí luminometru, která je přímo úměrná koncentraci PCT. Detekční limit je

0,1 ng/ml, k vyšetření je požadováno 20 μ l plasmy a stanovení může být provedeno do 2 hodin. [31]



Obrázek 6. Luminometr LB 953 [68]

5.1.3 Elektrochemiluminiscenční metody

Elektro–chemiluminiscenční imunoanalýza, neboli ECLIA (z ang. Electro–chemiluminescence immunoassay) je považována za nejpřesnější metodu. Stanovení chemiluminiscenční imunoanalýzou v sendvičovém uspořádání trvá 18 minut. Vzorek (30 μ l) je inkubován s biotinylovanou monoklonální myší protilátkou vůči PCT a monoklonální myší protilátkou proti PCT značenou rutheniovým komplexem za vzniku sendvičové formace. Poté se přidávají paramagnetické mikročástice potažené streptavidinem a celý komplex je vázaný na pevnou fázi pomocí biotin–streptavidinové kotvy. Reakční směs se nasaje do měřicí komůrky, kde se mikročástice zachytí magneticky na povrch elektrody. Pomocí tripropylaminového činidla dochází k odstranění nenavázané látky. Zavedení napětí na elektrodu vyvolává chemiluminiscenci, která se měří fotonásobičem při 620 nm.

Výsledky jsou stanoveny na základě kalibrační křivky, která je pro přístroj specifická a určena na základě dvoubodové kalibrace a vzorové křivky získané z čárového kódu činidla. Luminiscence je přímo úměrná koncentraci PCT ve vzorku. Od pacientů léčených vysokými dávkami biotinu by se neměly odebírat vzorky dříve než po 8 hodinách od posledního podání biotinu. Metoda je použitelná v rozsahu 0,02–100 μ g/l. Analytická citlivost je 0,02 μ g/l a funkční citlivost je 0,06 μ g/l. Chylosita, hemolýza a ikterus stanovení neruší. Příkladem přístroje využívající elektrochemiluminiscence je Cobas e411. [69]



Obrázek 7. Cobas e411 [70]

5.1.4 Fluorescenční enzymová imunoanalýza

Fluorescenční enzymová imunoanalýza, neboli ELFA (z ang. Enzyme-linked fluorescent assay) je velice používanou metodou. Zcela zásadní přínos pro měření fluorescence má technika zvaná časově modulovaná detekce fluorescence (time resolved fluorescence measurement–TR fluorescence). Tato technika je založená na použití nových fluorescenčních indikátorů, lathanidových chelátů-zejména europia, samaria, terbia nebo thulia. Jejich zavedením se podařilo překonat problém fluorescenčního pozadí média, ve kterém se fluorescence měří. Jedná se o indikátory s velmi dlouhou fluorescencí, přičemž je její detekce časově modulovaná. Krátký světelný impuls ze světelného zdroje (xenonové výbojky) nebo pulzním laserem slouží jako excitační zdroj a fluorescence je pak měřena s určitým časovým odstupem. [71]

Princip této metody spočívá v tom, že donor (MAb–Eu⁺³ v micelle) po ozáření dusíkovým laserem 337 nm emituje světlo 620 nm s dlouhou životností (ms). Akceptor (Mab–sběrný protein) generuje signál 665 nm s krátkou životností (ns). Jestliže jsou tyto dvě složky v imunokomplexu, pak dochází v imunokomplexu k zesílení signálu a prodloužení jeho životnosti. Sendvičová reakce probíhá 19 minut. Měřený signál je po připojení obou značených monoklonálních protilátek k PCT přímo úměrný hladině PCT. Příkladným přístrojem je Vidas 30 na obrázku 8.



Obrázek 8. Přístroj Vidas 30 [72]

5.1.5 Latexová imunoturbidimetrie

Tento test je založen na principu latexové imunoturbidimetrie, kdy PCT ve vzorku se váže na specifické protilátky anti-PCT. Jsou potaženy latexovými částicemi a způsobují aglutinaci. Stupeň zákalu způsobený aglutinací lze měřit opticky a je úměrný množství PCT ve vzorku. Analyzátor vypočítá koncentraci PCT ve vzorku interpolací získaného signálu pomocí kalibrační křivky. Reakce se měří při 600 nm a trvá přibližně 10 minut. [73]

Podle analytického vyhodnocení byla zjištěna nejnižší měřitelná hodnota 0,16 ng/ml. Celková nepřesnost byla určena na 2,2–7,7 %. [74]

Analytické vyhodnocení bylo provedeno pomocí Beckman Coulter AU5800. Analytické vlastnosti byly stanoveny pomocí výpočtu mezní hodnoty limitu detekce a limitu funkční citlivosti. Podle těchto výsledků se zdá, že metoda je spolehlivá pro diagnostiku s porovnáním s jinými existujícími automatizovanými immunoanalýzami. Má technické i analytické výhody. Ty zahrnují malý objem požadovaného vzorku (20 μ l), rychlost měření (10 minut), nízké náklady a vyšší citlivost. [75]

5.2 Interpretace výsledků

Mezi normální hodnoty PCT řadíme koncentrace nižší než 0,05 ng/ml. Koncentrace sérového PCT jsou zvýšeny u klinicky významných bakteriálních infekcí a stále rostou se zvyšující se závažností onemocnění. Jelikož je výsledek individuálně odlišný při různých klinických situacích. Stejně ložisko infekce může být spojeno s různým individuálním zvýšením koncentrace PCT. Výsledky by se měli interpretovat ve spojení s pacienty, dalšími

laboratorními nálezy a klinickými příznaky. Interpretovat tedy konkrétní hodnoty v kontextu s pacientem v klinické situaci. Níže uvedené referenční rozsahy, uvedené v tabulce 6, jsou poskytovány pouze pro orientační účely. [76]

Tabulka 6. Referenční hodnoty koncentrací PCT a jejich význam [76]

Koncentrace	Význam
< 0,5 ng/ml Systémová infekce není pravděpodobná.	Místní bakteriální infekce je možná. Pozor: hodnoty PCT pod 0,5 ng/ml nevylučují infekci, mohou být spojeny s lokalizovanými infekcemi (bez systémových příznaků) také v případech, když se PCT měří velmi brzo po bakteriální výzvě. Obvykle < 6 hodin.
≤ 0,5 a < 2 ng/ml Systémová infekce je možná, ale jsou známy i jiné stavy, které indukují PCT.	Mírné riziko progresu až těžké systémové infekce (závažné sepse). Pacient by měl být pečlivě monitorován a opětovně změřeny hladiny PCT do 6–24 hodin.
≥ 2 a < 10 ng/ml Systémová infekce (sepse) je pravděpodobná, pokud nejsou známy jiné příčiny zvýšené koncentrace PCT.	Vysoké riziko progresu až závažné systémové sepse.
≥ 10 ng/ml Závažná systémová zánětlivá odpověď, výhradně kvůli závažné bakteriální sepsi nebo septickému šoku.	Vysoká pravděpodobnost závažné sepse nebo septického šoku. Multiorganové selhání.

Závěr

Ve své bakalářské práci se zabývám klinickým významem prokalcitoninu, jakožto bílkoviny akutní zánětlivé reakce a markeru septických stavů. Prokalcitonin patří v diagnostice k novějším markerům a je stále předmětem mnoha výzkumů a bádání. I přestože se už delší dobu ví, že je laboratorním ukazatelem sepse.

Díky studiím a výzkumům se prokázalo, že prokalcitonin je velice důležitým markerem pro diferenciální diagnostiku různých onemocnění, léčbu a sledování pacientů. Jeho největším úkolem je indikace zánětlivého procesu v organismu, dále slouží k diagnostice kardiovaskulárního onemocnění, neonatálních infekcí, pankreatitid, urosepsy, nádorových onemocnění a mnoha dalších. Je velice specifický, citlivý a má podstatně rychlejší pokles koncentrací ve srovnání s C-reaktivním proteinem.

Prokalcitonin je považován za velice užitečný biochemický marker, který má nenahraditelnou roli v diagnostice různých onemocnění a monitorování pacientů v intenzivní péči. Jeho vyšetření dnes patří k laboratorní rutině v klinických laboratořích.

Seznam použitých informačních zdrojů

- [1] HOŘEJŠÍ V., BARTUŇKOVÁ J.: *Základy imunologie*. Praha: Triton. 2009. s. 48–51. ISBN 978–80–7387–280–9
- [2] MARUNA, P.: *Procalcitonin*. Praha: Triton. 2003. s. 16–25. ISBN 80–725–4410–1
- [3] PATHAK, S., PALAN, U.: *Immunology: essential and fundamental*. Tunbridge Wells: Anshan. 2009. s. 42–45, ISBN 184–82–9033–0
- [4] SEDLÁKOVÁ, V.: *Imunitní mechanismy zánětu – lokální a systémová reakce [video]*. Z: SlidePlayer [online]. 2016 [vid. 2017–06–21].
Dostupné z: <http://slideplayer.cz/slide/3970850/>
- [5] LYDYARD, P., WHELAN, A., et al.: *Immunology*, New York: Garland Science, BIOS instant notes. 2011. s. 30–35. ISBN 978–04–1560–753–7
- [6] YINGYING, L., ZHOU, Y., et. al.: *Chemokines and Chemokine Receptors: Their Manifold Roles in Homeostasis and Disease. Cellular & Molecular Immunology*. 2004. s. 95–104
- [7] MALINA, P.: *Staré a nové markery zánětu. FONS*. 2002 (2). s. 21–24. ISSN 1211–7137
- [8] FRY, M.: *Essential biochemistry for medicine*. Chichester, West Sussex: Wiley-Blackwell, 2011. s. 197–198. ISBN 978–047–074–328–7
- [9] FERENČÍK, M.: *Imunitní systém: informace pro každého*. Praha: Grada, 2005. s. 75–76. ISBN 80–247–1196–6
- [10] ŠTERN, P.: *Obecná a klinická biochemie pro bakalářské obory studia*, Praha: Karolinum. 2005. s. 28. ISBN 80–246–1025–6
- [11] SALAZAR, J., MARTÍNEZ, M.S., et al.: *C-Reactive Protein: An In-Depth look into Structure. Function and Regulation*. 2014. s. 1–11
- [12] QILING, L., KANG, T., et al.: *Multimeric Stability of Human C-reactive Protein in Archived Specimens. Plos one*. 2013. s. 1–6
- [13] *Structure of C-reactive protein [obrázek]*. Z: PG Blazer, Medical PG Entrance coaching. [vid. 2017–05–04]. Dostupné z: <https://pgblazer.com/c-reactive-protein-microbiology-mcq/>
- [14] AGRAWAL, A., DAVID, J., et al.: *Atherosclerosis-related functions of C-reactive protein, Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*. 2013. s. 235–240

- [15] AHMED, N.: *Clinical biochemistry*. New York: Oxford University Press, Fundamentals of biomedical science. 2011. s. 514–519. ISBN 9780199533930
- [16] SUGIMOTO, K., ADOMI, S., et al.: Procalcitonin as an indicator of urosepsis, *Research and Reports in Urology*. 2013. s. 77–79
- [17] ŠEVČÍK, V.: Seps v intenzivní medicíně. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví. 1997. s. 35–53. ISBN 80-7013-250-7
- [18] WHICHER, J., BIENVENU, J., et al.: Procalcitonin as an Acute Phase Marker, *Annals of clinical biochemistry*. 2001. s. 483–493
- [19] ROBERTSON, C. M., COOPERSMITH, C.M.: The Systemic Inflammatory Response Syndrom, *Microbes and Infection*, 2006. s. 1382–1389
- [20] LEVY, M.M., FINK M.P., SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS, International Sepsis Definitions Conference, *Critical Care Medicine*. 2003, 29. s. 530–538
- [21] KEAN, M.C., SYLVIA, C.: Principles and practice of hospital medicine, New York: McGraw-Hill. 2012. s. 99–109. ISBN 0071603891
- [22] DELALOYE, J., CALANDRA, T.: Invasive candidiasis as a cause of sepsis in the critically ill patient, *Virulence*. 2013. s. 161–169
- [23] DELLINGER R.P., MITCHELL M.D., et al.: Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock, *Critical Care Medicine*, 2012. s. 583–590
- [24] STREITOVÁ, D., ZOUBKOVÁ, R.: Septické stavy v intenzivní péči: ošetrovatelská péče, Praha: Grada Publishing, *Sestra*. 2015. s.11–15. ISBN 978–80–247–5215–0
- [25] YI-LING, C., TSENG, C., et al.: Procalcitonin as a marker of bacterial infection in the emergency department: an observational study, *Critical Care*. 2004. s. 12-15
- [26] A MEISNER, M.: Pathobiochemistry and Clinical Use of Procalcitonin, *Clinica Chimica Acta*. 2002. s. 17–29
- [27] LENÁRTOVÁ, R.: Procalcitonin – kvantitativní stanovení, *Labor aktuell*. 2008. s. 14–16
- [28] KARON, B.S.: Evaluation of lactate, white blood cell count, neutrophil count, procalcitonin and immature granulocyte count as biomarkers for sepsis in emergency department patients, *Clinical Biochemistry*. 2017. s. 1–3
<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2017.05.014>

- [29] Struktura prokalcitoninu [obrázek]. Z: *DocPlayer* [online]. 2017 [vid. 2017-06-13]. Dostupné z: <http://docplayer.cz/36502834-Novinky-ve-vnitřním-lekarství-jan-vaclavik-i-interní-klinika-kardiologická-fn-a-lf-up-olomouc.html>
- [30] MÜLLERA, B., BECKERB, K.L.: Procalcitonin: how a hormone became a marker and mediator of sepsis, *Swiss medical weekly*. 2001. s. 595–602
- [31] CAROLL, E.D., THOMSON, A.P.J.: Procalcitonin as a marker of sepsis, *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2002. s. 1–9
- [32] LIU Y.J., RAO J.: Procalcitonin as a diagnostic and prognostic marker for sepsis caused by intestinal infection: a case report, *European Review for Medical and Pharmacological Science*. 2013. s. 1311–1313
- [33] Klinické profily různých biomarkerů bakteriální infekce [obrázek]. Z: *Biomérieux*. 2017 [vid. 2017-05-16]. Dostupné z: <http://www.biomerieux.cz/produkty/vidasr-brahms-pcttm>
- [34] CHRIST-CRAIN, M., MÜLLER, B.: Procalcitonin in bacterial infections—hype, hope, more or less, *Swiss medical weekly*. 2005. s. 451–460
- [35] MUNOZ, P., SIMARRO, N., et al.: Evaluation of procalcitonin as a marker of infection in a nonselected sample of febrile hospitalized patients, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2004. s. 237–241
- [36] RAU, B., GANSAUGE F., et al.: The potential role of procalcitonin and interleukin 8 in the prediction of infected necrosis in acute pancreatitis, *Gut*. 1997. s. 832–840
- [37] TALEBI-TAHER, M., SHIRANI, F., et al.: Septic versus inflammatory arthritis: discriminating the ability of serum in inflammatory markers, *Rheumatology International*. 2013. s. 319–324
- [38] VAN ROSSUM, A.M.C., WULKAN, R.W., et al.: Procalcitonin as an early marker of infection in neonates and children, *The Lancet Infectious Diseases*. 2004. s. 620–630
- [39] WANNER, G.A., KEEL, M., et al.: Relationship between procalcitonin plasma levels and severity of injury, sepsis, organ failure, and mortality in injured patients, *Critical Care Medicine*. 2000. s. 950
- [40] MARUNA, P., et al.: Physiology and genetics of Procalcitonin, *Physiology Response*. 2000. s. 57–61
- [41] CHRISTOPHER, J.G.: *Procalcitonin as diagnostic biomarker of sepsis*. 2013. s. 382–385

- [42] PETROVÁ, P., ŠVÁBOVÁ, M.: Pomocné markery v diagnostice septických stavů, *Labor Aktuell*. 2010. s. 10–13
- [43] American Association for Clinical Chemistry. Z: *The Tests Sample* [online]. 2017–04–10 [vid. 2017–05–30].
Dostupné z: <https://labtestsonline.org/understanding/analytes/procalcitonin/tab/sample/>
- [44] MACHÁLKOVÁ, K., MAISNAR, V.: Využití procalcitoninu v diferenciální diagnostici febrilií u pacientů s mnohočetným myelomem, *Klinická Onkologie*. 2011. s. 298–301
- [45] COSSE, C., SABBAGH, C., et al.: Procalcitonin and intestinal ischemia, *World Journal of gastroenterology*. 2014. s. 74–76
- [46] CHAUHAN, N., TIWARI, S., et al.: Potential biomarkers for effective screening of neonatal sepsis infections: An overview, *Microbial Pathogenesis*. 2017. s. 234–242
- [47] CHIESA, C.: Reliability of procalcitonin concentrations for the diagnosis of sepsis in critically ill neonates, *Clin. Infect. Dis*. 1998. s. 664–672
- [48] YUAN, H.: Diagnosis value of the serum amyloid A test in neonatal sepsis: a meta-analysis, *BioMed Research International*. 2013. s. 1–9
- [49] CARROL E.D.: Procalcitonin as a diagnostic marker of meningococcal disease in children presenting with fever and a rash, *Arch Dis Child*. 2002. s. 282–285
- [50] CHAFTARI, A.M., HACHEM, R., et al.: Role of Procalcitonin and Interleukin–6 in Predicting Cancer, and Its Progression Independent of Infection, *Plos one*. 2015, s. 1–11
- [51] DE BONT, E.S.J.M.: Procalcitonin and Chemotherapy-induced Neutropenia, *Infection*. 2000. s. 398–400
- [52] SCHUETZ, P., DANIELS, LB., et al.: Procalcitonin: A new biomarker for the cardiologist, *International Journal of Cardiology*. 2016. s. 390–397
- [53] SPONHOLZ, C., SAKR, Y., et al.: Diagnostic value and prognostic implications of serum procalcitonin after cardiac surgery: a systematic review of the literature, *Critical Care*. 2006. s. 6–11
- [54] GREENBERG, A.J., et al.: Clinical practice guideline: management of acute pancreatitis, *J can chir*. 2016. s. 128–131
- [55] KOMOLAFE, O, PEREIRA, S.P.: Serum C-reactive protein, procalcitonin, and lactate dehydrogenase for the diagnosis of pancreatic necrosis, *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2017. s. 1–4

- [56] FLORES-MIRELES, et al.: Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options, *Microbiology review*. 2015. s. 269–284
- [57] MASAJTIS-ZAGAJEWSKA, A.: New markers of urinary tract infection, *Clinica Chimica Acta*. 2017. DOI: 10.1016/j.cca.2017.06.003
- [58] NORAL, D., SALLUH, J., et al.: Biomarker-guided antibiotic therapy-strengths and limitations, *Ann Transl Medicine*. 2017. s. 208
- [59] BOHDÁLKOVÁ, J., KVĚCHOVÁ, M.: Vyšetření prokalcitoninu a jeho srovnání s CRP. Z: *Sestra* [online]. 2017–11–14 [vid. 2017–05–15].
Dostupné z: <http://zdravi.euro.cz/clanek/sestra/vysetreni-prokalcitoninu-a-jeho-srovnani-s-crp-329825>
- [60] SANG LAB–KLINICKÁ LABORATOŘ s.r.o: Procalcitonin. Laboratorní listy [online]. 2013. s. 1–2 [vid. 2017–05–20].
Dostupné z: http://www.sanglab.cz/media/laboratornilisty/laboratorni_listy_2013/lab.%20listy_1307_prokalcitonin.pdf
- [61] IKEM: Pracoviště laboratorních metod. Odběr žilní krve [online]. 2017 [vid. 2017–06–10]. Dostupné z: <https://www.ikem.cz/cs/komplement/pracoviste-laboratornich-metod-plm/pro-pacienty/oddeleni-klinicke-biochemie/odber-zilni-krve/a-2587/>
- [62] KOTRLA R.: Nemocnice Kyjov — laboratorní příručka [online]. 2015–01–26 [vid. 2017–06–05]. Dostupné z: http://www.nemkyj.cz/file/7383/LabPrirucka_OKB_v07.pdf
- [63] ČIHALOVÁ, J., BEŇOVSKÁ, M.: Stanovení prokalcitoninu na modulu E170 analyzátoru, *Labor aktuell*. 2009. s. 26–28
- [64] THERMO SCIENTIFIC B·R·A·H·M·S PCT-Q.: Immunochromatografic point-of-care test for the determination of Procalcitonin in serum and plasma [online]. 2017 [vid. 2017–05–20]. Dostupné z: <http://www.procalcitonin.com/pct-assays/pct-q-rapid.html>
- [65] THERMO FISHER SCIENTIFIC BRAHMS PCT-Q.: Immunochromatografic point-of-care test [online]. 2017 [vid. 2017–05–30]. Dostupné z: <file:///C:/Users/admin/Downloads/D20712-%20.pdf>
- [66] Diagnostická destička ke stanovení PCT [obrázek]. Z: ThermoFisher SCIENTIFIC B·R·A·H·M·S PCT-Q. 2017 [vid. 2017–05–20]. Dostupné z: <http://www.procalcitonin.com/pct-assays/pct-q-rapid.html#test-procedure>
- [67] Referenční karta pro porovnání výsledků [obrázek]. Z: ThermoFisher SCIENTIFIC B·R·A·H·M·S PCT-Q. 2017 [vid. 2017–05–20]. Dostupné z: <http://www.procalcitonin.com/pct-assays/pct-q-rapid.html#test-procedure>

- [68] Luminometr [obrázek]. Z: Berthold technologies [online]. 2017 [vid. 2017-06-05].
Dostupné z:
https://www.berthold.com/en/bio/multi_tube_luminometer_Autolumat_LB953
- [69] Roche Diagnostics: Cobas e411 analyzer [online]. 2009.[vid. 2017-05-13].
Dostupné z: https://www.aub.edu.lb/fm/cmop/downloads/cobas_e_411_EN.pdf
- [70] Cobas e411 [obrázek]. Z: Roche diagnostics USA [online]. 2014-06-24 [vid. 2017-05-19]. Dostupné z: <https://usdiagnostics.roche.com/forher/cobase411.html>
- [71] KARLÍKOVÁ M., TOPOLČAN O.: Imunologické metody a jejich využití
biomedicínském výzkumu a klinické praxi [online]. 2017. s. 24-26 [vid. 2017-06-02].
Dostupné z: https://www.google.cz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjfntijyurUAhUIVhoKHfOUB2UQFgglMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.imunokurzy.cz%2Fstudijni-materialy-kategorie%2Fmonografie.html%3Fdownload%3D3%3Aprincipy-imunoanalytickych-metod&usg=AFQjCNEr1c_DRoUcFZLdQNq7-L5Nkcgfmg
- [72] Přístroj Vidas 30 [obrázek]. Z: BIOMÉRIEUX [online]. [vid. 2017-06-05]. Dostupné z: <http://www.biomerieux-usa.com/clinical/vidas-minividas-healthcare>
- [73] DIAZYME: Clinical Chemistry Reagents, Product list 6 [online]. ISO 13485. 2015 [vid. 2017-05-09].
Dostupné z: <http://www.labmark.cz/data/system/attachments/diazyme-katalog-en.pdf>
- [74] DIPALO, M., GUIDO, L., et al.: Multicenter comparison of automated procalcitonin immunoassays, *Practical Laboratory Medicine*. 2015. s. 22-28
- [75] DIPALO, M., BUONOCORE, R., et al.: Analytical evaluation of Diazyme procalcitonin latex-enhanced immunoturbidimetric assay on Beckman Coulter AU5800, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2014. s. 593-597
- [76] VIDAS® EMERGENCY ASSAYS: Procalcitonin-A Novel Biomarker for Bacterial Infections and Sepsis[online]. Biomérieux. 2015. s. 1-12. [vid. 2017-06-03].
Dostupné z: http://www.biomerieux-usa.com/sites/subsidiary_us/files/15_pct_scientific_booklet_v10.pdf