

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Oddělení klinické biochemie, hematologie a imunologie

Nemocnice Na Homolce

Martin Bureš

Prokalcitonin u kriticky nemocných

Bakalářská práce

Praha 2014

Autor práce: **Martin Bureš**

Vedoucí práce: **doc. MUDr. Miroslav Průcha, Ph.D.**

Oponent práce: **doc. MUDr. Roman Zazula, Ph.D.**

Datum obhajoby: **28. 5. 2014**

Bibliografický záznam

BUREŠ, Martin. *Prokalcitonin u kriticky nemocných*. Praha: Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, Oddělení klinické biochemie, hematologie a imunologie Nemocnice Na Homolce, 2014, 43 s., Vedoucí bakalářské práce doc. MUDr. Miroslav Průcha, Ph.D.

Anotace

Cílem práce bylo stanovení koncentrace prokalcitoninu a C-reaktivního proteinu v séru pacientů, kteří splnili kritéria diagnózy sepse a srovnání jejich hodnot s pozitivitou hemokultur, která je exaktním potvrzením infekční etiologie SIRS (syndromu systémové zánětlivé odpovědi).

Klíčová slova

Prokalcitonin, Sepse, C-reaktivní protein, hemokultura, diagnostika.

Annotation

The aim of this thesis was to determinate the levels of procalcitonin and C-reactive protein in the serum of patients who met the criteria of sepsis diagnosis and the comparison with positive blood cultures that is the exact confirmation of infectious etiology of SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome).

Keywords

Procalcitonin, sepsis, C-reactive protein, blood culture, diagnostics.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracoval samostatně pod vedením doc. MUDr. Miroslava Průchy Ph.D., uvedl všechny použité literární a odborné zdroje a dodržoval jsem zásady vědecké etiky. Dále prohlašuji, že stejná práce nebyla použita pro získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 28. 4. 2014

.....

Martin Bureš

Poděkování

Zde bych rád poděkoval doc. MUDr. Miroslavu Průchovi, Ph.D. za odborné vedení mé bakalářské práce, za trpělivost a cenné rady, které mi velmi pomohly při řešení daného tématu. Dále bych chtěl poděkovat Květě Pallové, Ivaně Křížové a všem laborantkám úseku imunologie na Oddělení klinické biochemie, hematologie a imunologie Nemocnice Na Homolce za pomoc a rady při mé praxi v laboratoři. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat mé rodině a své partnerce Tatianě Žingorové, která mi po celou dobu studia byla velkou oporou.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK.....	9
ÚVOD.....	10
1. TEORETICKÁ ČÁST.....	11
1.1. CHARAKTERISTIKA SEPSE.....	11
1.1.1. Charakteristika a úloha zánětu.....	11
1.1.2. SIRS a sepse.....	11
1.1.3. Etiologie sepse.....	12
1.1.4. Diagnostika sepse.....	13
1.1.5. Terapie při sepsi.....	13
1.2. ÚLOHA PROKALCITONINU PŘI DIAGNOSTICE SEPSE...	13
1.2.1. Současný stav využití PCT v diagnostice sepse.....	14
1.2.2. Kinetika a stabilita PCT v plazmě.....	15
1.2.3. Neinfekční příčiny zvýšené koncentrace PCT.....	15
1.3. CHARAKTERISTIKA PROKALCITONINU.....	16
1.3.1. Historie	16
1.3.2. Struktura	17
1.3.3. Geny zodpovědné za tvorbu PCT	19
1.3.4. Produkce zánětového PCT.....	20
1.3.5. Funkce zánětového PCT	20
1.4. C-REAKTIVNÍ PROTEIN.....	21
2. CÍLE PRÁCE.....	22
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	23
3.1. SOUBOR PACIENTŮ.....	23
3.2. MATERIÁL A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ.....	23
3.2.1. Popis B.R.A.H.M.S KRYPTOR compact.....	27

3.3.	METODIKA STANOVENÍ.....	28
	3.3.1. Stanovení PCT na B.R.A.H.M.S KRYPTOR compact...	28
	3.3.1.1 Pracovní postup.....	31
3.4.	STANOVENÍ CRP	32
3.5.	HEMOKULTIVACE.....	32
3.6.	STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT.....	33
4.	VÝSLEDKY.....	34
5.	DISKUZE.....	39
	ZÁVĚR	40
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	41

SEZNAM ZKRATEK

AMK	aminokyseliny
ARDS	syndrom akutní respirační tísně
CGRP-I	kalcitoninu příbuzný peptid I
CNS	centrální nervová soustava
CRP	C-reaktivní protein
IL-1	interleukin 1
IL-6	interleukin 6
IL-8	interleukin 8
ILMA	imunoluminometrická analýza
LIS	laboratorní informační systém
MODS	syndrom multiorgánové dysfunkce
NIS	nemocniční informační systém
PCT	prokalcitonin
SIRS	syndrom systémové zánětlivé odpovědi
TNF α	tumor-nekrotizující faktor α
TRACE	Time Resolved Amplifield Cryptande Emmision

ÚVOD

V současné době je diagnostika pomocí specifických biomarkerů jedním ze základních ukazatelů přítomnosti infekce v organismu. Jedna z hlavních laboratorních metod pro potvrzení sepse - přítomností bakterií v organismu, je hemokultivace. Ta je však pozitivní pouze u části pacientů (30-40%) a proto využíváme k diagnóze sepse další parametry, které jsou schopny infekční příčinu zánětu v organismu potvrdit. Tato vyšetření mají nespornou výhodu v tom, že na rozdíl od hemokultivace je čas potřebný pro analýzu významně kratší a umožňuje včasnější nasazení antibiotické terapie nebo naopak její ukončení.

Mezi základní parametry, které jsou využívány pro diagnostiku septických stavů, patří prokalcitonin a C-reaktivní protein. Ve své bakalářské práci se budu věnovat problematice sepse a významu stanovení koncentrace prokalcitoninu u pacientů se sepsí.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1. Charakteristika sepse

1.1.1. Charakteristika a úloha zánětu

Zánět je definován jako soubor všech fyziologických reakcí, ke kterým dochází při porušení integrity organismu. Příčin vzniku zánětu je mnoho. V zásadě je můžeme rozdělit na příčiny infekční a neinfekční. Z neinfekčních příčin to jsou např. operace, poranění fyzikálního i chemického charakteru, zánět slinivky břišní, důvodem může být i ischemie tkáně. Infekční příčiny zahrnují bakteriální, virová a mykotická agens.

V procesu zánětu se uplatňuje celá řada mechanismů, které mají hlavní úkol – zabránit další progresi zánětu a zachovat homeostázu. Během procesu zánětu dochází k degranulaci tkáňových žírných buněk, uvolnění mediátorů z poškozených buněk a mezibuněčné hmoty. Tyto mediátory působí lokálně zvýšenou propustnost cév, ovlivňují a působí na nervová zakončení v místě zánětu (pocit bolesti), regulaci teploty a v neposlední řadě aktivují koagulační a komplementový systém. ^[1]

1.1.2. SIRS a sepse

Pojmem sepse je definován klinický syndrom, který vzniká na podkladě systémové zánětlivé reakce organismu na infekční podnět. Přítomnost infekce v krevním řečišti vyvolává celkovou reakci organismu. Dochází ke zvýšené produkci hormonů, komplementu, cytokinů, vazoaktivních a koagulačních faktorů. ^[2]

Pojmem SIRS (syndrom systémové zánětlivé odpovědi) se rozumí zánětlivá reakce na infekční (sepse) i neinfekční inzulty – např. ischemie, tepelné a fyzikální poškození tkání. Diagnostika SIRS je založena na přítomnosti alespoň dvou nebo více kritérií (Tabulka č. 1).

teplota	> 38°C nebo < 36°C
dechová frekvence	> 20/ minutu nebo $p\text{CO}_2 < 4,25 \text{ kPa}$
tepová frekvence	> 90 tepů za minutu
počet leukocytů	> 12 000/ mm^3 nebo < 4 000/ mm^3 případně přítomnost > 10% nezralých forem (tyčí)

Tabulka č. 1 Klinické příznaky sepse (převzato a upraveno) ^[3]

Jedná se o celkové narušení vnitřního prostředí, které nese riziko sebepoškození z důvodu rozvoje zánětlivé odpovědi. ^[4, 5]

Pacient se sepsí musí splňovat nejméně dva příznaky SIRS, ale současně musí být prokázána infekční příčina. Těžká sepsa je charakteristická hypoperfuzí a orgánovou dysfunkcí. Nejtěžším klinickým stavem je septický šok. ^[3]

1.1.3. Etiologie sepse

Příčinou vzniku sepse jsou infekční mikroorganismy. Z hlediska původu sepse vyvolávají bakteriální, virová nebo mykotická infekční agens.

Mezi hlavní původce patří: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Candida albicans*.

V případě Gram-negativních infekcí je substancí zodpovědnou za rozvoj zánětlivé reakce látka označovaná jako endotoxin. Přítomnost endotoxinu není vázána pouze na přítomnost Gram-negativní infekce. Můžeme jej detekovat také u pacientů s Gram-pozitivní infekcí, kde dochází k jeho prostupu ve střevě procesem tzv. bakteriální translokace. Přítomnost infekce vede k tvorbě cytokinů a stimulaci prozánětlivé reakce. Dva nejdůležitější cytokiny účastníci se prozánětlivé reakce jsou TNF- α (tumor-nekrotizující faktor α) a interleukin-1 β (IL-1 β), které zajišťují nastartování zánětlivé kaskády. Dalšími důsledky je aktivace komplementu, aktivace leukocytů a v neposlední řadě aktivace fibrinolýzy a koagulace. ^[3, 5, 6]

1.1.4. Diagnostika sepse

Pro diagnózu sepse je nejdůležitější přímý průkaz infekčního agens. Takový průkaz se provádí mikrobiologickým vyšetřením, které spočívá v kultivaci tělních tekutin nebo vyšetřením provedených výtěrů nebo stěrů. Metoda, která slouží k průkazu infekčního agens v krvi, se nazývá hemokultivace. Hemokultivace se provádí ke zjištění aerobních i anaerobních bakterií. Pozitivní hemokultivaci prokážeme pouze u části pacientů se sepsí. Její přítomnost je ale naprosto spolehlivým průkazem sepse u daného pacienta. Kromě mikrobiologické diagnostiky se při diagnostice sepse využívají tzv. biomarkery, ke kterým řadíme C-reaktivní protein (CRP), prokalcitonin (PCT), interleukin 6 (IL-6) nebo interleukin 8 (IL-8).^[3, 6]

V řadě studií bylo prokázáno, že PCT umí rozlišit mezi SIRS infekčního a neinfekčního původu, což jej předurčuje pro použití v diagnostice u kriticky nemocných na jednotkách intenzivní péče.^[7]

1.1.5. Terapie při sepsi

Jako základní je lokalizace zdroje infekce, zjištění infekčního agens a jeho citlivosti na antibiotika a příslušná antibiotická terapie. Další terapie spočívá v ovlivnění orgánové dysfunkce, ke které v sepsi dochází.^[8]

1.2. Úloha prokalcitoninu při diagnostice sepse

Cílem a nejdůležitějším předpokladem úspěšné terapie sepse je její včasná diagnostika. Bylo prokázáno, že prodlení v diagnostice sepse má nepříznivý vliv na výslednou mortalitu těchto pacientů.^[9]

Hledáme proto parametry, které budou schopny rychle prokázat sepsi u kriticky nemocných pacientů. Mezi ně patří PCT, CRP, IL-6 a řada dalších. Problém tkví v tom, že většina z nich je nespecificky zvýšená i u pacientů s neinfekčním onemocněním. Jedním z nejvíce spolehlivých parametrů je PCT, který byl opakovaně vyhodnocen jako nejcitlivější a nejvíce specifický parametr při rozlišení infekčního a neinfekčního původu SIRS.^[10, 11]

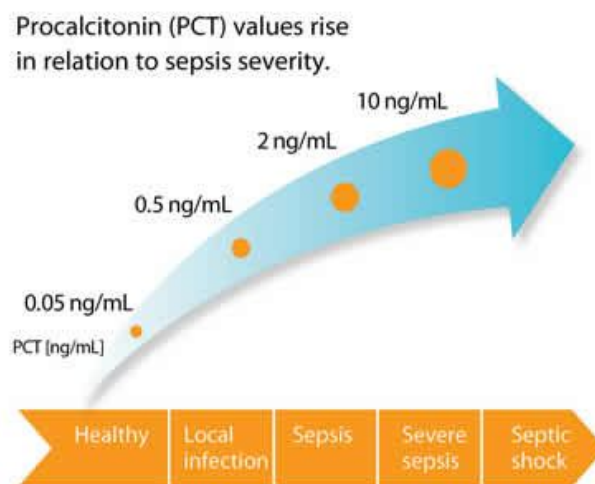
1.2.1. Současný stav využití PCT v diagnostice sepse

1. Při diagnostice sepse vykazuje PCT dobrou specifitu a sensitivitu pro zjištění infekční etiologie SIRS.

2. Koncentrace PCT v plazmě koreluje se stupněm závažnosti sepse a systémové zánětové reakce. ^[12]

3. Dynamika koncentrace PCT v čase je dobrým vodítkem k posouzení účinnosti antibiotické terapie. ^[13]

Koncentrace PCT za fyziologických podmínek je nižší než **0,5 ng/ml**. U pacientů se sepsí dochází k jeho zvýšení, které se liší v závislosti na závažnosti stavu (Obrázek č. 1) a různých klinických situacích (Tabulka č. 2). Je důležité si ale uvědomit, že jeho spolehlivost není absolutní a zvýšená koncentrace PCT je u některých diagnóz nespecifická. ^[4]



Obrázek č. 1 Koncentrace PCT v séru vzhledem k diagnostice sepse [převzato a upraveno z <http://www.thermofisher.com/global/en/aboutsepsis/sepsis-procalcitonin.asp#.U1zyIXBQWTc>]

PCT v ng/ml	Hodnocení	Diagnóza
0 – 0,5	norma	zdraví pacienti, není vyloučena lokalizovaná nebo jiná než bakteriální infekce
0,5 – 2	mírné zvýšení	lokalizovaný zánět, virózy (hepatitida A, B), pooperační hodnoty, renální insuficience
2 – 10	vysoká koncentrace	systémová bakteriální infekce
10 – X (až 1000)	velmi vysoká koncentrace	těžká sepse, multiorgánové selhání

Tabulka č. 2 Koncentrace PCT v séru s příslušnými možnými diagnózami [8, 14]

1.2.2. Kinetika a stabilita PCT v plazmě

Koncentrace PCT se zvyšuje již po 3 až 6 hodinách od začátku infekce. Vrcholu dosahuje po 12 až 24 hodinách. [10] Jde o rychlejší nárůst ve srovnání s CRP, který svých maximálních koncentrací v plazmě dosahuje po 48 hodinách. [9] PCT je velmi stabilní molekulou. Při teplotě 15 - 25°C vydrží stabilní vzorek 4 hodiny. [8, 14, 15]

Poločas rozpadu PCT v séru se v literatuře mírně liší. Nejedná se však o zásadní rozdíly v hodnotách: 20 – 24 hodin [6], 24 hodin [9, 16], 24 – 35 hodin [8], 25 – 30 hodin [4].

1.2.3. Neinfekční příčiny zvýšené koncentrace PCT

PCT je v současné době hodnocen jako nejvíce specifický marker v diagnostice těžkých bakteriálních infekcí, ale mohou nastat situace, kdy je koncentrace PCT zvýšená, přestože není přítomna žádná infekce. Jedná se např. o polytraumata, pankreatitidu, těžké poškození jater, úrazy teplem nebo abdominální trauma. Zvýšená koncentrace PCT se rovněž vyskytuje i u pacientů po transplantaci jater v závislosti na druhu použité imunosupresivní terapie. Při diferenciální diagnostice je velmi důležité tyto „výjimky“ rozpoznat a odlišit od PCT zvýšeného při sepsi. [4]

1.3. Charakteristika prokalcitoninu

Molekula PCT je polypeptid, který se primárně tvoří jako prekurzor hormonu kalcitoninu v C-buňkách štítné žlázy. Tyto buňky se také označují jako parafolikulární a jsou poněkud větší než okolní folikulární buňky. Jejich cytoplazma je bohatá na granulární endoplazmatická retikula, mitochondrie a Golgiho komplexy. Hlavním úkolem těchto buněk je tvorba polypeptidů. Mezi ně patří prokalcitonin. Za fyziologických podmínek je tvorba PCT a s ním související tvorba kalcitoninu, který se skládá z 32 aminokyselin, regulována hladinou K^+ iontů v krvi. ^[4, 17] Za určitých okolností ho mohou produkovat i jiné buňky v organismu - makrofágy a monocytární buňky. ^[8]

1.3.1. Historie

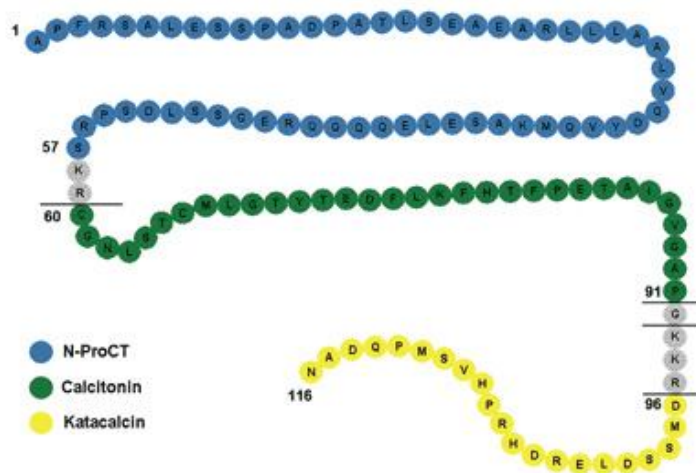
První práce o prokalcitoninu je z roku 1962, kdy se poprvé potvrdilo, že by mohl existovat třetí hormon štítné žlázy, který ovlivňuje metabolismus kalcia. Důkaz vyplynul z experimentu, kdy bylo do štítné žlázy pokusných zvířat vpraveno větší množství hyperkalemického roztoku, na který organismus reagoval poklesem koncentrace draselných iontů. Výsledek tohoto testu nebylo možné přímo objasnit pouze sníženou produkcí syntézy parathormonu, který byl již v této době znám. Další průlom nastal v roce 1975, kdy byl objeven preprokalcitonin, což je prekurzor již v té době známého hormonu štítné žlázy kalcitoninu. Molekula prokalcitoninu byla poprvé popsána v roce 1981.

Diagnosticky se PCT uplatnil poprvé v experimentu, který prokázal jeho zvýšenou koncentraci u medulárního karcinomu štítné žlázy u zvířat. Tento poznatek byl později potvrzen i u lidských pacientů, kteří měli toto onemocnění. Později se prokázalo, že zvýšené koncentrace PCT se objevují v séru i u dalších onemocnění jako např. u malobuněčného karcinomu plic a u syndromu akutní respirační tísně (ARDS). Zvýšená koncentrace v séru je důsledkem nefyziologické tvorby PCT v postižených buňkách. Studie, které se po tomto objevu snažily prokázat souvislost mezi kalcitoninem a plazmatickým PCT, dopadly neúspěšně a přímá vazba mezi těmito analyty nebyla prokázána. ^[4, 18]

V roce 1993 byly zjištěny velmi vysoké koncentrace plazmatického PCT u pacientů se sepsí. Bylo prokázáno, že příčinou je přítomnost bakteriálního endotoxinu – hlavní stavební součásti Gram-negativních bakterií. Po tomto objevu se PCT začal využívat v diagnostice sepse. Předpokládalo se, že byl objeven marker, který odliší infekční a neinfekční původ u zánětlivých stavů pacientů na jednotkách intenzivní péče. Postupně se však ukázalo, že PCT není zdaleka tak specifický marker, jak se předpokládalo a jeho koncentrace v séru se zvyšuje i v důsledku řady dalších neinfekčních příčin. ^[2] V roce 2000 byl prokázán původ PCT přítomného v séru při infekci. Prokalcitonin je produkován v průběhu akutní fáze zánětlivé odpovědi řadou buněk, ale fyziologicky syntetizované hormony se většinou tvoří v preformované endokrinní žláze. Konkrétní místo produkce PCT bylo lokalizováno v hepatocytech. ^[4]

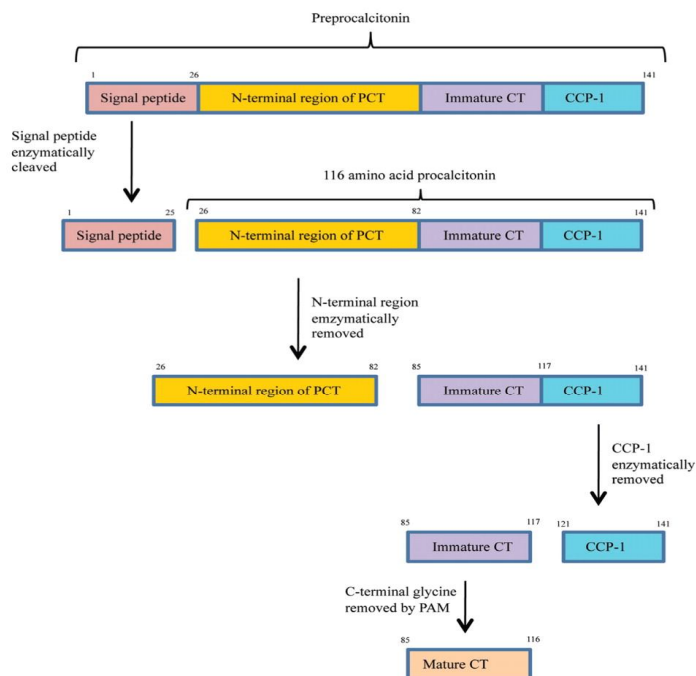
1.3.2. Struktura

PCT je z biochemického hlediska protein, který je tvořen polypeptidovým řetězcem o délce 116 aminokyselin (Obrázek č. 2). Jeho relativní molekulová hmotnost činí 13 kDa. V některých případech se však molekula cirkulujícího (septického) PCT může skládat pouze ze 114 aminokyselin, na jeho N-konci chybí aminokyseliny alanin a prolin (Obrázek č. 3). Za fyziologických a zřejmě i během infekce se molekula PCT vytváří z primárního prekurzoru, kterým je molekula preprokalcitoninu ve formě peptidického řetězce o 141 aminokyselinách. Až následně se tzv. signální sekvence, které se nachází na N-konci, díky svým hydrofobním vlastnostem, naváže do endoplazmatického retikula C-buněk štítné žlázy a vzniká PCT. Ten se dále v buňce (pouze v C-buňkách) štěpí pomocí příslušných endopeptidáz na hormon kalcitonin, N-terminální úsek a na C-terminální úsek, kterému se říká katakalcin. ^[6, 8, 9, 16]



Obrázek č. 2 Struktura prokalcitoninu [16]

Následně vzniklý kalcitonin se mění na terciální strukturu, vytvořením disulfidického můstku mezi aminokyselinami cysteinu a ukončení této biochemické syntézy obstará hydroxylace aminokyseliny prolinu na C-konci. Tato úprava je důležitá pro navázání kalcitoninu na cílový receptor (tyto sekvence tedy nejsou ještě součástí neštěpené molekuly PCT). Poté se PCT uvolňuje do krevního řečiště. [4, 8, 16]



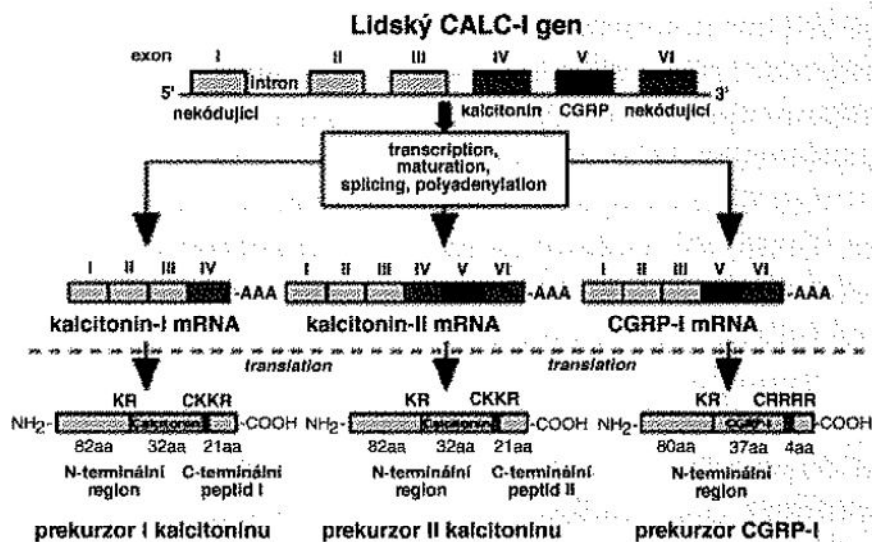
Abbreviations used:
PCT, procalcitonin; CT, calcitonin; CCP-1, calcitonin carboxypeptide-1;
PAM, peptidylglycine α -amidating monooxygenase.

Obrázek č. 3 Tvorba kalcitoninu z PCT [19]

1.3.3. Geny odpovědné za tvorbu PCT

Většina publikací hovoří o tom, že se jedná o tentýž gen, kterým je kódována primární sekvence pro prekurzor kalcitoninu. Tento gen je uvolňován C-buňkami ve štítné žláze. Označujeme ho jako CALC-I a je lokalizován na chromozomu 11 na jeho krátkém raménku (Obrázek č. 4). Nicméně gen odpovědný za syntézu zánětového PCT nebyl zatím definitivně lokalizován. Není vyloučeno, že může být uložen na jiném místě chromozomu 11. Exony čtyři a pět kódují sekvenci nukleotidů pro kalcitonin a kalcitoninu příbuzný peptid I (CGRP-I), který je posléze odstraněn a výsledný produkt transkripce již obsahuje molekulu preprokalcitoninu.

Dalšími geny, které by se mohly mít podílet na produkci zánětového PCT, jsou geny umístěné v těsné blízkosti genu CALC-I. Jedná se o geny, které by mohly mít společný evoluční vývoj. Jsou označovány CALC-II, CALC-III a CALC-IV. Z těchto genů pouze CALC-II kóduje plnohodnotnou sekvenci kalcitoninu, která však podléhá degradaci při intracelulárních úpravách. Vzniká tak protein s označením CGRP-II, který sice má podobnou sekvenci jako CALC-I, ale uplatňuje se hlavně jako neurotransmitter periferních nervů a centrální nervové soustavy. Geny CALC-III a CALC-IV se na produkci zánětového PCT nepodílejí. CALC-III je pseudogenem a CALC-IV obsahuje sekvenci, která kóduje amylin.



Obrázek č. 4 Expresse genu pro PCT ^[4]

1.3.4. Produkce zánětového PCT

Jak již bylo zmíněno výše, PCT se za fyziologických podmínek tvoří v C-buňkách štítné žlázy, kde jsou přeměněny téměř všechny molekuly PCT na kalcitonin, který dále plní svou hormonální úlohu. Množství enzymaticky neupraveného volného PCT uvolněného do krevního řečiště je minimální. Z toho vyplývá, že fyziologické hladiny PCT v séru u zdravých jedinců jsou velmi nízké až pod mezí detekce analytických metod. V plazmě se zatím nenalezly enzymy, které by byly schopné PCT rozštěpit, proto cirkulující PCT, pokud se dostane do krve v neštěpené podobě, může přetrvávat nezměněn i dlouhé hodiny. ^[2, 4] Syntéza zánětového PCT je stimulována zánětlivými cytokiny - TNF a IL-6. ^[20]

Při sepsi dokáží PCT produkovat i jiné druhy tkání než jsou C-buňky. Patří mezi ně například adherentní monocytární buňky nebo buňky jaterní. ^[8] V posledních letech se podařilo prokázat další místa tvorby zánětového PCT. Proces tvorby je spjat s neuroendokrinními buňkami a to především v plicích a ve střevě. V menší míře byla produkce zánětového PCT prokázána u monocytů, makrofágů a buněk hypofýzy. ^[4]

1.3.5. Funkce zánětového PCT

Z dosavadních studií je fyziologická funkce zánětového PCT zatím nejasná. ^[4]

Teorie, které by objasnily úlohu PCT v organismu, se zaměřují na několik oblastí. První z nich popisuje zánětový PCT s ohledem na metabolismus vápníku a fosfátů, protože struktura zánětového PCT je velmi podobná prekurzoru hormonu kalcitoninu (Tabulka č. 3). Další pracuje s poznatkem, že kalcitonin umí chemotakticky působit na monocyty a tím zvyšovat jejich aktivitu. Případně by zánětový PCT mohl být zapojený do sítě cytokinů nebo by mohl fungovat jako nesteroidní analgetikum. ^[10]

	zánětový PCT	PCT tvořený C-buňkami
Gen	CALC-I ?	CALC-I
Zdroj	hl. hepatocyty	C-buňky

dominantní regulace	LPS, TNF α , IL-6	Hypokalcémie
Molekulová hmotnost	13 000	13 000
délka řetězce	116 (114) AMK	116 AMK
poločas v cirkulaci	25 – 30 h	není uvolňován do oběhu
fyziologický význam	vliv na cytokiny?	Prekurzor hormonu

Tabulka č. 3 Srovnání zánětového PCT a tvořeného v C-buňkách štítné žlázy ^[4]

1.4. C-reaktivní protein

Historie C-reaktivního proteinu sahá až do roku 1930, kdy byl u pacientů s pneumokokovou pneumonií objeven „archetyp“ proteinu akutní fáze – CRP. CRP patří mezi proteiny akutní fáze a jeho hlavním producentem jsou játra (hepatocyty), které ho uvolňují do krevního řečiště. CRP na sebe váže Gram-pozitivní i Gram-negativní bakterie a stimuluje adhezi a fagocytózu, která je řízena komplementovým systémem. Je to marker přítomnosti zánětlivé reakce. Jeho plazmatická koncentrace nad 5 mg/l je patologická. Dynamika produkce CRP ve srovnání s PCT (případně IL-6) je limitujícím faktorem, který ovlivňuje jeho diagnostickou výpovědní hodnotu. ^[6, 9]

2. CÍLE PRÁCE

- 1.) Srovnání korelace pozitivních výsledků hemokultur, jakožto robustní diagnostické metody u průkazu sepse, s pozitivitou PCT a CRP.
- 2.) Prokázat míru spolehlivosti PCT u pacientů se sepsí (SIRS) ve vztahu k pozitivě hemokultury jakožto definitivní metodě průkazu přítomnosti infekce u pacienta.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Soubor pacientů

Byly vyšetřeny vzorky 35 pacientů anesteziologicko-resuscitačního oddělení, cévního a kardiochirurgického oddělení Nemocnice Na Homolce. Demografická charakteristika pacientů se nachází v tabulce č. 4. U všech pacientů byla ihned po stanovení klinické diagnózy sepse, těžké sepse resp. septického šoku odebrána krev k hemokultivaci pro aerobní a anaerobní mikroby. Ze stejného vpichu byla odebrána krev ke stanovení koncentrace PCT a C-reaktivního proteinu. Odběr krve pro výše uvedené dva proteiny byl opakován po 24 hodinách.

Pohlaví	Počet (n)	Věkové rozmezí	Průměrný věk	Podíl (%)
Muži	26	49 – 84	63,27	74,29
Ženy	9	38 – 85	68,77	25,71
Celkem	35	38 - 85	64,69	100,00

Tabulka č. 4 Charakteristika pacientů

3.2. Materiál a přístrojové vybavení

Potřebný materiál

Zkumavky

Eppendorfký

Stojan na zkumavky

Buničina

Pipety (od 0,5 do 5000 μ l)

Špičky (dle daného objemu pipety)

Pasteurova pipeta

Reagencie

Diagnostický KIT B.R.A.H.M.S sensitive KRYPTOR (REF 285.050) pro stanovení koncentrací PCT v séru - je nutné uchovávat kit v lednici o teplotě mezi 2 a 8°C (Tabulka č. 5).^[21]

XL665 – CONJUGATE (1x VIAL)	lyofilizované	monoklonální protilátka anti-katakalcin konjugovaná s XL665, pufr, bovinní albumin, myší imunoglobuliny, fluorid draselný
CRYPTATE – KONJUGATE (1x VIAL)	lyofilizované	ovčí polyklonální protilátka antikalcitonin konjugovaná s kryptátem europia, pufr, bovinní albumin, neimunizované myší imunoglobuliny, fluorid draselný
DILUENT (1x VIAL 4 mL)	možné použití ihned	lidské sérum, Kathon, EDTA

Tabulka č. 5 Obsah a popis B.R.A.H.M.S sensitive KRYPTOR^[21]

Další reagensie (Tabulka č. 6): kalibrátory B.R.A.H.M.S PCT sensitive KRYPTOR CAL (REF 82591), ^[21]

B.R.A.H.M.S PCT sensitive KRYPTOR CAL (6x VIAL)	lyofilizované	rekombinantní PCT v lidském séru
bar code card (1x)	možné použití ihned	karta s čárovým kódem – obsahuje informace o šarži kalibrace včetně její koncentrace

Tabulka č. 6 Obsah a popis B.R.A.H.M.S PCT sensitive KRYPTOR CAL ^[21]

kontrolní vzorky pro ověření vnitřní kvality B.R.A.H.M.S KRYPTOR compact (Tabulka č. 7)

B.R.A.H.M.S PCT sensitive KRYPTOR QC CONTROL 1 (3x VIAL)	lyofilizované	rekombinantní PCT v lidském séru
B.R.A.H.M.S PCT sensitive KRYPTOR QC CONTROL 2 (3x VIAL)	lyofilizované	rekombinantní PCT v lidském séru
bar code card (1x)	možné použití ihned	karta s čárovým kódem, které obsahuje informace o šarži kalibrace, zejména informace o cílové koncentraci, získané směrodatné odchylce a akceptační rozsah koncentrace
bar code stick – on labels	možné použití ihned	nálepky s čárovým kódem sloužící k identifikaci kontrol při

(20x pro každou kontrolní hladinu)		analýze systému B.R.A.H.M.S KRYPTOR compact
------------------------------------	--	---

Tabulka č. 7 Obsah a popis B.R.A.H.M.S PCT sensitive KRYPTOR QC ^[21]

Promývací a ředící roztoky B.R.A.H.M.S spotřební materiály KRYPTOR compact (Tabulka č. 8). ^[21]

Název	REF
B.R.A.H.M.S KRYPTOR BUFFER	89970
B.R.A.H.M.S KRYPTOR compact SOLUTION 1	89981
B.R.A.H.M.S KRYPTOR compact SOLUTION 2	89982
B.R.A.H.M.S KRYPTOR compact SOLUTION 3	89983
B.R.A.H.M.S KRYPTOR compact SOLUTION 4	89984
B.R.A.H.M.S KRYPTOR compact DILCUP	89985
B.R.A.H.M.S KRYPTOR compact REACT	89986

Tabulka č. 8 Obsah a popis B.R.A.H.M.S spotřební materiály KRYPTOR compact ^[21]

Přístroje

B.R.A.H.M.S KRYPTOR compact PLUS (B.R.A.H.M.S Aktiengesellschaft, Německo)

Centrifuga (Jouan)

PC se softwarem pro B.R.A.H.M.S KRYPTOR compact PLUS

PC napojený na Laboratorní a Nemocniční informační systém (LIS, NIS)

3.2.1. Popis B.R.A.H.M.S KRYPTOR compact

Přístroj B.R.A.H.M.S KRYPTOR compact (Obrázek č. 5) je automatizovaný systém, který je určen pro diagnostiku *in vitro*. Používá se ke stanovení koncentrace PCT v patientských sérech. [22]

Skládá se ze dvou hlavních částí. Z detekčního modulu (do kterého se vkládají mikrotitrační destička, na které probíhá inkubace) a pipetovacího modulu, který se dělí na tři části:

- karusel – místo pro reagentie nebo držáky se vzorky
- pipetovací jednotka – má vyhřívanou dávkovací jehlu, kterou nasává roztoky
- kapalinový systém – obsahuje 3 lahve po 5 litrech, promývací a tlumící kapalinu, destilovanou vodu a láhev pro kapalný odpad



Obrázek č. 5 Popis přístroje B.R.A.H.M.S KRYPTOR compact [převzato a upraveno z http://www.procalcitonin.com/default.aspx?tree=_4_0_3&key=kryptor5]

- č. 1 pipetovací jednotka
- č. 2 kapalinový systém
- č. 3 karusel
- č. 4 detekční modul

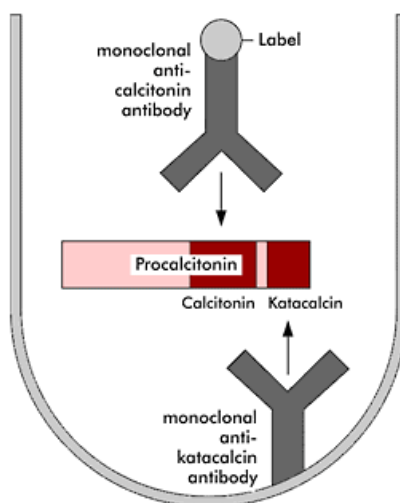
- č. 5 ruční snímač čárového kódu
- č. 6 PC se softwarem B.R.A.H.M.S KRYPTOR compact ^[22]

3.3. Metodika stanovení

3.3.1. Stanovení PCT na B.R.A.H.M.S KRYPTOR compact

Koncentrace PCT v séru je analyzována na základě specificity antigenních determinant metodou imunoluminometrické analýzy (ILMA). Ta spočívá v tom, že na molekulu PCT se naváží dvě antigen-specifické monoklonální protilátky. První monoklonální protilátka tvoří specifický komplex se sekvencí PCT obsahující kalcitonin. Druhá monoklonální protilátka tvoří imunokomplex s částí PCT, která obsahuje sekvenci katakalcin. Obě protilátky jsou přítomny v nadbytku. První protilátka volně přítomná ve vzorku je u ILMA značena luminiscenční látkou (luminofor) a druhá protilátka je adherována ke stěně zkumavky případně mikrotitrační destičky. Během inkubace obě protilátky s molekulami PCT, nalézajícími se ve vzorku, reagují a vytváří specifický imunokomplex. Reakce probíhá za zvýšené teploty (37°C) a po promytí zůstane v jamce/ zkumavce vzniklý komplex antigenu a protilátky (Obrázek č. 6). ^[4, 18, 23]

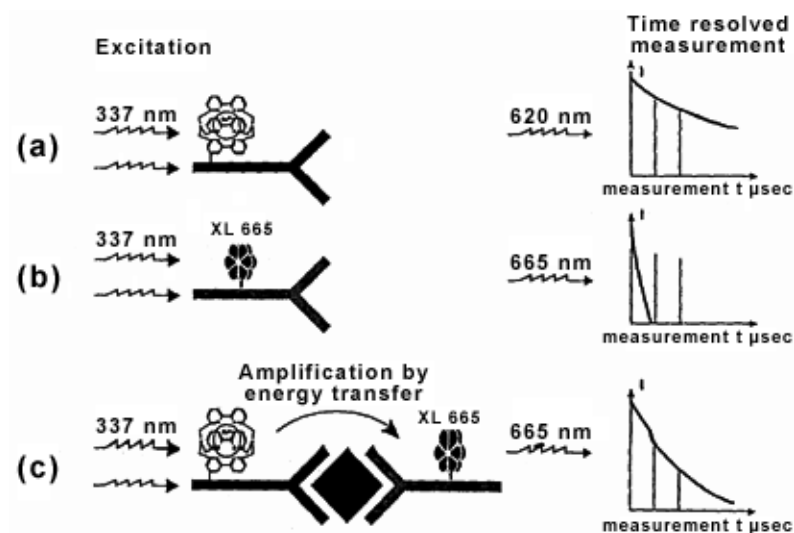
Z hlediska klasifikace imunoreakcí se jedná o nekompetitivní metodu, zpravidla ji označujeme jako „sendvičová“ metoda. Výhodou této metody, kdy značená protilátka reaguje v nadbytku, je vysoká specifita a senzitivita. Jinými slovy minimalizujeme riziko falešné positivity způsobenou jinými fragmenty (např. kalcitoninu). V další fázi měříme intenzitu luminiscenčního signálu. Intenzita signálu je závislá na koncentraci PCT v měřeném vzorku a pomocí kalibrační křivky se vypočte koncentrace PCT ve vzorku patientského séra. ^[4, 23, 24, 25]



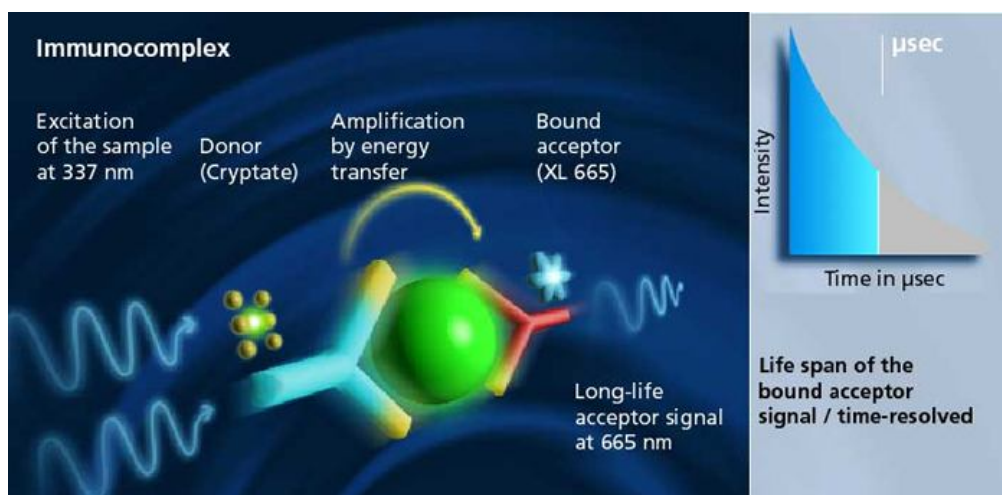
Obrázek č. 6 Obecné schéma „sendvičové“ metody – navázání antigenu (v konkrétním případě katacalcínu) na protilátku navázanou v reagenčním substrátu (jamka mikrotitrační destičky), navázání značené protilátky na antigenní determinantu antigenu (část PCT, která obsahuje strukturu kalcitoninu) a posléze odstranění přebytečných značených protilátek [převzato z

http://www.procalcitonin.com/mages/products/assay_principle.gif

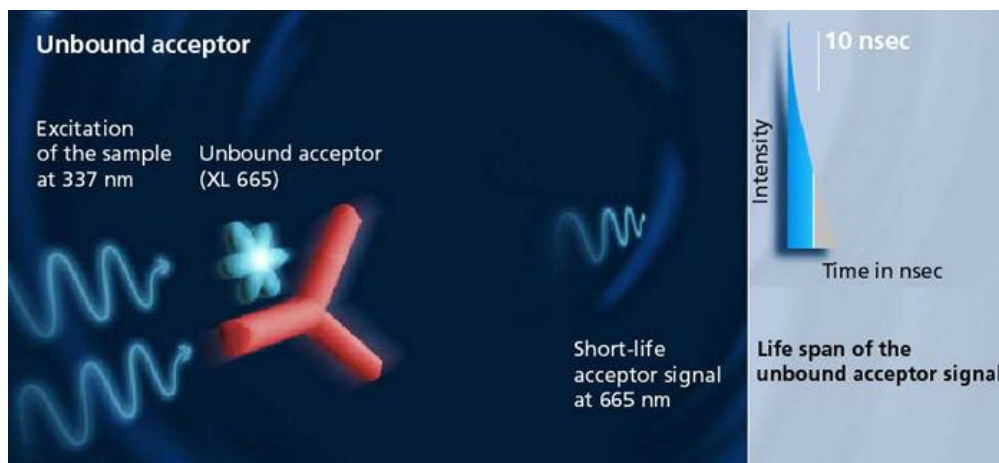
Metoda ILMA je na analyzátoru B.R.A.H.M.S KRYPTOR Compact. vylepšena o tzv. metodu Time Resolved Amplified Cryptande Emission (TRACE). Tato metoda měří signál, který je produkován imunokomplexem antigenu s protilátkou, jak je znázorněno na obrázku č. 7. Přitom dochází k přenosu neradioaktivní energie z donoru na akceptor. Jako donor zde vystupuje kryptátová skupina, která má uprostřed iont europia (Eu^{3+}). Akceptor je obsažen v chemicky modifikovaném proteinu XL 665, který pohlcuje světlo. Vzorek je následně ozářen dusíkovým laserem (337 nm) a donor vyzáří fluorescenční signál (Obrázek č. 8), který má dobu trvání v řádech milisekund (při 620 nm). Při navázání imunokomplexu dojde k zesílení signálu akceptoru při 650 nm a tedy i k prodloužení času produkce signálu (Obrázek č. 9). Jak již bylo zmíněno výše, jedná se o sendvičovou imunoanalýzu, při které jsou obě části (donor, akceptor) navázány společně na imunokomplex a protože jde o homogenní imunoanalýzu, není třeba promývat a separovat vzorek. Metoda je velmi přesná. [18, 21, 26,]



Obrázek č. 7 Schéma metody TRACE [převzato z http://www.procalcitonin.com/images/products/kryptor_principle.gif]



Obrázek č. 8 Metoda TRACE – dokončená imunitní reakce způsobí neradioaktivní přenos energie z donorové molekuly na molekulu akceptoru [převzato z <http://www.kryptor.net/Default.aspx?tabindex=3&tabid=254&lang=en>]



Obrázek č. 9 Metoda TRACE – měření zesíleného signálu [převzato z <http://www.kryptor.net/Default.aspx?tabindex=3&tabid=254&lang=en>]

3.3.1.1. Pracovní postup

K vyšetření byla odebrána krev pacienta do zkumavek obsahujících separační gel a aktivátor srážení (citrát sodný). Plná krev se nechá půl hodiny vysrážet a následně se centrifuguje po dobu 10 minut při 3000 otáčkách. Následně se odsaje ze vzorků sérum do čistých zkumavek. Pro stanovení koncentrace PCT ve vzorcích byl použit analyzátor B.R.A.H.M.S Kryptor Compact.

Postup analýzy:

- Vložení boxu s protilátkami proti PCT do karuselu čárovým kódem směrem ven pro načtení šarže.
- Uzavření poklopu karuselu.
- Zkontrolování čistoty pozadí (měřící okénko).
- Vložení mikrotitrační destičky (96 jamek) do detekčního modulu a před uzavřením načíst ruční čtečkou čárový kód.
- Spuštění inicializace → destička se začne zahřívat na 37°C (+/- 0,05°C) po dobu cca 15-20 minut.
- Tisk pracovního listu s přidělenými čísly patientských sér.
- Kontrola patientských sér ve stojánku.

- Propojení softwaru přístroje B.R.A.H.M.S KRYPTOR compact s LIS.
- Otevřít poklop karuselu a vložit dle pořadí čísel patientská séra do karuselu.
- Uzavření karuselu a spuštění vlastní analýzy na přídruženém PC. Doba analýzy je přibližně 20 minut.
- Kontrola výsledků a přenesení do NIS.

3.4. Stanovení C-reaktivního proteinu

Stanovení koncentrace CRP se provádí na základě imunoturbidimetrická analýzy, jde o modifikaci klasické turbidimetrie. CRP reaguje se specifickou protilátkou za vzniku imunokomplexů. Míra tzv. imunoprecipitace (zákalu) se měří při vlnové délce 340 nm. Jako urychlovač tvorby imunokomplexů se používá polyethylenglykol, který je přítomný v reakční směsi. Výsledná koncentrace CRP ve vzorku (mg/l) se určí z kalibrační křivky. ^[18, 14, 23]

3.5. Hemokultivace

Hemokultivace je mikrobiologická metoda, která se používá k diagnostice infekce krevního řečiště, provádí se u pacientů s podezřením na diagnózu sepse. Odběr nesrážlivé krve je důležité provést asepticky – nutná desinfekce pomocí jodových preparátů. Zpravidla je odebráno 10 – 20 ml. Odběr se provádí do dvou hemokultivačních lahvíček, kde první je pro aerobní kultivaci a druhá pro anaerobní kultivaci (Obrázek č. 10). Důležitou podmínkou úspěšné hemokultivace je i správné načasování odběru a to při vzestupu teploty, kdy se v krevním řečišti potencionálně nalézá největší množství bakterií. Hemokultivace se provádí v automatizovaném přístroji, který udržuje ideální podmínky pro růst bakterií a také vyhodnocuje změnu koncentrace CO₂ v závislosti na případném růstu bakteriálních kolonií (hemokultury). Nárůst koncentrace CO₂ značí nárůst počtu bakterií a tím i pozitivitu hemokultury. Vyhodnocuje se zde čas od příjmu do detekce positivity a vyjmutí z přístroje. Delší časové intervaly značí větší pravděpodobnost kontaminace. ^[27, 28]



Obrázek č. 10 Hemokultivační lahvičky – vlevo pro aerobní hemokulturu a vpravo pro anaerobní hemokulturu [28]

3.6. Statistické zpracování dat

Pro analýzu dat byl použit statistický program STATA 9.1. Pro testování rozdílu hodnot mezi skupinami byl využit Kruskalů-Wallisův neparametrický test, normalita distribuce naměřených hodnot byla provedena pomocí Skewness and kurtosis tests. Závislosti hodnot byly vzájemně testovány Spearmanovou pořadovou korelací a logistickou regresí.

4. VÝSLEDKY

Ve vyšetřované skupině 35 pacientů byla zjištěna pozitivní hemokultura u 10 pacientů (28,57 %). Zvýšená koncentrace PCT vyšší než 0,5 ng/ml byla 1. den zjištěna u 12 pacientů (34 % z celkového počtu pacientů). Z toho byli 4 pacienti s pozitivní hemokulturou a 8 pacientů s negativní kulturou (Tabulka č. 9 a 10). Druhý den byla zvýšená koncentrace PCT zjištěna u 10 pacientů. Z toho 3 pacienti měli pozitivní hemokulturu a 7 pacientů mělo negativní hemokulturu. Hodnoty PCT se statisticky významně nelišily mezi 1. a 2. dnem a to jak ve skupině pacientů s pozitivní hemokulturou tak ve skupině pacientů s negativní hemokulturou (Tabulka č. 11 a 12).

Zvýšená hodnota CRP vyšší než 5 mg/l byla zjištěna u 34 pacientů s pozitivní a negativní hemokulturou 1. den a u 34 pacientů s negativní a pozitivní hemokulturou 2. den (Tabulka č. 13 a 14). Hodnoty CRP se statisticky významně nelišily mezi 1. a 2. dnem a to jak ve skupině pacientů s pozitivní hemokulturou tak ve skupině pacientů s negativní hemokulturou (Tabulka č. 15 a 16).

U 5 pacientů (50%) z celkového počtu 10 pacientů s pozitivní hemokulturou byla zjištěna koncentrace PCT < 0,5 ng/ml (Tabulka č. 17). Koncentrace CRP byla zvýšená u všech pacientů bez ohledu na pozitivitu nebo negativitu hemokultury.

Analyt	Počet pacientů	Medián (ng/ml)	Směrodatná odchylka	Rozmezí (ng/ml)
PCT	35	1,31	2,37	0,05 – 8,42

Tabulka č. 9 Hodnoty PCT ve skupině pacientů s negativní hemokulturou a pozitivní hemokulturou **1. den**

Analyt	Počet pacientů	Medián (ng/ml)	Směrodatná odchylka	Rozmezí (ng/ml)
PCT	17	1,58	2,22	0,05 – 7,49

Tabulka č. 10 Hodnoty **PCT** ve skupině pacientů s negativní hemokulturou a pozitivní hemokulturou **2. den**

Analyt	Počet pacientů	Pozitivita hemokultury	Medián (ng/ml)	Směrodatná odchylka	Rozmezí (ng/ml)
PCT	9	ANO	1,76	3,02	0,05 – 8,42

Tabulka č. 11 Pozitivní hodnota **PCT** ve skupině pacientů s **pozitivní** hemokulturou 1. a 2. den

Analyt	Počet pacientů	Pozitivita hemokultury	Medián (ng/ml)	Směrodatná odchylka	Rozmezí (ng/ml)
PCT	26	ANO	1,16	2,15	0,05 – 7,98

Tabulka č. 12 Pozitivní hodnota **PCT** ve skupině pacientů s **negativní** hemokulturou 1. a 2. den

Analyt	Počet pacientů	Medián (mg/l)	Směrodatná odchylka	Rozmezí (mg/l)
CRP	35	105,33	67,85	3,4 – 228

Tabulka č. 13 Hodnoty **CRP** ve skupině pacientů s negativní hemokulturou a pozitivní hemokulturou **1. den**

Analyt	Počet pacientů	Medián (mg/l)	Směrodatná odchylka	Rozmezí (mg/l)
CRP	17	131,47	69,41	3,0 – 236

Tabulka č. 14 Hodnoty **CRP** ve skupině pacientů s negativní hemokulturou a pozitivní hemokulturou **2. den**

Analyt	Počet pacientů	Pozitivita hemokultury	Medián (mg/l)	Směrodatná odchylka	Rozmezí (mg/l)
CRP	9	ANO	93,11	69,21	6,0 – 208

Tabulka č. 15 Hodnota **CRP** ve skupině pacientů s **pozitivní** hemokulturou 1. a 2. den

Analyt	Počet pacientů	Pozitivita hemokultury	Medián (mg/l)	Směrodatná odchylka	Rozmezí (mg/l)
CRP	26	NE	109,55	68,23	3,4 – 228

Tabulka č. 16 Hodnota **CRP** ve skupině pacientů s **negativní** hemokulturou 1. a 2. den

Analyt	Počet pacientů	Pozitivita hemokultury	Hodnoty PCT u jednotlivých pacientů (ng/ml)
PCT	5	ANO	0,05; 0,13; 0,05; 0,05; 0,09

Tabulka č. 17 Pacienti s **pozitivní** hemokulturou a **negativní** hodnotou **PCT**

Číslo pacienta	Číslo vyšetření pro daného pacienta	Pohlaví (1-muž; 2- žena)	PCT (ng/ml)	CRP (mg/l)	Hemokultivace (1 - pozitivní; 0 - negativní)
1	1	1	8,42	208	1
1	2	1	6,42	152	1
2	1	1	0,05	85	0
3	1	1	0,46	101	0
3	2	1	0,31	73	0
4	1	1	6,53	220	0
5	1	1	0,06	137	0
6	1	2	0,20	80	0
7	1	2	0,33	157	0
7	2	2	0,36	165	0
8	1	1	0,05	6	1
8	2	1	0,10	42	1
9	1	1	7,98	164	0
10	1	2	0,09	30	0
11	1	1	0,79	129	0
12	1	1	0,33	110	0
12	2	1	2,17	169	0
13	1	1	0,23	32	0
14	2	1	1,29	236	0
14	1	1	0,84	36	1
14	2	1	0,82	31	1
14	3	1	0,93	230	0
15	1	1	0,44	138	0
16	1	1	2,30	147	0
16	2	1	3,32	206	0
17	1	1	0,10	41	0
17	2	1	0,13	50	0
17	3	1	0,17	75	0
17	4	1	0,26	60	0
18	1	1	0,36	72	0
18	2	1	1,12	195	1
18	3	1	0,05	50	1
19	1	1	0,50	228	0
20	1	2	0,20	28	0
21	1	1	1,73	205	0
21	2	1	2,00	209	0
21	3	1	0,14	105	0
22	1	1	0,13	61	1
23	1	1	0,15	66	0
24	1	2	0,28	71	0

25	1	1	5,35	136	1
25	2	1	7,49	173	1
26	1	2	0,87	185	1
27	1	1	0,11	220	0
27	2	1	0,08	152	0
28	1	2	0,05	42	1
29	1	1	0,06	110	0
29	2	1	0,05	117	0
30	1	1	5,75	195	0
31	1	1	0,05	89	1
31	2	1	0,05	114	1
32	1	2	0,62	3,4	0
32	2	2	0,56	3	0
33	1	2	0,05	70	0
33	2	2	0,66	148	0
34	1	1	0,09	75	1
35	1	1	0,47	9	0

Tabulka č. 18 Přehled vyšetřovaných pacientů – tučně vyznačené řádky označují pacienty s pozitivní hemokulturou a negativní hodnotou PCT

5. DISKUZE

Cílem práce bylo srovnání prokalcitoninu a C-reaktivního proteinu u pacientů splňujících kritéria sepse a s pozitivním průkazem systémové infekce – pozitivní hemokulturou. Musíme konstatovat, že C-reaktivní protein byl více sensitivním parametrem než prokalcitonin. Jeho pozitivitu jsme zjistili u všech 34 pacientů se sepsí, zatímco prokalcitonin byl pozitivní pouze u 16 pacientů. Je nutné zdůraznit, že diagnóza sepse byla v této studii stanovena klinickým lékařem. Potvrdili jsme tak nálezy z jiných studií, že prokalcitonin je pozitivní pouze u části pacientů se sepsí a je nutné brát v úvahu klinický stav každého pacienta individuálně. C-reaktivní protein v tomto srovnání se jeví jako více sensitivní, ale je nutné zdůraznit, že koncentrace CRP do 50mg/l jsou nespecifické pro etiologii bakteriálního zánětu.

Uvedené dva parametry jsme vybrali cíleně vzhledem k tomu, že je možné jejich stanovení v kontinuálním statimovém režimu a je tak splněna podmínka co nejrychlejší analýzy daného biomarkeru. U podstatné části pacientů s pozitivní hemokulturou (50%) jsme zjistili koncentraci PCT v mezích fyziologického rozmezí - $< 0,5$ ng/ml. O důvodech negativity prokalcitoninu u těchto pacientů můžeme jen spekulovat. Může se jednat o závažnost klinického stavu, může se jednat o různý druh etiologického infekčního agens, jak vyplývá z výsledků mikrobiologického vyšetření. Pozoruhodné je zjištění, že hodnota prokalcitoninu u uvedených nemocných byla negativní po oba dva dny, kdy bylo provedeno vyšetření, odpadá tedy příčina ev. krátkého časového intervalu od mezi začátkem sepse a provedením odběru.

ZÁVĚR

Prokalcitonin a C-reaktivní protein představují v současnosti nejvýznamnější biomarkery, které využíváme při diagnostice sepse. Oba je možné vyšetřovat v kontinuálním statimovém režimu. Technologie měření, které máme v současné době k dispozici- TRACE a turbidimetrie jsou dostatečně robustní. Sensitivita a specificita obou biomarkerů je ale omezená při průkazu systémové infekce, jak dokládá tato studie.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. HOŘEJŠÍ, Václav a Jiřina BARTŮŇKOVÁ. *Základy imunologie*, 4. vyd. Praha: Triton 2009, 316 s. ISBN 978-80-7387-280-9.
2. ZIMA, Tomáš a kol. *Laboratorní diagnostika*. 2. dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén 2007, 906 s. ISBN 978-80-7262-372-3.
3. FRIC, Milan. *Sepse ve stáří*. Česká geriatrická revue, 2008, roč. 6, č. 4, s. 249-256. ISSN 1214-0732.
4. MARUNA, Pavel. *Procalcitonin*. 1. vyd. Praha: TRITON, 2003, 140 s. ISBN 80-7254-410-1.
5. HOLUB, Michal. *Sepse: infekce a systémová zánětová odpověď*. Časopis lékařů českých, 2007, roč. 146, č. 2, s. 109-114. ISSN 0008-7335.
6. PRŮCHA, Miroslav. *Imunologie sepse*. Medical Tribune, 2008, roč. 4, č. 23, ISSN 1214-8911.
7. CHARLES P. E.; LADOIRE S.; SNAUWAERT A.; PRIN S.; AHO S.; PECHINOT A.; OLSSON N. O.; BLETTERY B.; DOISE J. M.; QUENOT J. P. *Impact of precios sepsis on the accuracy of procalcitonon for the early diagnosis of blood stream infection in critically ill patients*. BMC Infectious Diseases, 2008, roč. 8, č. 163. ISSN 1471-2334.
8. MCGEE, A. K.; BAUMANN A. N. *Procalcitonin Clinical Utility in Diagnosing Sepsis*. Clinical Laboratory News, 2009, roč. 35, č. 7, s. 10-12. ISSN 0161-9640.
9. BRUNKHORST, Frank. *Markery sepse – klinický význam*. Medical Tribune, 2009, roč. 5, č. 2, ISSN 1214-8911.
10. KAZDA, A.; VALENTA, J.; BRODSKÁ, H.; STACH, Z.; HENDL, J.; STRÍTESKÝ, M. *Procalcitonin u kriticky nemocných*. Klinická biochemie a metabolismus. 2005, roč. 13, č. 1, s. 4-9. ISSN 1210-7921.

11. JAIMES A. F.; DE LA ROSA D. G.; VALENCIA L. M.; ARANGO M. C.; GOMEZ I. C.; GARCIA A.; OSPINA S.; OSORNO C S.; HENAO I. A. *A latent class approach for sepsis diagnosis supports use of procalcitonin in the emergency room for diagnosis of severe sepsis*. BMC Anesthesiology, 2013, roč. 13, č. 1, s. 23-33. ISSN 1471-2253.
12. BORIS J.; MOLINARI N.; NASRI M.; HAJJEJ Z.; CHANQUES G.; JEAN-PIERRE H.; PANARO F.; JABER S. *Procalcitonin biomarker kinetics fails to predict treatment response in perioperative abdominal infection with septic shock*. Critical Care, 2013, roč. 17, č. 5, s. 225-234. ISSN 1364-8535.
13. CHARLES P. E.; TINEL C.; BARBAR S.; AHO S.; PRIN S.; DOISE J. M.; OLSSON N. O.; BLETTERY B.; QUENOT J. P. *Procalcitonin kinetics within the first days of sepsis: relationship with the appropriateness of antibiotic therapy and the outcome*. Critical Care, 2009, roč. 13, č. 2, s. 38-49. ISSN 1364-8535.
14. *Laboratorní příručka OKBHI Nemocnice Na Homolce – Příloha č. 3 - Podrobný seznam vyšetření - IMUNOLOGIE* [online]. 2014, verze 3 [cit. 2014-04-18]. 22 s. Dostupné z:
http://www.homolka.cz/public/data/odd/okbhi/OBMI_OKBHI_001_laboratorni_prirucka_v3_priloha-3_seznam_IMUNOLOGIE.pdf.
15. *Laboratorní příručka OKBHI Nemocnice Na Homolce – Příloha č. 6 - Stabilita analytů* [online]. 2014, verze 4 [cit. 2014-04-18]. 19 s. Dostupné z:
http://www.homolka.cz/public/data/odd/okbhi/OBMI_OKBHI_001_laboratorni_prirucka_v3_priloha-6_stabilita_analytu.pdf.
16. MCGEE, A. K.; BAUMANN A. N. *Procalcitonin Clinical Utility in Diagnosing Sepsis*. Clinical Laboratory News, 2009, roč. 35, č. 7, s. 10-12. ISSN 0161-9640.
17. KONRÁDOVÁ, V.; UHLÍK, J.; VAJNER, L. *Funkční histologie*. 2. vyd. Jinočany: H&H Vyšehradská, 2000, 291 s. ISBN 80-86022-80-3.
18. ŠTERN, Petr a kol. *Obecná a klinická biochemie pro bakalářské obory studia*. 2. upravené vydání. Praha: Karolinum, 2011, 269 s. ISBN 978-80-246-1979-8.

19. MING, J.; KHAN A. I. *Procalcitonin: Uses in the Clinical Laboratory for the Diagnosis of Sepsis*, LabMedicine, 2010, roč. 41, č. 3, s. 173-177. ISSN 0007-5027.
20. KARLSSON S.; HEIKKINEN M.; PETTILÄ V.; ALILA S.; VÄISÄNEN S.; PULKKI K.; KOLHO E.; RUOKONEN E.; THE FINNSEPSIS STUDY GROUP. *Predictive value of procalcitonin decrease in patients with severe sepsis: a prospective observational study*. Critical Care, 2010, roč. 14, č. 6, s. 205-214. ISSN 1364-8535.
21. *B.R.A.H.M.S PCT sensitive KRYPTOR- Návod k použití* [online]. 2008, [cit. 2014-04-19]. Dostupné z: http://www.procalcitonin.com/pdf/PCT-SENSITIVE_KRYPTOR/ifu_825.050_cs_R06_brahms-kryptor-pct-sensitive.pdf.
22. *B.R.A.H.M.S KRYPTOR compact – Uživatelská příručka*. 2008, v. R01cs, s. 20.
23. BARTŮŇKOVÁ, Jiřina a Milan PAULÍK a kol. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 1. vyd. Praha: Grada, 2005, 176 s. ISBN 80-247-0691-1.
24. PODROUŽEK, Petr. *Laboratorní metody v gynekologické endokrinologii*. Postgraduální medicína, 2001, roč. 2, č. 9, s. 1003. ISSN 1212-4184.
25. LAŠŤOVIČKA, Jan. *Imunoreakce se značenými protilátkami*. [online]. [cit. 2014-04-19]. Dostupné z: http://imunologie.lf2.cuni.cz/soubory_vyuka/imunoreakce.pdf.
26. ČIHALOVÁ, J.; BEŇOVSKÁ, M.; KLIMÍČEK I.; *Stanovení procalcitoninu na modulu EI70 analyzátoru Modular Analytics a a nalyzátoru Kryptor compact*. Labor Aktuell, 2009, roč. 14, č. 2. ISSN 1214-7672.
27. VOTAVA, Miroslav a kol. *Lékařská mikrobiologie - vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, 2010, 495 s. ISBN 978-80-86850-04-7.
28. MELTER, Oto a Annika MALMGREN. *Principy a praktika lékařské mikrobiologie*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2014, 139 s. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 978-802-4624-143.