

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

**STANOVENIE VYBRANÝCH BIOCHEMICKÝCH PARAMETROV
A ICH DIAGNOSTICKÉ A PROGNOTICKÉ HODNOTY
U SEPTICKÝCH OCHORENÍ**

Diplomová práca

Vedúci diplomovej práce: prof. MUDr. Jaroslav Dršata, CSc.

Konzultant diplomovej práce: Ing. Jana Netriová, PhD.

Hradec Králové 2014

Bc. Jaroslav Jenčo

PREHLÁSENIE

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovávaní čerpal, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované. Práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové dňa: 12.05.2014

.....
Bc. Jaroslav Jenčo

POĎAKOVANIE

Ďakujem všetkým, ktorí mi pomáhali pri písaní diplomovej práce, za pomoc pri výskume, odborné rady a usmernenia, menovite: Ing. Jane Netriovej, PhD., prof. MUDr. Jaroslavovi Dršatovi, CSc. a RNDr. Vladimírovi Melušovi, PhD.

Zároveň chcem poďakovať mojej rodine a priateľom za pochopenie, pomoc a trpezlivosť.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Jaroslav Jenčo

Školitel: prof. MUDr. Jaroslav Dršata, CSc.

Konzultant: Ing. Jana Netriová, PhD.

Názov diplomovej práce: Stanovenie vybraných biochemických parametrov a ich diagnostické a prognostické hodnoty u septických ochorení

Septické stavy sú pomerne častou komplikáciou, ktorá sa môže podpísať na zvýšenej úmrtnosti pacientov. Postihujú všetky vekové kategórie bez ohľadu na pohlavie. Výskyt je častejší u polymorbídnych a imunosuprimovaných pacientov. Najefektívnejšia metóda na zabránenie rozvoja septických komplikácií je rýchla a presná diagnostika.

V období od 1.6.2012 do 1.4.2014 sme pozorovali 697 pacientov, hospitalizovaných v dôsledku rozvoja septických komplikácií a štatisticky sme analyzovali sledované markery: presepsín, prokalcitonín, C – reaktívny proteín, interleukín – 6, laktát, D - diméry, fibrinogén a množstvo leukocytov, s cieľom určiť ich prediktívnu a diagnostickú hodnotu. Najväčšia závislosť nám vyšla v porovnaní presepsínu s prokalcitonínom a presepsínu s C – reaktívnym proteínom, ktoré odrážali rýchlo sa meniaci stav pacientov. Mierne závislosti sme pozorovali u laktátu, interleukínu – 6, D - dimérov a počtu leukocytov. Medzi rozvojom septického stavu a fibrinogénom sme nezistili žiadnu výraznú koreláciu.

Po rozdelení pacientov do skupín podľa počiatočnej diagnózy sme zistili výrazné rozdiely medzi skupinou pacientov s nádorovými ochoreniami a skupinami pacientov s metabolickými, kardiovaskulárnymi a infekčnými diagnózami. U pacientov s nádorovými ochoreniami dochádzalo k zníženiu všetkých parametrov aj napriek rozvíjajúcemu sa septickému stavu.

Názorne sme na kazuistikách 4 pacientov poukázali na skutočnosť, že vysoká variabilita biochemických markerov neumožňuje monitorovať stav pacienta len prostredníctvom jedného parametra, ale je potrebné tieto parametre kombinovať.

Kľúčové slová: Laboratórna diagnostika, septický stav, biochemické markery, presepsín, prokalcitonín

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Jaroslav Jenčo

Supervisor: prof. MUDr. Jaroslav Dršata, CSc.

Consultant: Ing. Jana Netriová, PhD.

Title of diploma thesis: Determination of biochemical parameters and their diagnostic and prognostic value in sepsis

Sepsis is a relatively common complication that may be signed by the increased mortality of patients. It affects all ages, regardless of gender. Occurrence is more frequent in polymorbid and immunosuppressed patients. The most effective method to prevent the development of septic complications is quick and accurate diagnosis.

In the period from 1.6.2012 to 01.4.2014, we observed 697 patients hospitalized due to the development of septic complications and we analyzed statistically tracked markers: presepsin, procalcitonin, C - reactive protein, interleukin - 6, lactate, D – dimer, fibrinogen and quantity of leukocytes to determine their predictive and diagnostic value. Largest correlation was observed between comparison of presepsin with procalcitonin and presepsin with C - reactive protein, which reflected rapidly changing status of patients. Moderate correlation was observed in lactate, interleukin - 6, D – dimer concentration and leukocyte count. Between the development of sepsis and fibrinogen we did not find any significant correlation.

After dividing patients into groups according to the initial diagnosis, we found significant differences between the group of cancer patients and groups of patients with metabolic, cardiovascular and infectious diagnoses. In cancer patients there was statistically significant decrease in all observed parameters despite a developing sepsis.

We illustrated on the four case reports that high variability of biochemical markers in the monitoring of patient's condition requires necessary combination of analyzed parameters instead of monitoring condition with only a few markers.

Key words: Laboratory diagnosis, sepsis, biochemical markers, presepsin, procalcitonin

OBSAH

ÚVOD	- 7 -
1 ZÁPALOVÁ REAKCIA	- 9 -
1.1 Odpoveď organizmu na zápal.....	- 11 -
1.1.1 Akútna vaskulárna odpoveď	- 11 -
1.1.2 Akútna a chronická celulárna odpoveď	- 12 -
1.1.3 Reparácia a zahojenie	- 12 -
1.2 Mediátory a regulátory zápalovej reakcie	- 13 -
1.3 Zápalová reakcia a vznik septického stavu	- 16 -
2 CHARAKTERISTIKA SEPTICKÝCH STAVOV	- 18 -
2.1 Syndróm systémovej zápalovej odpovede.....	- 19 -
2.2 Ťažká sepsa.....	- 20 -
2.3 Septický šok.....	- 20 -
2.4 Syndróm multiorgánového zlyhávania.....	- 21 -
3 LABORATÓRNA DIAGNOSTIKA SEPTICKÝCH OCHORENÍ	- 22 -
4 MARKERY SEPTICKÝCH PROCESOV	- 24 -
4.1 Biochemické parametre sledovania septického stavu	- 24 -
4.1.1 Laktát	- 24 -
4.1.2 C – reaktívny proteín	- 25 -
4.1.3 Interleukín – 6.....	- 26 -
4.1.4 Prokalcitonín.....	- 27 -
4.1.5 Presepsín	- 28 -
4.2 Hematologické parametre sledovania septického stavu	- 29 -
4.2.1 Fibrinogén.....	- 29 -
4.2.2 D-diméry	- 30 -
5 CIEĽ PRÁCE	- 31 -
6 MATERIÁL A METÓDY	- 32 -
6.1 Organizácia prieskumu	- 32 -
6.2 Výberový súbor	- 32 -
6.3 Princípy stanovení	- 36 -
6.3.1 Stanovenie LAKT	- 37 -
6.3.2 Stanovenie CRP	- 37 -
6.3.3 Stanovenie IL-6.....	- 37 -
6.3.4 Stanovenie PCT	- 38 -

6.3.5 Stanovenie P-SEP	- 39 -
6.3.6 Stanovenie KO	- 39 -
6.3.7 Stanovenie D-DIM	- 40 -
6.3.8 Stanovenie FBG	- 40 -
6.3.9 Použité reagenty	- 40 -
6.3.10 Použité štatistické metódy	- 43 -
7 VÝSLEDKY	- 44 -
7.1 Porovnanie parametrov vo výberovom súbore	- 44 -
7.2 Porovnanie parametrov podľa skupín	- 52 -
7.3 Porovnanie parametrov na kazuistikách	- 55 -
8 DISKUSIA	- 59 -
9 ZÁVER.....	- 63 -
10 ZOZNAM SKRATIEK.....	- 64 -
11 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	- 67 -

ÚVOD

Približne každé tri sekundy na svete podľahne následkom septického stavu jeden človek. Už v roku 1847 zaviedol Ignaz Semmelweis antiseptické metódy na zníženie puerperálnych sepsí, no doteraz aj napriek značnému pokroku v diagnostike, stratifikácii pacientov a modernej liečebnej terapii, je úmrtnosť na septické stavy značne vysoká. Progresia do terminálnych štádií, teda septického šoku a multiorgánového zlyhávania je najčastejšou nekoronárnou príčinou úmrtia. Podľa údajov WHO zomrie ročne na následky sepsy viac ako 6 miliónov detí a viac ako 100 000 prvoroďčiek z celkového počtu 30 miliónov pacientov s diagnostikovanou generalizovanou sepsou. Sepsa je jednou z najčastejších komplikácií nielen infekčných, ale aj nádorových a kardiovaskulárnych ochorení bez ohľadu na vek či pohlavie. Najväčšia úmrtnosť je pozorovaná práve u osôb so zníženou funkciou imunitného systému, teda u geriatrických, neonatálnych a imuno-deficientných pacientov.

Pojem sepsa pochádza z gréckeho slova sepo – hniť, skaziť sa, no väčšinou sa prekladá ako otrava krvi, čo nevystihuje jej pravú patofyziologickú podstatu. Problematická je najmä včasná diagnostika septického stavu, keďže rada symptómov je totožná s celou škálou ochorení. Všeobecný pokrok v medicíne, vplyvom častejších invazívnych zákrokov, zvyšuje riziko manifestácie septických stavov.

Najúčinnejším spôsobom, ako zabrániť progresii sepsy a znížiť mortalitu, je skorá a exaktná diagnostika, ktorá sa opiera nielen o čo najpresnejšie anamnestické údaje a prediktívne systémy, ale aj o celý rad biochemických, imunologických a hematologických parametrov. Kombináciou týchto údajov je možné predpovedať prognózu a vývin ochorenia a čo najskôr nasadiť účinnú terapiu.

V snahe o čo najrýchlejšiu diagnostiku sa dnes výskum opiera o hľadanie spoľahlivých markerov, ktoré by boli dostatočne senzitívne, špecifické a korelovali by s priebehom ochorenia. Za posledné desaťročie sa podarilo nájsť hneď niekoľko parametrov, no mnohé z nich nedokázali spoľahlivo dokázať a predpovedať progresiu ochorenia. Ich dynamika a rozdielne interakcie s vyvolávateľom boli často tak oneskorené, že ku zvýšeniu ich koncentrácie dochádzalo niekedy až pri vážnych terminálnych komplikáciách a multiorgánovom zlyhávaní.

Imunitná reakcia zúčastňujúca sa zápalovej odpovede organizmu je komplexným a doposiaľ do detailov nepreskúmaným dynamickým dejom, ktorý zahrňuje veľké množstvo zložiek interagujúcich na celulárnej, ale aj na orgánovej úrovni.

Mnohé štúdie poukázali na znižujúcu sa mortalitu pacientov v prípade skorého a včasného záchytu septických stavov a nasadenia adekvátnej antibiotickej terapie. Pri posudzovaní septických komplikácií sú dôležitými ukazovateľmi okrem klasických fyzikálno – anamnestických údajov aj laboratórne testy. No doposiaľ neexistuje spoľahlivý biologický marker, ktorý by bol dostatočne objektívny a špecifický. Výhodná je však kombinácia viacerých parametrov do prediktívneho indexu.

Cieľom predkladanej práce je porovnať doposiaľ v rutinej praxi používané biochemické markery pre odhalenie septických stavov a určiť ich prediktívnu hodnotu vzhľadom k dynamike rozvoja ochorenia.

1 ZÁPALOVÁ REAKCIA

Zápal predstavuje hlavnú obrannú reakciu pri porušení integrity organizmu. Charakteristické morfológické a fyziologické črty popisujúce základné prejavy zápalovej reakcie už v 1. storočí opísal rímsky vzdelanec a encyklopedista Aulus Cornelius Celsus. V 19. storočí ich rozšíril a podrobnejšie opísal nemecký lekár Rudolf Virchow. Popisujú procesy odohrávajúce sa v organizme s cieľom lokalizovať, ohraničiť a eliminovať vyvolávateľa patologickej reakcie. Spomenutí lekári definovali príznaky, ktoré pri zápale prebiehali takto: *calor* - teplo, *dolor* – bolesť, *tumor* – opuch, *rubor* – začervenenie a *functio laesa* – strata funkcie (Scott et al., 2004).

Moderná molekulárna biológia doplnila tento základný model o ďalšie poznatky. Zápal je možné definovať z viacerých hľadísk, ktoré utvárajú komplexný pohľad na tento proces. Odzrkadľuje odpoveď organizmu, ktorá je súborom obranných viacerých stereotypných reakcií na poškodenie zapríčinené porušením celistvosti organizmu. Platí, že reakcia na poškodenie organizmu, či už vplyvom infekcie, alebo narušením prirodzených fyziologických bariér, je adekvátna rozsahu ich poškodenia. Týmto spôsobom dochádza ku kontrolovaniu a regulácii celého spektra prebiehajúcich dejov poprepájaných na molekulárnej, celulárnej, ale aj humorálnej úrovni. Komplexná reakcia zápalového procesu v sebe zahŕňa mnohé mechanizmy, ktoré dotvárajú jeho celkový obraz. Predovšetkým sa jedná o koagulačné a kinínové procesy, fibrinolytický a komplementový systém, ale aj fagocytárne a imunomodulačné deje (Buc, 2001).

Exaktná funkcia a mechanizmy sú však stále aktívnym zdrojom výskumu. Vrodená imunitná odpoveď je prvou obrannou líniou pri vstupe patogénu do hostiteľského organizmu. Po prekonaní epiteliálnych fyziologických bariér je patogén detegovaný pomocou rozoznávacích receptorov (pattern recognition receptors - PRR's). Tie dokážu identifikovať rozsiahlu skupinu potenciálne nebezpečných agens prostredníctvom rozoznania s patogénom asociovaných povrchových molekulárnych znakov (pathogen-associated molecular patterns - PAMP's) alebo s poškodením asociovaných povrchových znakov (damage-associated molecular patterns – DAMP's). Na tieto podnety reagujú tkanivové makrofágy, ktoré patogén rozpoznávajú, fagocytujú ho a súčasne dochádza k prezentovaniu antigénnej informácie T-lymfocytom (Vladimer et al., 2012 ; Puleston, Simon, 2013).

Poškodením okolitých buniek dochádza k uvoľneniu intracelulárnych mediátorov. Zároveň sa odhalujú časti povrchových štruktúr spúšťajúcich koagulačné

a kinínové procesy, ktoré umožnia iniciáciu ďalšej časti zápalového procesu. Hydrolýzou C3 komplexu dochádza k aktivácii alternatívnej cesty komplementu. Po rozpoznaní baktérií alebo patologických častíc makrofágmi v nich, ale aj v okolitých aktivovaných endoteliálnych bunkách, dochádza k aktivácii nukleárneho faktora NF- κ B. Jeho vplyvom nastáva v bunkách transkripcia génov a produkcia biochemických mediátorov a cytokínov (napr. IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α) (Lawrence, 2009).

Hlavným zápalovým mediátorom je faktor nekrotizujúci tumory TNF- α , ktorého sérová koncentrácia je zreteľne zvýšená už po neceljej polhodine. Svojou expresiou stimuluje produkciu interleukínu - 1, faktora aktivujúceho doštičky, zvyšuje účinok adhezívnych molekúl, zvyšuje produkciu bradykinínu a je zodpovedný za zvýšenie celkovej telesnej teploty (Bradley, 2008).

Cytokíny prenášajú informáciu ďalším obranným systémom, ktoré produkujú kolektíny spúšťajúce lektínovú cestu aktivácie komplementu. Cytokíny spúšťajú aj mechanizmy adaptívnej imunity a aktivujú polymorfonukleárne leukocyty (Polymorphonuclear leukocytes - PMN's) k produkcii reaktívnych kyslíkových látok (Reactive oxygen species - ROS) a obrannej reakcii. Celý tento mechanizmus je sprevádzaný zmenami v permeabilite okolitých tkanív, prestupom vody, iónov a proteínov z vaskulárneho kompartmentu (Serhan et al., 2010). Okrem štrukturálnych zmien dochádza aj k zmenám mikrocirkulácie (Megyeri et al., 2014).

Aby nedochádzalo k poškodzovaniu ostatných častí organizmu nadmerným zápalom, je celý tento proces regulovaný spätnými mechanizmami, regulačnými cytokínmi, solubilnými cytokínovými receptormi a hormónmi. Ich úlohou je tlmiť obrannú reakciu, aby popri odstraňovaní patologických vyvolávateľov nedochádzalo k poškodzovaniu okolitých tkanív a ohrozeniu homeostázy organizmu (Arnold et al., 2013). Okrem biochemických a celulárnych mechanizmov je zápal regulovaný aj cez neurologické mechanizmy pôsobiace cez cholinergné receptory na makrofágy a inhibujúce expresiu zápalových mediátorov (Huston, Tracey, 2011).

Akákoľvek dysregulácia v zmysle pro-, ale aj protizápalových procesov môže mať v konečnom štádiu fatálne následky. Preto sa súčasný výskum zameriava na pochopenie interakcií medzi oboma mechanizmami, ich farmakologickou moduláciou a eradikáciou patologického vyvolávateľa (Signore, 2013).

1.1 ODPOVEĎ ORGANIZMU NA ZÁPÁL

Zápál je možné diferencovať z viacerých hľadísk, ktoré popisujú celý komplexný proces v závislosti od základných charakteristických faktorov. Podľa časového ohraničenia je možné zápal rozdeliť na hyperakútny, akútny, subakútny a chronický. Manifestácia je ďalším faktorom, deliacim zápalovú odpoveď na alteračnú, exudačnú a proliferáčnú, pričom v závislosti od poškodenia tkaniva je možné zatriediť zápalové ložisko na superficiálne (lokalizované na povrchu), alebo hĺbkové, (ohraničené alebo generalizované). Charakteristický obraz zápalovej odpovede môže byť špecifický alebo nešpecifický. Zápal zastrešuje viacero imunopatologických mechanizmov. Môže sa jednať od zápalovej odpovede na alergénny podnet, zápalu sprostredkovaného cytotoxickými protilátkami, sprostredkovaného imunitným komplexom, až po oneskorenú hypersenzitívnu reakciu.

Hlavným účelom zápalového procesu popri lokalizácii, zneškodnení a sprístupnení poškodeného miesta imunitnými mechanizmami, je proces zahojenia. Mechanizmy lokalizované na mieste porušenia fyziologických bariér by neboli schopné dostatočne adekvátnej reakcie na iniciátorov zápalu a zahájenia reparačných procesov. Celá rada mediátorov pochádzajúcich z cievného lumenu, či už buniek alebo proteínov, nemôže difundovať do okolia zápalového ložiska kvôli ich veľkosti samovoľne. Organizmus si preto vytvoril systém reakcií, ktoré umožňujú zvýšenú permeabilitu a prechod reaktívnych zložiek do extravaskulárneho priestoru v okolí poškodenia.

Skladá sa z 3 etáp, ktoré na seba nadväzujú. Jedná sa o akútnu cievnú odpoveď, akútnu bunkovú odpoveď a chronickú bunkovú odpoveď. Konečným vyústením je nakoniec reparácia a zahojenie (Serhan et al., 2010).

1.1.1 Akútna vaskulárna odpoveď

Akútna vaskulárna odpoveď nastáva ihneď po poškodení epiteliálnych fyziologických bariér a trvá nanajvýš niekoľko minút. Dochádza pri nej k vyplaveniu signalizačných reaktantov, chemokínov a k stimulácii nervovo - svalových zakončení. Vyplavia sa intracelulárne, najmä vápenaté ióny, ktoré sa viažu na kalmodulín. Ten aktivuje sťah aktínových a myozínových vlákien (Landry, Oliver, 2001).

Podráždením svalových vlákien v cievnej stene a okolitom priestore nastane vazokonstrikcia, ktorú po niekoľkých sekundách vystrieda vazodilatácia.

Alterácie v cievnom lumene zvýšia permeabilitu a umožnia väčší prietok krvi, dôsledkom čoho dochádza k charakteristickému erytému a edému okolitého tkaniva (Granger, Senchenkova, 2010). Vo fáze vazodilatácie dochádza v mieste poškodenia k teplotným extremítam, v dôsledku zníženého prietokového odporu a k mierne zvýšenej srdcovej činnosti. K prestupu tekutín prispieva aj zvýšený prechod albumínu do miesta zápalu až o 20% za hodinu (Worthley, 2000).

1.1.2 Akútna a chronická celulárna odpoveď

Ak došlo k iniciácii zápalových procesov, pomocou signalizačných dráh dochádza k mobilizácii, vyplaveniu a prestupu polymorfonukleárných leukocytov do ložiska. Jedná sa o akútnu bunkovú odpoveď. Iniciujú sa koagulačné procesy s cieľom obnovenia povrchových štruktúr a zamedzenia krvných strát.

Dôležitú úlohu zohrávajú aj samotné bunky okolitého tkaniva, narušením ktorých dochádza pôsobením fosfolipáz k produkcii prostanoïdov. Tie moderujú zápalovú odpoveď a ich biologické účinky dotvárajú obraz prebiehajúceho zápalu. Dochádza k prestupu mononukleárných lymfocytov, čisteniu ložiska a remodelácii poškodeného tkaniva (Tedgui, 2011).

K relevantnému poškodeniu sa neskôr pridruží aj chronická bunková odpoveď. Na ňu vplýva celé množstvo faktorov a prispieva ku komplikáciám mnohých ochorení (Akbaraly et al., 2013).

1.1.3 Reparácia a zahojenie

Po eliminácii vyvolávateľa zápalovej reakcie si organizmus vytvoril niekoľko reparačných metód závislých od rozsahu poškodeného tkaniva. Fibrinolytické reakcie odstránia koagulum. Pokiaľ nie je možné znovu obnoviť tkanivá do pôvodného stavu, vzniká zjazvenie. V prípade, že sa zápalovým mechanizmom nepodarilo odstrániť patogén, mononukleárne lymfocyty ho spolu s ostatnými tkanivovými bunkami obklopa a vytvoria granulomatózne tkanivo.

Z histologického hľadiska je možné konečnú fázu definovať ako interval od maximálnej infiltrácie tkaniva neutrofilmi až po stav, kedy v pôvodne infikovanom tkanive nie sú prítomné žiadne neutrofily (Serhan et al., 2007).

1.2 MEDIÁTORY A REGULÁTORY ZÁPALOVEJ REAKCIE

Každá zložka, ktorá sa zúčastňuje na procese zápalovej odpovede tým, že pôsobí na cievy, bunky okolitého tkaniva, do zápalu zainteresovaných buniek alebo ostatných buniek organizmu, je zaraďovaná medzi mediátory zápalovej reakcie. Tie môžu byť biologického charakteru, teda samotné bunky zápalovej reakcie ako lymfocyty, bunky okolitého tkaniva, krvné doštičky, fibroblasty, ale aj patologické baktérie.

K biochemickým mediátorom sa zaraďujú látky exogénneho a endogénneho pôvodu. Patria medzi ne toxíny produkované baktériami a látky produkované bunkami s cieľom modulácie zápalu (Huston, Tracey, 2011).

Tab. 1 Prehľad mediátorov zápalových procesov

		MEDIÁTORY		ZROJ
ODPOVEĎ	Lokálna (bunková)	Secernované v granulách	Histamín	Mastocyty, bazofily, trombocyty
			Serotonín	Trombocyty
			Lyzozomálne enzýmy	Neutrofilny, makrofágy
		Syntetizované	Prostaglandíny	Leukocyty, trombocyty, EC
			Leukotriény	Všetky leukocyty
			PAF	Všetky leukocyty, EC
			ROS	Všetky leukocyty
			Cytokíny	Lymfocyty, makrofágy, EC
		Z poškodenia tkaniva	Ióny Ca, K, Na	Všetky poškodené bunky
			ROS/ONOO ⁻	
			Lyzozomálne enzýmy	
			Fosfolipidy, kyselina arachidonová	
			Alarmíny	
	Orgánová (v plazme)	Aktivátory koagulácie	Koagulačné faktory	Pečeň
		Aktivátory komplementu	C3a, C5a, C3b, C5b, C5b-9	
Kinínogénne aktivátory		Aktivovaný faktor XII		

Legenda: EC – epiteliálne bunky, PAF – doštičky aktivujúci faktor, ROS – reaktívne kyslíkové látky, ONOO⁻ - peroxynitrit

Okrem toho, že plnia dôležitú komunikačnú úlohu v prenose a sprostredkovaní signálu medzi jednotlivými systémami navzájom, sú aj regulátormi zápalového procesu. Ich pro- , ale aj protizápalové účinky závisia od rozsahu zápalu, ktorý ich vyvolal a od ich koncentrácie v mieste účinku (Tanimura et al., 2013). Regulujú buď sami seba prostredníctvom zníženia syntézy cez spätné mechanizmy, alebo dochádza k regulácii medzi jednotlivými zložkami navzájom (Lucas, 2013). Neurologickou reguláciou cez acetylcholinové receptory dostávajú zasiahnuté bunky cez nervus vagus podnety na zvýšenú či zníženú expresiu jednotlivých zložiek. Dôležitú úlohu v regulácii zohrávajú aj glukokortikoidy, ktorých kulminácia pomocou hypotalamo – hypofýzo - adrenálnej osi tlmí zápal a neutralizujúci cytokínových receptorov, ktoré vycytávajú aktívne cytokíny (Huston, Tracey, 2011).

Existuje však niekoľko v krvnom obehu prirodzene sa vyskytujúcich protizápalových faktorov. Sú označované ako protizápalový systém odpovede (Counter inflammatory response system - CARS). Patrí medzi ne IL – 4, IL - 10 a IL – 12, ktoré majú silný tlmiaci účinok na zápalový proces. Stabilizujú I κ B α , ktorý priamo blokuje aktiváciu NF- κ B. Výsledkom je zastavenie tvorby prozápalových mediátorov a znížený počet PMN buniek v mieste zápalového ložiska. Regulácie sa zúčastňujú aj inhibítory serínových proteáz, ktoré sa uvoľňujú z fagocytujúcich buniek. Sekretovaný leukocytárny proteázový inhibítor stabilizuje I κ B β , v dôsledku čoho nedochádza k jeho hydrolýze a aktivácii transkripčného faktora NF- κ B. Mechanizmy antioxidantných enzýmov ako superoxid-dismutáza, kataláza a glutathion peroxidáza sú v priebehu zápalovej odpovede silne deregulované, čím vzniká tzv. redoxný stres ničiaci patogénne baktérie. Expresiu signálnych receptorov ovplyvňujú fosfatázy odštiepením fosfátových štruktúr, čím dochádza k ich terminácii. Niekoľko transkripčných faktorov ako SOCS3 (suppressor of cytokine signaling - SOCS3) a STAT3 regulujú aktiváciu prozápalových génov (Serhan et al., 2010). Tým sa zaistí, že do obrannej reakcie organizmu sa zapojí potrebné množstvo látok, ktorých aktivita vyústi v eradikáciu spúšťača. Všetky tieto mechanizmy však kvôli mnohým interakciám nie sú doposiaľ dostatočne objasnené (Pei et al., 2013).

Aj medzi vrodenu a adaptívnu imunitu sú regulačné interakcie zasahujúce do diferenciácie, aktivácie a alterácie ich funkcií (Serhan et al., 2010). Signálne molekuly nesúce informáciu o mobilizácii, sa pomocou chemoatraktantov uvoľnených z makrofágov a poškodeného epitelu, prenášajú na membránové receptory imunokompetentných buniek. Po ich prestupe na miesto signálu sa zapájajú

do komunikačnej kaskády. Začnú tvoriť interleukíny, ktorých koncentrácia závisí od závažnosti podnetu. Zvyšujú hematopoézu, kde nastáva posun v smere tvorby bielej krvnej rady. Indukujú tvorbu proteínov akútnej fázy v hepatálnych bunkách. Ich prejav je možné pozorovať v zmenách fyziológie organizmu, zvýšenou teplotou, alteráciami v kardiovaskulárnom systéme a zvýšenej metabolickej aktivite (Vandevyver et al., 2014).

Skupina B lymfocytov zohráva kľúčovú úlohu v produkcii komplementárnych protilátok typu imunoglobulínov. Majú kľúčovú úlohu aj v humorálnej imunite. Po antigénnom podnete cez B bunkový receptor (B – cell receptor - BCR) produkujú látky na zneškodnenie patologickej noxy. Ich účinok je zameraný prevažne na extracelulárne mikroorganizmy.

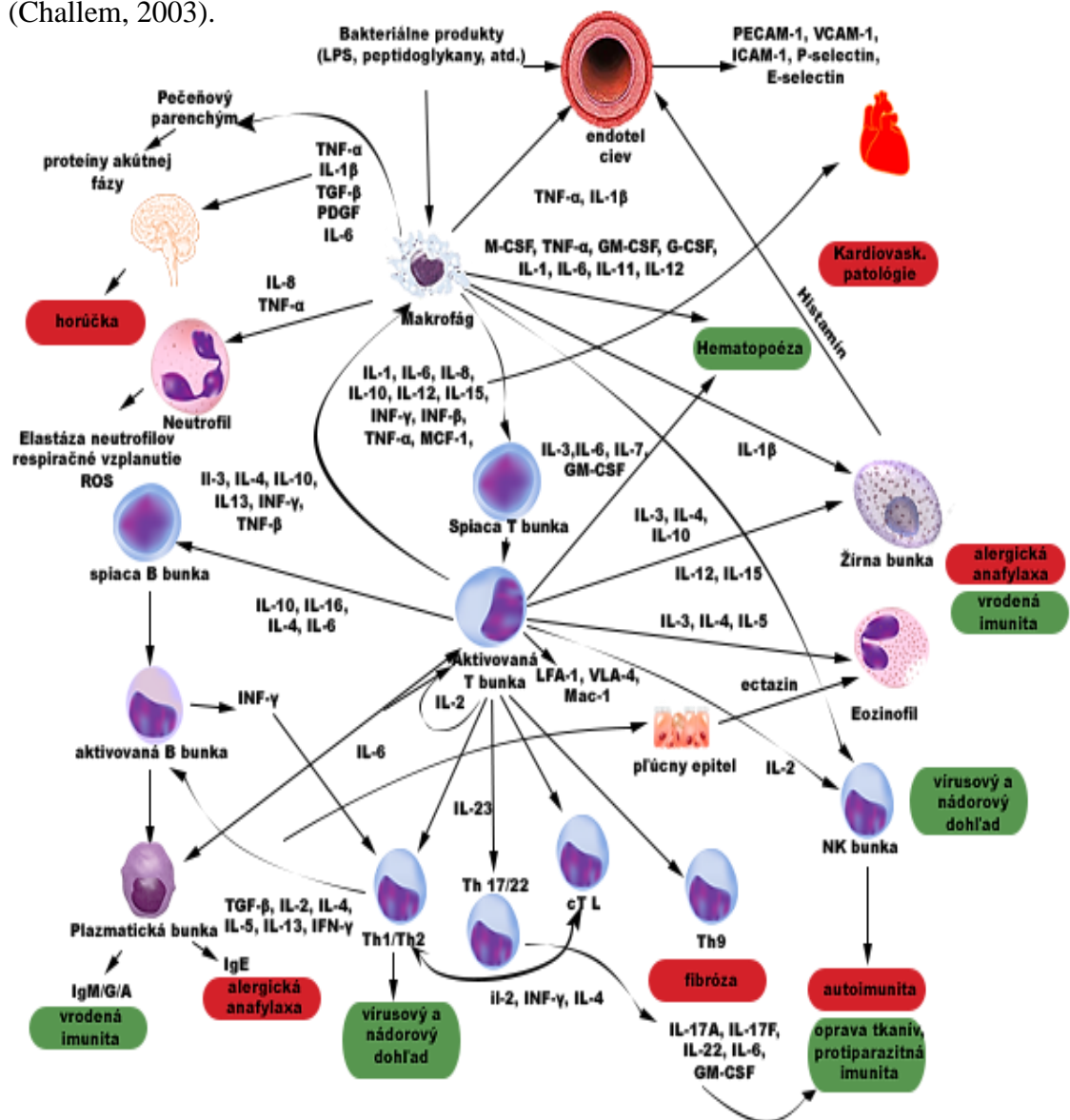
Skupina T lymfocytov zastupuje bunkami sprostredkovanú imunitnú odpoveď. Poskytujú ochranu prevažne proti intracelulárnym mikróboom, čím dopĺňajú účinok B lymfocytov v humorálnej imunite.

T lymfocyty sa rozdeľujú do niekoľkých tried podľa ich funkcie. Th (pomocné „helper“) lymfocyty asistujú makrofágom a B bunkám v zápalovom procese. Ich účinok je namierený hlavne proti vírusovým infekciám. Tc (cytotoxické) ničia infikované bunky alebo u poškodených buniek spúšťajú apoptózu. Ich aktiváciu môžu navodiť aj Th lymfocyty. T bunkový receptor (T – cell receptor - TCR) je omnoho komplexnejší než BCR a samostatne nedokáže naviazať natívny antigén. Viaže sa na komplexy tvorené MHC3 (major histocompatibility complex - 3) molekulou a peptidom odvodeným z antigénu produkovaným antigén prezentujúcimi bunkami (antigen presenting cell - APC).

Makrofágy prezentujú antigén po fagocytóze noxy, zatiaľ čo B lymfocyty po aktivácii receptorov. Aktivované Th lymfocyty sú stimulované k produkcii cytokínov zvyšujúcich proliferáciu a diferenciáciu B lymfocytov. B lymfocyty sa môžu diferencovať na plazmatickú bunku sekretujúcu protilátky, alebo na pamäťové B lymfocyty zabezpečujúce efektívnejšiu odpoveď pri opakovanom kontakte s infekčným agens. Th lymfocyty po rozpoznaní podnetu od makrofágov, tvoreného komplexom antigénneho peptidu a MHC typu II., uvoľňujú cytokíny napomáhajúce zničeniu fagocytovaných mikroorganizmov. Tým sa celý informačný okruh uzatvára (Fachada et al., 2013).

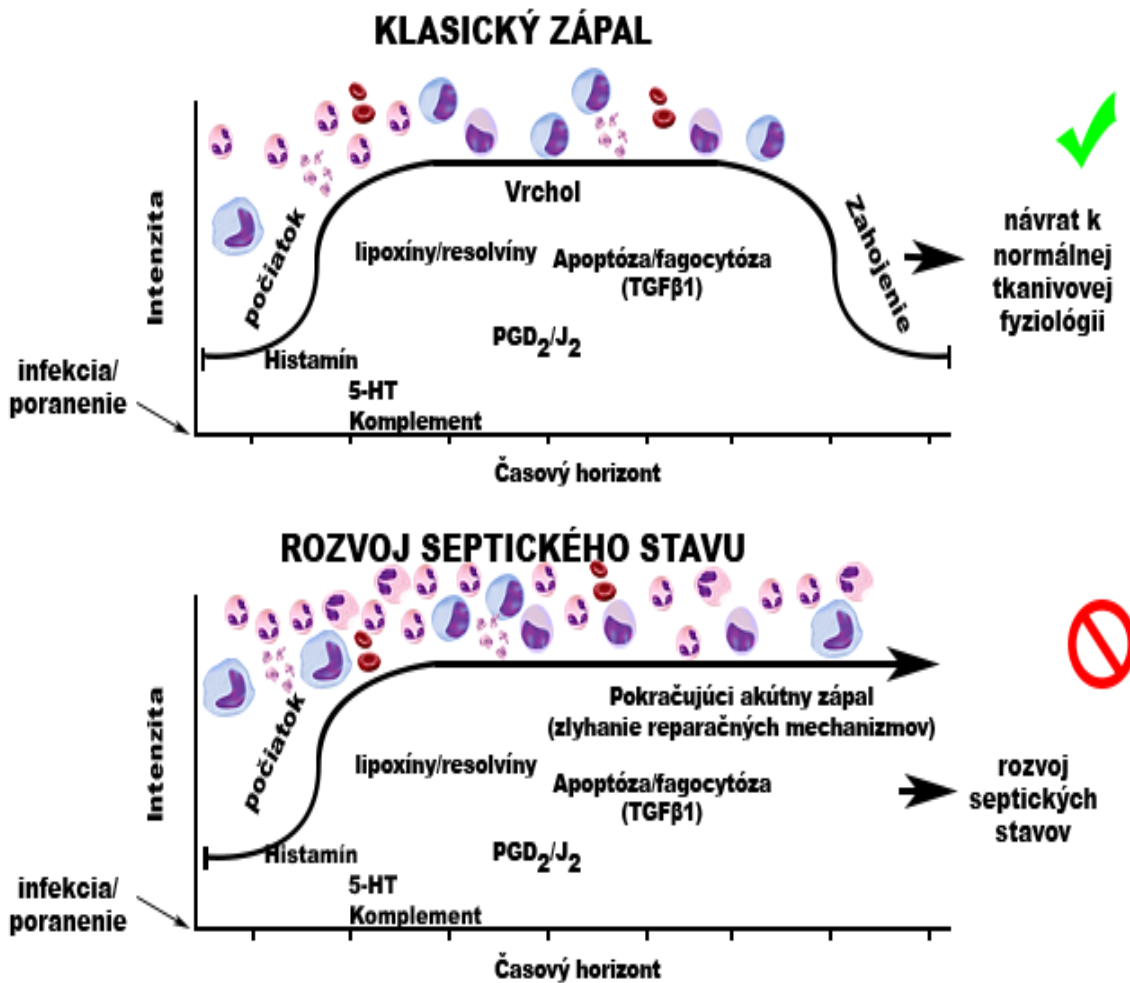
1.3 ZÁPALOVÁ REAKCIA A VZNIK SEPTICKÉHO STAVU

Systémový zápal vzniká dôsledkom aktivácie primárneho imunitného systému s charakteristickou prítomnosťou prozápalových cytokínov a ostatných vazoaktívnych mediátorov v cievnom obehu rovnako ako pri klasickej zápalovej reakcii. Práve prebytok pro- alebo protizápalových mediátorov spôsobí, že dôjde k obehovému kolapsu a panendoteliálnemu poškodeniu so zvýšenou mikrovaskulárnou priepustnosťou. Náchylnosť pacientov na dôsledky septického zápalu sú do značnej miery určené genetickými faktormi (Takala et al., 2004). Vývoj možných komplikácií je ovplyvnený aj nutričnou nevyváženosťou a stresovým zaťažením organizmu (Challem, 2003).



Obr. 1. Komunikácia pomocou mediátorov pri zápale – modifikované podľa (www.lifetechnologies.com)

Strata kontroly nad systémom zápalového mechanizmu vyústi v záplavu prozápalových cytokínov tzv. „cytokínovú búrku“ na čo reaguje vaskulatúra drastickým vzostupom manifestácie adhézných molekúl pre leukocyty.



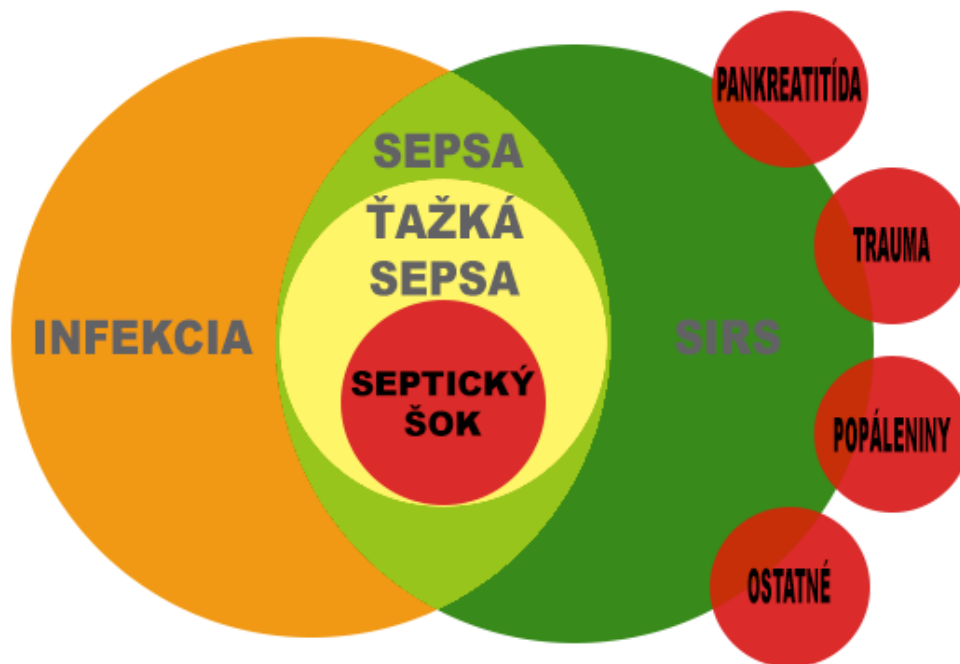
Obr. 2. Porovnanie priebehu zápalového procesu s priebehom rozvoja septického stavu – modifikované podľa (Serhan et al., 2007)

Tkanivové makrofágy začnú nadmernú produkciu a uvoľňovanie enzýmových granúl a voľných radikálov do krvného obehu. Granuly sa vyplavujú nielen z aktivovaných buniek, ale k uvoľňovaniu dochádza aj v apoptických bunkách, bunkách ovplyvnených hypoxiou, ischemiou a acidózou. Na to reagujú PMN zvýšenou expresiou CD11b/CD18, čo indikuje ich aktiváciu. Zvýši sa celkový počet bielych krviniek, ktoré sú hyperaktívne a poškadzujú okolité tkanivá a orgány. Nadmerne sa aktivuje komplementárny systém a vzniká konzumpčná koagulopatia. Prečo dochádza k celkovému systémovému rozvratu nie je doposiaľ známe (Muller, 2003; Frangogiannis et al., 2002).

2 CHARAKTERISTIKA SEPTICKÝCH STAVOV

Septické stavy sú spôsobené neadekvátnou až patologickou odpoveďou organizmu na podnet, ktorý odštartoval zápalové procesy. S novým náhľadom na biochemické a imunologické deje prebiehajúce počas vývoja septických ochorení bolo kvôli rôznorodosti mechanizmov vzniku problematické zadefinovať a terminologicky spresniť hranice septických stavov. V roku 1989 sa zaviedol pojem „septický syndróm“, ktorý doplnil pojem sepsa, charakterizujúci len generalizovanú bakteriálnu infekciu. V súčasnosti, kvôli širokej škále symptómov a vyvolávateľov, sa používa pojem septický syndróm eventuálne septický stav (Sagy et al., 2013). Nemusí sa jednať len o generalizovanú bakteriálnu, vírusovú či fungálnu infekciu ale promótorom môže byť napríklad aj akútna pankreatitída, polytraumatické stavy, popáleniny a mnoho autoimunitných ochorení (Vincent, 2009).

Na konferencii Americkej spoločnosti hrudných fyziológov a spoločnosti pre intenzívnu medicínu boli v roku 1991 načrtnuté základné definície pre viacero stavov stratifikujúcich septické ochorenia na syndróm systémovej zápalovej odpovede (systemic inflammatory response syndrome - SIRS), sepsa, ťažká sepsa, septický šok prechádzajúci do syndrómu mnohonásobnej orgánovej dysfunkcie (multiple organ dysfunction syndrome - MODS), ktoré navzájom pri nesprávnej kompenzácii nadväzujú (Picard et al., 2006).



Obr. 3. Vzťah medzi infekciou, SIRS, sepsou, ťažkou sepsou a septickým šokom - modifikované podľa (Bone et al., 1992)

V roku 2001 došlo k zrevidovaniu definícií a do stratifikácie septických stavov boli pridané aj viaceré laboratórne a klinické kritériá. Cieľom bolo zlepšiť metodológiu a presnosť začlenenia diagnóz (Gaieski, Goyar, 2013). Tie by sa mali posudzovať na základe štyroch kľúčových faktorov: predispozícia, infekcia, odpoveď hostiteľa a orgánová dysfunkcia, z ktorých bol vytvorený tzv. P.I.R.O systém (predisposition, infection, response and organ failure) (Sagy et al., 2013).

V súčasnosti sa posudzujú septické stavy ako multidisciplinárny fenomén, zložený z troch patofyziologických procesov, ktoré sú monitorované. Ide o prozápalovú odpoveď, zlyhanie protizápalovej odpovede a imunoparalýzu.

2.1 SYNDRÓM SYSTÉMOVEJ ZÁPALOVEJ ODPOVEDE

O syndróm systémovej zápalovej odpovede (SIRS) sa jedná v prípade, ak je splnený aspoň jeden zo štyroch nasledujúcich kritérií:

1. febrília nad 38°C, alebo hypotermia pod 36°C,
2. srdcová frekvencia presahujúca viac ako 90 úderov/min.,
3. dychová frekvencia viac ako 20 dychov/min. alebo hyperventilácia s parciálnym tlakom CO₂ nižším ako 32mgHg,
4. počet bielych krviniek vyšší ako 12000/mm³, nižší ako 4000/mm³, alebo vzostup nezrelých neutrofilov o viac ako 10%.

Všetky uvedené kritériá treba zohľadniť s celkovým stavom pacienta, s možnou doplnkovou terapiou a vekom pacienta. U novorodencov, dojčiat, seniorov a pacientov s terapiou, ktorá môže interferovať s príznakmi, je možné tieto hodnoty modifikovať. SIRS je v porovnaní s klasickou fázou zápalu omnoho intenzívnejší. Pri neadekvátnej kompenzácii má potenciálne deštruktívne pôsobenie na organizmus a môže mať až fatálne následky (Paterson, Webster, 2000). V prípade, ak je potvrdený bakteriálny iniciátor infekčného pôvodu z hemokultúry, spúta, alebo za fyziologických podmienok sterilných telových tekutín a sú splnené kritéria pre SIRS, je možné nazývať tento proces **sepsou**, resp. **septickým stavom**.

2.2 ŤAŽKÁ SEPSA

O *ťažkú sepsu* sa jedná pri prejavoch sepsy spolu s abnormalitami orgánovej hypoperfúzie, alebo septickým stavom vyvolanou hypotenziou či orgánovou dysfunkciou. Objavujú sa aj škvrnité oblasti na koži (Reinhart, Eyrich, 2012). Ďalšie znaky indikujúce, že sa jedná o ťažkú sepsu sú:

1. plnenie kapilár ≥ 3 s,
2. výdaj moča nižší ako 0,5ml/kg za hodinu alebo náhradná renálna terapia,
3. laktát > 2 mmol/l,
4. zmeny v mentálnom stave,
5. diseminovaná intravaskulárna koagulopatia alebo počet krvných doštičiek nižší ako 100 000/ml,
6. akútne poškodenie pľúc / syndróm akútnej respiračnej tiesne (ARDS),
7. kardiálna dysfunkcia (echokardiografia).

2.3 SEPTICKÝ ŠOK

Septický šok je manifestovaný ako ťažká sepsa, pričom hypotenzia vyvolaná septickým stavom aj napriek adekvátnym doplnkom tekutín pretrváva. Obvykle je vyvolávatelom septického šoku exogénny spúšťač ako exotoxín, endotoxín, aktivácia superantigénom, ktoré vedú k prudkému vzostupu zápalových mediátorov (Worthley, 2000). Doplnujúce kritériá sú:

1. priemerný arteriálny tlak < 60 mmHg (80mmHg ak predchádzala hypertenzia) po glukózovej infúzii v dávke 20 – 30 ml/kg alebo infúzii fyziologického roztoku s dávkovaním 40 – 60 ml/kg , alebo ak je stredný tlak v pulmonárnych kapilárach v rozmedzí 12 – 20 mmHg,
2. potreba podávania dopamínu v množstve 5 mg/kg/min., noradrenalínu alebo adrenalínu na udržanie priemerného arteriálneho tlaku nad 60 mmHg (80 mmHg pri predchádzajúcej hypertenzii).

V iniciácii septického šoku sa vyskytuje aj hyperdynamická fáza označovaná ako „tepelný šok“ , charakterizovaná ohraničeným pulzom a pocitom teplých rúk, aj napriek hypotenzii nasledovanej tzv. „chladovým šokom“ so slabou perfúziou periférií, nitkovitým pulzom, chladovým extrémítám. Tie napokon vedú k exitu pacientov (Hunter, Doddi, 2010).

2.4 SYNDRÓM MULTIORGÁNOVÉHO ZLYHÁVANIA

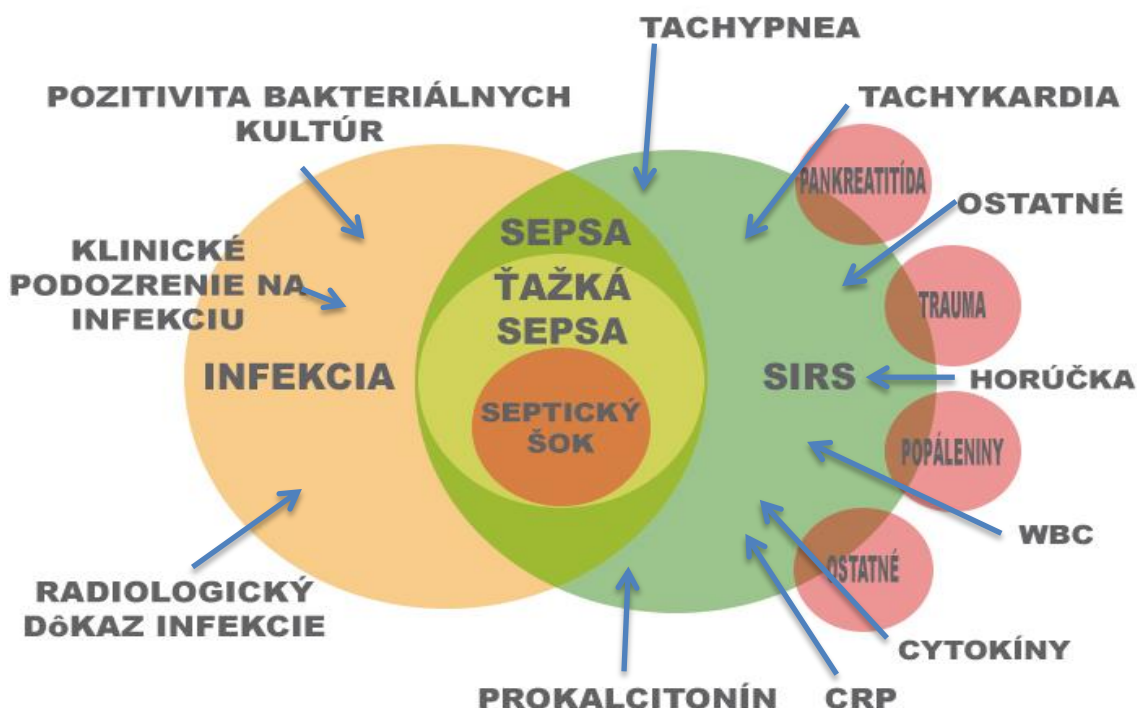
Syndróm multiorgánovej dysfunkcie sa môže vyvinúť pri nepriaznivom priebehu septických stavov. Najčastejšie sa dysfunkcia prejaví na obličkách, srdci, pečeni, pľúcach, mozgu a srdci. MODS je prítomný, ak sa prejavia nasledujúce príznaky:

1. akútna encefalopatia, nervozita, znížená pozornosť, dezorientácia alebo delírium nezapríčené podaním psychotropných látok,
2. dysfunkcia hematopoézy: počet krvných doštičiek $\leq 100\text{g/l}$ alebo pokles o $> 30\%$ za 24 hodín, ktorý nebol spôsobený krvácaním,
3. respiračná dysfunkcia: $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 250 \text{ mmHg}$ nespôsobený prítomnosťou pľúcnej, či srdcovej choroby, alebo $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200 \text{ mmHg}$ v prípade pneumónie,
4. kardiovaskulárna dysfunkcia: pokles systolického tlaku krvi $\leq 90 \text{ mmHg}$ v priebehu 1 hodiny u vopred normotonického pacienta, alebo trvalý pokles o $\geq 40 \text{ mmHg}$ v porovnaní s tlakom krvi za neprítomnosti ostatných príčin šoku,
5. renálna dysfunkcia: výdaj moču $\leq 0.5 \text{ ml/kg/h}$ v priebehu jednej hodiny aj napriek adekvátnej kompenzácii tekutín a/alebo zvýšenie hladiny sérového kreatinínu na ≥ 2 násobku horného limitu referenčných hodnôt (pri predchádzajúcej poruche funkcie obličiek môže byť splnené aj len jedno kritérium),
6. metabolická acidóza: $\text{pH} \leq 7.30$, alebo základný deficit $\geq 5.0 \text{ mmol/l}$, alebo plazmatická koncentrácia laktátu ≥ 1.5 násobku horného limitu referenčných hodnôt (Engel et al., 2007).

Pacienti hospitalizovaní na ktorýkoľvek zo septických stavov majú o 75% dlhšiu hospitalizáciu v porovnaní s ostatnými pacientmi. Ich mortalita je až osemnásobne vyššia a náklady na starostlivosť môžu byť až trojnásobné v porovnaní s ostatnými diagnózami (Hall et al., 2011).

3 LABORATÓRNA DIAGNOSTIKA SEPTICKÝCH OCHORENÍ

Moderná medicína založená na dôkazoch zaznamenala veľký pokrok. Mnohé prelomové metódy napomáhajú určeníu exaktnej diagnózy. Aj napriek výhodám, včasnému podávaniu vhodných antibiotík na správnu diagnózu, je včasné rozpoznanie septických stavov a dynamiky ich rozvoja naďalej veľkou výzvou pre klinických pracovníkov (Gibot et al., 2012). Pragmatický prístup v laboratórnej diagnostike septických stavov sa väčšinou zameriava na dokázanie infekčného ložiska zobrazovacími metódami a nasadenie antibiotickej terapie. V rozvoji sepsy hrá kľúčovú úlohu včasná eradikácia patologického vyvolávateľa z postihnutého jedinca. Každý mikroorganizmus iniciuje rozdielny priebeh sepsy, pričom ich patogenita a toxicita modelujú reakciu organizmu a ovplyvňujú jej konečný obraz. Príznaky sú však totožné, či už sa jedná o gram - pozitívneho alebo gram - negatívneho patogéna (Cohen, 2008). Rôzne klinické príznaky sprevádzajúce systémový zápal (zmeny telesnej teploty, tachykardia, leukocytóza, tachypnoe) sú síce pomerne senzitívne ukazovatele, avšak ich využitie je kvôli ich nízkej špecificite a limitáciám v interpretácii značne problematické (Kofod et al., 2007).



Obr. 4. Laboratórna diagnostika septických stavov – modifikované podľa (Vincent, 2009)

Neprítomnosť patogénov v hemokultúre v skorom štádiu rozvoja sepsy nemusí nutne znamenať, že sa v organizme nevyskytujú (Wiesinger-Mayr et al., 2007).

V bežnej diagnostike septických stavov sa dnes používajú 2 skórovacie systémy: APACHE II (acute physiology and chronic health evaluation) a SOFA (sequential organ failure assessment). APACHE skórovací systém sa vypočítava z: veku, rektálnej teploty, strednej hodnoty arteriálneho tlaku, arteriálneho pH, srdcovej frekvencie, respiračnej frekvencie, sérovej koncentrácie sodíka a draslíka, hladiny kreatinínu, hematokritu, počtu bielych krviniek a posudzuje sa aj stav vedomia podľa Glasgowskej komatickej škály.

SOFA skórovací systém sa skladá z vyšetrenia: parciálneho tlaku kyslíka na posúdenie respiračnej funkcie, Glasgowskej komatickej škály na posúdenie vedomia, strednej hodnoty arteriálneho tlaku na posúdenie kardiovaskulárneho systému. Hladiny bilirubínu na posúdenie funkcie pečene, počtu krvných doštičiek na posúdenie koagulačných procesov a hladiny kreatinínu na posúdenie funkcie obličiek (Vincent, Nuffelen, 2007).

Odpoveď organizmu na infekciu je rozdielna medzi pacientmi navzájom a mení sa aj v čase. Navyše, všetky znaky vykazujú značné oneskorenie oproti momentálnemu stavu pacienta, preto je odhad prognózy značne skreslený (Vincent, Abraham, 2006). Klinická podobnosť v symptomatológii medzi infekciou vyvolávaným a neinfekčným systematickým zápalom je spôsobená spoločnými molekulárnymi dráhami. Dochádza k aktivácii rovnakých signálnych dráh a receptorov rozoznávajúcich znaky (Lucas, 2013). V kontexte s celkovým stavom pacienta v závislosti od dynamiky rozvoja septického stavu sú preto v monitorovaní značné nedostatky.

Mnoho štúdií si kladlo za úlohu vyčleniť potenciálne biomarkery napomáhajúce určenie prognózy. Do rutinej praxe sa dnes ako štandardné metódy zaviedlo len stanovenie C - reaktívneho proteínu (CRP) a prokalcitonínu (PCT). Ani ich prediktívna hodnota však kvôli neskorej korelácii s priebehom ochorenia a množstvu iných faktorov ovplyvňujúcich koncentráciu nie je natoľko špecifická, aby dokázala diferencovať medzi sepsou a inými zápalovými procesmi (Pierrakos, Vincent, 2010). Viac špecifická je analýza efektorov a modulátorov zápalového procesu – cytokínov (Bozza et al., 2007). Tie dokážu monitorovať priebeh, no ich analýza je časovo i ekonomicky náročná a ich sérová hladina ani u zdravých subjektov nie je stála. Veľké množstvo a nejednotnosť stanovovaných biomarkerov je daná práve kvôli rozmanitosti patofyziologických procesov prebiehajúcich počas vývoja septického stavu (Pierrakos, Vincent, 2010).

4 MARKERY SEPTICKÝCH PROCESOV

Aj napriek jasným definíciám septických stavov je problematické zatriediť pacientov bez znalostí dynamiky vývoja. S neustálym pokrokom v chápaní interakcií v patofyziológii septických stavov a identifikácii mnohých nádejných septických markerov sa klinickí a experimentálni pracovníci zameriavajú na expandovanie zoznamu symptómov, ktoré by odrážali klinickú odpoveď organizmu na infekciu. Nanešťastie žiaden marker nemá 100% špecificitu, preto je vhodné pri určení diagnózy vychádzať z kombinácie príznakov a dostupných markerov (Gibot et al., 2012). Hladiny cytokínov, ako hlavných mediátorov, odrážajú odpoveď organizmu na zápal. Niektoré korelujú so stavom pacientov, no v súvislosti so septickými stavmi ich koncentrácia nie je natoľko stála a vyvíja sa s časovým priebehom ochorenia.

S priebehom septických stavov koreluje napr. interleukín – 6 (IL-6), ale jeho hladina sa zvyšuje aj pri iných stavoch s nezápalovou príčinou.

Aj iné zápalové markery si našli využitie v bežnej praxi pri diagnostike septických stavov. C – reaktívny proteín sa v dnešnej dobe využíva pomerne často ako užitočný indikátor prítomnosti sepsy. Ďalším užitočným indikátorom je prokalcitonín, ktorého najlepšie využitie je na odhad závažnosti infekcie. Hladiny prokalcitonínu sa rutinne používajú na monitorovanie terapie rôznych infekčných ochorení. Spoľahlivo dokáže rozlíšiť SIRS od sepsy. Najnovším prognostickým parametrom je presepsín, ktorý je rýchlym a spoľahlivým ukazovateľom a najpresnejšie koreluje s postupom ochorenia (Cavaillon, Adrie, 2009).

4.1 BIOCHEMICKÉ PARAMETRE SLEDOVANIA SEPTICKÉHO STAVU

4.1.1 Laktát

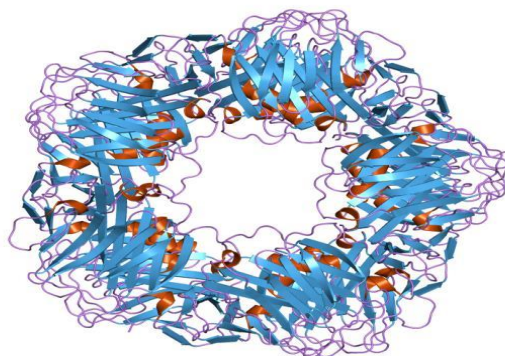
Laktát bol izolovaný z kravského mlieka v 18. storočí a až v roku 1918 bol dokázaný aj u človeka. Za fyziologických podmienok pri adekvátnej oxygenácii sa vyskytuje v nízkych koncentráciách.

Koncentrácia sérového laktátu (LAKT) sa používa v rutinnej praxi na posúdenie závažnosti septických stavov, ich stratifikáciu a na terapeutický monitoring. Prítomnosť zvýšených hladín laktátu je asociovaná so zvýšenou mortalitou u kriticky chorých septických pacientov (Rocha et al., 2013). K jeho vzostupu dochádza následkom anaeróbného metabolizmu v súvislosti s hypoperfúznymi zmenami

v poškodených tkanivách, kedy sa pyruvát metabolizuje na laktát. Je vhodné zvažovať jeho koncentráciu v závislosti na energetickej bilancii bunkového metabolizmu. Sérová koncentrácia laktátu nie je rovnomerná v dôsledku rozdielnej distribúcie medzi tkanivami. V rôznych tkanivách sa tieto zmeny prejavujú rozdielne. Produkcia laktátu je najvyššia najmä v kostrovom svalstve, mozgu, erytrocytoch a obličkách. Pretrvávajúce zvýšenie koncentrácie patrí medzi negatívne prognostické faktory u pacientov so závažnejšími septickými stavmi. Hodnoty laktátu zvyšuje jeho znížené odbúravanie a spracovávanie v pečeni. Vzostup hodnôt sa prejaví aj u pacientov s traumou, krvnou stratou a hypovolémiou a pri pacientoch so septickými stavmi. U zdravých subjektov dochádza k veľmi rýchlemu odbúravaniu laktátu až 320 mmol/l/h metabolizovaním v pečeni, ale aj spätnou premenou na pyruvát. Hladina laktátu je užitočným diagnostickým, prognostickým a monitorovacím nástrojom. Indikuje hypoperfúziu vyvolanú sepsou, je vodítkom pri nasadzovaní cielej terapie. Jeho zmeny sa prejavia ešte skôr než dochádza k zmenám v tlaku a hemodynamike (Blomkalns, 2007).

4.1.2 C – reaktívny proteín

C – reaktívny proteín (CRP) je členom pentraxínovej rady proteínov, sérových opsonínov viažúcich sa na poškodené membrány a nukleárne autoprotílátky. Je proteínom akútnej fázy zápalu, ktorého syntéza je kódovaná génom na prvom chromozóme.



Obr. 5. Štruktúra CRP – prevzaté z (Thompson et al., 1999)

Má schopnosť rozoznať patogény a aktivovať ich elimináciu zapojením komplementárneho systému a fagocytujúcich buniek. Je dôležitým faktorom

vo vrodenej imunitnej odpovedi. Jeho biologická úloha v organizme je komplexná. Nie je len biomarkerom, ale aj mediátorom patofyziologických procesov. Jeho protizápalové vlastnosti sú v dôsledku interakcie s monocytmi, ktoré po stimule produkujú IL – 1ra, IL – 10, INF - γ a $\alpha 2$ - makroglobulínových antagonistov. Vysoká koncentrácia CRP zmierňuje u neutrofilov ich chemotaktickú odpoveď (Janciauskiene et al., 2011).

Meranie sérovej koncentrácie CRP je používané ako podporný dôkaz diagnózy bakteriálnych infekcií (Zima, 2009). Je nešpecifickým zápalovým markerom. Jeho produkcia v hepatálnych bunkách je iniciovaná hlavne ako odpoveď na IL-6 v priebehu zápalu alebo traumy. Má schopnosť viazať sa na polysacharidové štruktúry v bunkovej stene patogénov, kde aktivuje klasickú cestu aktivácie komplementu. Reguluje tiež metabolizmus prostaglandínov. Môže brániť aj stimulácii T - lymfocytov a ovplyvňovať fagocytózu. Viaže sa na miesta bunkového poškodenia, na trombocyty, polymorfonukleáry, ale aj makrofágy a podieľa sa na regulácii lymfocytov. Hladina CRP stúpa počas septických stavov, ale aj pri reumatoidnej artritíde, Crohnovej chorobe, či infarkte myokardu. Preto pri septických stavoch sú zmeny koncentrácie v čase užitočnejšie než jednotlivé hodnoty. Sekrécia CRP začína už po 4 – 6 hodinách od stimulácie s maximom po 36 hodinách, kedy môže dôjsť k nárastu až o 100 násobok. K zvýšeniu koncentrácie dochádza skôr než dôjde ku klinickej manifestácii v počiatkovej fáze zápalu. Koncentrácia je závislá od reperfúzie a veľkosti ložiska (Simon et al., 2004).

4.1.3 Interleukín – 6

Interleukín – 6 (IL-6) je pleiotropný cytokín syntetizovaný širokou škálou buniek. Je proteínom akútnej fázy zápalu. Jeho signálne dráhy sú zainteresované v mnohých ochoreniach (Takahashi et al., 2014). Je jedným z hlavných cytokínov zúčastňujúcich sa zápalovej reakcie. Aktivuje cieľové gény, ktoré sú zodpovedné za diferenciáciu, prežitie, apoptózu a proliferáciu buniek. Jeho účinok má imunomodulačný a angiogénny charakter (Delerive et al., 1999). Zapája sa aj do formovania osteoklastov. Má pro- ale aj protizápalový účinok a je jedným z kľúčových aktivátorov hematopoézy v akútnej fáze a imunitnej odpovedi organizmu. Viaže sa na komplexy plazmatických membránových receptorov zahrňujúcich v sebe bežný proteín prenášajúci signál - gp130 (glykoproteín 130). Signálová komunikácia zahrňuje aj aktiváciu JAK (Janusovej kinázy), ktorá vedie k aktivácii ďalších signálnych dráh

(Heinrich et al., 2003). Jeho molekulová hmotnosť je 21 – 28 kDa v závislosti od glykácie proteínu. Skladá sa zo štyroch závitníc. Pôvodne bol označovaný ako B – bunkový diferenciačný faktor alebo interferón – β . Stimuluje bunky pečeneového parenchýmu k produkcii C – reaktívneho proteínu. CRP pritom proteolyticky odstraňuje z receptorov naviazaný IL-6, z ktorého vzniká slubilný receptor (O'Reilly et al., 2013). Sérová hladina IL-6 koreluje so stupňom zápalovej odpovede.

4.1.4 Prokalcitonín

Prokalcitonín (PCT) je prohormón kalcitonínu. Je produktom transkriptu CALC-1 génu. Ide o 116 aminokyselinový peptid, ktorý je za fyziologických okolností sekretovaný C – bunkami štítnej žľazy ako odpoveď na hyperkalcémiu.



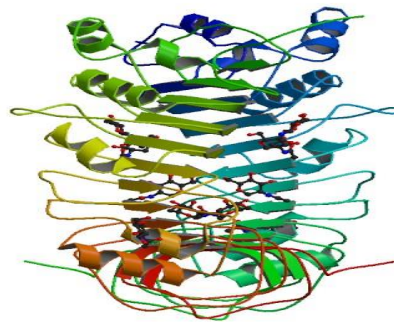
Obr. 6. Molekulárna štruktúra prokalcitonínu – prevzaté z (Althaus, Hauser, 2005)

Je pokladaný za spoľahlivý prediktor pozitívty bunkových kultúr u pacientov s rôznym druhom sepsy, najmä však komunitnej pneumónie, urosepsy, katérovej sepsy a pacientov podozrivých na SIRS. Za fyziologických podmienok je sérová koncentrácia PCT detekovaná len v nepatrnom množstve, keďže prepis CALC-1 génu je blokovaný. Mikrobiálne infekcie zvyšujú jeho expresiu, ktorá vedie k uvoľneniu PCT zo všetkých parenchymálnych tkanív a diferencovaných typov buniek v tele. Uvoľňujú ho aj mononukleárne bunky v perifériách a hepatálne bunky. Sú známe dva typy indukcie tvorby PCT. Prvý typ sekrécie je spúšťaný pomocou endotoxínov a PCT sa uvoľňuje v omnoho vyššej koncentrácii. Druhý typ spúšťajú cytokíny, pri bunkami mediovanej odpovedi a spúšťacími sú najmä IL – 1b, IL – 6 a TNF – α (Naffaa et al., 2014). Presné mechanizmy zodpovedné za produkciu PCT počas zápalových procesov nie sú doposiaľ kompletne objasnené. Predpokladá sa, že ho secernujú bunky pečeneového parenchýmu a periférne mononukleárne bunky modulované lipopolysacharidmi a cytokínmi.

Sekrécia PCT je patrná už po štyroch hodinách od stimulácie s najvyššou hladinou približne po ôsmich hodinách. Do fyziologických hodnôt sa vracia po odstránení patologického inzultu (Simon et al., 2004). Boli preukázané zvýšené hladiny u pacientov so sepsou, preto by mohol byť nápomocný v rozdelení medzi bakteriálnym, či iným infekčným pôvodcom. Vyššie hladiny PCT sú asociované so zvýšenou mortalitou. Podobne ako CRP, aj hodnoty PCT sa zvyšujú aj pri iných zápalových procesoch. PCT je nápomocný pri utilizácii antibiotickej terapie s ohľadom na zníženie nežiaducich účinkov a expozície pacientov.

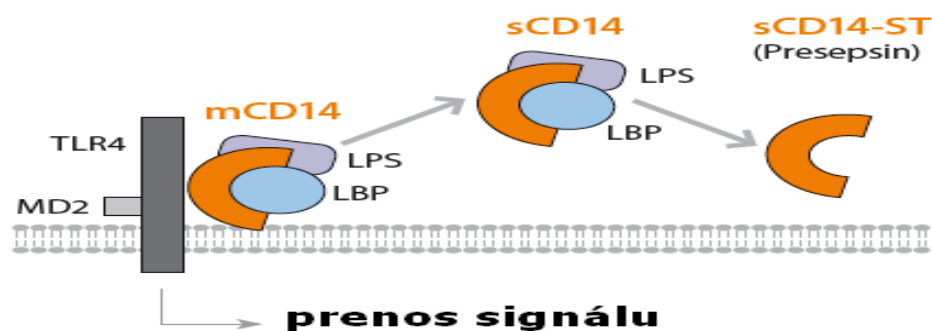
4.1.5 Presepsín

Jedná sa o povrchový glykoproteín (CD14) exprimovaný na povrchu monocytov a makrofágov, ktorý slúži ako receptor pre komplexy lipopolysacharidov (LPS) a LPS - naväzujúcich proteínov (LPB). Je súčasťou vrodenej imunitnej reakcie.



Obr. 7. Štruktúra presepsínu – prevzaté z (Kim et al., 2005)

Správa sa ako PRR tým, že aktivuje prozápalovú signálnu kaskádu pri kontakte s infekčným agens. Počas zápalového procesu aktivita plazmatickej proteázy generuje rozpustné fragmenty CD14. Ich podtyp sa nazýva presepsín (sCD14-ST) (P-SEP) (Ulla et al., 2013). Presepsín bol objavený len prednedávnom (Endo et al., 2012).



Obr. 8. Mechanizmus sekrécie presepsínu – modifikované podľa (Mitsubishi, 2011)

Za fyziologických podmienok je jeho sérová koncentrácia veľmi nízka. Bolo dokázané, že sa jeho koncentrácia rádovo zvyšuje v závislosti od závažnosti ochorenia. Nové chemiluminiscenčné enzýmové metódy umožnili meranie jeho koncentrácie v čase kratšom ako 20 minút (Mitsubishi, 2011). Presepsín (sCD14-ST) je nový sľubný diagnostický marker s vysokým prediktívnym indexom mortality a spoľahlivým markerom pri diagnostike a monitorovaní septických stavov. V praxi však ešte nie je v mnohých klinických pracoviskách využívaný (Spanuth et al., 2011).

4.2 HEMATOLOGICKÉ PARAMETRE SLEDOVANIA SEPTICKÉHO STAVU

Základné monitorovanie krvného obrazu (WBC) a jeho jednotlivých súčastí patrí medzi rutinné vyšetrenia a je aj jedným z kritérií pri posudzovaní septických stavov. Pri monitorovaní septických stavov sa často používajú aj koagulačné vyšetrenia. Stanovenie krvného obrazu väčšinou zahŕňa stanovenie počtu krvných elementov a ich vlastností ako veľkosť, objem a diferenciálne charakteristiky jednotlivých buniek (Pecka et al., 2010).

4.2.1 Fibrinogén

Fibrinogén (FBG) je označovaný aj ako faktor I. koagulačnej kaskády. Je to solubilný glykoproteín a patrí medzi reaktanty akútnej fázy. Ako odpoveď na rôznorodé zápalové procesy dochádza k aktivácii hemostatických mechanizmov a k zvýšeniu syntézy fibrinogénu v bunkách pečene.

Pri dekompenzácií stresovej záťaže pokročilého zápalového procesu dochádza k stimulácii fibrinolytických mechanizmov, ktoré spôsobia zníženie koncentrácie sérového fibrinogénu, môže dôjsť až k rozvoju diseminovanej intravaskulárnej koagulopatie (DIC) (Pal et al., 2013). Pri ťažkej sepe sa hladina fibrinogénu zvyšuje (indikácia silného zápalu). Pri septických stavoch je množstvo celkového fibrinogénu variabilné, môže byť znížené, zvýšené, ale aj normálne. Hladina fibrinogénu koreluje s hodnotami CRP. U septických stavov sa koncentrácia fibrinogénu posudzuje v súvislosti s hemodynamickým stavom (Matinlauri et al., 2010). Fibrinogén zohráva úlohu v patogenéze MODS, keď dochádza k zvýšeniu viskozity, zredukovaniu mikrovaskulárneho prietoku krvi a zhoršovaniu tkanivovej perfúzie. Pri septickom šoku napomáha sledovanie koncentrácie fibrinogénu k prognóze týždňovej mortality (Varga et al., 2011).

4.2.2 D-diméry

D - diméry (D-DIM) vznikajú pri lýze zrazenín degradáciou zasieťovaných fibrínových vlákien. Používajú sa ako indikátor prítomnosti disseminovanej intravaskulárnej koagulopatie a venózneho tromboembolizmu. Prozápalové stavy u kriticky chorých hospitalizovaných pacientov vedú k elevácii hladín D – dimérov prostredníctvom aktivácie koagulačnej kaskády cytokínmi a korešponujú s inhibíciou fibrinolýzy. Nerovnováha vo Virchowovej triáde počas zápalového procesu má za následok formáciu mikrotrombov. Mortalita septických stavov je priamo závislá na množstve a závažnosti postihnutých orgánov. Hladiny D - dimérov korelujú s klinickým skórovacím systémom APACHE II a napomáhajú v predikcii vývoja komplikácií (Sumney, Whiteman, 2007).

Fibrínové D - diméry sú potenciálnym a dostupným senzitívnym biomarkerom pri sledovaní septických stavov. D - dimér koreluje s vývojom ochorenia a je vhodným prediktívnym markerom sledovania mortality pri komplikáciách ťažkej sepsy a orgánovom zlyhávaní. V skorých štádiách je jeho spoľahlivosť nízka. Napomáha stratifikovať pacientov s ťažkým septickým stavom a prispôbiť tak vhodnú starostlivosť (Goebel et al., 2010 ; Kabrhel et al., 2010).

5 CIEĽ PRÁCE

Cieľom predkladanej práce je:

- porovnať v rutinej praxi používané biomarkery septických stavov,
- analyzovať rozdiely v nameraných hodnotách v závislosti od počiatkovej diagnózy,
- určiť prediktívnu hodnotu v dynamike rozvoja ochorenia.

6 MATERIÁL A METÓDY

Zhromažďovanie údajov bolo realizované v období od 1.6.2012 do 1.4.2014 s cieľom získania čo najreprezentatívnejšej vzorky vhodnej na štatistickú analýzu. Zo základného súboru pozostávajúceho z 57344 pacientov s nameranými parametrami spĺňalo stanovené kritériá septického stavu a malo minimálny počet 3 nami skúmaných súčasne vyšetrených parametrov 697 pacientov. Údaje pacientov boli pred štatistickým spracovaním deidentifikované, aby sa zaručila anonymita jedincov.

6.1 ORGANIZÁCIA PRIESKUMU

Výskumná časť pozostávala z vyšetrenia biochemických septických markerov u hospitalizovaných pacientov. Vzorka krvi odobraná na vyšetrenie indikované lekárom sa transportovala na pracovisko OKBaH Nemocnice sv. Michala v Bratislave, kde došlo k jej kvantitatívnej i kvalitatívnej analýze a výsledky boli začlenené do databázy. Z biochemických parametrov sa sledovala koncentrácia : PCT (ng/ml), P-SEP (pg/ml), IL-6 (pg/ml), LAKT (mmol/l), CRP (mg/l). Z hematologických parametrov boli sledované hladiny: D-Dim (mg/l), FBG (g/l), a počet WBC ($10^9/l$), ktoré sa následne podrobili štatistickej analýze.

6.2 VÝBEROVÝ SÚBOR

Jednotlivé parametre boli štatisticky spracované najprv v celom výberovom súbore. Štruktúra výberového súboru je zobrazená v Tab. 2 .

Tab. 2 Štruktúra výberového súboru

DIAGNÓZA	NÁZOV DIAGNÓZY	POČET
A41.9	Iné septikémie	6
B27.1	Infekčná mononukleóza	1
C16.9	Zhubný nádor žalúdka	31
C18.9	Zhubný nádor hrubého čreva	15
C22.0	Zhubný nádor pečene a vnútropečeňových žlčových ciest	1
C25.0	Zhubný nádor podžalúdkovej žľazy	9
C34.9	Zhubný nádor priedušiek a pľúc	1
D12.9	Nezhubný nádor hrubého čreva, konečníka, anusu a análneho kanála	2
D17.5	Nezhubný lipomatózny nádor	1
D18.1	Hemangióm a lymfangióm akejkoľvek lokalizácie	1
D48.7	Nádor nešpecifikovaných lokalizácií, neurčitého / neznámeho správania	2

DIAGNÓZA	NÁZOV DIAGNÓZY	POČET
D50.8	Málokrvnosť z nedostatku železa	4
D72.9	Iné poruchy bielych krviniek	1
E10.1	Diabetes mellitus závislý od inzulínu	3
E11.1	Diabetes mellitus nezávislý od inzulínu	11
E13.1	Iný bližšie určený diabetes mellitus	11
E78.8	Poruchy metabolizmu lipoproteínov a iné lipidémie	1
G04.8	Zápal mozgu, miechy – encephalitis, myelitis a encephalomyelitis	1
G44.9	Iné syndrómy bolesti hlavy	2
G83.2	Iné paralytické syndrómy	2
I10.0	Esenciálna (primárna) hypertenzia	3
I21.0	Akútny infarkt myokardu	2
I25.8	Chronická ischemická choroba srdca	8
I27.2	Iné typy cor pulmonale (pľúcneho srdca)	6
I33.9	Akútny a subakútny zápal vnútro srdca – endocarditis acuta et subacuta	1
I41.0	Zápal srdcového svalu – myokarditída – pri nezatriedených chorobách	1
I48.1	Predsieňová fibrilácia a flater	1
I49.5	Iné srdcové arytmie	2
I50.1	Srdcové zlyhanie	6
I61.2	Mozgové – intracerebrálne – krvácanie	1
I70.9	Ateroskleróza	1
I71.5	Aneurizma a rászťepová vydutina aorty – aneurysma dissecans	1
I81.0	Trombóza vrátnice (vena portae)	3
I83.0	Kŕčové žily – varixy – dolných končatín	1
J02.9	Akútny zápal hltana – pharyngitis acuta	1
J03.0	Akútny zápal mandlí – tonsillitis acuta	2
J10.0	Chrípka vyvolaná identifikovaným vírusom chrípky	1
J11.0	Chrípka vyvolaná neidentifikovaným vírusom	1
J15.0	Bakteriálny zápal pľúc nezatriedený inde	3
J16.0	Zápal pľúc vyvolaný inými mikroorganizmami nezatriedený inde	1
J18.0	Zápal pľúc vyvolaný nešpecifikovaným mikroorganizmom	7
J20.6	Akútny zápal priedušiek – bronchitis acuta	3
J40.1	Bronchitída neurčená ako akútna alebo chronická	2
J45.9	Astma – záduch	5
J46.9	Status asthmaticus – záduchový stav	12
J93.9	Pneumotorax	1
J95.2	Pozáakrokové respiračné ochorenia nezatriedené inde	2
J96.0	Respiračné zlyhanie nezatriedené inde	2
K29.9	Gastritída a duodenitída	1
K30.9	Dyspepsia	93
K35.0	Akútny zápal červovitého prívesku – appendicitis acuta	6
K36.1	Iné zápaly červovitého prívesku	6
K38.8	Iné choroby červovitého prívesku	1
K40.3	Slabinová prietrž – hernia inguinalis	4
K43.9	Brušná prietrž – hernia ventralis	1

DIAGNÓZA	NÁZOV DIAGNÓZY	POČET
K50.9	Crohnova choroba [enteritis regionalis]	7
K51.9	Ulcerózna kolitída	33
K52.3	Iná neinfekčná gastroenteritída a kolitída	10
K56.9	Paralytický ileus a črevná obštrukcia (zátvor) bez prietrže	11
K57.3	Divertikulová choroba čreva	15
K59.9	Iné funkčné črevné poruchy	4
K61.9	Absces análnej a rektálnej oblasti	1
K63.1	Iné choroby čreva	2
K70.1	Alkoholická choroba pečene	3
K71.9	Toxická choroba pečene	1
K74.6	Fibróza a cirhóza pečene	1
K75.9	Iné zápalové choroby pečene	3
K76.7	Iné choroby pečene	8
K77.9	Choroby pečene pri chorobách zatriedených inde	1
K80.9	Žlčové kamene – cholelithiasis	29
K81.1	Zápal žlčníka - cholecystitis	8
K83.9	Iné choroby žlčových ciest	6
K85.0	Akútny zápal podžalúdkovej žľazy - pancreatitis acuta	90
K86.9	Iné choroby podžalúdkovej žľazy	14
K90.1	Črevná malabsorpcia	2
K91.9	Pozáakrokové ochorenia tráviacej sústavy nezatriedené inde	2
L08.0	Iné lokálne infekcie kože a podkožného tkaniva	30
L97.0	Vred dolnej končatiny nezatriedený inde	3
M00.0	Pyogénna artritída	6
M17.3	Gonartróza [artróza kolenného kĺbu]	3
M54.1	Bolesť chrbtice - dorzalgia	4
M67.1	Iné choroby synoviálnej membrány a šliach	1
N00.0	Akútny nefrotický syndróm	1
N04.1	Nefrotický syndróm	1
N10.0	Akútna tubulointersticiálna nefritída	2
N15.1	Iné renálne tubulointersticiálne choroby	1
N17.8	Akútne zlyhanie obličiek	2
N18.8	Chronické zlyhanie obličiek	8
N23.9	Nešpecifikovaná obličková kolika	1
N30.9	Cystitída	1
R07.1	Bolesť v hrdle a v hrudníku	1
R10.1	Bolesť v oblasti brucha a panvy	51
R17.1	Nešpecifikovaná žltáčka	1
R40.1	Somnolencia, sopor a kóma	5
R50.1	Horúčka neznámeho pôvodu	10
R55.1	Synkopa a kolaps	5
R60.1	Opuch nezatriedený inde	2
S70.8	Zvýšená sedimentácia erytrocytov a odchýlky viskozity plazmy	1
S83.7	Abnormálne nálezy v mozgovomiechovom moku	1
T81.1	Komplikácie po výkonoch nezatriedené inde	7

Následne sme časť pacientov rozdelili podľa počiatočných diagnóz vychádzajúcich z medzinárodnej klasifikácie chorôb (MKCH10) a z revízie MKCH – 10 – SK - 2013 do štyroch skupín, ktoré sa medzi sebou štatisticky porovnali.

Prvú skupinu tvorilo 63 pacientov s komplikáciami septického stavu so základnou diagnózou nádorového ochorenia (ONKO). Jednalo sa o diagnózy:

- Zhubný nádor žalúdka (C16.9, n = 31)
- Zhubný nádor hrubého čreva (C18.9, n = 15)
- Zhubný nádor pečene a vnútropečeňových žlčových ciest (C22.0, n = 1)
- Zhubný nádor podžalúdkovej žľazy (C25.0, n = 9)
- Zhubný nádor priedušiek a pľúc (C34.9, n = 1)
- Nezhubný nádor hrubého čreva, konečníka, anusu a análneho kanála (D12.9, n = 2)
- Nezhubný lipomatózny nádor (D17.5, n = 1)
- Hemangióm a lymfangióm akejkol'vek lokalizácie (D18.1, n = 1)
- Nádor iných a nešpecifikovaných lokalizácií neurčitého alebo neznámeho správania (D48.7, n = 2)

Druhá skupina s 37 pacientmi reprezentovala kardiovaskulárne diagnózy so septickými komplikáciami (KARDIO). V tejto skupine boli zastúpené:

- Esenciálna (primárna) hypertenzia (I10.0, n = 3)
- Akútny infarkt myokardu (I21.0, n = 2)
- Chronická ischemická choroba srdca (I25.8, n = 8)
- Iné typy cor pulmonale (pľúcneho srdca) (I27.2, n = 6)
- Predsieňová fibrilácia a flater (I48.1, n = 1)
- Iné srdcové arytmie (I49.5, n = 2)
- Srdcové zlyhanie (I50.1, n = 6)
- Ateroskleróza (I70.9, n = 1)
- Vydutina - aneurizma a rózštepová vydutina aorty
 - aneurysma dissecans (I71.05, n = 1)
- Trombóza vrátnice (vena portae) (I81.0, n = 3)
- Akútny a subakútny zápal vnútro srdca
 - endocarditis acuta et subacuta (I33.9, n = 1)

- Zápal srdcového svalu - myokarditída
 - pri chorobách zatriedených inde (I41.0 n = 1)
- Mozgové - intracerebrálne - krvácanie (I61.2, n = 1)
- Kŕčové žily - varixy - dolných končatín (I83.0, n = 1)

Tretiu skupinu (n = 52) tvorili pacienti s infekciami ako primárnou diagnózou (INFEKT). Skupina pozostávala z:

- Iné septikémie (A41.9, n = 6)
- Infekčná mononukleóza (B27.1, n = 1)
- Zápal mozgu, miechy, mozgu aj miechy
 - encephalitis, myelitis a encephalomyelitis (G04.8, n = 1)
- Iné lokálne infekcie kože a podkožného tkaniva (L08.8, n = 30)
- Vred dolnej končatiny nezatriedený inde (L97.1, n = 3)
- Bakteriálny zápal pľúc nezatriedený inde (J15.1, n = 3)
- Zápal pľúc vyvolaný inými mikroorganizmami nezatriedený inde (J16.1, n = 1)
- Zápal pľúc vyvolaný nešpecifikovaným mikroorganizmom (J18.1, n = 7)

Poslednú skupinu (n = 26) tvorili pacienti s metabolickými ochoreniami (METAB). Skupinu tvorili diagnózy:

- Diabetes mellitus závislý od inzulínu (E10.1, n = 3)
- Diabetes mellitus nezávislý od inzulínu (E11.1, n = 11)
- Iný bližšie určený diabetes mellitus (E13.1, n = 11)
- Poruchy metabolizmu lipoproteínov a iné lipidémie (E78.8, n = 1)

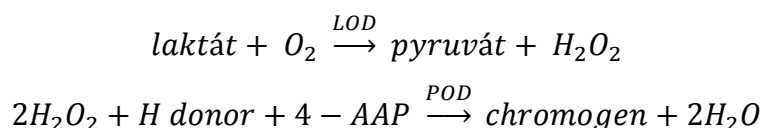
6.3 PRINCÍPY STANOVENÍ

Koncentrácie meraných parametrov CRP a LAKT sme stanovovali na analyzátore Cobas 6000 od firmy ROCHE® Diagnostics. Koncentrácie IL-6 a PCT boli stanovené na analyzátore Cobas ELECSYS e411 od firmy ROCHE® Diagnostics. Počet WBC bol stanovený pomocou analyzátora SYSMEX® XE2100 a koncentrácie D-DIM a FBG boli stanovené na analyzátore SYSMEX® CA-1500. Stanovenie koncentrácie P-SEP bolo vykonané na analyzátore PATHFAST® od firmy Mitsubishi chemical corporation. Pred samotným stanovením boli prístroje kalibrované na všetky nami merané parametre pomocou štandardizovaných kalibrátorov dodávaných k diagnostickým setom. Presnosť

a správnosť metodiky sme kontrolovali prostredníctvom komerčných kontrolných materiálov.

6.3.1 Stanovenie LAKT

Hladina plazmatického laktátu bola meraná kolorimetrickým stanovením. L - laktát je pri nej oxidovaný na pyruvát pomocou špecifického enzýmu laktát oxidáza (LOD). Následne je reakcia pomocou peroxidázy (POD) využitá k produkcii zafarbenia využitím peroxidu vodíka vznikajúceho z predchádzajúcej reakcie. Intenzita vzniknutého sfarbenia je priamo úmerná koncentrácii laktátu v plazme. Následne sa spektrofotometricky meria nárast absorbancie pri vlnovej dĺžke 700/660 nm (Roche, 2009).



Referenčné hodnoty: Plazma: 0,5-2,2 mmol/l

Rozsah merania: 0,2-15,5 mmol/l

6.3.2 Stanovenie CRP

Analýza koncentrácie CRP bola vykonaná imunoturbidimetrickou metódou podporovanou aglutináciou. Molekuly CRP v reakčnej kvete aglutinujú s latexovými časticami potiahnutými špecifickou protilátkou proti ľudskému CRP. Následne sa hodnota koncentrácie stanoví z vytvoreného koagula turbidimetricky pri 570 nm (Roche, 2012).

Referenčné hodnoty : Sérum: 0,0 – 5,0 mg/l

Rozsah merania: 0,15-20,0 mg/l (1,43-190 nmol/l, 0,015-2,0 mg/dl)

6.3.3 Stanovenie IL-6

Stanovenie IL-6 je založené na sendvičovom princípe s celkovou dobou stanovenia 18 minút. Vzorka séra je inkubovaná s biotinylovanou monoklonálnou protilátkou proti IL-6. Po pridaní monoklonálnej protilátky proti IL-6 značenej ruthéniovým komplexom a mikročastíc potiahnutých streptavidínom tvoria protilátky s antigénmi vzorky sendvičový komplex. Celá reakčná zmes je následne nasatá do meracej cely, kde dôjde

k zachyteniu mikročastíc na povrchu elektródy pomocou magnetického poľa. Nenaviazané zložky sa odstránia a napätie na elektróde vyvolá chemiluminiscenčnú emisiu fotónov, ktorá je pomocou fotonásobiča zmeraná. Výsledná hodnota koncentrácie IL-6 je vyhodnotená z kalibračnej krivky, ktorá je špecificky vytvorená pre prístroj pri kalibrácii (Roche, 2012).

Referenčné hodnoty: < 7 pg/ml

Rozsah merania: 1,5-5000 pg/ml

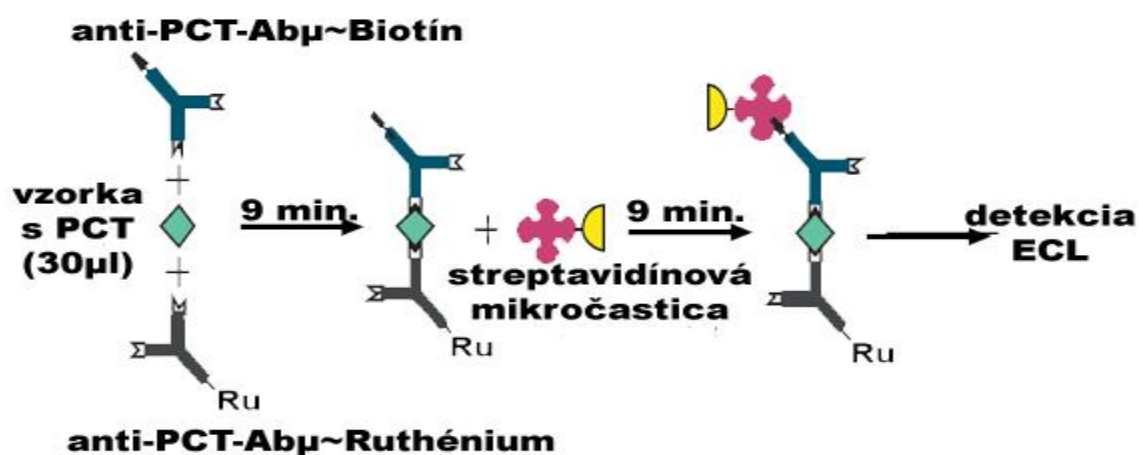
6.3.4 Stanovenie PCT

Stanovenie sérovej koncentrácie PCT je založené na dvojkrokovej dvojstrannej sendvičovej elektrochemiluminiscenčnej (ECLIA) analýze. Pomocou biotínom značenej špecifickej protilátky proti PCT a monoklonálnej špecifickej protilátky proti PCT značenej ruthéniovým komplexom sa po inkubácii vytvorí komplex. V druhej inkubačnej fáze sa pridávajú streptavidínom značené mikročastice, ktoré sa viažu na komplex interakciou medzi biotínom a streptavidínom.

Reakčná zmes je nasatá do meracej komôrky, kde dôjde k magnetickému zachyteniu mikročastíc na povrch elektródy. Po preplachu a odstránení nežiaducich zložiek je privedené napätie na elektródu, ktoré indukuje chemiluminiscenciu. Koncentrácia je následne vyhodnotená z kalibračnej krivky.

Referenčné hodnoty: 0,0 – 0,50 ng/ml

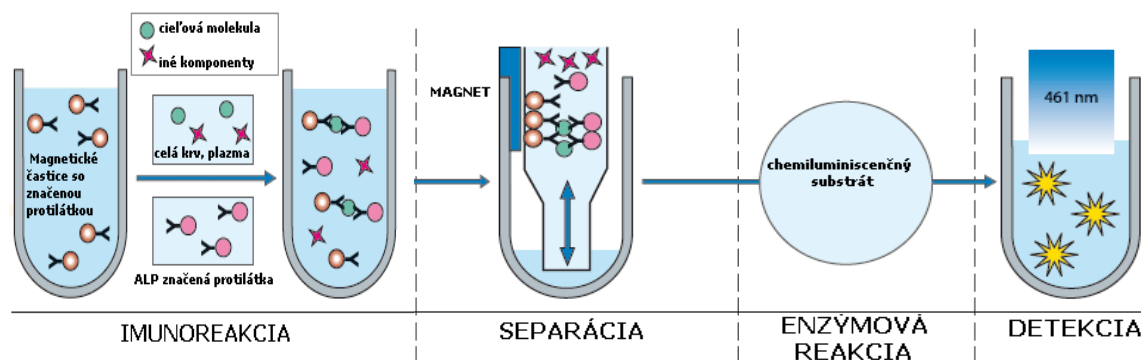
Rozsah merania: 0,02-100 ng/ml



Obr. 9. Princíp stanovenia prokalcitonínu – modifikované podľa (Moshides et al., 2009)

6.3.5 Stanovenie P-SEP

Stanovovanie presepsínu je založené na nekompetitívnej chemiluminiscenčnej enzýmovej imunoanalýze spolu s technológiou MAGTRATION[®]. Vyšetrenie sa vykonáva z EDTA plazmy za použitia monoklonálnych a polyklonálnych protilátok. Počas inkubačného procesu sa anti - presepsínové polyklonálne protilátky značené alkalickou fosfatázou a anti - presepsínové monoklonálne protilátky značené magnetickými časticami naviažu na sCD14-ST a vytvoria imunokomplex. Po odstránení nenaviazaných častíc sa pridá chemiluminiscenčný substrát. Celá zmes sa po krátkej inkubačnej dobe podrobí meraniu. Intenzita luminiscencie je priamo úmerná koncentrácii presepsínu vo vzorke. Výsledok je k dispozícii už do 17 minút (Mitsubishi, 2011).



Obr. 10. Princíp stanovenia presepsínu – modifikované podľa (Mitsubishi, 2011)

Referenčné hodnoty: 0,0 – 300 pg/ml

Rozsah merania: 20 - 20 000 pg/l

Špecifická testu je 99,16% a jeho senzitivita je 90,67%.

6.3.6 Stanovenie KO

Vzorka plnej krvi sa riedi s reagentiou Stromatolyser-FB v pomere 1:50 a takto zriedená prechádza do reakčného kanála, kde zhruba po 14 sekundovom intervale dôjde k lýze červených krviniek. Vzorka následne prechádza cez optický detektor, kde je analyzovaná za použitia polovodičového laseru (Sysmex, 2012).

Referenčné hodnoty: 4,0 – 10,0 x10⁹/l

Rozsah merania: 0,0 – 440 x10⁹/l

6.3.7 Stanovenie D-DIM

Stanovenie koncentrácie D-dimérov je založené na časticami urýchlenom imunoturbidimetrickom stanovení. Latexové častice uniformnej veľkosti sú potiahnuté monoklonálnou protilátkou proti epitopu D-DIM. Komplex antigén - protilátka, vznikajúci po pridaní vzorky plazmy, vytvára zákal s reakčnou zmesou. Zmena absorbančie v čase je závislá na koncentrácii epitopov D-DIM. Precipitát je stanovený turbidimetricky pri vlnovej dĺžke 800 nm (Sysmex, 2012).

Referenčné hodnoty: 0,0 – 0,20 mg/l

Rozsah merania: 0,07 – 9,00 mg /l

6.3.8 Stanovenie FBG

Stanovenie fibrinogénu je založené na modifikovanej metóde podľa Claussa. V prítomnosti bovinného trombínu „multifibren U“ sa fibrinogén transformuje na fibrín a čas formácie koagula je priamo úmerný koncentrácii fibrinogénu v plazme.

Metóda je citlivá na heparín až do dávky 2,0 U/ml (Sysmex, 2012).

Referenčné hodnoty: 1,8 – 4,0 g/l

Rozsah merania: 0,80–12,00 g/l

6.3.9 Použité reagensy

Vykonanie analýz CRP a LAKT na analyzátore Cobas 6000 si vyžadovalo použitie nasledujúcich reagensov:

CRP 3gen. – cobas c501	Kat. č. 04956842
Calibrator f.a.s. Proteins (5 x 1 ml)	Kat. č. 11355279
PreciControl ClinChem Multi 1 (20 x 5 ml)	Kat. č. 05117003
PreciControl ClinChem Multi 2 (20 x 5 ml)	Kat. č. 05117216
NaCl Diluent 9% (50 ml)	Kat. č. 04489357

Lactate Gen.2 - cobas c 501	Kat. č. 03183700
Calibrator f.a.s. (12 x 3 ml)	Kat. č. 10759350
PreciControl ClinChem Multi 1 (20 x 5 ml)	Kat. č. 05117003
PreciControl ClinChem Multi 2 (20 x 5 ml)	Kat. č. 05117216
NaCl Diluent 9 % (50 ml)	Kat. č. 04489357

Na vykonanie analýzy počtu WBC na analyzátore SYSMEX XT 2100 boli použité nasledovné chemikálie dodávané firmou Medservis:

Lyser HBG	Kat. č. L001
Diluent	Kat. č. L006
Sheat (CellSheat)	Kat. č. L007
Lyser FBA	Kat. č. L013
Lyser FFD	Kat. č. L036
Lyser FFS + Dialyser SYS 4DS	Kat. č. L037
Lyser IM-DIALYSER	Kat. č. L040
D-CHECK XE L, 4,5ml, XE, XT	Kat. č. M024
D-CHECK XE H, 4,5ml, XE, XT	Kat. č. M025
D-CHECK XE M, 4,5ml, XE, XT	Kat. č. M026

Pre analýzu D-DIM a FBG na analyzátore SYSMEX CA-1500 boli použité tieto chemikálie:

D-DIM (Medirox – Diagnostica a.s.)

D-dimer reagent	Kat. č. MRX143
D-dimer kalibrator	Kat. č. MRX144
Multikontrola (normálna)	Kat. č. GHI162
Multikontrola (patologická)	Kat. č. GHI167B

FBG (Reagencie Siemens pre koaguláciu pôvodne DADE BEHRING - BIOG)

Thrombin reagent	Kat. č. B4233-27
Owrenov pufor	Kat. č. B4234-25
Standard human plasma calibrator	Kat. č. ORKL175
Control plasma – N	Kat. č. ORKE415
Control plasma - P	Kat. č. OUPZ175

Na analyzátore Cobas ELECSYS e411, pomocou ktorého boli vyšetrené parametre IL-6 a PCT boli použité nasledujúce kity:

IL-6	Kat. č. 05109442
IL-6 CalSet Elecsys	Kat. č. 05109469
PreciControl Multimarker Elecsys	Kat. č. 05341787
Elecsys Diluent MultiAssay	Kat. č. 03609987
PCT B.R.A.H.M.S	Kat. č. 05056888
Calibrator f.a.s. Proteins (5 x 1 ml)	Kat. č. 11355279
PreciControl Multimarker Elecsys	Kat. č. 05341787
Elecsys Diluent MultiAssay	Kat. č. 03609987

Pre vykonanie analýzy P-SEP na analyzátor PATHFAST boli použité nasledujúce reagenty:

PRESEPSIN PATHFAST set	Kat. č. 1110-4000
PATHFAST špičky	Kat. č. 1114-1000
CONTROL SET	Kat. č. 1110-4001

6.3.10 Použité štatistické metódy

Štatistickú analýzu sme vykonávali v programe InStat 3.02 od spoločnosti GraphPad software, Inc. a na kontrolovanie správnosti štatistických výpočtov sme použili program XLStat-PRO 7.5.2 od spoločnosti Addinsoft.

Základnú charakteristiku sledovaných premenných sme udávali pomocou aritmetického priemeru, smerodajnej odchýlky, mediánu a rozsahu, ktorý bol daný minimálnou a maximálnou hodnotu. Na hodnotenie miery závislosti medzi jednotlivými meranými parametrami sme použili neparametrický Spearmanov korelačný koeficient. Spearmanov korelačný koeficient je založený na myšlienke, že ak sú poradia znakov štatistického súboru podobné, potom medzi znakmi X a Y existuje závislosť. Za hladinu významnosti, pri ktorej sme zamietli nulovú hypotézu rovnosti stredných hodnôt porovnávaných súborov, sme považovali hladinu $\alpha = 0,05$.

Závislosť medzi sledovanými premennými sme považovali za dostatočne veľkú pri absolútnej hodnote $R > |\pm 0,5|$. Pre testovanie vekovej štruktúry medzi pohlaviami sme použili neparametrický Mann - Whitneyov test, určený pre nezávislé dvojice premenných, so zamietnutím nulovej hypotézy pri p - hodnote testovacieho kritéria $p = 0,05$. Pre neparametrické štatistické testy sme sa rozhodli z dôvodu heterogenity dát čo do počtu, ako aj vlastností ich distribúcie. Napriek tomu však v odôvodnených prípadoch používame pre komparáciu s týmito výsledkami aj výpočty s pomocou parametrických testov (t - test). Ide o prípady dosiahnutia marginálnej p -hodnoty testovacieho kritéria v rozsahu: $0,1 > p < 0,5$, ktorá nedovoľuje validnejšiu interpretáciu výsledkov. V tomto prípade sme považovali orientačné využitie parametrických testov za prínosné.

Medzi sledovanými premennými v rámci piatich skupín nebolo možné analyzovať dáta pomocou korelačného koeficientu. Interpretovať výsledky by bolo náročné a pri výrazných odlišnostiach by nebolo možné kvôli malému počtu dát vylúčiť sprostredkovanú koreláciu. Riešením by bola faktorová analýza, pre ňu je však primárne číselných údajov v niektorých parametroch. Z toho dôvodu boli dáta s dostatočnou početnosťou vo všetkých skupinách porovnávané medzi sebou pomocou Kruskal – Wallisovej analýzy, ktorá je neparametrickou alternatívou ANOVA. Za hladinu významnosti výsledkov testov, pri ktorej sme zamietli nulovú hypotézu rovnosti stredných hodnôt porovnávaných súborov sme považovali $p = 0,05$. Výsledky dvojíc podsúborov boli porovnávané aj Dunnovým testom.

7 VÝSLEDKY

7.1 POROVNANIE PARAMETROV VO VÝBEROVOM SÚBORE

Štatisticky sme pozorovali 697 pacientov pričom skupina pozostávala z 383 mužov s priemerným vekom ($56 \pm 15,42$) a 314 žien s priemerným vekom ($58 \pm 16,92$) rokov. Najmladšia pacientka mala 18 rokov, najstaršia mala 92 rokov. Najmladší pacient mal 20 rokov, najstarší pacient mal 91 rokov. Medzi pohlaviami nebola pozorovaná výrazná štatistická významnosť (Tab. 3).

Tab. 3 Veková štruktúra pacientov a jej porovnanie medzi pohlaviami

Pohlavie	n	\bar{x}	sd	min.	max.	Med	p
MUŽI	383	56,034	15,42	20	91	55	0,0743
ŽENY	314	57,99	16,92	18	92	58,5	
SPOLU	697	56,92	16,13	18	92	56	

Legenda: n – počet pacientov, \bar{x} – aritmetický priemer veku v rokoch, sd – smerodajná odchýlka, Med – medián, min. – minimálna hodnota, max. – maximálna hodnota, p – hladina významnosti Mann - Whitneyovho testu

Rozdiel vo veku probandov sme hodnotili pomocou neparametrického t-testu s predpokladom zhodnosti a nezhdnosti premenných, ktorý podporil domnienku vekovej homogenity výberového súboru (Tab. 4).

Tab. 4 Porovnanie vekovej štruktúry medzi pohlaviami t-testom

Premenné	pozorovaná t	Kritická t	Metóda	p
nezhodné	-1,583	1,964	Satterthwaite	0,114
zhodné	-1,583	1,967	Cochran-Cox	0,114
	-1,597	1,963	Student	0,111

Legenda: t – hodnota testovacieho kritéria, p – hladina významnosti t-testu

Pre ďalšie spracovanie výsledkov sme si za základ zvolili parameter P-SEP, ktorý sa na OKBaH Nemocnice sv. Michala používa v rutinej praxi pri rozlíšení septických stavov a diferenciálnej diagnostike už približne tretí rok.

Tab. 5 Základná štatistická charakteristika P-SEP

Parameter	n	\bar{x}	sd	x_m	min.	max.
P-SEP [pg/ml]	697	603,543	1073,6	268,0	47,7	10993

Legenda: n – počet pacientov, \bar{x} – aritmetický priemer, sd – smerodajná odchýlka, x_m – medián, min. – minimálna hodnota, max. – maximálna hodnota

U 53% sme pozorovali normálne hodnoty avšak u 47% boli hodnoty zvýšené.

Tab. 6 Porovnanie P-SEP s referenčným rozsahom

P-SEP [pg/ml]	n	RH	↓	↑	NH
	697	0,0 – 300	-	328(47%)	369(53%)

Legenda: n - počet pacientov, RH – referenčný rozsah, ↓ – zníženie oproti rozsahu, ↑ - zvýšenie oproti rozsahu, NH – normálne hodnoty

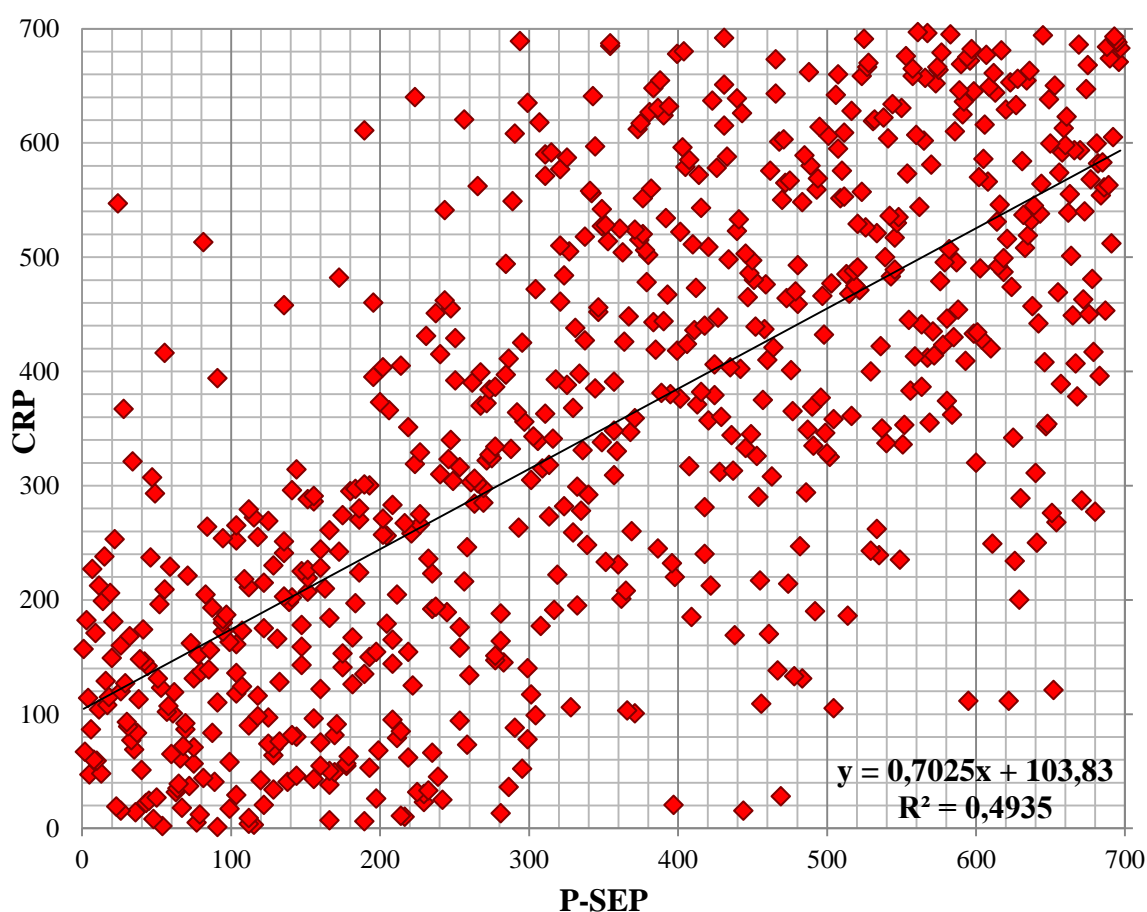
S presepsínom je štandardne na žiadosť lekára stanovované aj CRP, preto ich počet bol rovnaký. CRP je najbežnejšie stanovovaný reaktant akútnej fázy (Tab. 7).

Tab. 7 Štatistická charakteristika a závislosť medzi P-SEP a CRP

Parameter	n	\bar{x}	sd	x_m	min.	max.
CRP [mg/l]	697	61,066	74,192	25,78	0,00	370,68
R			95% interval spoľahlivosti korelačného koeficientu			
0,7025			0,6616		0,7393	

Legenda: n – počet pacientov, \bar{x} – aritmetický priemer, sd – smerodajná odchýlka, x_m – medián, min. – minimálna hodnota, max. – maximálna hodnota, R – neparametrický Spearmanov korelačný koeficient

Priemerná hodnota koncentrácie CRP bola ($61,066 \pm 74,192$ mg/l). Medzi P-SEP a CRP je pozorovaná významná korelácia ($R = 0,725$) (Tab. 7, Obr. 12.).



Obr. 11. Scattergram distribúcie premenných CRP a P-SEP

Až 67 % pacientov malo zvýšené hodnoty CRP, 33% pacientov malo hodnoty v norme (Tab. 8).

Tab. 8 Porovnanie CRP s referenčným rozsahom

CRP [mg/l]	Popisná štatistika				
	n	RH	↓	↑	NH
	697	0,0 – 5,0	-	467 (67%)	231 (33%)

Legenda: n - počet pacientov, RH – referenčný rozsah, ↓ – zníženie oproti rozsahu, ↑ - zvýšenie oproti rozsahu, NH – normálne hodnoty

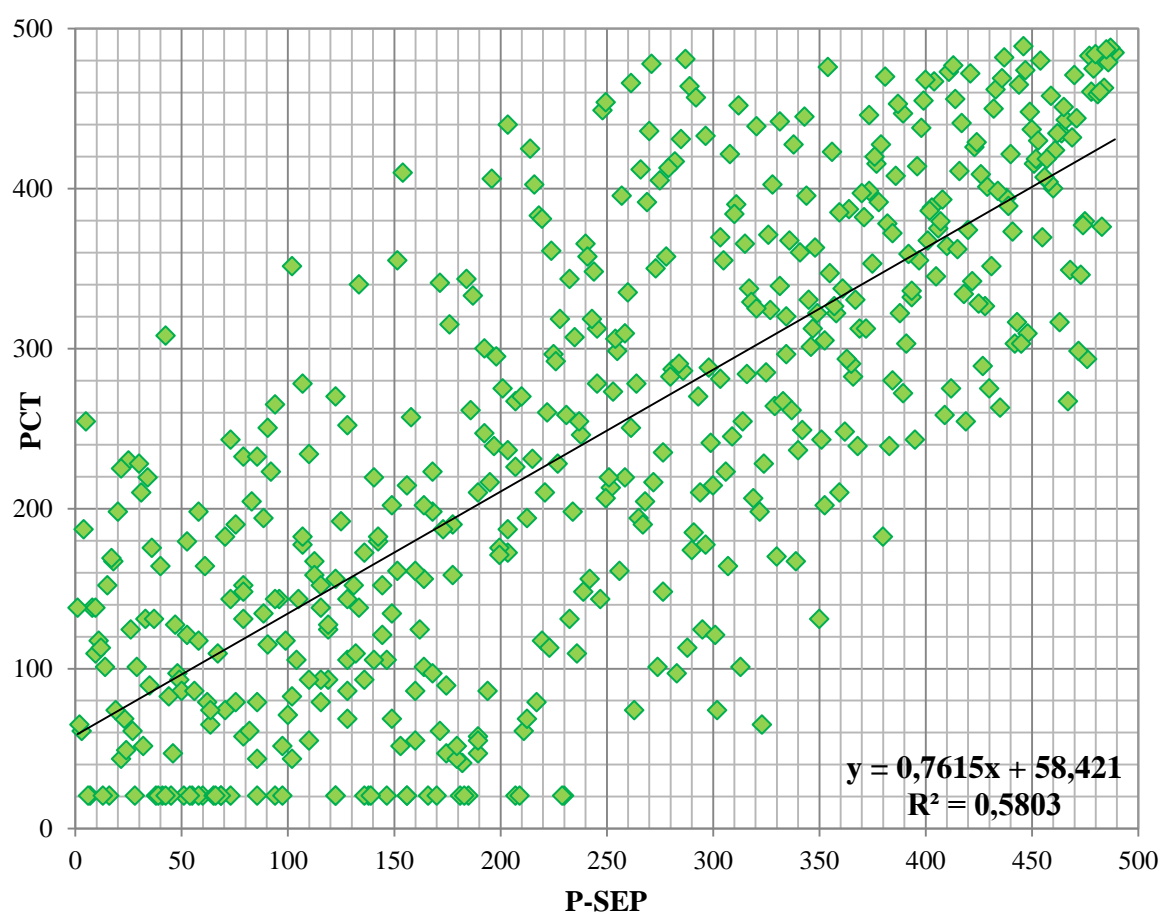
Druhým parametrom podrobeným štatistickej analýze bol PCT, všeobecne považovaný za najšpecifickejší septický marker.

Tab. 9 Základná štatistická charakteristika a závislosť medzi P-SEP a PCT

Parameter	n	\bar{x}	sd	x_m	min.	max.
PCT [ng/ml]	489	2,856	14,142	0,1010	0,02	177,50
R			95% interval spoľahlivosti korelačného koeficientu			
0,7618			0,7206		0,7976	

Legenda: n – počet pacientov, \bar{x} – aritmetický priemer, sd – smerodajná odchýlka, x_m – medián, min. – minimálna hodnota, max. – maximálna hodnota, R – neparametrický Spearmanov korelačný koeficient

Jeho priemerná sérová koncentrácia bola $(2,856 \pm 14,142 \text{ ng/ml})$. PCT zo všetkých parametrov najvýznamnejšie koreluje s P-SEP ($R = 0,7618$) (Tab. 9, Obr. 13.)



Obr. 12. Scattergram distribúcie premenných PCT a P-SEP

V sledovanom súbore pacientov malo PCT v referenčnom rozmedzí 78%, 22% pacientov malo hladinu zvýšenú (Tab. 10).

Tab. 10 Porovnanie PCT s referenčným rozsahom

PCT [ng/ml]	Popisná štatistika				
	n	RH	↓	↑	NH
	489	0,0 – 0,50	-	107(22%)	382(78%)

Legenda: n - počet pacientov, RH – referenčný rozsah, ↓ – zníženie oproti rozsahu, ↑ - zvýšenie oproti rozsahu, NH – normálne hodnoty

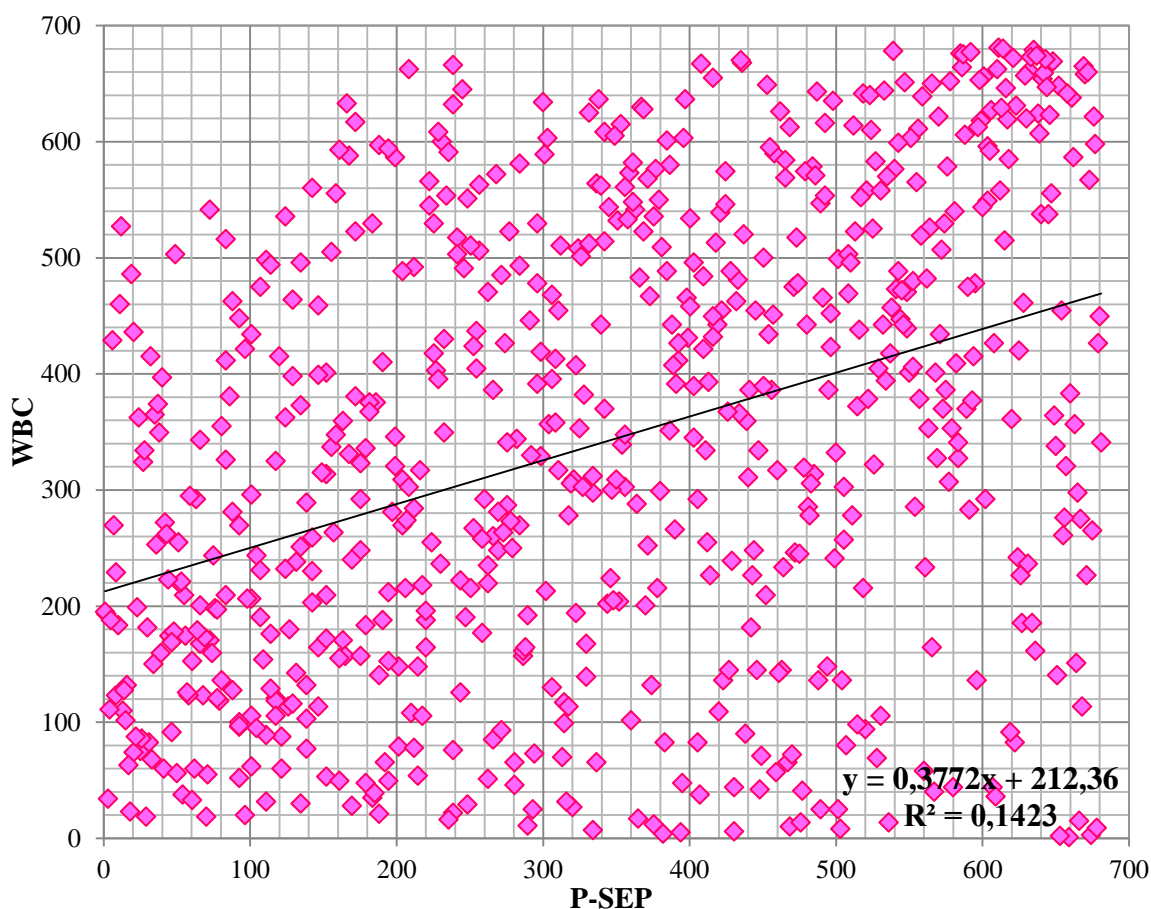
Ďalším faktorom monitorovania septických stavov, ktorý je často používaný a pomerne reprezentatívny, je množstvo WBC.

Tab. 11 Základná štatistická charakteristika a závislosť medzi P-SEP a WBC

Parameter	n	\bar{x}	sd	x_m	min.	max.
WBC[10⁹/l]	681	10,106	5,232	8,9	2,10	45,6
R			95% interval spoľahlivosti korelačného koeficientu			
0,3772			0,3089		0,4417	

Legenda: n – počet pacientov, \bar{x} – aritmetický priemer, sd – smerodajná odchýlka, x_m – medián, min. – minimálna hodnota, max. – maximálna hodnota, R – neparametrický Spearmanov korelačný koeficient

Priemerná hodnota množstva leukocytov bola (10,106 ± 5,232). Medzi P-SEP a WBC štatistické spracovanie nevykázalo významnú závislosť (R = 0,3772)(Tab. 11, Obr. 14.).



Obr. 13. Scattergram distribúcie premenných WBC a P-SEP

Množstvo WBC vykazovalo u 56% pacientov normálne hodnoty, 41% pacientov malo hodnoty zvýšené a u 3,4% pacientov sa nameralo znížené množstvo WBC (Tab. 12).

Tab. 12 Porovnanie WBC s referenčným rozsahom

WBC [10 ⁹ /l]	Popisná štatistika				
	n	RH	↓	↑	NH
	681	4,0 – 10,00	23(3,4%)	279(41%)	379(55,6%)

Legenda: n - počet pacientov, RH – referenčný rozsah, ↓ – zníženie oproti rozsahu, ↑ - zvýšenie oproti rozsahu, NH – normálne hodnoty

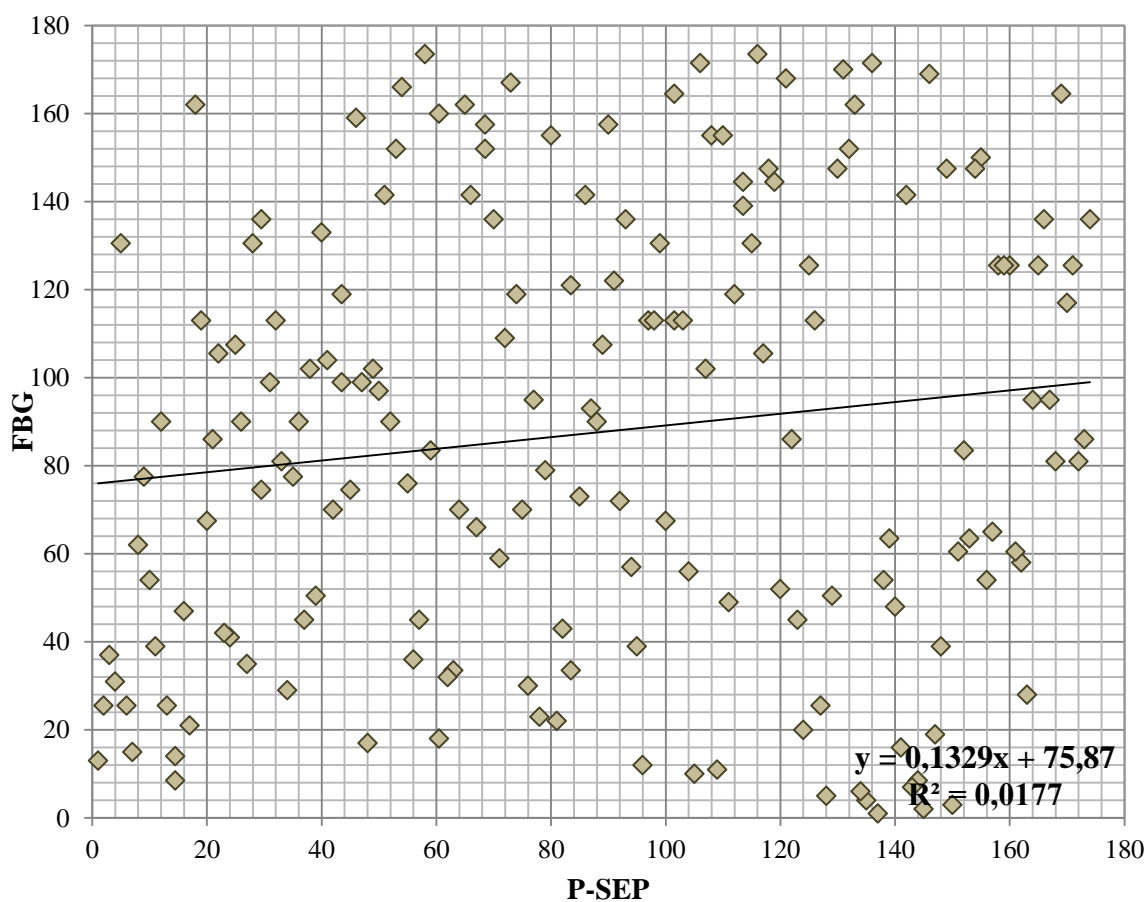
Na monitorovanie koagulačných mechanizmov zapojených do septických stavov sa frekventovane používa koncentrácia FBG.

Tab. 13 Základná štatistická charakteristika a závislosť medzi P-SEP a FBG

Parameter	n	\bar{x}	sd	x_m	min.	max.
FBG[g/l]	174	4,411	1,532	4,6	1,560	9,660
R			95% interval spoľahlivosti korelačného koeficientu			
0,1329			-0,2062		0,2804	

Legenda: n – počet pacientov, \bar{x} – aritmetický priemer, sd – smerodajná odchýlka, x_m – medián, min. – minimálna hodnota, max. – maximálna hodnota, R – neparametrický Spearmanov korelačný koeficient

Priemerná hodnota FBG bola ($4,411 \pm 1,532$ g/l). Medzi P-SEP a FBG štatistická analýza vykázala najmenej významnú závislosť ($R = 0,1329$) (Tab. 13, Obr. 15.).



Obr. 14. Scattergram distribúcie premenných FBG a P-SEP

Pri 39,1% boli hodnoty v norme. Len 2,3% malo koncentráciu FBG zvýšenú a až 58,6% malo hladinu FBG zvýšenú (Tab. 14).

Tab. 14 Porovnanie FBG s referenčným rozsahom

FBG [g/l]	Popisná štatistika				
	n	RH)	↓	↑	NH
	174	1,8 – 4,0	4(2,3%)	102(58,6%)	68(39,1%)

Legenda: n - počet pacientov, RH – referenčný rozsah, ↓ – zníženie oproti rozsahu, ↑ - zvýšenie oproti rozsahu, NH – normálne hodnoty

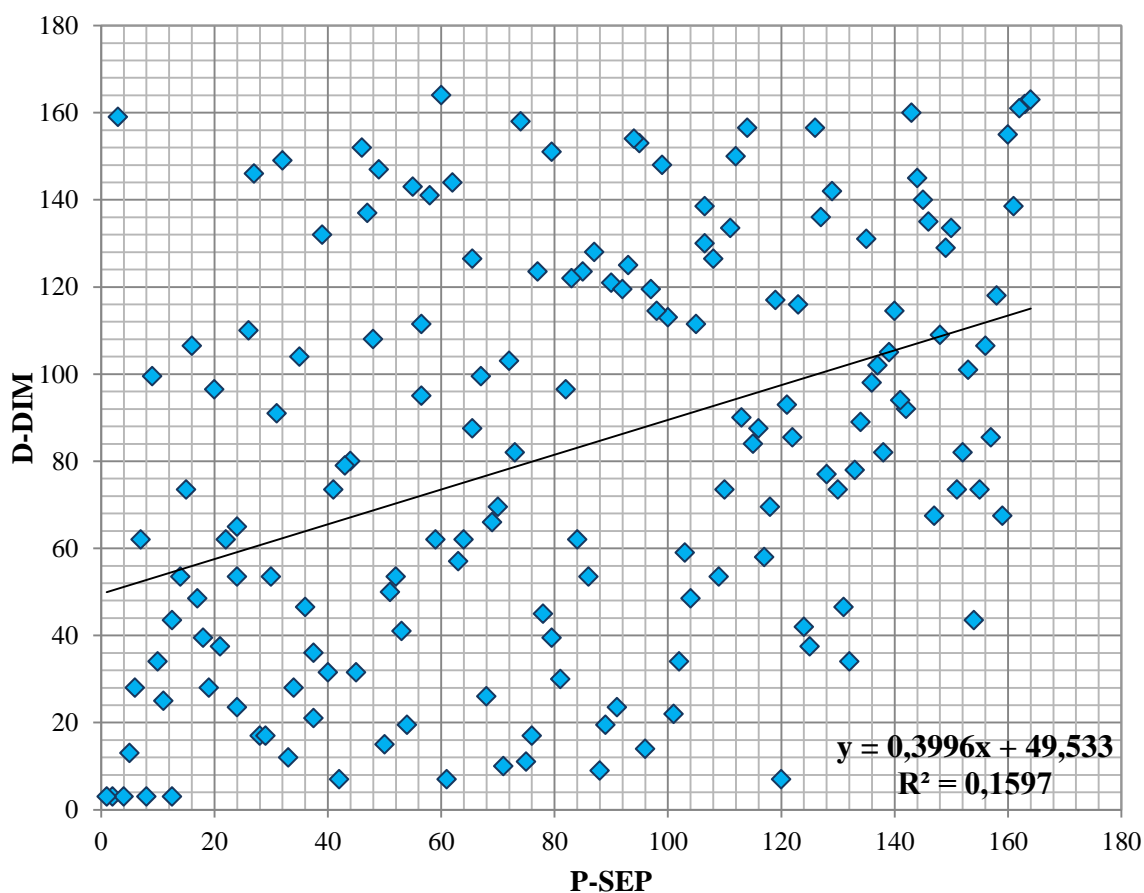
Ďalším parametrom podrobeným analýze a často využívaným na skrining je sérová koncentrácia D-DIM.

Tab. 15 Základná štatistická charakteristika a závislosť medzi P-SEP a D-DIM

Parameter	n	\bar{x}	sd	x_m	min.	max.
D-DIM [mg/l]	164	1,069	1,124	0,66	0,07	10,99
R			95% interval spoľahlivosti korelačného koeficientu			
0,3996			0,2582		0,5243	

Legenda: n – počet pacientov, \bar{x} – aritmetický priemer, sd – smerodajná odchýlka, x_m – medián, min. – minimálna hodnota, max. – maximálna hodnota, R – neparametrický Spearmanov korelačný koeficient

D-DIM vykazoval priemernú hodnotu ($1,069 \pm 1,124$ mg/l). Medzi P-SEP a D-DIM analýza neukázala významnú závislosť ($R = 0,3996$) (Tab. 15, Obr. 16.).



Obr. 15. Scattergram distribúcie premenných D-DIM a P-SEP

Štatisticky najviac, až 90,9% pacientov malo hodnoty zvýšené. Len 9,1% pacientov malo hodnoty v norme (Tab. 16).

Tab. 16 Porovnanie D-DIM s referenčným rozsahom

D-DIM [mg/l]	Popisná štatistika				
	n	RH	↓	↑	NH
	164	0,0 – 0,20	-	149(90,9%)	15(9,1%)

Legenda: n - počet pacientov, RH – referenčný rozsah, ↓ – zníženie oproti rozsahu, ↑ - zvýšenie oproti rozsahu, NH – normálne hodnoty

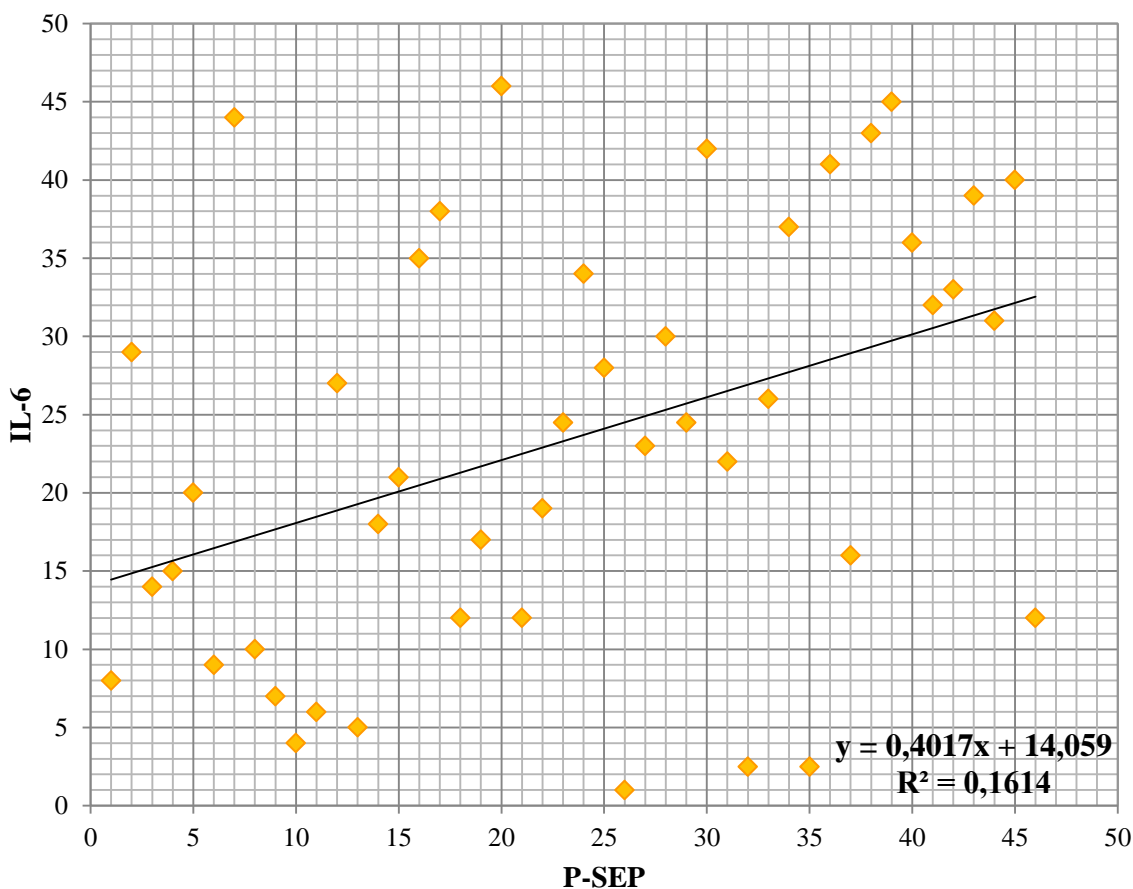
Štatistickú analýzu sme vykonali aj na cytokíne IL-6, ktorý je jedným z hlavných mediátorov zápalového procesu.

Tab. 17 Základná štatistická charakteristika a závislosť medzi P-SEP a IL-6

Parameter	n	\bar{x}	sd	x_m	min.	max.
IL-6[pg/ml]	46	281,376	1478,1	18,585	2,880	10050
R			95% interval spoľahlivosti korelačného koeficientu			
0,418			0,1174		0,6253	

Legenda: n – počet pacientov, \bar{x} – aritmetický priemer, sd – smerodajná odchýlka, x_m – medián, min. – minimálna hodnota, max. – maximálna hodnota, R – neparametrický Spearmanov korelačný koeficient

U IL-6 vykazovala priemerná hodnota ($281,376 \pm 1478,1$ pg/ml). Štatistická analýza vykázala miernu ale nevýznamnú závislosť ($R = 0,418$) (Tab. 17, Obr. 17.).



Obr. 16. Scattergram distribúcie premenných IL-6 a P-SEP

V referenčnom rozsahu malo normálne hodnoty 22% pacientov. Nad rozsah normálnych hodnôt malo koncentráciu IL-6 78% pacientov (Tab.18).

Tab. 18 Porovnanie IL-6 s referenčným rozsahom

IL-6 [pg/ml]	Popisná štatistika				
	n	RH	↓	↑	NH
	46	0,0 - 7	-	36(78%)	10(22%)

Legenda: n - počet pacientov, RH – referenčný rozsah, ↓ – zníženie oproti rozsahu, ↑ - zvýšenie oproti rozsahu, NH – normálne hodnoty

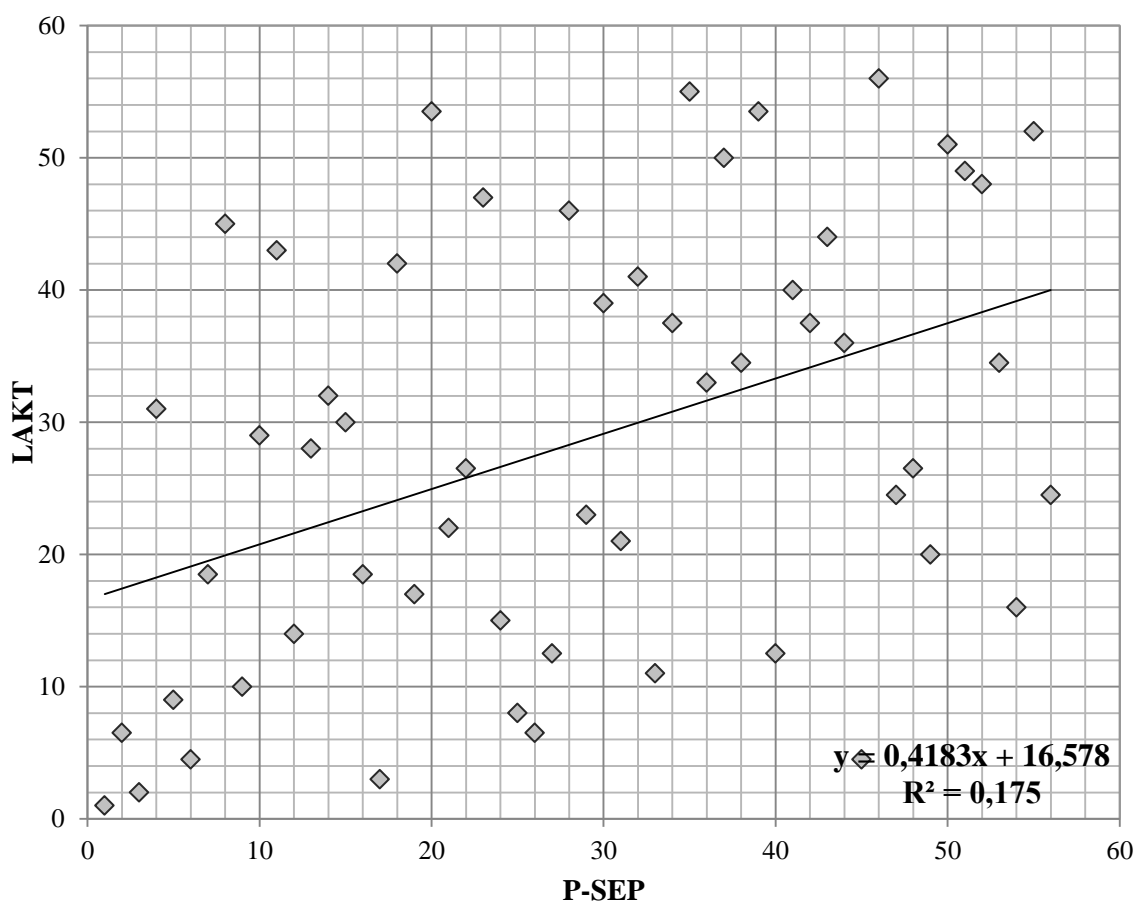
Posledným sledovaným parametrom predpovedajúcim vývin komplikácii je koncentrácia plazmatického LAKT.

Tab. 19 Základná štatistická charakteristika a závislosť medzi P-SEP a LAKT

Parameter	n	\bar{x}	sd	x_m	min.	max.
LAKT[mmol/l]	56	2,61	3,87	1,515	0,52	22,0
R			95% interval spoľahlivosti korelačného koeficientu			
0,4184			0,1669		0,6188	

Legenda: n – počet pacientov, \bar{x} – aritmetický priemer, sd – smerodajná odchýlka, x_m – medián, min. – minimálna hodnota, max. – maximálna hodnota, R – neparametrický Spearmanov korelačný koeficient

Priemerná hodnota LAKT bola ($2,61 \pm 3,87$ mmol/l). Štatistická analýza vykázala hraničnú závislosť ($R = 0,4184$) (Tab. 19, Obr. 18.).



Obr. 17. Scattergram distribúcie premenných LAKT a P-SEP

Hodnoty LAKT boli u 75% pacientov v normále. Len 25% pacientov malo hodnoty zvýšené (Tab. 20).

Tab. 20 Porovnanie LAKT s referenčným rozsahom

LAKT [mmol/l]	Popisná štatistika				
	n	RH	↓	↑	NH
	56	0,5- 2,2	-	14(25%)	42(75%)

Legenda: n - počet pacientov, RH – referenčný rozsah, ↓ – zníženie oproti rozsahu, ↑ - zvýšenie oproti rozsahu, NH – normálne hodnoty

7.2 POROVNANIE PARAMETROV PODĽA SKUPÍN

Výberový súbor tvorený 697 pacientmi sme rozdelili na štyri podsúbory podľa primárnej diagnózy. Výsledkom je podsúbor pacientov s nádorovými ochoreniami (ONKO), kardiovaskulárnymi ochoreniami (KARDIO) a metabolickými ochoreniami (METAB). Posledným podsúborom bol súbor tvorený pacientmi s infekčnými chorobami (INFEKT).

Vo všetkých podsúboroch sme zhodnotili základné štatistické parametre P-SEP, CRP, PCT, WBC a FBG (Tab. 21). Následne sme rozdiely v sledovaných parametroch medzi podsúbormi testovali neparametrickým Kruskal - Wallisovým testom a Dunnovým testom pre jednotlivé dvojice podsúborov pacientov (Tab. 22 - 26).

Tab. 21 Základná štatistická charakteristika testovaných parametrov

Parameter	Podsúbor	n	\bar{x}	sd	x_m	min.	max.
P-SEP [pg/ml]	O	62	257,33	300,67	140	53,3	1971
	K	37	572,91	563,63	341	133	2693
	M	26	874,85	706,01	656	162	2711
	I	51	1201,58	1423,2	754	87,5	6375
CRP [mg/l]	O	62	27,89	56,96	3,57	0,02	224,36
	K	37	62,40	56,19	43,53	0,27	181,6
	M	26	117,39	110,05	75,63	5,516	348,67
	I	51	99,77	57,12	109,1	0,452	195,3
PCT [ng/ml]	O	54	1,1875	6,121	0,0575	0,02	42,9
	K	27	3,404	6,988	0,353	0,021	29,31
	M	21	8,905	38,633	0,275	0,083	177,50
	I	32	5,265	13,210	0,341	0,032	55,66
WBC [10 ⁹ /l]	O	58	8,330	3,850	7,210	2,340	24,25
	K	37	10,404	3,909	9,700	4,130	24,54
	M	26	13,402	5,178	12,625	5,730	25,40
	I	51	13,934	6,682	12,800	3,500	32,600
FBG [g/l]	O	8	4,028	1,606	3,465	2,250	6,080
	K	19	4,607	1,000	4,740	2,240	6,290
	M	11	4,895	0,854	5,160	2,550	5,720
	I	24	4,563	1,411	4,335	2,530	7,880

Legenda: n – počet pacientov, \bar{x} – aritmetický priemer, sd – smerodajná odchýlka, x_m – medián, min. – minimálna hodnota, max. – maximálna hodnota. Podsúbory pacientov: O – nádorové ochorenia, K – kardiovaskulárne ochorenia, M – metabolické ochorenia, I – infekčné choroby

Rozdiely v koncentráciách P-SEP medzi testovanými podsúbormi sú štatisticky extrémne významné ($p < 0,001$) (Tab. 22). Najnižšie hodnoty nachádzame u pacientov s nádorovými ochoreniami. Vzájomné rozdiely u pacientov s kardiovaskulárnymi, metabolickými a infekčnými ochoreniami boli obdobné (Dunnov test; $p > 0,05$), teda štatisticky nesignifikantné. Výrazne sa však odlišovali od predošlých podsúborov pacientov s nádorovými chorobami (Tab. 21).

Tab. 22 P-SEP – testovanie podsúborov pacientov

Podsúbor	Štatistické testovanie			Dunnov test				
	n	x	p		O	K	M	I
O	62	140	<0,001	O		***	***	***
K	37	341		K	***		ns	ns
M	26	656		M	***	ns		ns
I	51	754		I	***	ns	ns	

Legenda: n – počet pacientov, \bar{x} – aritmetický priemer, p-hodnota testovacieho kritéria Kruskal-Wallisovho testu. p-hodnoty testovacieho kritéria Dunnovho testu: *** - $p < 0,001$; ** - $p < 0,01$; * - $p < 0,05$; ns - $p > 0,05$.

Obdobnú schému vzťahov sme zistili pri testovaní rozdielov v koncentrácii CRP (Tab. 23), kde je vidieť významné korelácie medzi pacientmi s onkologickými diagnózami a ostatnými skupinami.

Tab. 23 CRP – testovanie podsúborov pacientov

Podsúbor	Štatistické testovanie			Dunnov test				
	n	x	p		O	K	M	I
O	62	3,57	<0,001	O		**	***	***
K	37	43,53		K	**		ns	ns
M	26	75,63		M	***	ns		ns
I	51	109,1		I	***	ns	ns	

Legenda: n – počet pacientov, \bar{x} – aritmetický priemer, p-hodnota testovacieho kritéria Kruskal-Wallisovho testu. P-hodnoty testovacieho kritéria Dunnovho testu: *** - $p < 0,001$; ** - $p < 0,01$; * - $p < 0,05$; ns - $p > 0,05$.

Medzi podsúborami ochorení sa testoval vzájomný vzťah PCT (Tab. 24) s diagnózami.

Tab. 24 PCT - testovanie podsúborov pacientov

Podsúbor	Štatistické testovanie			Dunnov test				
	n	x	p		O	K	M	I
O	54	0,058	<0,001	O		***	***	***
K	27	0,353		K	***		ns	ns
M	21	0,275		M	***	ns		ns
I	32	0,341		I	***	ns	ns	

Legenda: n – počet pacientov, \bar{x} – aritmetický priemer, p-hodnota testovacieho kritéria Kruskal-Wallisovho testu. p-hodnoty testovacieho kritéria Dunnovho testu: *** - $p < 0,001$; ** - $p < 0,01$; * - $p < 0,05$; ns - $p > 0,05$.

V priemerných hodnotách vykazujú podskupiny normálne hodnoty, tie však nehovoria o prítomnosti či neprítomnosti septických komplikácií (Tab. 24).

Tab. 25 WBC - testovanie podsúborov pacientov

Podsúbor	Štatistické testovanie			Dunnov test				
	n	x	p		O	K	M	I
O	58	7,210	<0,001	O		*	***	***
K	37	9,700		K	*		ns	ns
M	26	12,625		M	***	ns		ns
I	51	12,800		I	***	ns	ns	

Legenda: n – počet pacientov, \bar{x} – aritmetický priemer, p-hodnota testovacieho kritéria Kruskal-Wallisovho testu. p-hodnoty testovacieho kritéria Dunnovho testu: *** - $p < 0,001$; ** - $p < 0,01$; * - $p < 0,05$; ns - $p > 0,05$.

Pri testovaní počtu WBC medzi podsúbormi (Tab. 25) sme našli štatisticky významné rozdiely len u pacientov s nádorovými ochoreniami.

Tab. 26 FBG - testovanie podsúborov pacientov

Podsúbor	Štatistické testovanie			Dunnov test				
	n	x	p		O	K	M	I
O	8	3,465	0,42	O		ns	ns	ns
K	19	4,740		K	ns		ns	ns
M	11	5,160		M	ns	ns		ns
I	24	4,335		I	ns	ns	ns	

Legenda: n – počet pacientov, \bar{x} – aritmetický priemer, p-hodnota testovacieho kritéria Kruskal-Wallisovho testu. p-hodnoty testovacieho kritéria Dunnovho testu: *** - $p < 0,001$; ** - $p < 0,01$; * - $p < 0,05$; ns - $p > 0,05$.

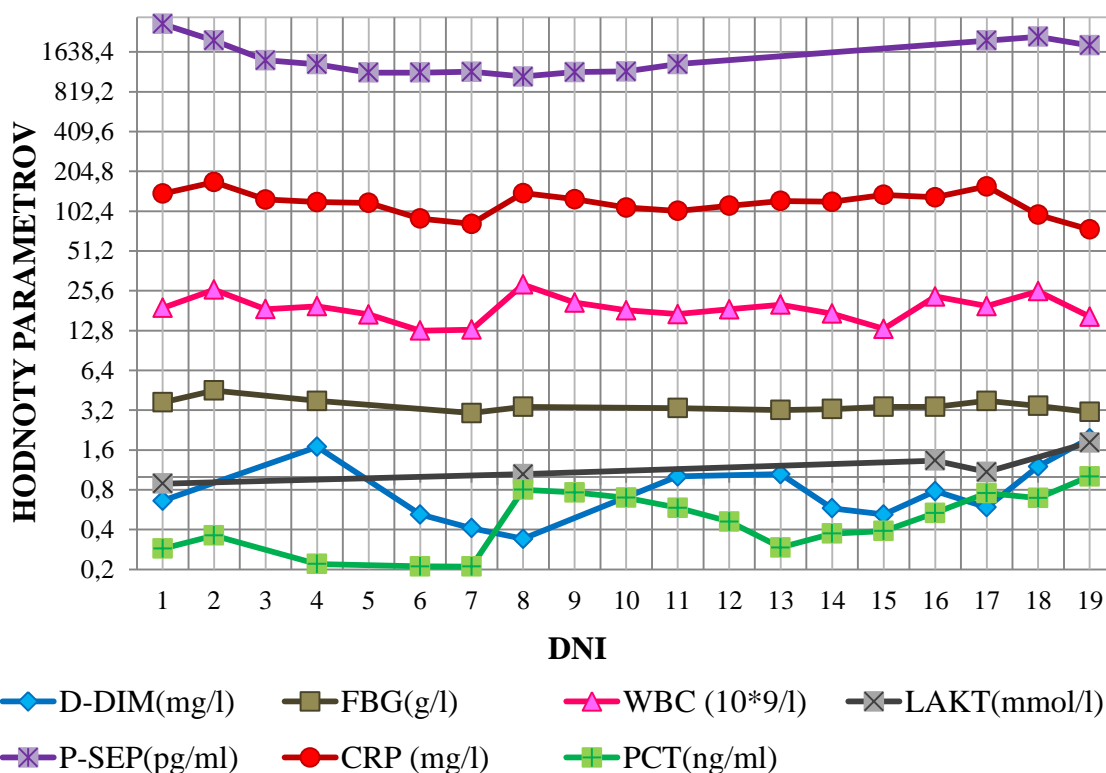
Vzhľadom ku koncentrácii FBG sme nezistili žiadne signifikantné rozdiely medzi sledovanými podsúbormi pacientov (Tab. 26; $p = 0,42$).

7.3 POROVNANIE PARAMETROV NA KAZUISTIKÁCH

Pacient 1.

73 - ročný pacient začal začiatkom roka navštevovať internú ambulanciu z dôvodu aterosklerózy končatinových artérií. Nasadená liečba nebola dostatočne kompenzovaná a pacienta pre pretrvávajúce ťažkosti a zhoršujúci sa stav bolo nutné hospitalizovať.

Počas hospitalizácie na internom oddelení došlo u pacienta k rozvoju lokálnej infekcie kože a podkožného tkaniva (L08.8), ktorá sa rozvinula po chirurgickom zákroku v súvislosti s aterosklerózou. Pacient mal mierne zvýšený prokalcitonín (PCT = 0,287 ng/ml) a trojnásobne zvýšenú hladinu D - dimérov (D-DIM = 0,66 mg/l) oproti normálnym hodnotám. Hladina laktátu (LAKT = 0,89mmol/l) a fibrinogénu (FBG = 3,67 g/l) však bola v norme. Radikálne zvýšenie bolo pozorované u C – Reaktívneho proteínu (CRP = 139,1 mg/l) a v počte bielych krviniek (WBC = $19 \times 10^9/l$). Sérová koncentrácia presepsínu naznačovala, že sa u pacienta rozvíja septický stav (P-SEP=2669pg/ml).



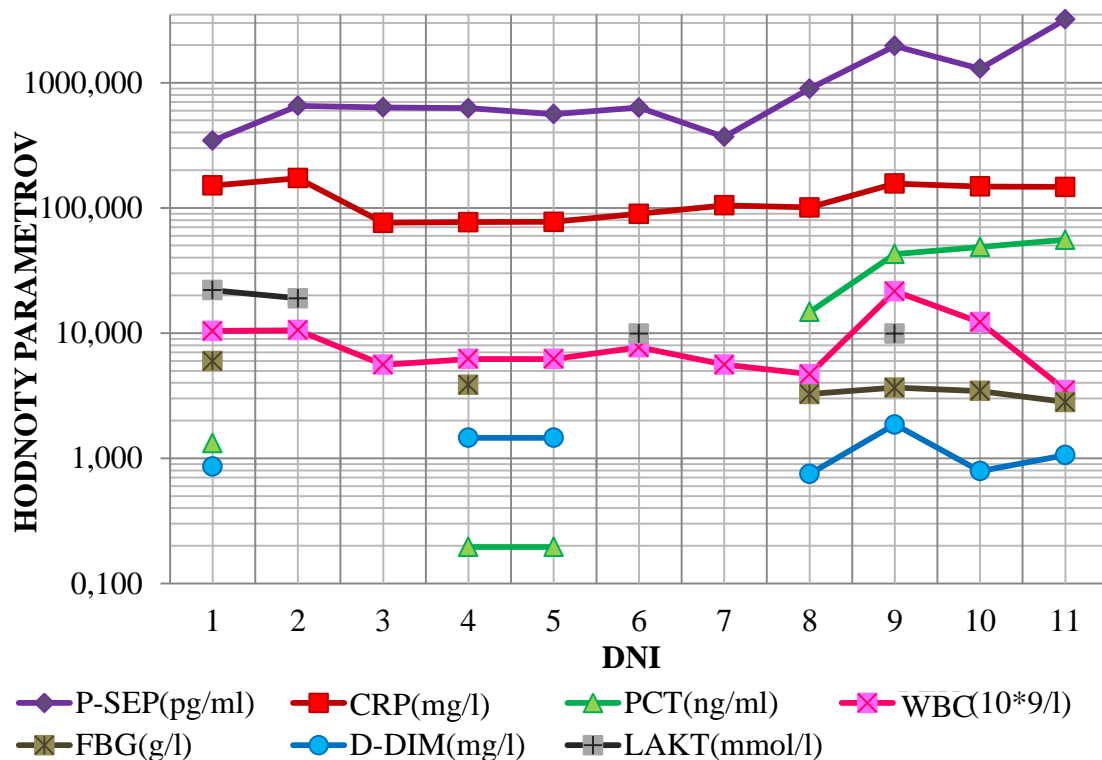
Obr. 18. Rozvoj parametrov v priebehu sledovania

Pacient bol preložený na jednotku intenzívnej starostlivosti a bola mu nasadená medikamentózna terapia. Jeho stav sa stabilizoval. Po siedmich dňoch došlo k relapsu

a jeho stav sa začal rapídne zhoršovať. Koncentrácia PCT (PCT = 0,20ng/ml) a FBG (FBG = 3,04g/l) bola v norme, zatiaľ čo ostatné parametre vykazovali vysoké koncentrácie. Aj napriek terapii u neho došlo v osemnásty deň k ARDS a následnému respiračnému zlyhaniu. Pacient bol napojený na ventiláciu. Na devätnásty deň bol pacient prevezený na OAIM do iného pracoviska, preto sme nemali možnosť ho sledovať a ďalšie záznamy chýbajú.

Pacient 2.

Po resekcii časti hrubého čreva, kvôli zhubnému nádoru, na chirurgickom oddelení bola na jednotku intenzívnej starostlivosti preložená 77 - ročná žena. Výsledky z prvého dňa naznačovali rozvoj septických komplikácií v prípade hladiny CRP, PCT, LAKT, ale v prípade P-SEP nie (P-SEP = 344 pg/ml, CRP = 151 mg/l, LAKT = 22 mmol/l, PCT = 1,02 ng/ml, FBG = 5,97 g/l, D-DIM = 0,86 mg/l). Namerané bolo aj mierne zvýšené množstvo WBC (WBC = $10,4 \times 10^9/l$). Po nasadení ATB liečby sa stav stabilizoval.



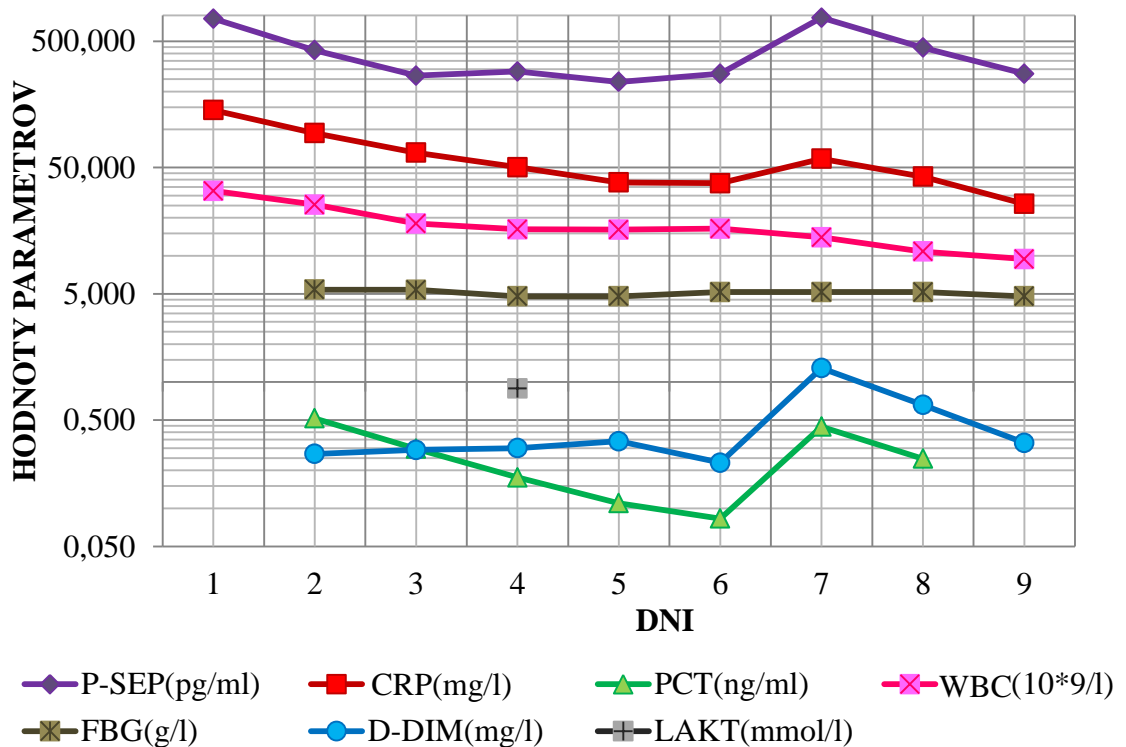
Obr. 19. Rozvoj parametrov v priebehu sledovania

Na ôsmy deň došlo k rozšíreniu infekcie z resekčnej hrany do brušnej dutiny a rozvinula sa ťažká bakteriálna sepsa potvrdená pozitívnou hemokultúrou. Pacientka

bola preložená na OAIM na intenzifikovanú liečebnú terapiu, no na jedenásty deň exituje.

Pacient 3

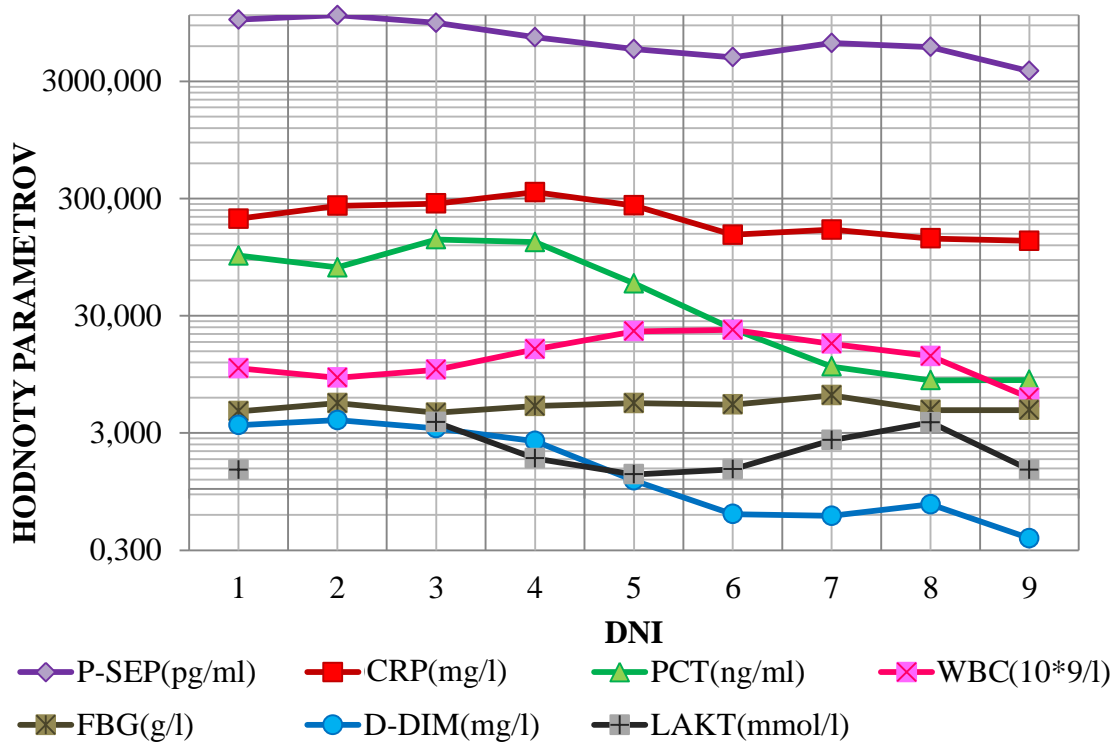
66 - ročný muž, s diabetom nezávislým od inzulínu, po amputácii prstov na dolnej končatine, kvôli diabetickej neuropatii bol po chirurgickom zákroku z chirurgického oddelenia pre rozvíjajúcu sa leukocytózu ($WBC = 32,6 \times 10^9/l$) preložený na jednotku intenzívnej starostlivosti. Namerané hodnoty P-SEP a CRP vykazovali zvýšenú hladinu (P-SEP = 754 pg/ml, CRP = 142,4 mg/l). Jeho stav sa mierne zlepšoval no na šiesty deň sa u neho rozvinula generalizovaná infekcia podkožia s následným septickým stavom. Hladiny P-SEP, PCT a CRP prudko elevovali (P-SEP = 276 pg/ml na P-SEP = 768 pg/ml; PCT = 0,083 ng/ml na PCT = 0,443 ng/ml; CRP = 37,52 mg/l na CRP = 58,571 mg/l). Z hematologických parametrov sa koncentrácia D-DIM zvýšila (D-DIM = 0,230 mg/l na D-DIM = 1,29 mg/l) a hladina WBC a FBG sa naopak znížila ($WBC = 14 \times 10^9/l$; FBG = 5,16 g/l). Pacienta sa podarilo stabilizovať a bol preložený na iné oddelenie.



Obr. 20. Rozvoj parametrov v priebehu sledovania

Pacient 4

Na jednotku urgentnej medicíny sa dostavila 48 - ročná žena so silnými bolesťami brucha. Počas vyšetrenia lekárom bola zistená zvýšená teplota a rezistencia s miernym opuchom v oblasti žalúdka a podžalúdkovej žľazy. Laboratórne jej bol zistený akútny zápal podžalúdkovej žľazy (lipáza = 13,93 μ kat/l; amyláza = 3,91 μ kat/l) a hodnoty zápalových markerov poukazovali na rozvoj septického stavu (P-SEP = 10003 pg/ml, CRP = 260 mg/l, PCT = 77,59 ng/ml). Súčasne bol zistený aj akútny zápal obličiek (kreatinín = 1434 μ mol/l, močovina = 38,5 mmol/l - meranie kreatinínu bolo kvôli vylúčeniu falošnej pozitivity viacnásobne kontrolované) a bola prostredníctvom pozitívnej hemokultúry potvrdená sepsa. Hladina FBG bola mierne zvýšená (FBG = 5,39 g/l). Pacientke bola ordinovaná antibiotická terapia, na ktorú dobre reagovala a dochádzalo k postupnému poklesu všetkých parametrov (P-SEP = 3686 pg/ml, PCT = 8,51 ng/ml). Pacientka bola kvôli dialýze preložená na iné pracovisko, a preto ju nebolo možné ďalej monitorovať.



Obr. 21. Rozvoj parametrov v priebehu sledovania

8 DISKUSIA

V predkladanej práci sme sa zamerali na stanovenie vybraných biochemických parametrov a ich diagnostické a prognostické hodnoty u septických stavov v monitorovaní ochorenia. V súbore 697 pacientov pozostávajúcem z 383 mužov a 314 žien, hospitalizovaných v dôsledku rozvoja septických komplikácií, sme v priebehu 22 mesiacov sledovali markery: P-SEP, PCT, CRP, IL-6, LAKT, D-DIM, FBG a WBC. Z pôvodného základného súboru 57344 pacientov sme ich vyčlenili na základe splnených kritérií septického stavu vyplývajúcich z teoretickej časti diplomovej práce. Pre hodnotnejšiu analýzu sme museli vynechať aj pacientov, ktorí mali merané menej ako tri parametre súčasne.

Analýza vekovej štruktúry a rozdelenia medzi pohlaviami daného výberového súboru poukázala, že medzi mužmi a ženami nie je významný vekový rozdiel. Kvôli rovnomernej distribúcii oboch pohlaví sme si však toto tvrdenie overili aj t - testom, ktorý naše predpoklady podporil. Keďže dané pracovisko nedisponuje novorodeneckým a detským oddelením, v našom súbore pacienti s vekom pod 18 rokov nefigurovali. Aj napriek tomu je možné tvrdiť, že septické ochorenia sa vyskytujú v približne rovnakej miere medzi mužmi aj ženami a postihujú všetky vekové kategórie. Často sa vyskytujú u polymorbídnych pacientov so zlou kompenzáciou primárneho ochorenia, alebo u imunosuprimovaných pacientov, čo je možné pozorovať na charakteristike výberového súboru, v porovnaní diagnóz a kazuistikách. Nami zistené tvrdenia sa zhodujú aj s literárnymi zdrojmi (Chen et al., 2014).

Namerané hodnoty sme porovnávali voči referenčným intervalom. Pri porovnávaní parametrov sme kládli dôraz na to, aby bolo možné výsledky štatistických analýz aplikovať priamo v klinických pracoviskách, preto sme pri vyhodnocovaní boli obozretní a brali sme ohľad aj na dané skupiny pacientov. Najšpecifickejším a najsenzitívnejším markerom septických stavov spomedzi nami stanovovaných parametrov je podľa našich zistení, ale aj viacerých publikácií, presepsín (P-SEP) (Spanuth et al., 2011 ; Agilli et al., 2012 ; Caironi et al., 2013). Je to logické, keďže k jeho uvoľňovaniu dochádza ihneď po kontakte makrofágov so spúšťačom patologickej odpovede a jeho sérová hladina v odpovedi na tieto stimuly stúpa. P-SEP bol meraný u všetkých parametrov a mal rovnomernú distribúciu hodnôt v porovnaní s referenčnými hodnotami, preto sme si ho zvolili za hlavný porovnávací parameter. Prostredníctvom neho sme sledovali vzájomné vzťahy medzi ostatnými sledovanými

parametrami.

Analyzovaním vzájomných vzťahov medzi P-SEP a CRP sme zistili ich signifikantnú koreláciu, ktorá sa pohybovala na úrovni $R = 0,7025$. So zvyšujúcou sa sérovou koncentráciou P-SEP stúpala aj hladina CRP. Jeho hodnoty však boli v porovnaní s normálnymi hodnotami zvýšené u 20% pacientov viac než u P-SEP, čo je možné spájať aj s inými ako len septickými príčinami. Syntézu CRP v bunkách pečeneňového parenchýmu reguluje viacero faktorov, ktoré sa uvoľňujú aj pri nádorových ochoreniach, ischemických dysreguláciách a ďalších patologických stavoch vyskytujúcich sa aj u pacientov v našom výberovom súbore.

Ešte vyššia závislosť ($R = 0,7618$) bola pozorovaná medzi P-SEP a PCT. Gilbert zdokumentoval, že hladiny PCT sú uvoľňované už do dvoch až štyroch hodín od patologického kontaktu, podobne ako P-SEP, z parenchymálnych tkanív a jeho expresia sa znižuje iba u vírusových infekcií (Gilbert, 2010). K zvýšeniu hodnôt PCT nad referenčný rozsah došlo u 22% pacientov, u ktorých sa aj neskôr prejavili ťažšie septické komplikácie. 78% pacientov malo hodnoty PCT v norme.

Medzi P-SEP a množstvom WBC sme pozorovali miernu, menej významnú závislosť ($R = 0,3772$), čo však mohlo byť spôsobené intraindividuálnou variabilitou a výberovými charakteristikami súboru, ktoré mohli skresliť výsledky štatistickej analýzy. Vo viacerých štúdiách boli pozorované významné korelácie medzi P-SEP a počtom WBC (Vodnik et al., 2013 ; Madencia et al., 2014). Počet WBC je jedným zo základných faktorov pri posudzovaní septického stavu, no len na základe jeho hodnôt nie je možné posúdiť celkový vývin septického ochorenia, keďže v našom súbore až 55,6% pacientov malo hodnoty v norme aj napriek septickým komplikáciám. Perspektívne by bolo vhodné porovnať hodnoty P-SEP s jednotlivými leukocytárnymi radami, ktoré by mohli presnejšie vykazovať celkový stav pacientov.

Najnižšiu závislosť spomedzi sledovaných parametrov vykazovala koncentrácia FBG ($R = 0,1329$). Ku koagulačným abnormalitám dochádza pomerne často u pacientov so septickými komplikáciami (Levi, Opal, 2006). Zvyšuje sa tým aj konzumpcia fibrinogénu, no nie u všetkých pacientov v rovnakej miere. Práve to mohlo byť príčinou zvýšenej variability a štatistickej nevýznamnosti sledovaného parametra. Zvýšená expresia FBG bola pozorovaná u 58,6% pacientov zatiaľ čo u 2,3% došlo k zníženiu koncentrácie. Aj pri kazuistikách je možné všimnúť si oneskorenú interakciu FBG oproti vývoju ochorenia a ostatným parametrom.

Mierna štatistická závislosť nám vyšla v porovnaní koncentrácií P-SEP s D-DIM

($R = 0,3996$). Menší počet pacientov s vyšetrovaným D-DIM ($n = 164$) mohol výslednú hodnotu nepatrne skresliť, ale aj napriek tomuto faktoru sme potvrdili lepšiu diagnostickú citlivosť P-SEP, ktorá je uvádzaná aj v ostatných literárnych zdrojoch (Ishikura et al., 2014 ; Agilli et al., 2012 ; Goebel et al., 2010). U 90,6% pacientov bolo zaznamenané zvýšenie koncentrácie D-DIM oproti referenčným hodnotám. Vysoké hodnoty D-DIM upozorňujú na možné koagulopatické komplikácie, ktoré môžu v konečnom dôsledku znižovať prežívanie pacientov a zvyšovať septické komplikácie.

Vysoká variabilita a nízky počet sledovanej premennej vo výberovom súbore ($n = 46$) nám neumožňuje validnejšie posúdenie vzájomných vzťahov medzi IL-6 a P-SEP hoci je medzi sledovanými parametrami mierna závislosť ($R = 0,418$). IL-6 je hlavným mediátorom spúšťajúcim produkciu zápalových reaktantov a signalizujúcich odpoveď organizmu na priebeh septických stavov. Zo skúmanej selekcie malo 78% pacientov koncentráciu IL-6 nad normálom, vykazovali silnú mediáciu v prebiehajúcim zápalovom procese.

Posledným porovnávaným parametrom, ktorý je zaradený aj do diagnostických kritérií posudzovania septického stavu je koncentrácia LAKT. Mierna korelácia ($R = 0,4184$) poukazuje na fakt, že pri zvýšení hladín P-SEP nemusí vždy dochádzať aj k zvýšeniu hladín LAKT. Inými slovami, pri rozvoji zápalových procesov počas septických stavov nemusí vždy dôjsť aj k rozvoju zníženej perfúzie a hypoxie tkanív, ktorá by aktivizovala mechanizmy anaeróbneho získavania energie. Väčšina pacientov (75%) vykazovala hladinu laktátu v rozsahu normálnych hodnôt.

V ďalšom kroku sme rozdelili pacientov podľa ich počiatočných diagnóz. Po štatistickej analýze sme pri porovnávaní koncentrácie P-SEP v jednotlivých skupinách zistili významné štatistické rozdiely medzi skupinou pacientov s onkologickou diagnózou a ostatnými diagnózami. Pacienti s nádorovými ochoreniami mali v priemere nižšie hodnoty P-SEP než iné skupiny. Príčin zníženej koncentrácie P-SEP môže byť hneď niekoľko, nakoľko títo pacienti podstupovali chemoterapeutickú alebo rádiologickú liečbu, ktorá mohla mať vplyv na uvoľňovanie P-SEP z povrchu bunkových membrán a na procesy zapojené do expresie a syntézy tohto faktora. Najvýraznejšie zvýšenie bolo pozorované u pacientov s infekčnými chorobami. U týchto pacientov je priama súvislosť medzi septickým stavom a vyvolávateľom ochorenia.

Obdobné výsledky analýzy boli pozorované aj pri sérovej koncentrácii CRP. Najnižšie hodnoty sme sledovali u onkologických pacientov. Najvyššie priemerné

hodnoty vykazovali pacienti s metabolickými ochoreniami čo mohlo byť spôsobené hyperreaktivitou imunitného systému v súvislosti s primárnou diagnózou.

Aj pri koncentrácii PCT u nádorových ochorení boli hodnoty diametrálne odlišné oproti ostatným diagnózam. Nízke hladiny sledovaných parametrov neodzrkadľovali celkový stav pacientov, preto je u nádorových ochorení potrebné opatrne pristupovať k interpretácii výsledkov a akékoľvek odchýlky v dynamike rozvoja sledovaných markerov posudzovať s nasadenou liečebnou terapiou.

V počte WBC boli pozorované významné rozdiely len u pacientov s diagnostikovanými novotvarmi v porovnaní s ostatnými podskupinami. Tieto rozdiely vznikli pravdepodobne vplyvom agresívnej protinádorovej terapie, ktorá znížila množstvo leukocytov. U takto imunosuprimovaných pacientov sa generalizovaný septický stav rozvinie omnoho skôr a v konečnom dôsledku môže pri nesprávnej kompenzácii celkového stavu mať fatálne následky.

Pri hladinách FBG sme medzi danými skupinami nepozorovali významný rozdiel. Malý počet pacientov a veľká heterogenita výsledných hodnôt mohli tieto závery ovplyvniť, a preto nie je možné z týchto výsledkov vyvodzovať akékoľvek závery v súvislosti s diagnózami a septickým stavom.

U koncentrácií D-DIM, IL-6 a LAKT nám malý počet meraní v jednotlivých diagnózach znemožnil vykonať štatistickú analýzu.

Na prezentácii kazuistík štyroch pacientov sa nám potvrdili zistenia našej štatistickej analýzy. Na posúdenie priebehu a vyvodenie prognózy septického stavu je nutná komplexná biochemická analýza a nedá sa spoliehať len na výsledné hodnoty jedného parametra.

9 ZÁVER

Diagnostikovať sepsu len na základe biochemických markerov nie je z hľadiska výpovednej hodnoty pre stanovenie sepsy a ani kompletnosti údajov správne. Je to však účinná metóda pri monitorovaní vývoja a predpovede pre možné komplikácie, ktoré sa môžu vyskytnúť počas hospitalizácie. V našej práci sme porovnávali parametre, ktoré sa dnes už na rutinnej báze využívajú vo viacerých nemocniciach. Existuje celý rad ďalších parametrov, no tie nemajú vzhľadom na ich vysokú ekonomickú náročnosť, problematickú interpretáciu, či prístrojovo náročné a zdĺhavé stanovovanie veľké uplatnenie. Lekári musia často balansovať medzi výpovednou hodnotou týchto parametrov a faktom, či im tieto parametre v súvislosti s danou diagnózou poisťovňa preplatí.

V monitorovaní septických stavov a pri stratifikácii pacientov je potrebné vychádzať z komplexnej analýzy vyšetrení a biochemických ukazovateľov a vhodne ich kombinovať. Snažili sme sa teoreticky zhrnúť základné poznatky o najbežnejšie stanovovaných markeroch a doplniť teoretické portfólio o ich interakcie a deje vedúce k vzniku septických komplikácií. Vývoj septického stavu ovplyvňuje mnoho interakcií a je preto potrebné vychádzať z dynamiky rozvoja a sledovania trendu stanovovaných parametrov. Fakt, že zápalové procesy prebiehajúce počas rozvoja septických stavov nie sú úplne do detailov preskúmané, však ešte stále dáva nádej na objavenie nových potenciálnych markerov.

10 ZOZNAM SKRATIEK

APACHE II	hodnotenie akútnej fyziológie a chronického zdravia (acute physiology and chronic health evaluation)
ARDS	syndróm akútnej respiračnej tiesne (acute respiration distress syndrome)
BCR	B – bunkový receptor (B - cell receptor)
CALC-1	s kalcitonínom spojený gén (calcitonine related gene)
CARS	system protizápalovej odpovede (Counter inflammatory response system)
CD11b/CD18	povrchové znaky 11b a 18 (cluster of differentiation)
CD14	povrchový znak 14
CRP	C - reaktívny proteín
DAMP's	s poškodením asociované povrchové znaky (damage-associated mollecular patterns)
D-DIM	D-diméry
DIC	diseminovaná intravaskulárna koagulopatia
EC	epiteliálne bunky (epithel cells)
ECLIA	elektrochemiluminiscenčná imunoanalýza (Electro-chemiluminescence immunoassay)
EDTA	etyléndiaminotetraoctová kyselina
FBG	fibrinogén
IL-4	interleukín 4
IL-6	interleukín 6
IL-8	interleukín 8
IL-10	interleukín 10
IL-12	interleukín 12
IL-1 β	interleukín 1 β
INFEKT	pacienti s infekčnými diagnózami
I κ B α	inhibítor nukleárneho faktora κ B α
JAK	Janusova kináza
KARDIO	pacienti s kardiovaskulárnymi diagnózami
LAKT	laktát
LOD	laktát oxidáza

LPB	peroxidáza
LPS	lipopolysacharidy
METAB	pacienti s metabolickou diagnózou
MHC3	hlavný histokompatibilný komplex
MKCH10	medzinárodná klasifikácia chorôb 10. vydanie
MKCH-10-SK-2013	medzinárodná klasifikácia chorôb upravená v roku 2013 podľa Slovenskej lekárskej spoločnosti
MODS	syndróm mnohonásobnej orgánovej dysfunkcie (multiple organ dysfunction syndrome)
NF- κ B	nukleárny faktor κ B
OAIM	oddelenie anestéziológie a intenzívnej medicíny
OKBaH	oddelenie klinickej biochémie a hematológie
ONKO	pacienti s onkologickou diagnózou
ONOO ⁻	peroxynitrit
P.I.R.O	system monitorovania predispozície, infekcie, odpovede a orgánového zlyhávania (predisposition, infection, response and organ failure system)
PAF	doštičky aktivujúci faktor (platelet-activating factor)
PAMP's	s patogénom asociované povrchové molekulárne znaky (pathogen-associated mollecular patterns)
PCT	prokalcitonín
PMN's	polymorfonukleárne leukocyty
POD	peroxidáza
PRR	receptor rozoznávajúci vzory (pattern recognition receptor)
P-SEP	presepsín
ROS	reaktívne kyslíkové formy (reactive oxygen species)
sCD14-ST	solubilný podtyp povrchového znaku 14
SIRS	syndróm systémovej zápalovej odpovede (systematic inflammatory response syndrome)
SOCS3	faktor tlmiaci cytokínovú signalizáciu 3 (suppresor of cytokine signaling - SOCS3)
SOFA	sekvenčné posudzovanie orgánového zlyhávania (sequential organ failure asesment)

STAT3	Signálový prenášač a aktivátor transkripcie 3 (Signal transducer and activator of transcription 3)
TCR	T – bunkový receptor (T – cell receptor)
Th	T pomocný lymfocyt (T helper lymphocyte)
TNF α	faktor nekrotizujúci tumory α (tumor necrosis factor α)
WBC	počet bielych krviniek (white blood cell count)
WHO	Svetová zdravotnícka organizácia (World health organization)

11 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

Agilli, M., Sener, I., Yesildal, F., Honca, T., et al. : „A new marker for the diagnosis of sepsis: Presepsin.“ *J Investig Biochem*, 2012, 1(1), s.55-57;

doi:10.5455/jib.20120521073837

Akbaraly, T., Hamer, M., Ferrie, J., et al. „Chronic inflammation as a determinant of future aging phenotypes.“ *CMAJ*, 2013, 185(16) ; doi:10.1503/cmaj.122072

Althaus, H., Hauser, H. „Human procalcitonin and the preparation and use thereof.“ 2005 pat. n: 6905687 ; [online] http://www.rcsb.org/pdb/images/2jxz_bio_r_250.jpg

Arnold, Ch., Whyte, C., et al. „A critical role for suppressor of cytokine signalling 3 in promoting M1 macrophage activation and function in vitro and in vivo.“ *Immunology*, 2013, 141, s.96–110

Blomkalns, A. „Lactate – a marker for sepsis and trauma.“ *emcreg*, 2007

Bone, C., Balk, A.; Cerra, B.; Dellinger, P.; Fein, M.; Knaus, A.; et al. „Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine.“ 1992, 101(6), s.1644-1655

Bozza, F., Salluh, J., Japiassu, A., Soares, M., Assis, E., et al. „Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis.“ *Critical Care*, 2007, 11(49); doi:10.1186/cc5783

Bradley, J. „TNF-mediated inflammatory disease.“ *J Pathol*, 2008, 214(1), s.149–160; doi:10.1002/path.2287

Buc, M. *Imunológia*. Bratislava: Vydavateľstvo Osveta, 2001

Caironi, P., Masson, S., Spanuth, E., Thomae, R., et al. „Compared values of presepsin (sCD14-ST) and procalcitonin as early markers of outcome in severe sepsis and septic shock: a preliminary report from the Albumin Italian Outcome Sepsis (ALBIOS) study.“ *Critical Care*, 2013, 17(2), s.35 ; doi: 10.1186/cc11973

Cavaillon, J., Adrie, Ch. Sepsis and Non-infectious Systemic Inflammation. Wiley-Blackwell, 2009

Cohen, J. „Diagnosing sepsis: does the microbiology matter?“ *Critical Care* , 2008, 145(12), 2: ; doi:10.1186/cc6881

Delerive, P., De Bosscher, K., Besnard, S., Vanden Berghe, W., et al. „Peroxisome Proliferator-activated Receptor alpha Negatively Regulates the Vascular Inflammatory Gene Response by Negative Cross-talk with Transcription Factors NF-kB and AP-1.“ *J. Biol. Chem.*, 1999, 274(1), s.32048-32054 ; doi: 10.1074/jbc.274.45.32048

Endo, S., Takahashi, G., Tatsuyori, S., et al. „Usefulness of Presepsin (Soluble CD14 Subtype) as a diagnostic marker for sepsis.“ *JJAAM*, 2012, 23, s.27-38

Engel, Ch., Brunkhorst, F., Bone, H., et al. „Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study.“ *Intensive Care Med*, 2007, 33 s.606–618 ; doi 10.1007/s00134-006-0517-7

Fachada, N., Lopes, V. Rosa, A. „Agent Based Modelling and Simulation of the Immune System: a Review.“ *researchgate.net*, 2013

Frangogiannis, N., Smith, C., Entman, M. „The inflammatory response in myocardial infarction.“ *Cardiovascular Research*, 2002, 53(1), s.31–47 ; doi:10.1016/S0008-6363(01)00434-5

Gaieski, F., Goyal, M. „What is sepsis? What is severe sepsis? What is septic shock? Searching for objective definitions among the winds of doctrines and wild theories.“ *Expert Rev. Anti Infect. Ther.*, 2013,s.867–871 ; doi: 10.1586/14787210.2013.829633

Gibot, S., Bene, M., Noel, R., Massin, F., et al. „Combination Biomarkers to Diagnose Sepsis in the Critically Ill Patient.“ *Am J Respir Crit Care Med* , 2012, 186(1), s.65–71 ; doi: 10.1164/rccm.201201-0037OC

Gilbert, D. „Use of Plasma Procalcitonin Levels as an Adjunct to Clinical Microbiology.“ *J. Clin. Microbiol.* , 2010, 48(7), s.2325–2329 ; doi:10.1128/JCM.00655-10

Goebel, P., Williams, J., Gerhardt., R. „Pilot Study of the Performance Characteristics of the D-dimer in Presumed Sepsis.“ *West J Emerg Med.*, 2010, 11(2), s.173-179

Granger, N., Senchenkova, E. *Inflammation and microcirculation*. Louisiana: Morgan & Claypool, 2010, ISBN 978-161-5041657

Hall, M., Williams, S., DeFrances, C., Golosinskiy, A. „Inpatient Care for Septicemia or Sepsis: A Challenge for Patients and Hospitals.“ *NCHS Data Brief*, 2011, 62

Heinrich, P., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H., et al. „Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation.“ *Biochem. J.*, 2003, 374, s.1–20 ; doi: 10.1042/BJ20030407

Hunter, J., Doddi., M. „Sepsis and the heart.“ *Br J Anaesth*, 2010, 104(1), s.3–11 ; doi:10.1093/bja/aep339

Huston, J., Tracey, K. „The pulse of inflammation: heart rate variability, the cholinergic anti-inflammatory pathway and implications for therapy.“ *Journal of internal medicine*, 2011, 263, s.45-53 ; doi: 10.1111/j.1365-2796.2010.02321

Challem, J. *The inflammation syndrome*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2003 ; ISBN-978-0471202714

Chen, Ch., Cheng, K., Chan, K., Yu, W. „Age may not influence the outcome of patients with severe sepsis in intensive care units.“ *International Journal of gerontology* , 2014, 8 , s.22-26 ; doi:10.1016/j.ijge.2013.08.004

Ishikura, H., Nishida, T., Murai, A., Nakamura, Y., Irie, Y. et al. „New diagnostic strategy for sepsis-induced disseminated intravascular coagulation: a prospective single-center observational study.“ *Critical Care*, 2014, 18(19) ; doi:10.1186/cc13700

Janciauskiene, S., Welte, T., Mahadeva, R. „Acute Phase Proteins: Structure and Function Relationship.“ *InTech Open Science*, 2011

Kabrhel, Ch., Courtney, D., Camargo, C., Plewa, M. et al. „Factors Associated With Positive D-dimer Results in Patients Evaluated for Pulmonary Embolism.“ *Acad Emerg Med.*, 2010, 17(6), s.589–597 ; doi:10.1111/j.1553-2712.2010.00765.x

Kim, I., Lee, J., Jin, S., Lee, H., Paik, G., Lee, H., Lee, O. „Crystal structure of CD14 and its implications for lipopolysaccharide signaling.“ *J.BIOL.CHEM.*, 2005, 280, s.11347-11351 ; doi: 10.1074/jbc.M414607200

Kofoed, K., Andersen, O., Kronborg, G., Tvede, M. et al. „Use of plasma C-reactive protein, procalcitonin, neutrophils, macrophage migration inhibitory factor, soluble urokinase-type plasminogen activator receptor, and soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in combination to diagnose infections.“ *Critical Care*, 2007, 11(38) ; doi:10.1186/cc5723

Landry, D., Oliver, J. „The pathogenesis of vasodilatory shock.“ *N Engl J Med*, 2001, 345(8), s.588-595

Lawrence, T. „The Nuclear Factor NF- κ B Pathway in Inflammation.“ *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2009, doi: 10.1101/cshperspect.a001651

Levi, M., Opal, S. „Coagulation abnormalities in critically ill patients.“ *Crit Care*, 2006, 10(4), s.222 ; doi: 10.1186/cc4975

Lucas, S. „Sepsis definitions.“ *Lancet*, 2013, 381, s.2249-2250

Madencia, Ö., Yakupoğlu, S., Benzonana, N. „Evaluation of soluble CD14 subtype (presepsin) in burn sepsis.“ *Burns*, 2014, 40(4), s.664–669

Megyeri, M., Jani, P., Kajdácsi, E., Dobó, J. et al. „Serum MASP-1 in complex with MBL activates endothelial cells.“ *Molecular Immunology*, 2014: 39-45 doi: 10.1016/j.molimm.2014.01.001

Matinlauri, I., Juutilainen, A., Hämäläinen, S., Koivula, I., et al. „Fibrinogen and antithrombin in hematological patients with neutropenic fever.“ *Cent. Eur. J. Med.*, 2010, 5(4), s.520-526 ; doi: 10.2478/s11536-010-0012-y

Mitsubishi, chemical. „NEW SEPSIS MARKER PATHFAST® PRESEPSIN.“ 2011

Moshides, J., M. Moriatis, a E. Ellis. Procalcitonin Immunoassay on the Roche cobas e 411. SEALS Clinical Chemistry, Prince of Wales Hospital, Sydney, Australia. 2009

Muller, W. „Leukocyte – endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response.“ *TRENDS in Immunology*, 2003, 24(6), s.327-334

Naffaa, M., Makhoul, B., Tobia, A., Kaplan, M., et al. „Procalcitonin and interleukin 6 for predicting blood culture positivity in sepsis.“ *Am J Emerg Med*, 2014 ; doi:10.1016/j.ajem.2013.12.058

O'Reilly, S., Cant, R., Ciechomska, M., Van Laar, M. „Interleukin-6: a new therapeutic target in systemic sclerosis?“ *Clinical & Translational Immunology*, 2013, 2(4) ; doi:10.1038/cti.2013.2

Pal, A., Mukhopadhyay, D., Kundu, P. „Serum Fibrinogen Profile In Neonatal Septicemia.“ *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences*, 2013, 7(5), s.1-5 ; ISSN: 2279-0861

Paterson, R., Webster, N. „Sepsis and the systemic inflammatory response syndrome.“ *J.R.Coll.Surg.Edinb.*, 2000, 45(3), s.178-182

Pecka, M., Bláha, M., Fátorová, I., et al. *Praktická hematologie*. Český Těšín: Infiniti art, s.r.o., 2010, ISBN 978-80-903872-9-5

Pei, Ch., Barbour, M., Fairlie-Clarke, J. et al. „Emerging role of interleukin-33 in autoimmune diseases.“ *Immunology*, 2013, 141, s.9–17 ; doi: 10.1111/imm.12174

Picard, K., Donoghue, S., Young-Kershaw, D. Russell, K. „Development and Implementation of a Multidisciplinary Sepsis Protocol.“ *Critical care nurse*, 2006, 26(3), s.43-54

Pierrakos, Ch., Vincent, J. „Sepsis biomarkers: a review.“ *Critical Care*, 2010, 14(15)

Puleston, S, Simon, A. „Autophagy in the immune system.“ *Immunology*, 2013, 141, s.1-8 ; doi: 10.1111/imm.12165

Reinhart, K., Eyrich, K. *Sepsis: An Interdisciplinary Challenge*. London: Springer, 2012, ISBN 36-4283-085-4

Rocha, L., Pessoa, C., Colombo, G., Corrêa, T., et al. „Lactate as a prognostic marker in patients with severe sepsis or septic shock admitted to the ICU.“ *Critical Care*, 2013, 17(3), s.51 ; doi: 10.1186/cc12667

Roche , Diagnostics GmbH. Lactate Gen.2 LACT2. Mannheim: Cobas, 2009

Roche, Diagnostics GmbH. CRP3gen. C-Reactive Protein. Mannheim: Cobas, 2012

Roche, Diagnostics GmbH. Interleukin-6, IL-6. Mannheim: Cobas, 2012

Sagy, M., Al-Qaqa, Y., Kim, P. „Definitions and Pathophysiology of Sepsis.“ *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*, 2013, 43(10), s.260-263; doi: 10.1016/j.cppeds.2013.10.001

Scott, A., Khan, K., Cook, J., Duronio, V. What is "inflammation"? Are we ready to move beyond Celsus? *Br J Sport Med*, 2004, s.248-249 ; doi: 10.1136/bjism.2003.011221

Serhan, Ch., Ward, P., Gilroy, D. *Fundamentals of inflammation*. Cambridge University Press, 2010, ISBN: 978-0-521-88729-8

Serhan, Ch., Brain, S., Buckley, Ch., et al. „Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms.“ *FASEB J.*, 2007, 21(2), s.325–332

Signore, A. „About inflammation and infection.“ *EJNMMI Research*, 2013, 3(8) ; doi:10.1186/2191-219X-3-8

Simon, L., Gauvin, F., Amre, D., Saint-Louis, P., Lacroix, J. „Serum Procalcitonin and C-Reactive Protein Levels as Markers of Bacterial Infection: A Systematic Review and Meta-analysis.“ *Clinical Infectious Diseases*, 2004, 39(2), s.206–217

Spanuth, E., Ebelt, H., Ivandic, B., Werdan, K. „Diagnostic and prognostic value of presepsin (soluble CD14 subtype) in emergency patients with early sepsis using the new assay PATHFAST Presepsin.“ *IFCC-WorldLab – EuroMedLab*, 2011.

Sumney, M., Whiteman, K. „D-dimer: Past, present, and future.“ *ED Insider*, 2007, 37(8) s.14-16

Sysmex. Katalog produktů. Brno: SYSMEX CZ s.r.o., 2012

Takahashi, W., Nakada, T., Abe, R., Tanaka, K., et al. „Usefulness of interleukin-6 levels in the cerebrospinal fluid for the diagnosis of bacterial meningitis.“ *Journal of Critical Care*, 2014, ; doi: 10.1016/j.jcrc.2014.02.020

Takala, A., Repo, H. „Markers for the clinical diagnosis of sepsis.“ *CLI*, 2004

Tanimura, N., Saitoh, S., Ohto, U., Ohto, U., et al. „The attenuated inflammation of MPL is due to the lack of CD-14 dependent tight dimerization of TLR/MD2 complex at the plasma membrane.“ *International Immunology*, 2013, ; doi: 10.1093/intimm/dxt071

Tedgui, A. „Focus on Inflammation.“ *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 2011, 31. s.958-959 ; doi: 10.1161/ATVBAHA.111.227355

Thompson, D., Pepys, B., Wood, P. „The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine.“ *Structure Fold.Des.*, 1999, 7, s.169-177

Ulla, M., Pizzolato, E., Lucchiari, M., Loiacono, M., Soardo, F. et al. „Diagnostic and prognostic value of presepsin in the management of sepsis in the emergency department: a multicenter prospective study.“ *Critical Care*, 2013, 17(4), R168

Vandevyver, S., Dejager, L., Vandebroucke, R., Libert, C. „An acute phase protein ready to go therapeutic for sepsis.“ *EMBO Molecular Medicine*, 2014, 6(1) ; doi: 10.1002/emmm.201303524

Varga, J., Bataller, A., de Nadal, M., Camps, A., et al. „Variation in prothrombin time and fibrinogen plasma levels in septic shock patients in relation to outcome and the SOFA score.“ *European Journal of Anaesthesiology*, 2011, 1(28), s.172-173

Vincent, J. „Definition of Sepsis and Non-infectious SIRS.“ *Sepsis and Non-infectious Systemic Inflammation*, 2009

Vincent, J., Abraham, E. „The Last 100 Years of Sepsis.“ *Am J Respir Crit Care Med*, 2006, 173(3), s.256–263

Vincent, J., Nuffelen, M. *Diagnosing Sepsis—Markers, Microarrays, and Multiplexes.* Springer, 2007, s. 45-47

Vladimer, G., Weng, D., Paquette, S., Vanaja, S., Rathinam, V. et al. „The NLRP12 inflammasome recognizes *Yersinia pestis*.“ 2012, 37(1) s. 588 ; doi: 10.1016/j.immuni.2012.07.006

Vodnik, T., Kaljevic, G., Tadic, T., Majkic-Singh, N. „Presepsin (sCD14-ST) in preoperative diagnosis of abdominal sepsis.“ *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2013, 51(10), s.2053–2062

Wiesinger-Mayr, H., Vierlinger, K., Pichler, R., Kriegner, A., et al. „Identification of human pathogens isolated from blood using microarray hybridisation and signal pattern recognition.“ *BMC Microbiology*, 2007, 7(78) ; doi:10.1186/1471-2180-7-78

Worthley, L. „Shock: A Review of Pathophysiology and Management. Part II.“ *Critical Care and Resuscitation*, 2000,2, s.66-84

<http://www.lifetechnologies.com/content/dam/LifeTech/migration/images/cell-analysis/data.par.47590.image.-1.0.1.gif> [online]

Zima, T. *Laboratorní diagnostika*. Praha: Karolinum, Galen, 2009