

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA HRADEC KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD

**Prokalcitonin jako časný marker bakteriální infekce**

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Doc.PharmDr. Martin Beránek Ph.D.

Konzultant: MUDr. Zdislava Vaničková

Hradec Králové 2016

Lenka Mikulová

## PROHLÁŠENÍ

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové

Podpis:

## PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych zde poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce doc. PharmDr. Beránkovi Ph.D. z katedry biochemických věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové a své konzultantce MUDr. Vaníčkové z 1. LF UK a VFN v Praze za jejich ochotu, čas a cenné rady, které mi poskytli. Dále MUDr. Uhrové z Centrální biochemické laboratoře VFN v Praze za poskytnutí dat a taktéž cenné rady. Ráda bych také poděkovala MUDr. Mrázové a MUDr. Brodské Ph.D. z Centrální biochemické laboratoře VFN v Praze za informace potřebné ke kazuistice. V neposlední řadě bych ráda poděkovala svojí rodině za neskutečnou podporu v průběhu celého mého studia.

## Obsah

ABSTRAKT .....	6
ABSTRACT.....	8
1. ÚVOD .....	10
2. TEORETICKÁ ČÁST .....	10
2.1. Laboratorní testy k detekci zánětlivé reakce.....	10
2.1.1. C- reaktivní protein.....	11
2.1.2. Prokalcitonin.....	12
2.1.3. Interleukin 1 .....	13
2.1.4. Interleukin 6.....	14
2.1.5. Tumor necrosis faktor $\alpha$ .....	14
2.2. Fyziologie a patofyziologie zánětového prokalcitoninu.....	15
2.2.1. Struktura prokalcitoninu .....	15
2.2.2. Syntéza prokalcitoninu .....	15
2.2.3. Hlavní zdroj zánětového prokalcitoninu.....	17
2.2.4. Eliminační mechanismus prokalcitoninu.....	18
2.3. Dynamika koncentrace prokalcitoninu při zánětu .....	18
2.3.1. Zánět, SIRS, sepse .....	18
2.3.2. Koncentrace prokalcitoninu při aseptické zánětlivé reakci .....	19
2.3.3. Koncentrace prokalcitoninu při septické zánětlivé reakci .....	20
2.4. Diagnostický význam PCT v porovnání s cytokiny .....	22
2.5. Prokalcitonin jako faktor ovlivňující stanovení kalcitoninu.....	23
2.6. Metody stanovení prokalcitoninu v ÚLBD .....	24
2.6.1. Semikvantitativní imunochromatografický test.....	24
2.6.2. Kvantitativní imunoluminiscenční test .....	26
2.6.3. Kvantitativní imunochemický test na bázi enzymové fluorescence.....	26
2.6.4. Kvantitativní elektrochemiluminiscenční test .....	27
3. Experimentální část.....	29
3.1. Cíle práce .....	29
3.2. Materiál a metody .....	29
3.2.1. Biologické vzorky.....	29
3.2.2. Vyšetření C- reaktivního proteinu .....	30

3.2.3. Vyšetření prokalcitoninu.....	34
3.3. Výsledky .....	37
4. Diskuze .....	48
5. Závěr .....	50
6. Seznam zkratk .....	51
7. Seznam obrázků.....	52
8. Seznam tabulek .....	52
9. Seznam grafů .....	53
10. Seznam literatury .....	54

## **ABSTRAKT**

**Úvod:** Prokalcitonin (PCT) je protein s řetězcem o 116 aminokyselinách s molekulovou hmotností 13 kD. Je tvořen parafolikulárními buňkami štítné žlázy. Zánětlivý prokalcitonin je tvořen jen 114 aminokyselinami. Prokalcitonin, který detekujeme v plazmě při probíhající zánětu, není tvořen C-buňkami štítné žlázy, ale v játrech, v menší míře pak v plicích, ledvinách, varlotech, prostatě a tenkém střevě.

**Cíle:** 1. Porovnat hladiny a dynamiku C-reaktivního proteinu (CRP) a prokalcitoninu (PCT) při zánětlivém procesu u tří vybraných pacientů s rozdílnými diagnózami. 2. Porovnat počty vyšetřených PCT dle indikujících oddělení VFN v letech 2009, 2012, 2015. 3. Sledovat dynamiku počtu vyšetřených PCT v letech 2001-2016.

**Metody:** Hladiny CRP a PCT byly stanoveny v laboratoři ÚLBLD VFN Praha v období 20. 5. -17. 6. 2016. CRP bylo měřeno imunoturbidimetrickou metodou na analyzátoru Unicel DxC 880i. PCT bylo měřeno elektrochemiluminiscenční metodou na analyzátoru Cobas e411. Pro vyhodnocení byly zpracovány grafy s hladinami obou analytů u 3 pacientů v kritickém stavu. Dále byla zpracována data potřebná pro vyhodnocení cílů č. 2 a 3. uvedených výše.

**Výsledky:** Byla prokázána větší senzitivita i specificita PCT na rozdíl od CRP při odlišení infekčního a neinfekčního systémového zánětu. 1) U pacienta D. P. klesala hladina prokalcitoninu po nasazení antibiotik rychleji, než hladina C-reaktivního proteinu. U pacienta D. J. je opět vidět znatelný pokles PCT během tří dnů, což je dobrý prognostický ukazatel stavu pacienta. Hladina CRP klesla za tuto dobu jen mírně a postupem času se zvýšila ještě více. U pacienta Š. B. s pankreatitidou pozorujeme vysoké hladiny CRP, ale hladiny PCT nízké. PCT tedy nereaguje na zánětlivou reakci bez infekční příčiny. 2) V letech 2009, 2012 a 2015 bylo v naší laboratoři ÚLBLD ve VFN Praha provedeno 11673-12667 stanovení prokalcitoninu za rok. Největší propad v počtu vyšetření PCT byl u onkologicky nemocných pacientů. Naopak více vyšetření prokalcitoninu začala indikovat klinika dětského a dorostového lékařství a klinika chirurgie. Nejvíce vyšetření PCT bylo indikováno interními odděleními nemocnice, dále klinikou anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny a kardiologickou klinikou. 3) Dynamika počtu vyšetřených PCT v letech 2001-2016 odpovídá trendu při zavedení nového vyšetření do praxe.

**Závěr:** Vyšetření prokalcitoninu je indikováno u nemocných v kritickém stavu k monitorování jejich stavu v průběhu léčby, je vhodným markerem k rozlišení syndromu systémové zánětové odpovědi (SIRS) a sepse. Je dobrým vodítkem k zahájení či ukončení léčby antibiotiky.

**Klíčová slova:** prokalcitonin, C- reaktivní protein, SIRS, sepse

## ABSTRACT

**Introduction:** Procalcitonin (PCT) is a 13 kD protein with a chain of 116 amino acids. It consists of parafollicular cells of the thyroid gland. Inflammatory procalcitonin is made up of 114 amino acids. Procalcitonin from plasma in the course of inflammatory process, does not consist of C-cells of the thyroid gland but it is generated in the liver, and, to a lesser extent, in the lungs, kidneys, testes, prostate and small intestine.

**Objectives:** 1. To compare the levels and the dynamics of C-reactive protein (CRP) and procalcitonin in the inflammatory process. in three patients with different diagnoses. To compare the number of examined PCT according to indicated VFN (General University Hospital) departments in the years 2009, 2012 and 2015. 3. To study the dynamics of the number of examined PCT in the years 2001- 2016.

**Methods:** The levels of CRP and PCT were measured in the ÚLBLD laboratory of the General University Hospital in Prague in the period from May 20 to June 17, 2016. The CRP was measured by immunoturbidimetric analyzer UnicelDxC 880i. The PCT was measured by the Cobas analyser using the electrochemiluminescence technology. In order to evaluate the data, graphs were processed with levels of both analytes for 3 patients. Further, data needed for the evaluation of the above mentioned objectives no. 2 and 3 were also processed.

**Results:** A greater sensitivity and PCT specificity was demonstrated, in contrast to CRP while differentiating infectious and non-infectious systemic inflammation. 1) Level of procalcitonin (PCT) in the patient D. P. decreased faster than that of the C-reactive protein (CRP) after administration of antibiotics. In the case of the patient D.J., a noticeable drop in PCT has been observed within three days, reflecting a good prognostic indicator of the patient status. The patient Š. B. with pancreatitis exhibited high levels of CRP, but low PCT levels. Therefore, PCT does not respond to an inflammatory stimuli without encountering infectious agents. 2) Our laboratory at ÚLBLD (Prague General University Hospital) performed 11673-12667 determinations of procalcitonin per year in the years 2009, 2012 and 2015. The biggest fall in the number of PCT tests was observed within the patients treated at the Oncology clinic. On the other hand, enhanced determination of procalcitonin was performed at the departments of Pediatrics and Adolescent medicine, as well as at the Surgery clinic.



Most of the examinations of PCT was carried out by internal departments of the hospital, as well as by the department of Anesthesiology and Intensive care medicine, as well as by the Cardiology clinic. 3) The dynamic of PCT tests in the years 2001-2016 reflects the introduction of new tests into practice.

**Conclusion:**The examination of procalcitonin is indicated for patients in critical condition in order to monitor their state during treatment. Thus, procalcitonin is a suitable marker to distinguish the syndrome of systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and sepsis. It also serves as an indicator for starting or finishing the antibiotic treatment.

**Key words:** procalcitonin, C-reactive protein, SIRS, sepsis

# 1. ÚVOD

Bakteriální infekce jsou od nepaměti velmi závažný problém pro lidskou populaci. Dříve lidé umírali, protože nebyly k dispozici vhodné léky - antibiotika. Dnes je situace opačná, díky nadužívání antibiotik na ně vzniká bakteriální rezistence. K rozlišení virové a bakteriální infekce, a to jak v ambulantní, tak nemocniční praxi slouží lékařům především C- reaktivní protein. CRP však selhává při rozlišení infekční a neinfekční zánětlivé systémové odpovědi, tedy při identifikaci sepse.

Do popředí zájmu se dostává prokalcitonin jako vhodný marker, který dokáže dobře rozlišit, zda se jedná o SIRS, či sepsi.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. Laboratorní testy k detekci zánětlivé reakce

Ideální marker zánětlivé reakce organismu pro diagnostické účely by měl splňovat určitá kritéria:

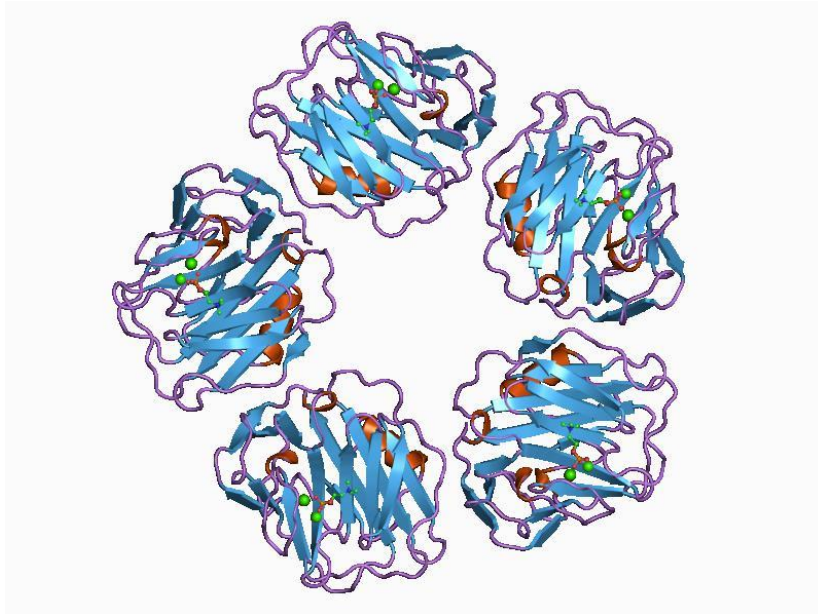
- vysokou senzitivitu a specificitu
- dostupnost statimového stanovení
- snadnou interpretaci výsledků
- cenovou dostupnost

Bohužel, žádný marker nespĺňuje všechna kritéria beze zbytku a za všech okolností. Záleží na lékaři, které vyšetření, popřípadě kombinaci markerů, indikuje a co mu naměřené hodnoty přinesou (1). V současné době mezi zánětlivé markery řadíme:

- proteiny akutní fáze
- cytokiny
- prokalcitonin

### 2.1.1. C- reaktivní protein

Mezi bílkoviny akutní fáze zánětu patří C- reaktivní protein (CRP), který byl objeven v roce 1930. Jeho název je odvozen podle schopnosti precipitovat C-polysacharid pneumokoků (2). CRP je nejčastěji indikovaným markerem zánětu. Struktura molekuly C- reaktivního proteinu na obrázku č. 1.



**Obrázek 1. Struktura C- reaktivního proteinu (3)**

Z bílkovin akutní fáze reaguje nejrychleji, je syntetizován v játrech po indukci cytokiny, zvláště pak interleukinem 6. Hladina CRP v séru stoupá a klesá rychleji, než sedimentace erytrocytů, ale pomaleji, než hladina prokalcitoninu (4). Biologický poločas CRP je 18 hodin a maxima dosahuje za 24-48 hodin po působení zánětlivého podnětu. Pokud je infekce virového původu, stoupá hladina CRP v séru v desítkách mg/l (maximálně asi 50 mg/l), při bakteriální infekci může koncentrace CRP vystoupat až ke stovkám mg/l (4).

C- reaktivní protein je tedy důležitý při diagnostice, je-li infekce virová či bakteriální a zda je na místě léčba antibiotiky. Pomocí CRP ale nerozlišíme, zda se jedná o zánět infekční nebo neinfekční, lokální či systémový. Nevýhodou CRP je jeho pokles v krvi opožděující se o 24-48 hod oproti klinickým projevům (5).

Nejvyšší hodnoty CRP bývají až 400-800 mg/l, a to zejména u těžkého zánětu žlučníku a zápalu plic. Problematická může být interpretace CRP u těžce malnutričních pacientů a u pacientů se sníženou jaterní funkcí, spojenou s výrazně sníženou proteosyntetickou kapacitou jater. Od roku 1982 probíhají studie možnosti využití CRP jako markeru rizika kardiálních chorob (4).

Hladinu CRP lze stanovit metodou imunoturbidimetrie.

#### Princip stanovení

C- reaktivní protein se váže na specifickou protilátku a vytváří nerozpustný CRP komplex antigen-protilátka. Změna absorpance měřená při 600 nm je přímo úměrná koncentraci C- reaktivního proteinu ve vzorku. Je použita pro výpočet koncentrace CRP na základě jednobodové kalibrační křivky (6).

### 2.1.2. Prokalcitonin

V roce 1975 objevili Moya a kolegové prekurzor kalcitoninu preprokalcitonin a jeho štěpné produkty včetně prokalcitoninu. Glykoproteinová struktura prokalcitoninu (PCT) je známa od roku 1981. Prokalcitonin byl prokázán v séru krys s karcinomem štítné žlázy roku 1983. O tři roky později byl zjištěn i u lidí trpící stejnou nemocí. V roce 1993 Assicot a kolegové našli vysoké hodnoty plazmatického prokalcitoninu u septických pacientů. Jako hlavní spouštěč syntézy PCT byl označen bakteriální endotoxin. Zánětový prokalcitonin je tvořen v různých typech buněk, ale největší syntéza byla prokázána v játrech. V menší míře pak v plicích, ledvinách, varlatech, prostatě a tenkém střevě (1).

Během několika let se začal prokalcitonin používat jako diagnostický marker systémové bakteriální infekce, který je jak senzitivní, tak vysoce selektivní.

Vyšetření prokalcitoninu lze provést elektrochemiluminiscenční metodou na analyzátoru Cobas e411.

### Princip stanovení

Antigen obsažený ve vzorku reaguje s biotinylovanou monoklonální protilátkou proti PCT a monoklonální protilátkou proti PCT, která je značená rutheniovým komplexem. Reakce probíhá za vzniku sendvičového komplexu. Poté jsou přidány mikročástice potažené streptavidinem, což vyvolá navázání komplexu na pevnou fázi na základě interakce biotin-streptavidin. Nenavázané složky jsou odstraněny a přivedené napětí na elektrodě vyvolá chemiluminiscenční emisi fotonů, které jsou zachyceny fotonásobičem. Výsledky se určují z dvoubodové kalibrační křivky a tzv. master křivky (křivka stanovená výrobcem pro danou šarži setu), dodávané v čárovém kódu reagentie (7).

### 2.1.3. Interleukin 1

Základními působky, ovlivňujícími činnost imunitního systému, jsou cytokiny neboli tkáňové hormony. Lékařům slouží k diagnostice zánětlivého procesu a monitorování úspěšnosti léčby. Jedna ze skupin cytokinů jsou interleukiny.

Interleukin1 (IL-1) je polypeptidový cytokin, skládající se z podjednotky  $\alpha$  a  $\beta$ . Je produkován polymorfonukleárními buňkami a makrofágy. Patří mezi prozánětlivé interleukiny, stimuluje proliferaci T- lymfocytů, indukuje syntézu dalších cytokinů, vyvolává horečku (8).

Hladina IL-1 se stanovuje metodou ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

### Princip stanovení

Na dně mikrotitrační destičky je navázána specifická protilátka proti antigenu, který je obsažen ve vzorku. Po přidání vzorku dochází při inkubaci k navázání antigenu k protilátce a vytvoření imunokomplexu antigen-protilátka. Po odmytí nenavázaného antigenu se přidá další protilátka, na kterou je navázán enzym a následuje opět inkubace a promytí. Poté se přidá substrát, který je přeměněn enzymem na barevný produkt detekovaný spektrofotometricky. Koncentrace substrátu je přímo úměrná koncentraci antigenu obsaženého ve vzorku (9).

#### 2.1.4. Interleukin 6

Interleukin 6 (IL-6) se dle své struktury řadí mezi hemopoiety, funkčně je to prozánětlivý cytokin. Je produkován makrofágy, polymorfonukleáry, T- lymfocyty, fibroblasty a buňkami endotelu. Při zánětlivé reakci indukuje syntézu proteinů akutní fáze v játrech, má rozhodující vliv na syntézu C-reaktivního proteinu. Dále stimuluje T-lymfocyty a B-lymfocyty, které začnou produkovat protilátky (8).

IL-6 je nejčastěji vyšetřovaným cytokinem v diagnostice zánětu. U pacientů po operaci či léčených imunosupresivou dokáže velmi časně ukázat na počátek infekce, ještě před rozvojem klinických příznaků. Interleukin 6 je vhodný marker sepse novorozenců. V tomto případě je výhodnější stanovit hladinu IL-6 místo CRP nebo prokalcitoninu. Hladina prokalcitoninu je po porodu fyziologicky zvýšena a normálních hodnot dosahuje 48 hodin po porodu. Naopak hladina CRP je i při sepsi po porodu nízká, začíná stoupat až několik dní po narození (5).

Při syndromu systémové zánětové odpovědi (SIRS-Systemic Inflammatory Response Syndrome) stoupá hladina IL-6 již po 30-60 minutách a předchází tak o několik hodin vzestup CRP, který se teprve tvoří v játrech na základě indukce interleukinem 6 (5). Interleukin 6 lze stanovit například metodou ELISA.

#### 2.1.5. Tumor necrosis faktor $\alpha$

Tumor necrosis faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) je nejznámější cytokin zvýšený nejen při zánětu, ale i při malignitách, hemoragickém šoku a nekróze. V nízkých koncentracích (které jsou v plazmě pod mezí detekce) je TNF- $\alpha$  potřebný k apoptóze, remodelaci tkání a k normální funkci imunitního systému. Primárně je produkován aktivovanými buňkami monocytomakrofágové řady (10). Stanovuje se pomocí průtokové cytometrie, ale i metodou ELISA.

### Princip průtokové cytometrie

Pomocí monoklonální protilátky je z plné krve vyselektována populace T-lymfocytů, poté následuje permeabilizace buněk a intracelulární značení TNF-  $\alpha$  . Ten je poté detekován pomocí laseru průtokového cytometru (11). Vyšetření trvá 2 dny, což je její nevýhoda.

## **2.2. Fyziologie a patofyziologie zánětového prokalcitoninu**

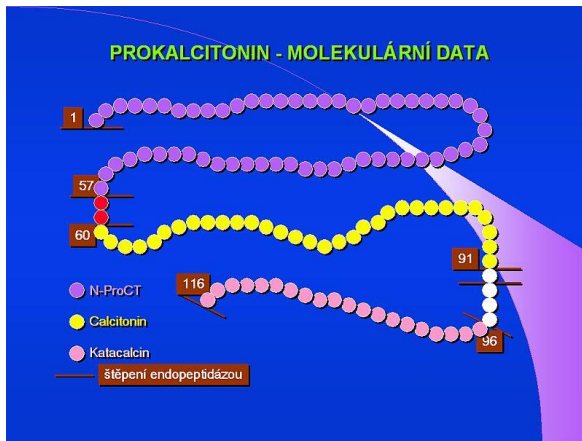
### 2.2.1. Struktura prokalcitoninu

Prokalcitonin je protein s řetězcem dlouhým 116 aminokyselin a s molekulovou hmotností 13 kD. Je tvořen parafolikulárními buňkami štítné žlázy.

Zánětový prokalcitonin je tvořen jen 114 aminokyselinami, na N- konci mu chybí dvojice aminokyselin alanin-prolin (1).

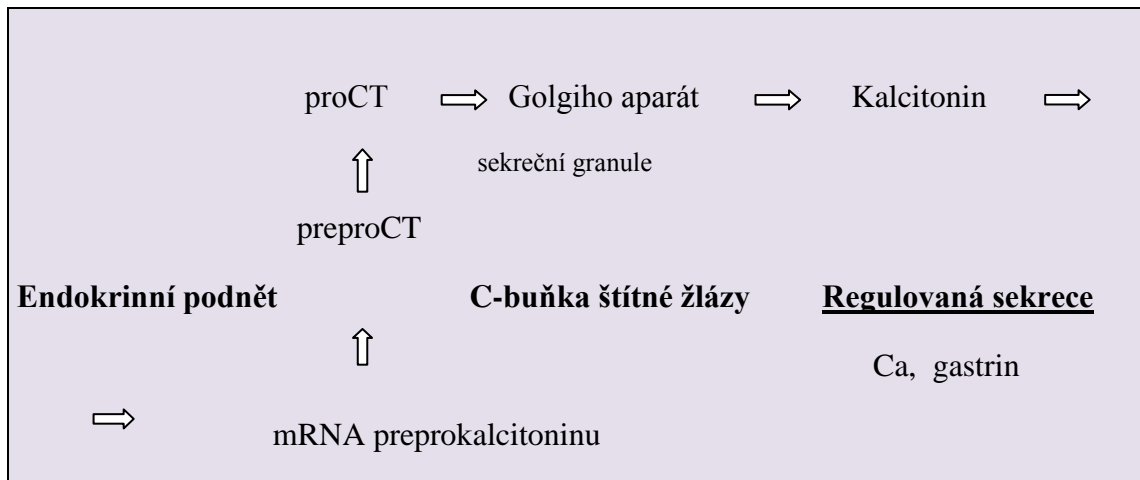
### 2.2.2. Syntéza prokalcitoninu

Prekurzor PCT preprokalcitonin je kódován genem *CALC-I*, který je u člověka lokalizován na krátkém raménku 11. chromosomu. Signální sekvence na N-konci preprokalcitoninu je odstraněna endopeptidázou za vzniku prokalcitoninu. Poté je prokalcitonin dále intracelulárně štěpen, je odstraněn N- terminální úsek a C- terminální fragment (katakalcin) za vzniku hormonu kalcitoninu (1). Intracelulární štěpení prokalcitoninu endopeptidázou je znázorněno na obrázku 2.



**Obrázek 2. Prokalcitonin- „molekulární data“ (12)**

Na obrázku 3. vidíme Expresi *CALC-1* v C- buňkách štítné žlázy. Prokalcitonin je zde štěpen v sekrečních granulech Golgiho aparátu na kalcitonin. Jeho sekrece je regulována hladinou kalcia a gastrinu v krvi (13).



**Obrázek 3. Expresi *CALC-1* v C- buňkách štítné žlázy (13)**

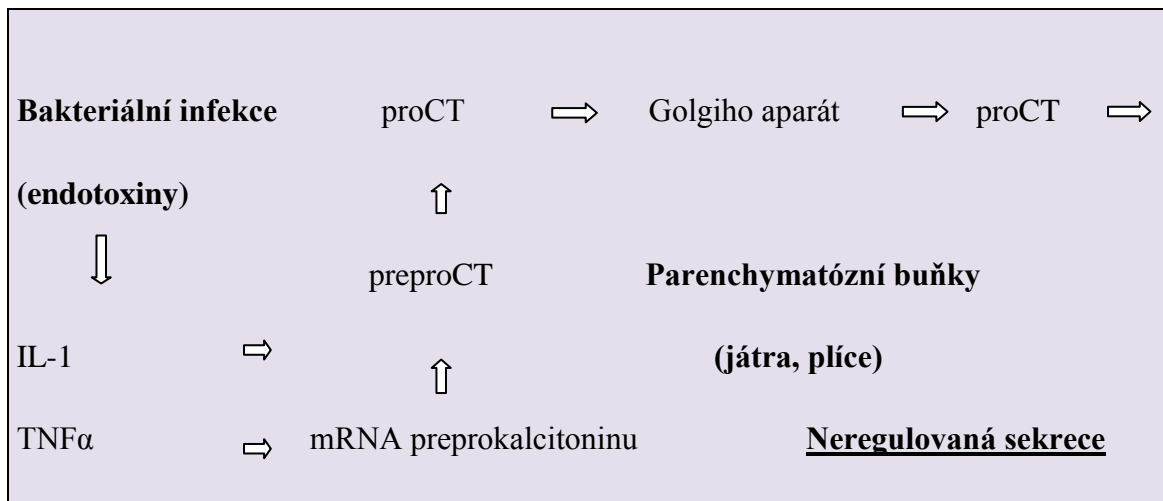
Vysvětlivky: mRNA- messengerová ribonukleová kyselina, preproCT- preprokalcitonin, proCT- prokalcitonin



### 2.2.3. Hlavní zdroj zánětového prokalcitoninu

Prokalcitonin, který detekujeme v plazmě při probíhajícím zánětu, není tvořen C-buňkami štítné žlázy. Ukazuje na to fakt, že zánětový prokalcitonin nacházíme v plazmě i u lidí po odstranění štítné žlázy. Zánětový prokalcitonin je nejspíše kódován stejným genem *CALC-1*, který kóduje prekurzor kalcitoninu v C-buňkách štítné žlázy. Nedochází zde však již k proteolytickému štěpení prokalcitoninu na kalcitonin (1).

Na obrázku 4. vidíme neregulovanou sekreci prokalcitoninu po indukci endotoxiny a následně cytokiny. Golgiho aparát parenchymatózních buněk neobsahuje sekreční granula, prokalcitonin není tedy štěpen na kalcitonin a je vyplavován do krve.



**Obrázek 4. Exprese *CALC-1* v parenchymatózních buňkách (13)**

Vysvětlivky: mRNA- messengerová ribonukleová kyselina, preproCT- preprokalcitonin, proCT- prokalcitonin

Nejvyšší exprese mRNA prokalcitoninu byla nalezena v játrech. V menší míře pak v plicích, ledvinách, varlatech, prostatě a tenkém střevě.

Endotoxin tvořený bakteriemi je nejsilnější induktor syntézy PCT a jeho následného uvolnění do krevního řečiště. Jeho syntézu lze vyvolat i přímým podáním cytokinů, jako je TNF-α, interleukin 1β (IL-1β), interleukin 2 (IL-2) a IL-6 (14).

Hladina PCT po indukci endotoxinem stoupá po 3-6 hodinách, k maximu dochází v rozmezí 6-8 hodin. Poločas prokalcitoninu je 25-30 hodin, což umožňuje dobrou sledovatelnost hladin (15).

Ve srovnání s CRP reaguje PCT na infekční podmět rychleji a jeho pokles lépe koreluje se zlepšením klinického stavu pacienta (2).

#### 2.2.4. Eliminační mechanismus prokalcitoninu

Hlavním eliminačním mechanismem PCT jsou ledviny (16). Meisner a kolegové ve třech svých studiích v letech 2000 a 2001 zkoumali, zda se liší eliminace plazmatického PCT u pacientů s různým stupněm renální dysfunkce, věku a pohlaví a porovnávali renální clearance PCT s vývojem hladiny PCT u septických pacientů, kteří podstoupili hemofiltraci. Došli k závěru, že renální clearance PCT není ovlivněna žádným z těchto parametrů a že clearance kreatininu nemá vliv na plazmatické hladiny PCT ani v klidové fázi ani během zánětu. Hladina PCT není závislá na akutním ani chronickém onemocnění ledvin, ale pouze na přítomnosti zánětu (1).

### 2.3. Dynamika koncentrace prokalcitoninu při zánětu

#### 2.3.1. Zánět, SIRS, sepse

Zánět je souhrn fyziologických reakcí na porušení integrity organismu, které vedou k ochraně proti infikování poškozeného místa, k lokalizaci poškození a ke zhojení (17). Příčiny zánětu mohou být infekční agens (bakterie, viry, mykóza) nebo neinfekční (chemické a fyzikální vlivy, operace či ischemie tkáně). Zánět může být akutní, či přejít do chronického stádia. Reakce organismu na porušení jeho celistvosti může být místní nebo celková (17).

SIRS je obranná reakce celého organismu snažící se najít a zneškodnit patogen, infekčního nebo neinfekčního původu. Je to neadekvátní reakce organismu, která může vést k poškození vlastní tkáně (17).

O SIRS můžeme hovořit, pokud u nemocného nalezneme 2 a více symptomů:

- teplota  $>38^{\circ}\text{C}$  nebo  $<36^{\circ}\text{C}$
- tepová frekvence  $>90$  tepů / min
- dechová frekvence  $>20$  dechů / min nebo  $\text{PaCO}_2 <4,25$  kPa  
počet leukocytů  $>12 \times 10^9 / \text{l}$  nebo  $<4 \times 10^9 / \text{l}$  nebo  $>10\%$  nezralých forem -tyčí (14)

### Sepse

Sepse je systémová zánětová reakce organismu (SIRS) s prokázanou infekcí (17).

### 2.3.2. Koncentrace prokalcitoninu při aseptické zánětlivé reakci

V některých případech může být hladina prokalcitoninu zvýšena, aniž by v těle pacienta byla přítomna systémová infekce, či dokonce sepsa.

Mezi příčiny zvýšení PCT nad fyziologickou mez  $0,05 \mu\text{g/l}$  můžeme zařadit:

- pooperační stavy
- mnohočetné trauma
- popáleniny
- kardiogenní šok
- fyziologické zvýšení hladin PCT u novorozenců do 48 hodin po porodu (18)

Nejvyšších hodnot v rámci pooperačních stavů dosahuje PCT po operacích břicha a hrudníku, kdy hladina kulminuje 24-48 hodin po zákroku a vrací se na původní hodnotu do 5 dnů po zákroku (15). Hodnoty PCT u větších operací bývají do  $2 \mu\text{g/l}$ , pokud vystoupají nad  $10 \mu\text{g/l}$ , měl by lékař začít pátrat po infekci (19).

U mnohočetných traumat bývají hladiny PCT do 2 µg/l, výjimku tvoří vyšší hladiny u pacientů s těžkým traumatem v oblasti břicha, ohrožených komplikacemi (seps, syndrom multiorgánové dysfunkce) a se špatnou prognózou (19).

Zvýšení PCT při popáleninách je úměrné rozsahu popálení a stupni poškozené tkáně. Hladina PCT koreluje s prognózou přežití. Zvýšení PCT nastává do 8 hodin po traumatu a přetrvává několik dní. Podobně se mění hladina IL-6, zatímco TNF-α zůstává nízký (19).

Během déletrvajícího kardiogenního šoku se zvyšuje hladina prokalcitoninu. Nedosahuje však hladin jako při sepsi a zvyšuje se pomaleji (19).

Hodnota PCT u novorozenců stoupá bezprostředně po narození. Maxima dosahuje 24 hodin po porodu a to v dosti širokém rozmezí 0,5-21 µg/l. Během 48 hod po porodu hladiny PCT klesají pod 0,5 µg/l. PCT je i u novorozenců pokládán za specifický marker bakteriální infekce, ale lékař musí mít na paměti tuto odlišnost v referenčních mezích (1).

Studie Hahna a jeho kolegů z minulého roku přišla se zjištěním, že prokalcitonin u dětí narozených před 32. týdnem gestačního věku je 7-30 dní po narození zvýšen, aniž by projevovaly známky sepsy. Dle své studie stanovili referenční meze u této skupiny dětí na 1,70-3,53 µg/l (20).

### 2.3.3. Koncentrace prokalcitoninu při septické zánětlivé reakci

Při sepsi se hladina PCT prudce zvyšuje během 2-6 hodin a maxima dosahuje mezi 6-12. hodinou po vzniku sepsy.

Prokalcitonin představuje dobrý diagnostický marker sepsy a septického šoku. Jeho hladina v séru koreluje s tíží stavu pacienta. Při odlišení infekčního od neinfekčního systémového zánětu má na rozdíl od CRP vyšší senzitivitu (88 % vs. 75 %) i specifitu (81 % vs. 67 %) (21).

Sledování dynamiky PCT prvních 24 a 48 hodin má prognostický charakter (22). Příkladem může být například studie z let 2011-2013 z Indie. V období 2 let bylo do

studie zařazeno 54 pacientů se sepsí, těžkou sepsí a septickým šokem, kterým byly měřeny 1., 7. a 28. den hodnoty prokalcitoninu. U pacientů, kteří měli hodnotu prokalcitoninu  $<7 \mu\text{g/l}$  první den přijetí na JIP bylo přežití větší než u pacientů s hodnotou  $>7 \mu\text{g/l}$  (23).

Hodnotami prokalcitoninu u pacientů v sepsi a SIRS se zabývala další studie, provedená v letech 2010-2012 v Albánii. Pacienti se sepsí měli průměrnou hodnotu PCT  $11,28 \mu\text{g/l}$ , zatímco pacienti s příznaky SIRS jen  $0,27 \mu\text{g/l}$  (24).

Prokalcitonin je tedy dostatečně specifický marker pro diagnostiku sepse. Je také vodítkem, zda nasadit léčbu antibiotiky a pokud jsou nasazena, jak dlouho je pacientovi podávat. V dnešní době aktuální problematikou rezistence bakterií na antibiotika se PCT jeví jako velmi slibný marker.

Možností řídit léčbu antibiotiky na základě hladin PCT se zabývala francouzsko-německá studie. Všichni nemocní na nechirurgické jednotce intenzivní péče (JIP) měli suspektní bakteriální infekci. Skupina 311 nemocných, kteří dostávali antibiotika na základě hladin prokalcitoninu, měla léčbu ATB průměrně 11,6 dne, zatímco kontrolní skupina 14,3 dne. Mortalita obou skupin byla podobná. Bylo tedy prokázáno, že prokalcitonin může přispět k opatrnějšímu užívání ATB a snížit tak možnost rezistence bakteriálních kmenů (25).

Prokalcitonin nám může i napovědět, zda je sepsa u pacienta způsobena Gram negativními nebo Gram pozitivními bakteriemi.

Porovnáním hladin PCT u pacientů se septikémií způsobenou Gram negativními, Gram pozitivními bakteriemi a mykotickou infekcí se zabývala studie provedená ve VFN Praha MUDr. Brodskou a kolegy. Studie byla provedena na 166 pacientech. Všichni měli pozitivní hemokulturu s určeným původcem septikémie. Z toho 83 pacientů mělo Gram negativního původce, 78 Gram pozitivního a 5 pacientů houbového původce sepse. Zatímco hladiny CRP se významně nelišily mezi jednotlivými skupinami, hladiny PCT byly až desetinásobně vyšší u pacientů s Gram negativním původcem sepse (26). Průměrné hodnoty koncentrací u různých původců sepse v tabulce 1.

**Tabulka 1. Hodnoty CRP a PCT dle původce sepse (26)**

<b>Původce sepse</b>	<b>Průměrná hodnota CRP (mg/l)</b>	<b>Průměrná hodnota PCT (µg/l)</b>
<b>Gram negativní</b>	129,9	8,9
<b>Gram pozitivní</b>	123,1	0,73
<b>Houbová</b>	149	0,58

Vyšetření PCT nemůže zcela nahradit izolaci a identifikaci původce sepse z hemokultury. Ale díky zjištění, zda je původce septikémie Gram pozitivní či Gram negativní, umožní lékaři zahájit dříve léčbu vhodnými ATB (26).

PCT se používá také jako časný marker infekčních komplikací u imunosuprimovaných leukopenických pacientů. Leukopenie zde redukuje vzestup PCT u septických pacientů, nelze zde tedy použít standardní referenční meze.

U pacientů v aplastické fázi při transplantaci kostní dřeně, kde chybí varovný signál zánětu - leukocytóza, se hladina PCT v krvi pacienta zvyšuje ještě před klinickými příznaky systémové infekce (2).

#### **2.4. Diagnostický význam PCT v porovnání s cytokiny**

Na rozdíl od cytokinů, např. TNF- $\alpha$  a IL-6, kdy jejich vzestup hladin v zánětlivých stavech je nespecifický vůči typu zánětu:

- PCT stoupá především u bakteriálních zánětů
- PCT velmi dobře rozliší SIRS od bakteriální sepse
- PCT má výrazně nižší hladiny při virovém infektu a autoimunitních onemocněních
- koncentrace PCT je úměrná rozsahu imunitní reakce
- nespornou výhodou je stabilita prokalcitoninu v plazmě 24 hodin, vzorek se tedy nemusí ihned mrazit, jak je tomu v případě stanovení cytokinů

(2)

Pro cytokiny je typický nepoměr mezi skutečnou lokální produkcí po zánětlivém stimulu a naměřenými plazmatickými koncentracemi. Reakce většiny cytokinů se odehrává na lokální, tkáňové úrovni, která je rutinními diagnostickými metodami nedostupná (2).

Otázka vhodných indikačních kritérií pro vyšetření PCT, cytokinů a proteinů akutní fáze není zatím uzavřena.

Ke zvýšení diagnostické výtěžnosti se doporučuje souběžné vyšetření PCT s dalšími parametry, např. IL-6 a CRP (2).

## **2.5. Prokalcitonin jako faktor ovlivňující stanovení kalcitoninu**

Kalcitonin (CT) je hormon produkovaný C buňkami štítné žlázy. Snižuje hladinu vápníku v krvi a přesouvá ho do kostí. Je to antagonist parathormonu.

Zvýšená koncentrace kalcitoninu v krvi může značit medulární karcinom štítné žlázy. Byly zaznamenány případy, kdy u pacientů bez klinických příznaků svědčících pro karcinom štítné žlázy byly nalezeny zvýšené koncentrace kalcitoninu. Zároveň byly změřeny i vyšší hladiny prokalcitoninu v jejich séru.

V roce 2011 provedla MUDr. Uhrová společně s kolegy studii zabývající se možnou interferencí prokalcitoninu a kalcitoninu. Do studie bylo zařazeno 34 pacientů, kteří byli rozděleni do dvou skupin. První skupina 17-ti pacientů měla klinické projevy sepse, pozitivní hemokulturu a PCT  $>0,5 \mu\text{g/l}$ . Druhá skupina také 17-ti pacientů neměla klinické projevy sepse a PCT bylo  $<0,1 \mu\text{g/l}$ . Kalcitonin byl stanoven souběžně pomocí dvou odlišných metod. První metodika imunoradiometrická analýza (IRMA-Immuno Radiometric Assay) využívá 2 polyklonální protilátky. Ty se specificky vážou na různé epitopy molekuly kalcitoninu. První protilátka je fixována na pevné fázi, druhá je radioaktivně značená radionuklidem  $^{125}\text{I}$ . Míra radioaktivity přímo úměrná koncentraci kalcitoninu v séru se měří gamakamerou. Druhá metodika enzymová imunoanalýza (ELISA-Enzyme Linked Immunosorbent Assay) využívá 2 monoklonální protilátky. První je fixována na pevnou fázi a druhá je enzymaticky značená křenovou peroxidázou, která přemění přidaný substrát na barevný produkt. Ten se

spektrofotometricky měří při vlnové délce 450nm a výsledná absorbance je přímo úměrná koncentraci kalcitoninu v séru. Prokalcitonin byl stanoven enzymovou fluorescenční analýzou (ELFA-Enzyme Linked Fluorescent Assay), která v sobě spojuje imunoanalýzu a fluorescenční detekci. Používají se 2 protilátky, první je fixována na pevný povrch a druhá je značená alkalickou protilátkou. Při použití metodiky IRMA s polyklonální protilátkou u první skupiny pacientů (příznaky sepse, pozitivní hemokultura, PCT >0,5 µg/l) prokázala tato metoda falešně vyšší hodnoty kalcitoninu v séru. Při použití metodiky ELISA s monoklonální protilátkou byly hodnoty kalcitoninu v referenčních mezích. U druhé skupiny pacientů (PCT <0,1µg/l) byly hladiny kalcitoninů srovnatelné, v referenčních mezích u obou metodik IRMA i ELISA. Studie prokázala falešně zvýšené hodnoty kalcitoninu u septických pacientů metodikou IRMA. Příčinou je stanovení kalcitoninu, který je součástí zánětového prokalcitoninu. Hladina kalcitoninu přímo korelovala s hladinou PCT. Falešně vyšší hodnoty CT byly zjištěny i u pacientů v terminálním stádiu poškození ledvin a poruchou metabolismu vápníku a fosfátu (27).

## **2.6. Metody stanovení prokalcitoninu v ÚLBLD**

### **2.6.1. Semikvantitativní imunochromatografický test**

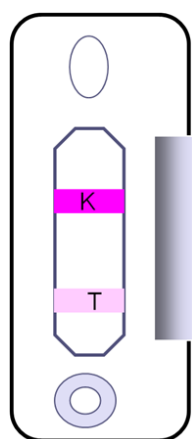
Semikvantitativní imunochromatografický test od firmy BRAHMS (ICHT-Immuno Chromatographic Test) byl v biochemické laboratoři ve VFN Praha zaveden v roce 1998. Vyšetření se provádělo semikvantitativně ve statimové laboratoři.

Od roku 2001 se séra s pozitivním výsledkem PCT >0,5 µg/l předávala do rutinní laboratoře, kde byla výsledná koncentrace PCT změřena kvantitativně imunoluminiscenční metodou (ILMA-Immuno Luminometric Assay).



## Princip ICHT

Test se provádí na diagnostické destičce firmy BRAHMS (obr. 5). Principem je semikvantitativní imunochromatický test. V systému se používají dvě protilátky. První monoklonální s koloidním zlatým konjugátem myší-anti-katacalcin-protilátkou (Tracer) a polyklonální protilátkou anti-kalcitonin (na pevné fázi). Po nanesení vzorku dochází ke vzniku imunokomplexu s Tracerem. Ten pak vzlíná vlásečnicemi do testovacího prostoru, kde dochází k jeho fixaci na polyklonální protilátku za vzniku sendvičového imunokomplexu. Intenzita zbarvení testovacího proužku se odečítá proti barevné škále. O správné funkčnosti testu vypovídá přítomnost kontrolního proužku po aplikaci vzorku. Pokud není přítomen, je nutné test opakovat s novou diagnostickou destičkou (28).



**K**..... Kontrolní zóna

**T**..... Testovací zóna

- 200  $\mu$ l séra, plazmy
- 30 minut inkubace
- vizuální hodnocení dle barevné stupnice

**Obrázek 5. Diagnostická destička na semikvantitativní stanovení PCT (29)**

Výsledek semikvantitativního vyšetření je zjištěn na základě porovnání diagnostické destičky s referenční kartou, která je součástí každé destičky (obr. 6)



**Obrázek 6. Porovnání výsledků na testovací destičce s referenční kartou (30)**

## 2.6.2. Kvantitativní imunoluminiscenční test

Kvantitativní imunoluminiscenční test (ILMA-Immuno Luminometric Assay) navazoval na předchozí semikvantitativní stanovení PCT. Byl prováděn pouze v rutinním provozu.

### Princip ILMA

Principem je imunoluminiscenční stanovení. Při stanovení jsou použity dvě monoklonální protilátky. První je fixována na dně zkumavky, druhá je luminiscenčně značená. Během inkubace probíhá imunoreakce za vzniku imunokomplexu sendvičového typu. Po promytí se provádí kvantitativní vyhodnocení luminiscenčního signálu v luminometru (obr. 7). Intenzita luminiscenčního signálu je přímo úměrná koncentraci prokalcitoninu ve vzorku pacienta (31).



**Obrázek 7. Luminometr Lumat LB 9507(29)**

## 2.6.3. Kvantitativní imunochemický test na bázi enzymové fluorescence

Prokalcitonin byl v naší laboratoři měřen také pomocí metody enzymové fluorescence (ELFA- Enzyme Linked Fluorescent Assay) na přístroji Vidas firmy BRAHMS (obr. 8) a to v letech 2007-2010.

### Princip ELFA

Principem metody je kombinace jednostupňové sendvičové imunoanalýzy s vyhodnocením za pomoci fluorescence.

Pevná fáze je potažena monoklonální myší protilátkou proti prokalcitoninu, která je značená alkalickou fosfatázou (konjugát). Antigen ve vzorku pacienta reaguje s protilátkou a konjugátem za vzniku imunokomplexu. Nenavázané složky se odstraní promytím. Do reakce se přidá substrát. Konjugovaný enzym katalyzuje hydrolýzu tohoto substrátu za vzniku fluorescenčního produktu, jehož fluorescence se měří při 450 nm. Intenzita fluorescence je přímo úměrná koncentraci PCT ve vzorku (32).



**Obrázek 8. Analyzátor mini VIDAS (34)**

#### 2.6.4. Kvantitativní elektrochemiluminiscenční test

Od roku 2010 do současnosti je PCT v naší laboratoři měřen elektrochemiluminiscenční metodou (ECLIA-Electrochemiluminescence Immuno Assay) na přístroji Cobas e411 (obr. 9) firmy Roche v licenci BRAHMS, a to v nepřetržitém režimu. Jediné omezení se týká pacientů z ambulancí, těm pojišťovna vyšetření nehradí.



**Obrázek 9. Analyzátor Cobas e411 (foto autorky)**

#### Princip ECLIA

Antigen obsažený ve vzorku reaguje s biotinylovanou monoklonální protilátkou proti PCT a monoklonální protilátkou proti PCT, která je značená rutheniovým komplexem.

Reakce probíhá za vzniku sendvičového komplexu. Poté jsou přidány mikročástice potažené streptavidinem, což vyvolá navázání komplexu na pevnou fázi na základě interakce biotin-streptavidin. Nenavázané složky jsou odstraněny a přivedené napětí na elektrodě vyvolá chemiluminiscenční emisi fotonů, která je změřena fotonásobičem. Výsledky jsou určeny z dvoubodové kalibrační křivky a master křivky, dodávané v čárovém kódu reagentie (7).

Tabulka 2. Přináší přehled jednotlivých metod stanovení PCT.

**Tabulka 2. Přehled metod stanovení PCT (28,31,32,7)**

Metoda stanovení	Objem vzorku (μl)	Rozsah stanovení (μg/l)	Doba stanovení (minuty)	Interference
<b>ICHT</b>	200	<0,5- >10	30 min inkubace pak vyhodnocení	lipémie hemolýza
<b>ILMA</b>	20	0,1-500	30 min inkubace pak vyhodnocení	lipémie hemolýza
<b>ELFA</b>	200	0,05-200	20	lipémie
<b>ECLIA</b>	30	0,02-100	18	vyšší lipémie

## **3. Experimentální část**

### **3.1. Cíle práce**

1. Porovnat hladiny a dynamiku C- reaktivního proteinu a prokalcitoninu při zánětlivém procesu u tří vybraných pacientů s rozdílnou diagnózou.
2. Porovnat počty vyšetřených PCT dle indikujících oddělení VFN v letech 2009, 2012, 2015.
3. Sledovat dynamiku počtu vyšetřených PCT v letech 2001- 2016.

### **3.2. Materiál a metody**

#### **3.2.1. Biologické vzorky**

Biologické vzorky byly převážně od pacientů z lůžkových oddělení Všeobecné fakultní nemocnice v Praze, ale jsou zde zahrnuty i vzorky od pacientů mimo VFN Praha.

V naší nemocnici je používán uzavřený odběrový systém Vacutainer. Pro biochemická stanovení se krev pacienta odebírá nejčastěji do zkumavek s gelem a oxidem křemičitým. Ten aktivuje koagulaci krevního vzorku a gel odděluje po centrifugaci plazmu nebo sérum od krevního koláče. Takto je zajištěna stabilita analytů ve vzorku. Ke stanovení PCT a CRP lze použít heparinizovanou plazmu (s heparinátém lithným) či sérum. Pokud jsou vzorky odebrané mimo VFN v jiné zkumavce, plazma či sérum se po centrifugaci oddělí do čisté zkumavky a jsou připraveny k analýze. Vzorek je zpracován v co nejkratší době.

Na příjmu byla laborantkou vzorkům přidělena laboratorní čísla shodná se žádankou a vzorky se polepily čárovým kódem. Následně byly centrifugovány po dobu 10 minut při 1500-2000 g za minutu. Elektronické žádanky byly načteny pomocí čtečky do laboratorního informačního systému (LIS) OpenLims firmy Stapro. Vzorky odebrané

mimo VFN neměly elektronickou žádanku, byly tedy zadány ručně podle rodného čísla pacienta. Stanovení PCT a C-reaktivního proteinu se v naší laboratoři ÚLBLD provádí nepřetržitě 24 hodin denně ve statimové laboratoři.

Po schválení laborantkou odchází výsledek ke schválení lékaři, či jinému vysokoškolsky vzdělanému pracovníku laboratoře. Výsledek je vydán nejpozději do 30 minut v případě vitální indikace, ve statimovém režimu do 2 hodin. Poté je vzorek uložen do lednice, kde je skladován do druhého dne.

Pro experimentální část bakalářské práce byla použita data z databáze OpenLims firmy Stapro nemocnice VFN Praha. Data jsou z období roku 2009, 2012, 2015 a 2016.

### 3.2.2. Vyšetření C- reaktivního proteinu

C- reaktivní protein byl stanoven imunoturbidimetrickou metodou na analyzátoru UniCel DxC 880i firmy Beckman Coulter používaným ve statimové laboratoři Centrální biochemické laboratoře ÚLBLD ve VFN Praha (obr. 10).



**Obrázek 10. Analyzátor UniCel DxC 880i (35)**

Analyzátor UniCel DxC 880i firmy Beckman Coulter se skládá z rychlého modulu, fotometrického modulu a imunologického modulu. Systém umožňuje jednoduchou obsluhu, použití primárních i sekundárních zkumavek. Analyzátor je vybaven čtečkou čárového kódu, pomocí kterého identifikuje pacienta a zahájí analýzu požadovaných

vyšetření. Po analýze jsou data z analyzátoru přenesena do laboratorního informačního systému. Reagencie a vzorky lze doplňovat za chodu analyzátoru, není třeba jej zastavovat. Je vybaven detekcí hladin reagensů a vzorku a také detekcí sraženiny vzorku (35).

### **Princip stanovení**

CRP(antigen) + anti-CRP protilátka → CRP komplex antigen- protilátka

Princip viz kapitola 2.1.1 v obecné části bakalářské práce.

### **Kalibrátor**

SYNCHRON<sup>®</sup> Systems CAL 5 Plus kat. č. 469965.

Stabilita kalibrátoru do data expirace při uskladnění v lednici při teplotě +2°C až +8°C.

### **Interval kalibrace**

Systém musí mít v paměti uložený platný kalibrační faktor a musí v něm být vložena specifická karta s parametry pro šarži ještě před měřením kontrol nebo patientských vzorků. Kalibrace je stabilní 30 dní. Doporučuje se kalibrovat po výměně náhradních dílů, po údržbě, po neúspěchu v interní kontrole kvality. Kalibrace je platná pro více reagenčních souprav jedné šarže (6).

### **Reagencie**

Originální souprava od firmy Beckman Coulter pro stanovení CRP, která obsahuje 2 reagenční zásobníky ( 2x200 testů).



**Obrázek 11. Reagenční zásobník na stanovení CRP (foto autorky)**

V tabulkách 3. a 4. je uvedeno složení, skladování a stabilita reagensů

### **Složení reagensů**

**Tabulka 3. Složení reagensů pro stanovení CRP(6)**

polyklonální anti-CRP protilátka (kozí a myší)
reagenční tlumivý roztok
hovězí albumin
nereaktivní komponenty pro optimalizaci procesu

### **Skladování a stabilita reagensů**

**Tabulka 4. Skladování a stabilita reagensů (6)**

Stav reagensie	Teplota skladování	Stabilita
neotevřená	2-8°C	do data expirace
otevřená	2-8°C	do data expirace, 60 dní

### **Kontroly kvality**

Kontrola kvality je prováděna pomocí kontrolních materiálů, každý den před začátkem analýzy. Kontrola se provádí 2x denně na dvou hladinách (ráno a v poledne po dolití roztoků). Mimo tento interval se provádí po kalibraci a po servisním zásahu (6).

PreciControl ClinChem Multi1- lyofilizovaná kontrola z lidského séra s hodnotami analytů v normálních hladinách.

PreciControl ClinChem Multi2- lyofilizovaná kontrola z lidského séra s hodnotami analytů v patologických hladinách.

Povolené meze kontrolních materiálů jsou nastaveny v analyzátoru v bloku QC.

Stabilita lyofilizovaného séra při 2-8 °C je do data expirace. Stabilita kontrol po rekonstituci v tabulce 5.



**Tabulka 5. Stabilita kontrol po rekonstituci (36)**

Teplota skladování	Stabilita analytů
15-25 °C	8 hodin
2-8 °C	24 hodin
-15 až -25 °C	14 dní

**Vzorky**

CRP se stanovuje v heparinované plazmě (heparinát lithný) nebo v séru, stabilita CRP ve vzorku je uvedena v tabulce 6.

**Stabilita analytu CRP ve vzorku****Tabulka 6. Stabilita vzorku (6)**

Teplota skladování	Stabilita analytu	Typ vzorku
laboratorní	max. 8 hodin	sérum, plazma
2-8 °C	72 hodin	sérum, plazma
-15 až -20°C	>72hodin	pouze sérum

**Interference**

Chylózní vzorky je nutno před analýzou ultracentrifugovat ( 90000x g, 10 minut).

**Rozsah měření**

Do určité koncentrace CRP případné ředění vzorku analyzátor provádí automaticky, v případě extrémně vysoké koncentrace CRP je nutné naředit vzorek ručně (tabulka 7).

**Tabulka 7. Funkční charakteristiky (6)**

Analyt	Typ vzorku	Rozsah měření	Referenční rozmezí
CRP	sérum, plazma	0-250 mg/l	0,0-5,0 mg/l
Automatické naředění	sérum, plazma	200-500 mg/l	
V případě, že je výsledek mimo měřicí rozsah, ředit fyziologickým roztokem 10x.			

### 3.2.3. Vyšetření prokalcitoninu

Prokalcitonin byl v laboratoři ÚLBLD stanoven na přístroji Cobas e411 firmy Roche Diagnostic. Přístroj je samozřejmě také vybaven čtečkou čárového kódu. Pomocí ní identifikuje vzorek a provede požadované vyšetření, v našem případě prokalcitonin. Výsledek pak přenese do počítače.

#### **Princip stanovení**

Sendvičový princip, doba stanovení je 18 minut. Princip je popsán v teoretické části bakalářské práce v kapitole 2.1.2.

Výsledky jsou zjištěny z kalibrační křivky, která je specificky vytvořena pro přístroj dvoubodovou kalibrací, a master křivky, která se do přístroje načte z čárového kódu reagensie (7).

#### **Kalibrátory**

Přesné hodnoty kalibrátoru specifické pro šarži jsou zakódovány ve štítcích s čárovým kódem reagensie specifické pro test. Všechny informace nezbytné pro kalibraci stanovení jsou automaticky načteny do analyzátoru.

#### **Interval kalibrace**

Kalibrace se provádí vždy pro novou šarži reagensií. Obnovení kalibrace se doporučuje:

- po 8 týdnech používání stejné šarže reagensií
- po 7 dnech (stejná reagenční souprava v analyzátoru)
- výsledky kontrol mimo definované rozmezí (7)
- 

#### **Tabulka 8. Stabilita kalibrátorů a kontrol (7)**

<b>Stabilita kalibrátorů a kontrol</b>	
lyofilizované kalibrátory/ kontroly	do uvedeného data expirace
rekonstituované kalibrátory/ kontroly v analyzátozech	2 hodiny
rekonstituované kalibrátory/ kontroly při -20°C	3 měsíce

## Kontroly kvality

Ke vnitřní kontrole kvality se používají kontroly PreciControl PCT 1 a 2 o dvou různých hladinách. Přesné cílové hodnoty specifické pro šarži a rozmezí jsou zakódovány v čárovém kódu a současně vytištěny na přiloženém nebo elektronicky dostupném letáku hodnot. Ke kontrole kvality lze použít i jiný vhodný kontrolní materiál.

## Reagencie

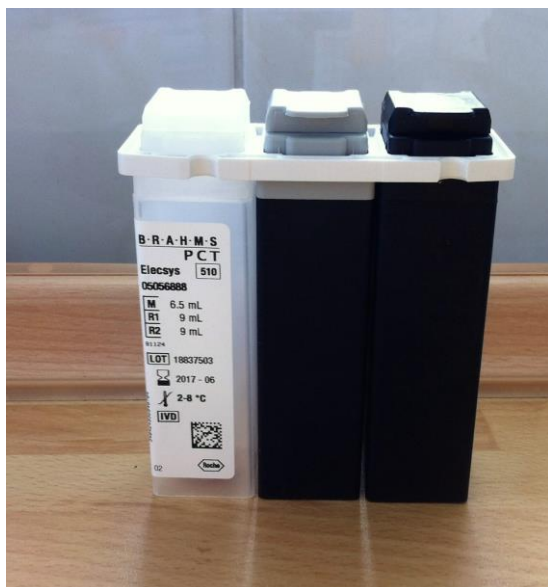
Reagenční set Elecsys BRAHMS PCT se skládá ze tří oddělených reagenčních nádob.

Reagencie v soupravě jsou připraveny k použití a dodávány v nádobkách kompatibilních se systémem (obr. 12). Složení reagensů v tabulce 9.

## Složení reagensů

**Tabulka 9. Složení reagensů (7)**

<b>M</b>	streptavidinem potažené mikročástice
<b>R1</b>	biotinylovaná monoklonální protilátka proti PCT (myší)
<b>R2</b>	monoklonální protilátka proti PCT (myší), značená rutheniovým komplexem



**Obrázek 12. Reagenční set Elecsys PCT BRAHMS (foto autorky)**

Stabilita setu PCT se liší dle způsobu uložení setu PCT, jak je uvedeno v tabulce 10.

### **Skladování a stabilita setu PCT**

**Tabulka 10. Stabilita setu PCT (7)**

neotevřené při 2-8 °C	do uvedeného data expirace
po otevření při 2-8 °C	12 týdnů
v analyzátoch	4 týdny

### **Vzorky**

Pro stanovení PCT se používá stejně jako u stanovení CRP sérum nebo heparinizovaná plazma (s heparinátem lithným). Stabilita PCT ve vzorku je uvedena v tabulce 11.

### **Stabilita analytu PCT ve vzorku**

**Tabulka 11. Stabilita analytu PCT ve vzorku (7)**

Teplota skladování	Stabilita analytu	Typ vzorku
2-8 °C	24 hodin	sérum, plazma
-20 °C	3 měsíce	sérum, plazma

### **Interference**

Stanovení není ovlivněno ikteritou, hemolýzou a lipémií do určité hodnoty (7). Vzorky by neměly být odebrány pacientům podstupující léčbu vysokými dávkami biotinu po dobu nejméně 8 hodin po podání poslední dávky biotinu. U revmatoidních faktorů nebyla interference zaznamenána do koncentrace 1500 IU/ml. Hook efekt nebyl zaznamenán pro koncentrace PCT do 1000 ng/ml (7).

### **Rozsah měření**

Rozsah měření PCT je 0,02-100 µg/l. Hodnoty pod spodním detekčním limitem jsou vykazovány jako <0,02 µg/l. Hodnoty nad rozsahem měření jsou vykazovány jako >100 µg/l (7).

### **Ředění**

Vzorky s koncentracemi PCT nad rozsahem měření mohou být naředěny ručně PCT negativním sérem nebo plazmou. Doporučené ředění je 1:4. Poté se výsledek vynásobí faktorem ředění (7).

### **Referenční rozmezí**

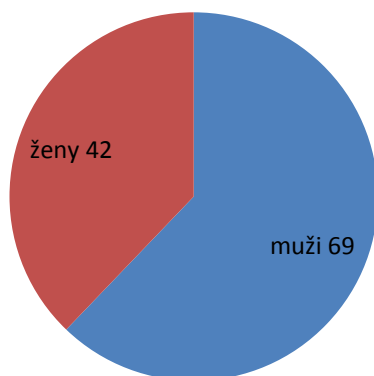
Referenční rozmezí bylo stanoveno na hodnotu 0,046  $\mu\text{g/l}$ (7).

### **Klinický cut-off**

Hodnoty PCT  $<0.5 \mu\text{g/l}$  znamenají malé riziko závažné sepse nebo septického šoku. Hodnoty PCT  $>0.5 \mu\text{g/l}$  znamenají velké riziko závažné sepse nebo septického šoku (7).

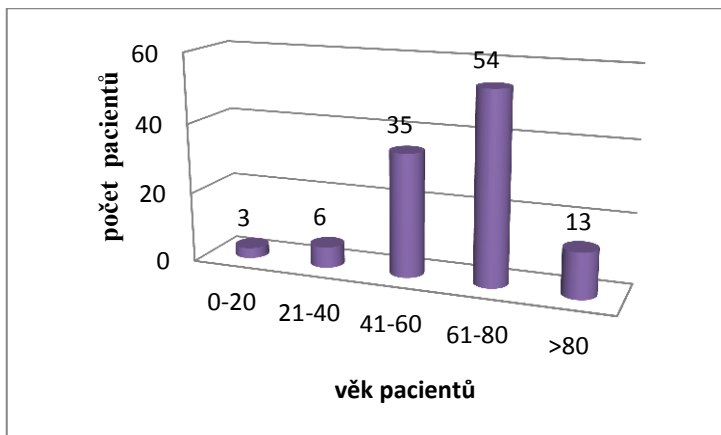
## **3.3. Výsledky**

Z databáze centrální biochemické laboratoře ve VFN Praha byl vybrán soubor 111 pacientů v kritickém stavu, u kterých byly opakovaně stanoveny hladiny prokalcitoninu a C-reaktivního proteinu v období 20.5. -17. 6. 2016. Statistické údaje o skupině pacientů uvádím v grafech 1 a 2 a tabulce 12.



**Graf 1. Zastoupení mužů a žen ve skupině 111 pacientů**

Z grafu 1 vyplývá, že ve skupině bylo 69 mužů a 42 žen různého věku, jak je znázorněno v grafu 2.



**Graf 2. Věkové zastoupení pacientů ve sledované skupině**

Ve sledované skupině bylo nejvíce pacientů ve věku 61-80 let, nejméně ve věku 0-20 let.

Všem pacientům ve sledované skupině bylo dohromady provedeno 1021 stanovení hladin CRP a 544 stanovení hladin PCT (tabulka 12).

**Tabulka 12. Počet vyšetření CRP a PCT sledované skupiny**

Vyšetření	Počet
CRP	1021
PCT	544

Poloviční počet vyšetření PCT si vysvětlují mnohonásobně vyšší cenou stanovení PCT oproti CRP (pojišťovna PCT ohodnotila 787 body, CRP 149 body, přičemž 1 bod=cca 1 Kč).

## Výsledky práce vyjádřené podle cílů bakalářské práce:

### **1. Porovnat hladiny a dynamiku C-reaktivního proteinu a prokalcitoninu při zánětlivém procesu u tří vybraných pacientů s rozdílnou diagnózou.**

Ze 111 pacientů mělo 88 z nich alespoň třikrát současně vyšetřeno CRP i PCT. Z těchto pacientů byli vybráni 3 pacienti, u kterých jsem porovnávala hladiny CRP a PCT a uvedla kazuistiku.

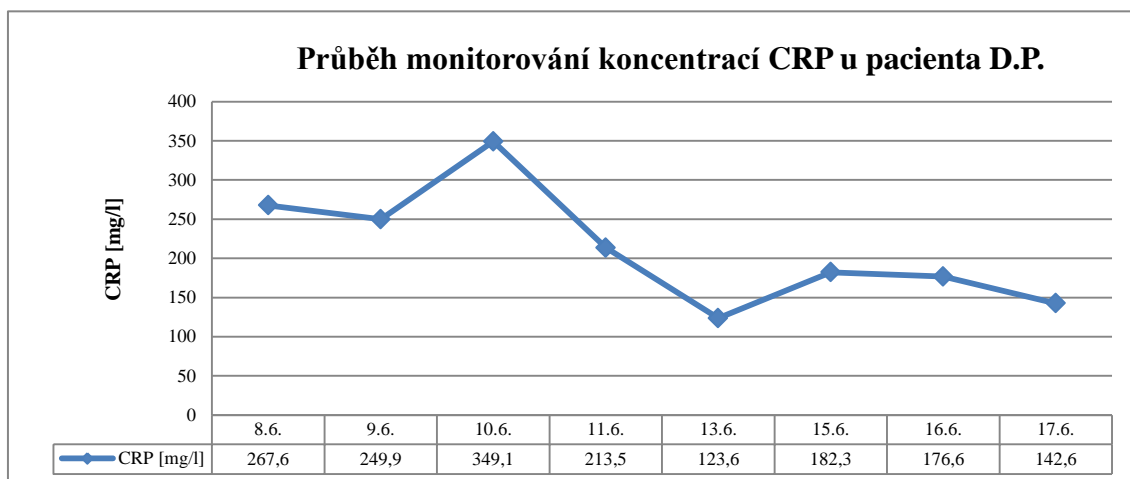
#### **1) D. P.**

Muž, 40 let, intravenózní narkoman (heroin) s neléčenou žloutenkou typu C, (hospitalizace od 8.6. - 24. 6. 2016 na IV. interní klinice VFN), přijat pro kolapsový stav, sepsi a hlubokou ileofemorální žilní trombózu a bércové vředy a anémii. Jeho septický stav se dále komplikoval plicním edémem, pro nějž byl dočasně přeložen na jednotku intenzivní péče.

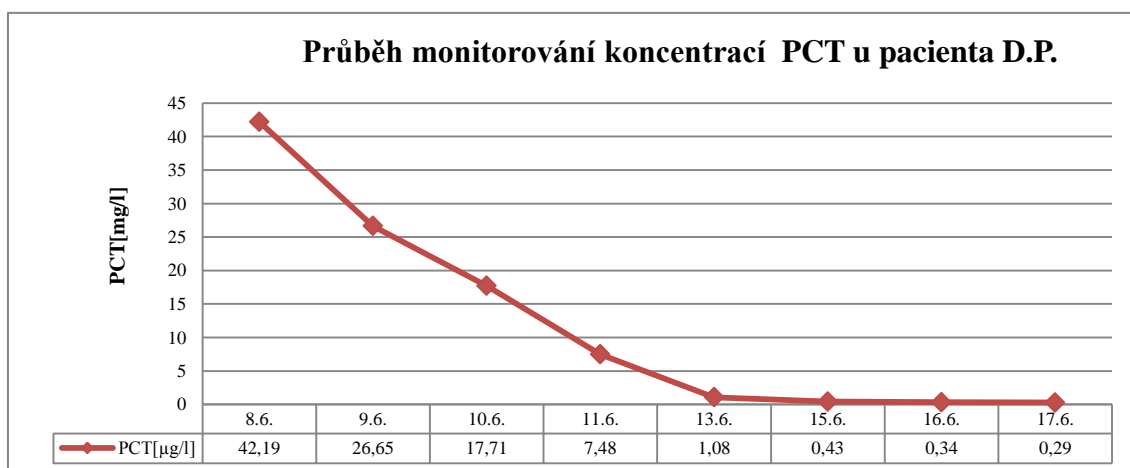
Mikrobiologicky byly zjištěny následující patogeny:

8. 6. 2016 stěr z bércového vředu pravé dolní končetiny -*Staphylococcus aureus* masivně, *Acinetobacter species* masivně

16. 6.2016 výtěr z krku - *Escherichia. coli* a *Candida albicans*



**Graf 3 Monitorování koncentrací CRP u pacienta D. P. od 8. 6. do 17. 6. 2016**



**Graf 4. Monitorování koncentrací PCT u pacienta D. P. od 8. 6. do 17.6.20016**

U pacienta D. P. byl ze stěru z bérce zjištěn nález *Staphylococcus aureus* masivně, *Acinetobacter species* masivně. Právě *Acinetobacter species* jako Gram negativní patogen pravděpodobně zapříčinil vysoké hodnoty CRP a PCT (267 mg/l a 42,19 µg/l) dne 8. 6. 2016. Pacient byl úspěšně zaléčen antibiotiky, jak se můžeme přesvědčit z klesajících hodnot koncentrací prokalcitoninu. Naopak hodnoty C- reaktivního proteinu dále narůstaly, protože CRP stoupá i klesá pomaleji, než hodnoty PCT. Pokud by lékař neindikoval vyšetření PCT a rozhodoval se pouze na základě koncentrace CRP, došel by nejspíše k mylnému závěru, že antibiotika je nutno změnit. Pacient měl dále nález *Escherichia coli* a *Candida albicans* ve výtěru z krku ze dne 16. 6. 2016. To se projevilo opětovným nárůstem pouze CRP, ale hladinu PCT to neovlivnilo, díky kontinuálnímu



podávání antibiotik. Pacient byl ve stabilizovaném stavu propuštěn domů, kde v antibiotické léčbě pokračoval.

## 2) D. J.

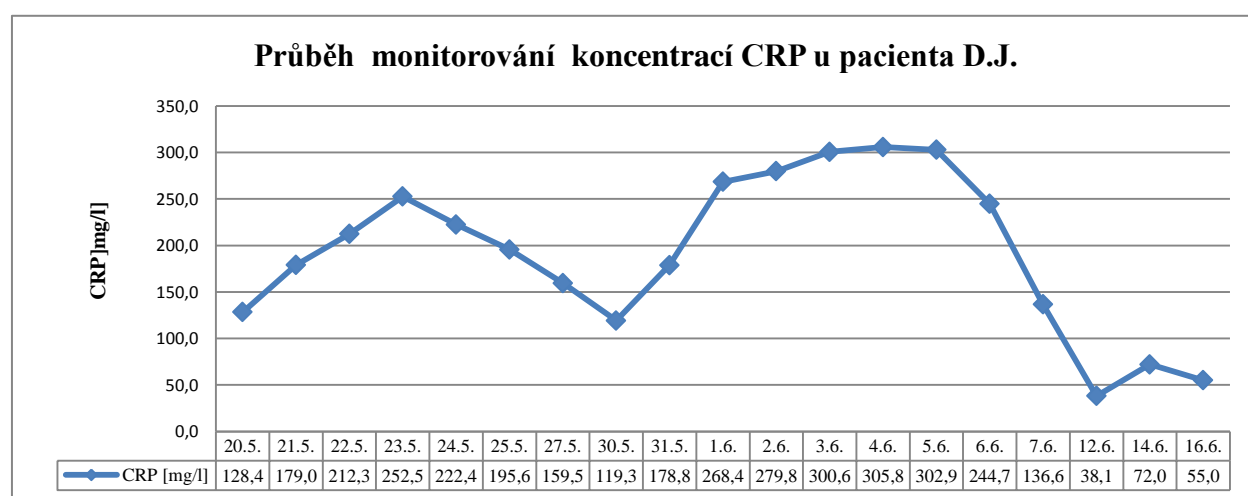
Muž, 60 let s akutní promyelocytární leukemií v průběhu prvního cyklu chemoterapie (s rozvojem neutropenie, pancytopenie), přeložen z Ústavu hematologie a krevní transfuze (ÚHK), hospitalizace dnech 22.6.-24.6. 2016 na KARIM ve VFN pro akutní respirační selhání, st.p. hypoxické zástavě akce srdeční a úspěšné kardio-pulmonální resuscitaci. Poté přeložen zpět na ÚHK. V průběhu hospitalizace byla potvrzena Gram pozitivní sepe.

Mikrobiologicky byly zjištěny následující patogeny:

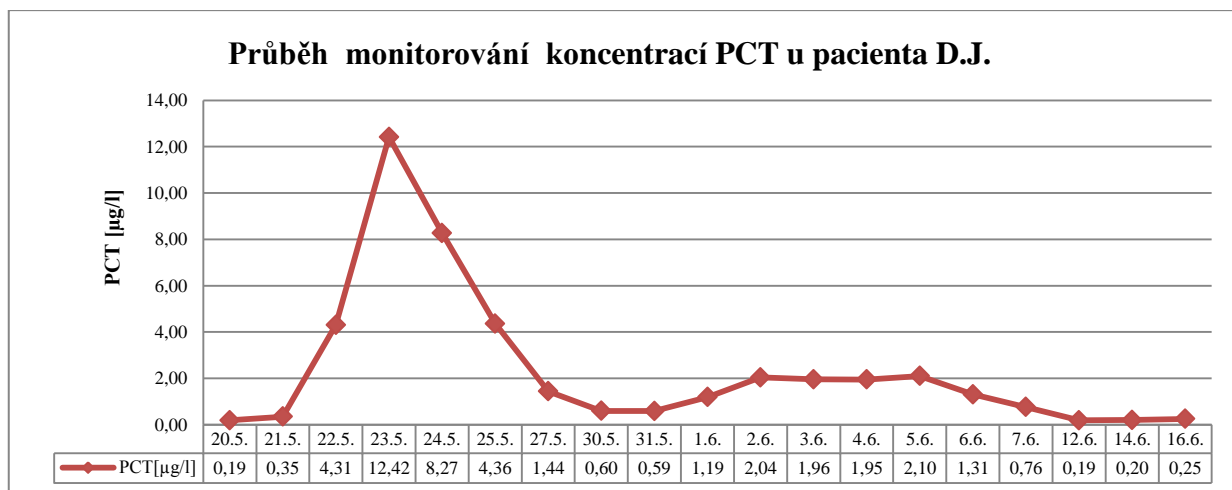
20. 6. 2016 centrální žilní katetr - *Staphylococcus aureus*

22. 6. 2016 hemokultura -*Stafylococcus epidermidis*

v dutině ústní a horních cestách dýchacích prokázána *Candida albicans* opakovaně v průběhu hospitalizace na ÚHK a KARIM



**Graf 5. Monitorování koncentrací CRP u pacienta D. J. od 20 5. do 16. 6. 2016.**



**Graf 6. Monitorování koncentrací PCT u pacienta D. J. od 20. 5. do 16. 6. 2016.**

U Pacienta D. J. byl zjištěn *Staphylococcus aureus* v centrálním žilním katetru a dále *Stafylococcus epidermidis* v hemokultuře. Dle vysoké hladiny PCT (12,4 µg/l) ze dne 23. 5. 2016 můžeme usuzovat, že právě *Stafylococcus epidermidis* byl příčinou zvýšení hladiny prokalcitoninu. Pacient byl zaléčen antibiotiky a hladiny PCT a CRP klesly. Opětovné zvýšení hladin CRP v období 1.6. -7. 6. 2016 nejspíše souvisí s opakovaným nálezem kvasinky *Candida albicans*. Hladina PCT sice opět stoupla, ale již mírně oproti hladině ze dne 23. 5. 2016

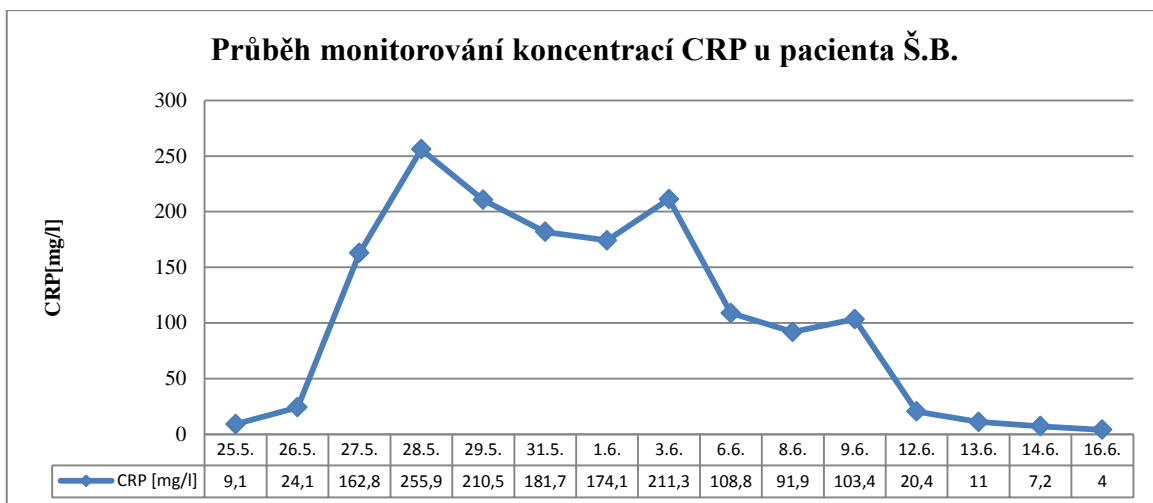
### 3) Š.B.

Muž, 67 let, s anamnézou akutní pankreatitidy v květnu 2016, hospitalizace 25.5. -4. 7. 2016 na IV. interní klinice, byl přijat pro dušnost a bolest v podbřišku. Byly diagnostikovány: exacerbace alkoholické pankreatitidy a počínající nekróza hlavy pankreatu, srdeční selhání kombinované etiologie, mírná normocytární anémie a jaterní cirhóza. Pacientovi byla nasazena výživa nosní sondou, která byla časem změněna na výživu parenterální cestou, postupně kombinováno s výživou *per os*. Během hospitalizace u pacienta došlo k uroinfekci.

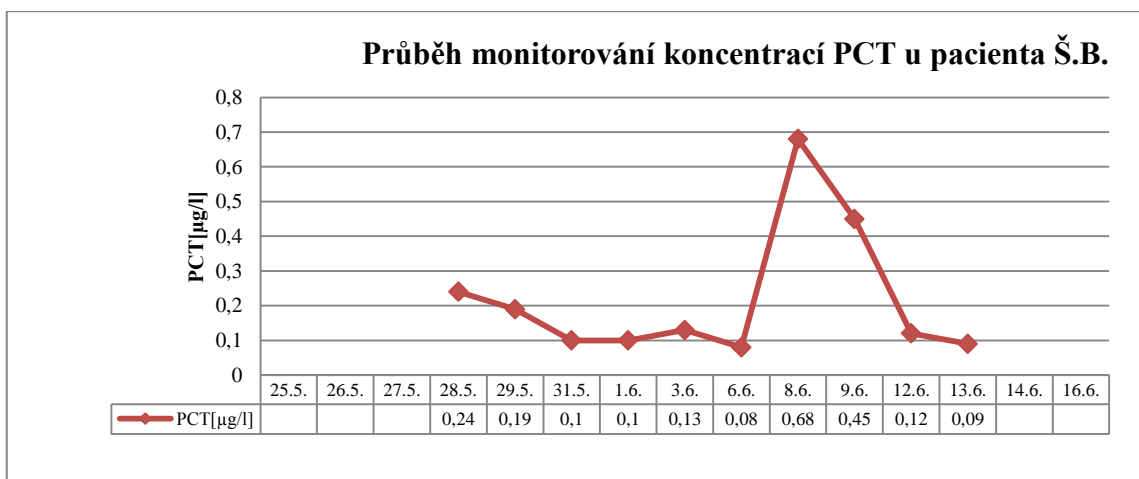
Mikrobiologicky byly zjištěny následující patogeny:

9. 6. 2016 rectum-*Candida albicans* opakovaně

9. 6. 2016 moč - *Klebsiela pneumoniae*



**Graf 7. Monitorování koncentrací CRP u pacienta Š. B. od 25. 5. do 16. 6. 2016**

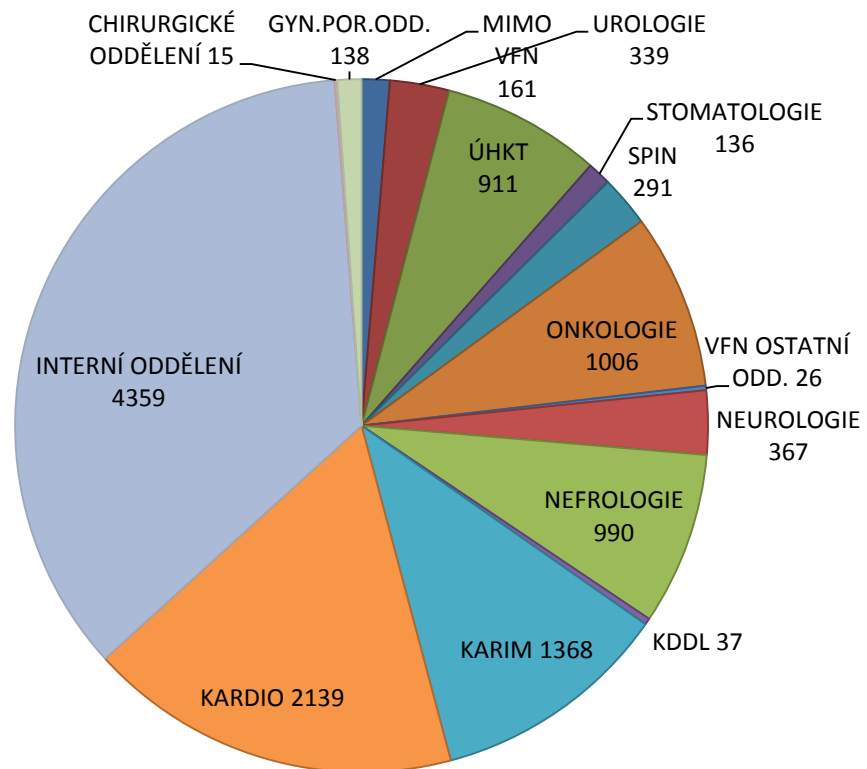


**Graf 8. Monitorování koncentrací PCT u pacienta Š. B. od 28. 5. do 13. 6. 2016**

Pacient Š. B. byl léčen pro pankreatitidu způsobenou alkoholem. U hodnot CRP dochází k vzestupu s maximem dne 28. 5. 2016, kdy se hodnota CRP vyšplhala až na 255,9 mg/l. Hladiny PCT se pohybují jen okolo 0,2 µg/l. Můžeme tedy u pacienta mluvit o SIRS, kdy CRP je vysoké (stovky mg/l), ale PCT nepřekročilo hranici 0,5 µg/l. Pacientův stav se zkomplikoval uroinfekcí 8. 6. 2016, kdy došlo ke zvýšení koncentrace PCT z hodnoty 0,08 µg/l na 0,68 µg/l. O den později, 9. 6. 2016 je u pacienta prokázána bakterie *Klebsiela species* v moči. Pacient byl po zaléčení antibiotiky propuštěn do domácího ošetření ve zlepšeném stavu.

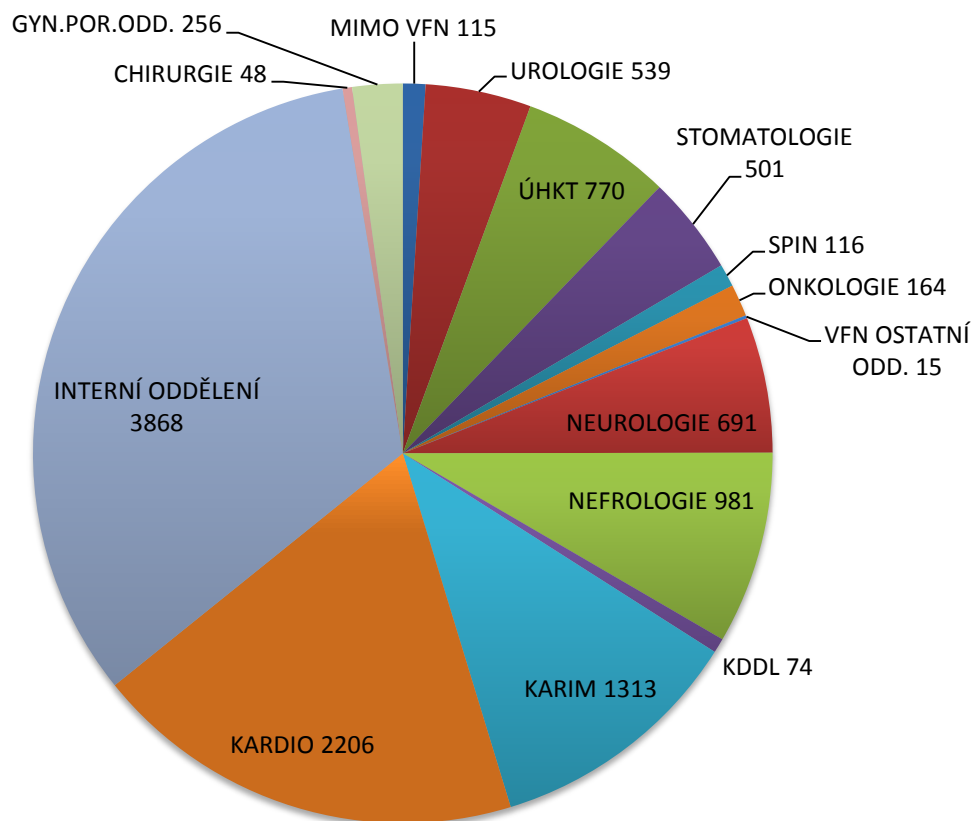
## 2. Porovnat počty vyšetřených PCT dle indikujících oddělení v letech 2009, 2012, 2015.

Přehled vyšetřených PCT dle indikujících klinik v letech 2009,2012 a 2015 přináší grafy 9, 10, 11 a tabulka 13.



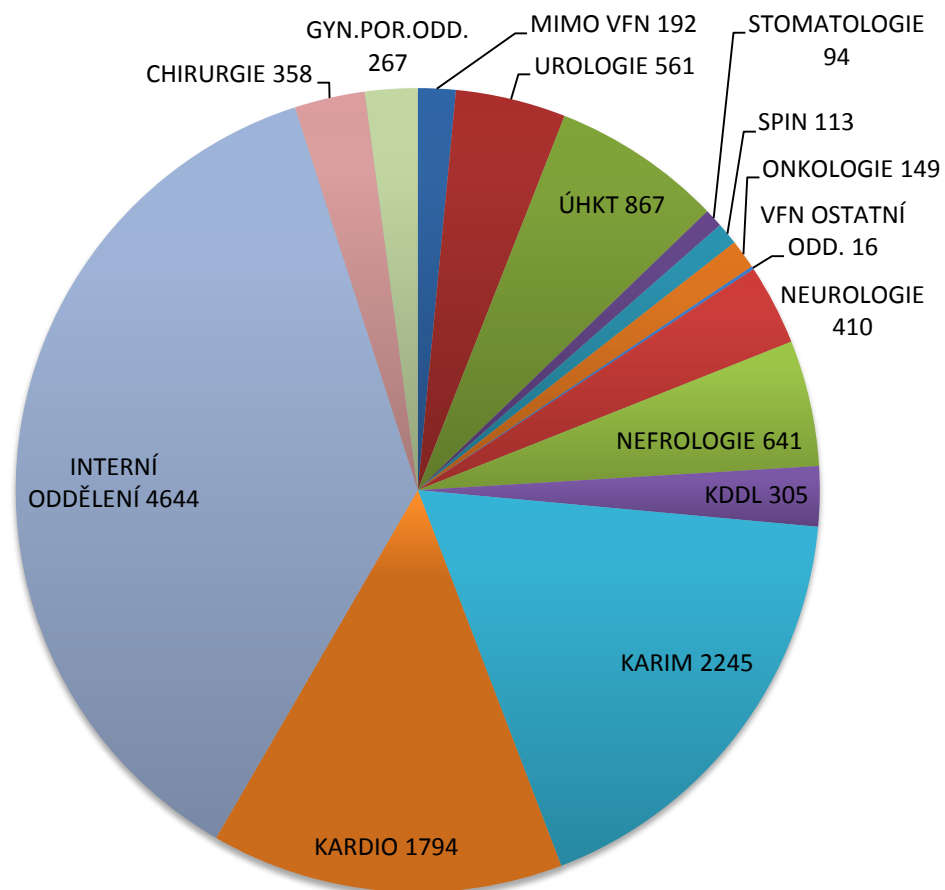
**Graf 9. Počet vyšetření PCT za rok 2009- jednotlivá oddělení, celkem 12297**

Vysvětlivky: Gyn.por.odd.- Gynekologicko porodnické oddělení, VFN - Všeobecná fakultní nemocnice, ÚHKT - Ústav hematologie a krevní transfuze, KDDL - Klinika dětského a dorostového lékařství, SPIN- Společný příjem interně nemocných, KARIM - Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny, Kardio - kardiologie



**Graf 10. Počet vyšetření PCT za rok 2012 jednotlivá oddělení, celkem 11673**

Vysvětlivky: Gyn.por.odd.- Gynekologicko porodnické oddělení, VFN - Všeobecná fakultní nemocnice, ÚHKT - Ústav hematologie a krevní transfuze, KDDL - Klinika dětského a dorostového lékařství, SPIN- Společný příjem interně nemocných, KARIM - Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny, Kardio - kardiologie



**Graf 11. Počet vyšetření PCT za rok 2015- jednotlivá oddělení, celkem 12667**

Vysvětlivky: Gyn.por.odd.- Gynekologicko porodnické oddělení, VFN - Všeobecná fakultní nemocnice, ÚHKT - Ústav hematologie a krevní transfuze, KDDL - Klinika dětského a dorostového lékařství, SPIN- Společný příjem interně nemocných, KARIM - Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny, Kardio - kardiologie

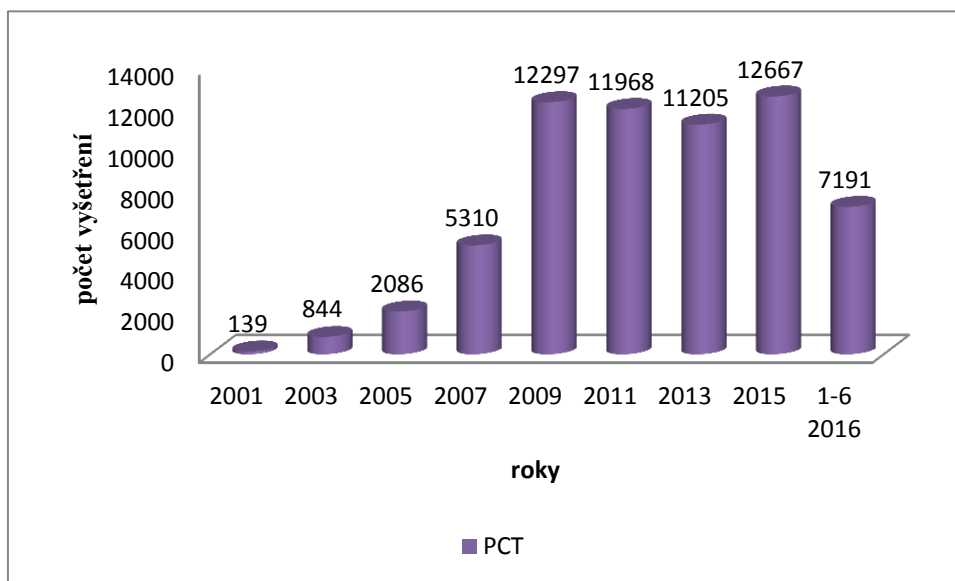
**Tabulka 13. Přehled počtu vyšetření dle oddělení za roky 2009, 2012, 2015**

Oddělení	Počet vyšetření za rok 2009	Počet vyšetření za rok 2012	Počet vyšetření za rok 2015
MIMO VFN	161	115	192
UROLOGIE	339	539	561
ÚHKT	911	770	867
STOMATOLOGIE	136	501	94
SPIN	291	116	113
ONKOLOGIE	1006	164	149
VFN OSTATNÍ ODD.	26	15	16
NEUROLOGIE	367	691	410
NEFROLOGIE	990	981	641
KDDL	37	74	305
KARIM	1368	1313	2245
KARDIO	2139	2206	1794
INTERNÍ ODDĚLENÍ	4359	3868	4644
CHIRURGICKÉ ODD.	15	48	358
GYNEKOL.POROD. ODD.	138	256	267
<b>CELKEM</b>	<b>12297</b>	<b>11673</b>	<b>12667</b>

Jak je z grafů 9, 10, a 11 a tabulky 13. patrné, počty vyšetřených PCT se liší jak mezi jednotlivými odděleními, tak i mezi jednotlivými roky.

### **3. Sledovat dynamiku počtu vyšetřených PCT v letech 2001-6/2016.**

Dynamika vyšetření PCT odpovídá trendu při zavedení nového vyšetření do praxe. V prvních třech letech sledování se počet vyšetření PCT pohybuje ve stovkách, později již v tisících vyšetření prokalcitoninu za rok. Dramatický nárůst vidíme v letech 2007-2009.(obr. 12). Je zde patrné, že vyšetření hladiny PCT se stalo běžnou praxí u sledování stavu kriticky nemocných pacientů. Podle počtu vyšetření v první polovině roku 2016 lze očekávat mírný nárůst oproti minulým rokům.



**Graf 12. Dynamika vyšetřených PCT v letech 2001-6/2016**

## 4. Diskuze

### Cílem této práce bylo:

**1) Porovnat hladiny a dynamiku C-reaktivního proteinu a prokalcitoninu při zánětlivém procesu u tří vybraných pacientů s rozdílnými diagnózami.**

V případě tří vybraných pacientů v kritickém stavu hospitalizovaných ve VFN si dovoluji prohlásit, že prokalcitonin je marker s větší senzitivitou a specificitou než CRP.

U prvního pacienta D. P. klesala hladina prokalcitoninu po nasazení antibiotik rychleji, než hladina C-reaktivního proteinu (ta naopak ještě stoupala). Tato skutečnost je v souladu se současnými poznatky o rozdílné dynamice PCT a CRP při zánětlivém procesu. Lékař tak dostal informaci, že pacient je správně léčen.

V případě druhého pacienta D. J. je opět vidět znatelný pokles PCT během tří dnů, což je dobrý prognostický ukazatel stavu pacienta. Hladina CRP klesla za tuto dobu jen mírně a postupem času se zvýšila ještě více (až 305,8 mg/l), ale hladina PCT se



pohybovala pouze kolem 2 µg/l. Zde je patrné, jak oba zánětlivé markery odlišně reagují na mykotickou infekci.

U třetího pacienta Š. B. s pankreatitidou pozorujeme vysoké hladiny CRP (až 255,9 mg/l), ale hladiny PCT nejvýše 0,2 µg/l. PCT tedy nereaguje na zánětlivou reakci bez infekční příčiny. Naopak poté, co pacient v průběhu hospitalizace dostal uroinfekci, PCT stoupl na hodnotu 0,68 µg/l.

## **2) Porovnat počty vyšetřených PCT dle indikujících oddělení v letech 2009, 2012, 2015.**

V letech 2009, 2012 a 2015 bylo v naší laboratoři ÚLBLD ve VFN Praha provedeno 11673-12667 stanovení prokalcitoninu za rok. Největší propad v počtu vyšetření PCT byl u onkologicky nemocných pacientů. Oddělení onkologie měla v roce 2009 vyšetřeno 1006 PCT, ale v roce 2012 již pouze 164. Dle mého názoru vyšetření PCT nebylo pro onkologická oddělení takovým přínosem, jak původně lékaři očekávali a během tří let od něj dramaticky upustili. Podobně tomu bylo i na stomatologických odděleních, kde došlo k nárůstu vyšetřených PCT v roce 2012(501 vyšetření), ale o tři roky později se počet PCT propadl ještě níže (94 vyšetření), než za rok 2009(136 vyšetření). Naopak více vyšetření prokalcitoninu začala indikovat klinika dětského a dorostového lékařství a chirurgie. Nejvíce vyšetření PCT bylo indikováno interními odděleními nemocnice, dále klinikou anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny a oddělením kardiologie.

Zlomek stanovení hladin PCT bylo provedeno pro oddělení mimo VFN, v roce 2015 to bylo pouze 192 vzorků z celkového počtu 12667.

Nejvíce vyšetření, a to až 1/4 ze všech v uvedených letech indikovala interní klinika.

Ráda bych ještě poznamenala, že stanovení hladin prokalcitoninu proplácení zdravotní pojišťovny jen pacientům v ústavní léčbě, nikoli v ambulancích.

## **3) Sledovat dynamiku počtu vyšetřených PCT v letech 2001-6/2016.**

Jak jsem již uvedla ve výsledcích, dynamika počtu vyšetřených PCT ve výše uvedených letech odpovídá trendu při zavedení nového vyšetření do praxe. Pro některé specializace

se vyšetření prokalcitoninu stalo rutinní záležitostí, jiní lékaři nejspíše usoudili, že pro jejich potřeby se nehodí tak, jak by potřebovali.

## **5. Závěr**

Domnívám se, že vyšetření prokalcitoninu je velice přínosné. Pro první cíl mé bakalářské práce dle mého názoru platí, že lékař má podle dynamiky koncentrace PCT šanci rozpoznat syndrom systémové zánětlivé odpovědi (SIRS- Systemic Inflammatory Response Syndrome) od sepse. Může včas nasadit antibiotika nebo naopak antibiotickou léčbu ukončit, pokud již není důvod v ní pokračovat. Pacient je tak léčen efektivněji a může se snáze předcházet vzniku rezistence mikrobiálních kmenů na antibiotika.

Ke druhému cíli bych ráda poznamenala, že lékaři napříč specializacemi se naučili cíleněji indikovat vyšetření PCT a požadují ho s větším rozmyslem a zacílením.

Každé nové vyšetření vzbudí zájem lékařů a je to tak dobře. Jak je patrné u třetího bodu mé bakalářské práce, od roku 2009 stanovujeme v naší laboratoři podobné počty stanovení prokalcitoninu každý rok. Na základě dat za první pololetí roku 2016 se domnívám, že podobně tomu bude i letos.

Je třeba ale zdůraznit, že lékař by se neměl řídit jen výsledky vyšetření z laboratoře, ale měl by brát na zřetel i klinický stav pacienta.

## 6. Seznam zkratek

CRP	C-reaktivní protein
CT	kalcitonin
ECLIA	elektrochemiluminiscenční analýza, Electrochemiluminescence Immuno Assay
ELISA	enzymová imunoanalýza, Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ELFA	enzymová fluorescenční analýza, Enzyme Linked Fluorescent Assay
ICHT	imunochromatografický test, Immuno Chromatographic Test
IL-1	interleukin 1
IL-1 $\beta$	interleukin 1 $\beta$
IL-2	interleukin 2
IL-6	interleukin 6
ILMA	imunoluminiscenční analýza, Immuno Luminometric Assay
IRMA	imunoradiometrická analýza, Immuno Radiometric Assay
JIP	jednotka intenzivní péče
KARIM	Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny
KDDL	Klinika dětského a dorostového lékařství
KARDIO	kardiologie
LIS	laboratorní informační systém
mRNA	messengerová ribonukleová kyselina
PCT, proCT	prokalcitonin
preproCT	preprokalcitonin
SIRS	syndrom systémové zánětlivé odpovědi
SPIN	Společný příjem interně nemocných
TNF $\alpha$	tumor nekrotizující faktor $\alpha$
ÚHKT	Ústav hematologie a krevní transfuze
ÚLBLD	Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky
VFN	Všeobecná fakultní nemocnice

## 7. Seznam obrázků

Obrázek 1. Struktura C- reaktivního proteinu (3).....	11
Obrázek 2. Prokalcitonin- „molekulární data“ (12).....	16
Obrázek 3. Exprese <i>CALC-1</i> v C- buňkách štítné žlázy (13) .....	16
Obrázek 4. Exprese <i>CALC-1</i> v parenchymatózních buňkách (13) .....	17
Obrázek 5. Diagnostická destička na semikvantitativní stanovení PCT (29).....	25
Obrázek 6. Porovnání výsledků na testovací destičce s referenční kartou (30) .....	25
Obrázek 7. Luminometr Lumat LB 9507(29).....	26
Obrázek 8. Analyzátor mini VIDAS (34).....	27
Obrázek 9. Analyzátor Cobas e411(foto autorky) .....	27
Obrázek 10. Analyzátor UniCel DxC 880i (35) .....	30
Obrázek 11. Reagenční zásobník na stanovení CRP (foto autorky) .....	31
Obrázek 12. Reagenční set Elecsys PCT BRAHMS (foto autorky).....	35

## 8. Seznam tabulek

Tabulka 1. Hodnoty CRP a PCT dle původce sepse (26).....	22
Tabulka 2. Přehled metod stanovení PCT (28,31,32,7).....	28
Tabulka 3. Složení reagensů pro stanovení CRP(6).....	32
Tabulka 4. Skladování a stabilita reagensů (6).....	32
Tabulka 5. Stabilita kontrol po rekonstituci (36).....	33
Tabulka 6. Stabilita vzorku (6) .....	33
Tabulka 7. Funkční charakteristiky (6).....	33
Tabulka 8. Stabilita kalibrátorů a kontrol (7) .....	34
Tabulka 9. Složení reagensů (7) .....	35
Tabulka 10. Stabilita setu PCT (7).....	36
Tabulka 11. Stabilita analytu PCT ve vzorku (7) .....	36
Tabulka 12. Počet vyšetření CRP a PCT sledované skupiny .....	38
Tabulka 13. Přehled počtu vyšetření dle oddělení za roky 2009, 2012, 2015 .....	47

## 9. Seznam grafů

Graf 1. Zastoupení mužů a žen ve skupině 111 pacientů .....	37
Graf 2. Věkové zastoupení pacientů ve sledované skupině.....	38
Graf 3 Monitorování koncentrací CRP u pacienta D. P. od 8. 6. do 17. 6. 2016 .....	40
Graf 4. Monitorování koncentrací PCT u pacienta D. P. od 8. 6. do 17.6.2016.....	40
Graf 5. Monitorování koncentrací CRP u pacienta D. J. od 20. 5. do 16. 6. 2016.....	41
Graf 6. Monitorování koncentrací PCT u pacienta D. J. od 20. 5. do 16. 6. 2016. ....	42
Graf 7. Monitorování koncentrací CRP u pacienta Š. B. od 25. 5. do 16. 6. 2016.....	43
Graf 8. Monitorování koncentrací PCT u pacienta Š. B. od 28. 5. do 13. 6. 2016.....	43
Graf 9. Počet vyšetření PCT za rok 2009- jednotlivá oddělení, celkem 12297.....	44
Graf 10. Počet vyšetření PCT za rok 2012-jednotlivá oddělení, celkem 11673 .....	45
Graf 11. Počet vyšetření PCT za rok 2015- jednotlivá oddělení, celkem 12667.....	46
Graf 12. Dynamika vyšetřených PCT v letech 2001-6/2016.....	48

## 10. Seznam literatury

1. MARUNA, P. Prokalcitonin. 1. vyd. Praha: Triton, c2003, s. 13-14, 16-17, 20, 23, 81, 104. ISBN 80-7254-410-1
2. KAZDA, A. et al. Kritické stavy. 1. vyd. Praha. Galén. c 2012, s. 168-169, 188, 191-192. ISBN 978-80-7262-7639
3. Struktura C- reaktivního proteinu (převzato z <http://www.ebi.ac.uk/>)
4. BUNEŠOVÁ, M.: Klíčové biochemické markery zánětů. FLORENCE. 2010, roč. 6(10), s. 14-16. ISSN: 1801-46
5. MALINA, P.: Staré a nové markery zánětu. FONS. 2012, **22**(2), s. 21-24. ISSN 1211-7137
6. SOP- Stanovení hmotnostní koncentrace C-reaktivního proteinu imunoturbidimetricky na analyzátoch Unicel DxC 880i a DxC 800, firma BECKMAN 2015
7. Pracovní návod - Stanovení prokalcitoninu metodou ECLIA na přístrojích Cobas, firma BRAHMS 2014
8. RACEK, J. et al. Klinická biochemie. 2. přeprac. vyd. Praha. Galén. c2006, s. 160 ISBN 80-7262-324-9
9. <http://www.wikiskripta.eu/index.php/ELISA>
10. ZIMA, T. Laboratorní diagnostika. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, c2007. s. 557  
ISBN 978-80-7262-372-3.
11. MAREŠKOVÁ H. Přínos Vyšetření Intracelulárních Cytokinů Pro Klinickou Imunologii. [Rukopis] [e-book]. Praha, 2001; 2001. Centrální katalog UK / Central Catalog CU, Ipswich, MA. Accessed April 27, 2016
12. Prokalcitonin- molekulární data (převzato z <http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/glab/glency1.htm>)
13. SKÁLOVÁ, S. Prokalcitonin a jeho úloha v současné diagnostice. Osteologický bulletin [online]. 2007, **12**(3), 100-105 [cit. 2016-05]. ISSN 1211-3778. Dostupné z: [http://smos.cz/wp-content/uploads/2014/10/ob07\\_03.pdf](http://smos.cz/wp-content/uploads/2014/10/ob07_03.pdf)
14. BRODSKÁ, H. Sledování biochemických markerů septických stavů. Praha, 2009. Disertační práce. UK Praha. Vedoucí práce Prof MUDr Antonín Kazda, DrSc.

15. PETROVÁ P., ŠVÁBOVÁ M.. IL-6, PCT, CRP- pomocné markery v diagnostice septických stavů[online].[cit.2016-03-13]. Dostupné z: [http://www.roche-diagnostics.cz/content/dam/diagnostics\\_czechrepublic/cs\\_CZ/documents/Labor\\_Aktuell/LA2010/LA0110/Sepse.pdf](http://www.roche-diagnostics.cz/content/dam/diagnostics_czechrepublic/cs_CZ/documents/Labor_Aktuell/LA2010/LA0110/Sepse.pdf)
16. MEISNER, M. The natural elimination rate of procalcitonin in patients with normal and impaired renal function. *Intensive Care Med.* **2000**(26). s. 212-216
17. HOŘEJŠÍ, V., BARTŮŇKOVÁ J. Základy imunologie. 4. vyd. Praha: Triton, 2009.s. 57 ISBN 978-80-7387-280-9.
18. KAZDA A, BRODSKÁ H.Procalcitonin- Vývoj názorů na interpretaci [cit. 2016-05-30]. Dostupné z: <http://www.cskb.cz/res/file/akce/sjezdy/2009-Pha/ppt/B1/Kazda.pdf>
19. ZIMA, T. Laboratorní diagnostika. 3., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, c2013.s. 617 ISBN 978-80-7492-062-2.
20. HAHN, W.et. al. Reference Intervals of Serum Procalcitonin Are Affected by Postnatal Age in Very Low Birth Weight Infants during the First 60 Days after Birth. *Neonatology* [online]. 2015-6-18, **108**(1), 60-64 [cit. 2016-07-06]. DOI: 10.1159/000381330. ISSN 1661-7800. Dostupné z: <http://www.karger.com/?doi=10.1159/000381330>
21. REINHART, Konrad a Michael MEISNER. Biomarkers in the Critically Ill Patient: Procalcitonin [online]. [cit. 2016-07-30]. DOI: 10.1016/j.ccc. 2011.01.002. ISBN 10.1016/j.ccc. 2011.01.002. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0749070411000030>
22. DE AZEVEDO, José R.A., Orlando J.M. TORRES, Rafael A. BERALDI, Carmen A.P.M. RIBAS a Osvaldo MALAFAIA. Prognostic evaluation of severe sepsis and septic shock: Procalcitonin clearance vs  $\Delta$  Sequential Organ Failure Assessment. *Journal of Critical Care* [online]. 2015, **30**(1), 219.e9-219.e12 [cit. 2016-07-30]. DOI: 10.1016/j.jcrc.2014.08.018. ISSN 08839441. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0883944114003499>
23. SARANSH J., SINHA S., SURENDRA K SHARMA, et al. Procalcitonin as a prognostic marker for sepsis: a prospective observational study. *BMC Research Notes* [online]. 2014, **7**(1), 458- [cit. 2016-07-04]. DOI: 10.1186/1756-0500-7-458. ISSN 1756-0500. Dostupné z: <http://bmcresnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-0500-7-458>
24. BEQJALIKA A.,BULOKASNECI A. REFATLLARI E. et al.. Serum Procalcitonine Levels as an Early Diagnostic Indicator of Sepsis. *Materia Socio Medica* [online]. 2013, **25**(1), 23- [cit. 2016-07-05]. DOI: 10.5455/msm.2013.25.23-25. ISSN 1512-7680. Dostupné z: <http://www.scopemed.org/?mno=34338>

25. POTLUKOVÁ E. Procalcitonin pomůže snížit spotřebu antibiotik na JIP [ cit. 2016-03-23].

Dostupné z: <http://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/procalcitonin-pomuze-snizit-spotrebu-antibiotik-na-jip-450817>

26. BRODSKÁ, H., MALÍČKOVÁ K., ADÁMKOVÁ V., et al.. Significantly higher procalcitonin levels could differentiate Gram-negative sepsis from Gram-positive and fungal sepsis. *Clinical and Experimental Medicine* [online]. 2013, **13**(3), 165-170 [cit. 2016-07-05]. DOI: 10.1007/s10238-012-0191-8. ISSN 1591-8890. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10238-012-0191-8>

27. UHROVA, Jana, Helena BRODSKA, Zdislava VANICKOVA, Hana BENAKOVA a Tomas ZIMA. Procalcitonin interference in an immunometric calcitonin assay. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* [online]. 2011, **71**(2), 157-162 [cit. 2016-07-03]. DOI: 10.3109/00365513.2010.547214. ISSN 0036-5513. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/00365513.2010.547214>

28. Pracovní návod- Semikvantitativní stanovení procalcitoninu metodou ICHT, firma BRAHMS 2007

29. UHROVÁ J., ČERNOHOUSOVÁ L.- Procalcitonin a jeho využití v klinické praxi- přednáška

30. <http://www.procalcitonin.com/pct-assays/pct-q-rapid.html>)

31. Pracovní návod- Stanovení procalcitoninu metodou ILMA, firma BRAHMS 2007

32. Pracovní návod- Stanovení procalcitoninu metodou ELFA na přístrojích VIDAS, firma BRAHMS 2008

33. <http://www.procalcitonin.com/pct-assays/pct-q-rapid.html>)

34. [http://www.biomerieux-diagnostics.com/sites/clinic/files/styles/product\\_big/public/mini-vidas-019.png?timestamp=1469285887753](http://www.biomerieux-diagnostics.com/sites/clinic/files/styles/product_big/public/mini-vidas-019.png?timestamp=1469285887753)

35. <https://www.beckmancoulter.com>)

36. Příbalové letáky PreciControl ClinChem Multi 1a 2 -firma Roche Diagnostic