

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Stanovení CD64 v diagnostice novorozenecké sepse u předčasně
narozených novorozenců**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Veronika Hornychová**
Studijní program: B1501 Experimentální biologie
Studijní obor: Experimentální biologie
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **RNDr. Martin Novák, Ph.D.**
Termín odevzdání práce: 2020

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Veronika Hornychová
Název práce: Stanovení CD64 v diagnostice novorozenecké sepse u předčasně narozených novorozenců
Typ práce: Bakalářská
Pracoviště: Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce: RNDr. Martin Novák, Ph.D.
Rok obhajoby práce: 2020
Abstrakt: Tato práce se zabývá detekcí markeru CD64 a možností jeho využití v diagnostice sepse u předčasně narozených novorozenců.

Sepse je celosvětově nejčastější příčinou úmrtí v novorozeneckém období. Klíčovým bodem pro snížení mortality a morbidity je včasná diagnostika. Sepse je velice komplexní patofyziologický proces a z toho důvodu je její diagnostika obtížná. Proto jsou neustále hledány nové markery.

Marker CD64 se jeví jako časný marker sepse. Jedná se o vysokoafinitní receptor pro monomerní IgG protilátky. Po infekčním podnětu dochází ke zvýšení exprese tohoto receptoru na povrchu neutrofilů. Neutrofilové představují významnou složkou anti-infekční imunitní obrany organismu a výrazně se podílejí na procesu fagocytózy opsonizovaných bakterií.

Pomocí průtokové cytometrie bylo stanoveno procentuální zastoupení markeru CD64 na granulocytech. Výsledek statistické analýzy poukazuje na významnou asociaci hodnot markeru CD64 s výskytem sepse a jako ideální cut-off hodnota se jeví 10 %.

Klíčová slova: Předčasně narozený novorozenec, sepse, marker CD64, průtoková cytometrie
Počet stran: 46
Počet příloh: 2
Jazyk: Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Veronika Hornychová
Title of thesis: CD64 as a diagnostic marker of neonatal sepsis in preterm newborns
Type of thesis: Bachelor
Department: Laboratory of Growth Regulators
Supervisor: RNDr. Martin Novák, Ph.D.
The year of presentation: 2020
Abstract: This paper is focused on the CD64 marker detection and its possible use in the diagnostics of sepsis in preterm newborns.

Sepsis is globally the most common cause of mortality among newborns. Early diagnostics is the key for the decreasing mortality and morbidity. Sepsis is very complex pathophysiological process and its diagnostics is difficult. Therefore new markers are searched.

Marker CD64 appears to be good early sepsis marker. The CD64 marker is high-affinity receptor for the monomeric IgG antibodies. After infection stimula there is increased expression of this receptor on the neutrophil surface. The neutrophils, which are the significant part of the anti-infection immune defense, are significantly involved in process of phagocytosis the opsonized bacteria.

Flow cytometry was used to determine the proportion of marker CD64. The output of the static analysis points out the significant association between CD64 marker and sepsis. The ideal cut-off value appears to be 10 %.

Keywords: Preterm newborn, sepsis, marker CD64, flow cytometry
Number of pages: 46
Number of appendices: 2
Language: Czech

„Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Martina Nováka, Ph.D., za použití citované literatury.“

V Olomouci dne

/vlastnoruční podpis/

Tímto bych ráda poděkovala RNDr. Martinu Novákovi Ph.D. za vstřícnost, ochotu, věnovaný čas a odborné vedení mé bakalářské práce. Mé poděkování také patří RNDr. Tomáši Füstovi Ph.D. za zpracování statistiky. Tato práce byla částečně podpořena z prostředků Institucionální podpory MZ CR-RVO (FNOL,00098892)

Obsah

Seznam použitých zkratk	7
Úvod	8
1 Současný stav řešené problematiky	10
1.1 Novorozenec	10
1.2 Definice sepse	10
1.3 Novorozenecká sepse	12
1.4 Diagnostika sepse.....	13
1.4.1 Klinické příznaky	14
1.4.2 Mikrobiologická diagnostika sepse.....	14
1.4.3 Laboratorní markery.....	15
1.4.3.1 C-reaktivní protein	16
1.4.3.2 Prokalcitonin	17
1.4.3.3 Marker CD64	18
1.5 Mortalita a morbidita v novorozeneckém období	19
1.6 Průtoková cytometrie	22
2 Experimentální část	24
2.1 Cíle práce	24
3 Materiál a metodika	25
3.1 Biologický materiál.....	25
3.2 Chemikálie a protilátky.....	25
3.3 Přístrojové a laboratorní vybavení	25
3.4 Příprava vzorků.....	25
3.5 Průtoková cytometrie	26
3.5.1 Analýza vzorků	26
3.5.2 Vnitřní kontrola kvality.....	26
3.5.3 Gatovací strategie.....	26
3.6 Rozřazení novorozenců do příslušné kategorie.....	28
4 Výsledky	29
4.1 Časná sepse	29
4.2 Pozdní sepse.....	30
4.3 Časná a pozdní sepse.....	31
5 Diskuze	34
6 Závěr	37
7 Bibliografie	38
8 Seznam příloh	44

Seznam použitých zkratk

CD	cluster of differentiation neboli diferenciacní skupina
CRP	C-reaktivní protein
ČR	Česká republika
DAMP	damage associated molecular patterns
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EOS	early-onset sepsis neboli časná sepse
FN	fakultní nemocnice
GBS	group B Streptococcus neboli streptokokus skupiny B
G-CSF	granulocyte stimulating factor neboli granulocytární kolonie stimulující faktor
IG	immature granulocyte neboli nezralé granulocyty
IgG	imunoglobulin třídy G
IL	interleukin
INF- γ	interferon gamma
IS	imunitní systém
K ₃ EDTA	ethylendiamintetraacetát tridraselný
LOS	late-onset sepsis neboli pozdní sepse
MODS	syndrom multiorgánového selhání
NE	neutrofily
NS	novorozenecká sepse
NÚ	novorozenecká úmrtnost
PAMP	pathogen associated molecular patterns
PCT	prokalcitonin
PNN	předčasně narozený novorozenec
PRR	pattern recognition receptors
SIRS	systémová zánětlivá odpověď organismu
SOFA	sequential organ failure assessment
TLR	toll-like receptor
TNF- α	tumor nekrotizující faktor α
WBC	white blood cells neboli leukocyty

Úvod

Imunitní systém (IS) patří k základním homeostatickým mechanismům. Jeho úkolem je udržovat integritu organismu. Pokud dojde k infekci, musí být aktivován, aby se organismus mohl bránit. Imunitní systém umí rozpoznat vnější patogenní mikroorganismy a jejich toxické produkty díky nespecifickým a specifickým imunitním mechanismům. Tyto dva systémy jsou navzájem propojeny pomocí mediátorových molekul. Reakce vyvolaná přítomností patogenů a jejich produktů se obecně nazývá zánět. Mezi prvními buňkami, které se účastní protizánětlivé odpovědi jsou fagocyty, a to zejména neutrofilů. Obvyklým výsledkem protizánětlivé odpovědi je rychlá lokalizace infekce a zneškodnění patogenů. V závislosti na rozsahu poškození a délce trvání lokálního zánětu může dojít k systémové reakci o různé intenzitě (Hořejší, 2005). Právě tato systémová zánětlivá reakce organismu na infekční podnět bývá označována jako sepse (Průcha, 2015).

První použití slova „seps“ je přisuzováno Hippokratovi, který jím označil rozklad tkáně komplikující závažnější poranění. V roce 1847 se gynekolog Ignaz Philipp Semmelweis zasloužil o první zásadní diagnostický a terapeutický pohled na sepsi. Na porodním oddělení, kde pracoval, docházelo k častému úmrtí žen po porodu na horečku omladnic neboli puerperální sepsi. Hledal tedy příčinu. Pověšil si souvislosti mezi výskytem smrtící horečky a studenty vyšetřujícími rodičky, kteří přicházeli na porodní oddělení z patologických cvičení na pitevně. Zavedl tedy mytí rukou v chlorové vodě před gynekologickým vyšetřením. Po zavedení tohoto preventivního opatření úmrtnost matek po porodu výrazně klesla (Průcha, 2015). Louis Pasteur se zabýval mikroorganismy a poukázal na souvislost mezi jejich přítomností a vznikem zánětu. Z jeho poznatků pak vycházel Joseph Lister (1827-1912), který kladl důraz na čistotu chirurgických nástrojů a sálů a zavedl princip antiseptiky. (Jessney, 2012). Následovalo období, kdy byla seps a její patofyziologie zkoumána. Interpretace klinických studií však byla obtížná, protože neexistovala jednotná definice sepse. O jednotnou definici sepse a pojmů s ní souvisejících se zasloužili v roce 1992 R.C. Bone et. al. v práci: „Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis“ (Bone, 1992). V roce 2016 byla vytvořena nová definice s názvem: „Sepsis-3“. Seps je zde definována jako život ohrožující orgánová dysfunkce způsobená deregulovanou odpovědí organismu na přítomnost infekce, přičemž její závažnost je kvantifikována dle skórovacího systému SOFA (Sequential Organ Failure Assessment). Tato definice a staging v sobě odráží poznatky, které přinesl výzkum sepse v posledních letech (Singer, 2016).

Seps však není specifické onemocnění. Je to komplexní děj s dosud nejasnou patofyziologií. Z tohoto důvodu není její diagnóza jednoduchá. Prozatím však neexistuje

validní test, který by umožnil její jednoznačnou diagnostiku (Singer, 2016). K sepsi může dojít u kteréhokoliv pacienta nezávisle na jeho věku či pohlaví. Nejvíce ohroženou skupinou jsou však starší lidé a novorozenci. Novorozenecká sepse (NS) je jednou z nejčastějších příčin morbidit a mortalit u novorozenců. Klíčem ke snížení je její časná diagnostika a zahájení antibiotické terapie. Rozpoznat novorozeneckou sepsi v časné fázi je však obtížné z důvodu nespecifických a variabilních příznaků. Standardně využívanými laboratorními testy jsou C-reaktivní protein (CRP), prokalcitonin (PCT) a zlatým standardem je pak mikrobiologická kultivace vzorku periferní krve tzv. hemokultura. Tyto tradiční laboratorní testy mají však v diagnostice NS značná omezení. Obecně je problémem jejich nízká senzitivita a specifita. U hemokultury je navíc nevýhodou dlouhá detekční doba a výrazné ovlivnění výsledku předchozími farmakologickými zásahy jak u rodičky, tak u novorozence. Typicky je výsledek hemokultury ovlivněn předchozím podáním antibiotik.

V současné době jsou tedy hledány a testovány nové markery sepse, které by umožnily její časnou diagnostiku. Předmětem této práce je detekce sepse pomocí markeru CD64 u předčasně narozených novorozenců. Marker CD64 je vysokoafinitní Fc-gamma receptor na povrchu neutrofilů. Neutrofily jsou buněčnou složkou nespecifických imunitních mechanismů a významně se podílejí na procesu fagocytózy opsonizovaných bakterií. Bylo zjištěno, že po invazi patogenů dochází ke zvýšení exprese tohoto receptoru na neutrofilech. Metodou průtokové cytometrie bylo tedy stanoveno procentuální zastoupení CD64 pozitivních neutrofilů ve vzorku periferní krve předčasně narozených novorozenců. Cílem této práce je ověřit, zda je znak CD64 vhodným markerem sepse u dané skupiny pacientů a také stanovit cut-off hodnoty. Tato metoda by pak mohla být využita jako doplňující informace pro potvrzení diagnózy NS.

1 Současný stav řešené problematiky

1.1 Novorozenec

V momentě, kdy dojde k oplodnění lidského vajíčka spermií, je započat vývoj plodu. Doba od početí do porodu se nazývá těhotenství a trvá v průměru 280 dní, což odpovídá 40 týdnům. Novorozencem se stává dítě od okamžiku narození a toto období trvá do jeho 28. dne života. Fyziologická hodnota dechové frekvence se u novorozenců pohybuje v rozmezí 40-60 dechů za minutu, srdeční frekvence pak 100-180 tepů za minutu. Za fyziologickou tělesnou teplotu se považuje 36,5-37,5 °C naměřených rektálně. Nastane-li porod mezi 38-42 gestačním týdnem jedná se o novorozence narozeného v termínu. Porodní hmotnost bývá v rozmezí od 2500 g do 4000 g.

Pokud dojde k porodu před ukončeným 37. gestačním týdnem, jedná se o předčasně narozeného novorozence (PNN). Porodní hmotnost bývá nižší než 2500 g a odvíjí se od gestačního věku. Předčasný porod je v současné době považován za syndrom. Za jednu z nejčastějších příčin předčasného porodu jsou považovány infekce (Straňák, 2015). Problémem je, že takto narozený novorozenec je nezralý a jeho orgány a tkáně jsou nedovyvinuté. S nezralostí novorozence se pojí značné problémy a komplikace, které se odvíjí od gestačního věku. Imunitní obrana není plně rozvinutá a kvůli tomu jsou PNN náchylnější k infekcím. U těchto novorozenců je výrazně vyšší riziko morbidity a mortality nežli u novorozenců narozených v termínu (Buonocore, 2018).

1.2 Definice sepse

Důležitým milníkem byl rok 1991, kdy byla ustanovena definice sepse na konsenzuální konferenci American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Sepse je zde definována jako systémová zánětlivá odpověď organismu (SIRS) na přítomnost infekce. Pro stanovení sepse byla vytvořena SIRS kritéria a ke splnění diagnózy u pacienta s infekcí dostačovala přítomnost dvou ze čtyř kritérií. Těmito kritérii jsou: Tělesná teplota vyšší než 38 °C, nebo nižší než 36 °C. Srdeční frekvence vyšší než 90 tepů za minutu. Dechová frekvence vyšší než 20 vdechů za minutu. Změna v počtu bílých krvinek, a to při hodnotě vyšší než 12000/mm³, nebo nižší než 4000/mm³, nebo více než 10 % nezralých neutrofilů. Dalším přínosem byla také doporučení pro sjednocení definic pojmů se sepsí souvisejících, jimiž jsou infekce, bakteremie, syndrom multiorganového selhání (MODS), těžká sepsa a septický šok (Bone, 1992). V roce 2001 byla provedena aktualizace této definice, kdy byla kritéria sepse doplněna o rozsáhlý seznam klinických příznaků a biologických markerů. Klinická praxe časem ukázala, že kritéria SIRS mají vysokou senzitivitu, ale nízkou specifitu, s čímž se pojí vysoká míra falešně pozitivních případů (Levy, 2003). V důsledku toho byla snaha o vytvoření nové definice. V roce 2014 dvě velké

odborné společnosti Society of Critical Care a European Society of intensive Care Medicine pověřily své experty, aby vytvořili novou definici sepse v souvislosti s dosavadními poznatky. Dle nové definice s názvem Sepsis-3 je sepsa popisována jako život ohrožující orgánová dysfunkce způsobená deregulovanou odpovědí organismu na přítomnost infekce. Klinické stanovení orgánové dysfunkce se zde hodnotí pomocí SOFA skóre, přičemž vyšší skóre je spojováno s vyšší pravděpodobností mortality. Pomocí bodové stupnice se hodnotí respirační funkce, jaterní a renální funkce, parametry koagulace, hemodynamika a stav vědomí (Singer, 2016). Tyto definice byly vytvořeny pro stanovení sepse u dospělého člověka.

V roce 2005 byla na mezinárodní pediatrické konferenci stanovena konsenzuální definice sepse a orgánové dysfunkce v pediatrii. Sepsa byla definována jako SIRS s prokázanou infekcí nebo podezřením na ni (SIRS kritéria jsou uvedena v Tab. 1). Hlavním rozdílem oproti definici sepse u dospělého člověka je, že pro stanovení diagnózy musí být přítomno kritérium změny teploty, nebo abnormalita v počtu leukocytů. Tachykardie a tachypnoe jsou totiž společným symptomem mnoha nemocí v pediatrii. Cut-off hodnoty u kritérií pro stanovení sepse v pediatrii jsou přizpůsobeny fyziologickým změnám odpovídajícím vývojovým fázím jedince. Je zde vytvořeno šest věkově specifických skupin, mezi nimiž jsou i termínově narození novorozenci. Nejsou zde ale zahrnuti předčasně narození novorozenci (Goldstein, 2005). V prospektivní studii autorů Hofer *et al.* byla aplikována SIRS kritéria stanovená na zmíněné pediatrické konsenzuální konferenci na skupinu předčasně a termínově narozených novorozenců. V této studii SIRS kritéria nezachytila dvě třetiny termínových a jednu čtvrtinu předčasně narozených novorozenců s časnou sepsí kdy hemokultura byla pozitivní. Obecně měla SIRS kritéria vyšší senzitivitu u předčasně narozených novorozenců (Hofer, 2015).

V současnosti neexistuje jednotná definice NS. Její absence výrazně snižuje pravděpodobnost shody mezi nálezy epidemiologů, kliniků a výzkumných pracovníků, což brání pokroku v této oblasti směrem ke zlepšování výsledků (Wynn, 2016). Je zde určitá snaha o adaptaci definice Sepsis-3 pro využití v pediatrii (Schlapbach, 2018). Avšak formální revize nebyla zatím uskutečněna. Lze říci, že definice samotná není vrcholem poznání a správné praxe, ale je právě pomyslnou základnou.

Tabulka 1. SIRS kritéria pro stanovení sepse u novorozenců. Upraveno podle (Goldstein, 2005).

Věková skupina	Tělesná teplota t (°C)	Srdeční frekvence (tepů/min)		Dechová frekvence (dechů/min)	Počet leukocytů ^a (Leukocyty × 10 ³ /mm ³)
		Tachykardie	Bradykardie		
0-7 dní	36 > t > 38,5	>180	<100	>50	> 34
7-28 dní	36 > t > 38,5	>180	<100	>40	>19,4 nebo <5

^a Dalším kritériem souvisejícím s počtem leukocytů je přítomnost více než 10 % nezralých neutrofilů.

1.3 Novorozenecká sepse

Sepse je tedy výsledkem systémové reakce organismu na infekci. Nejčastěji se jedná o infekci bakteriálního původu, méně často o virovou nebo fungální infekci (Goldstein, 2005). Podle toho, kdy dojde k manifestaci, se sepse u novorozence dělí na časnou, takzvanou „early-onset sepsis“ (EOS), a pozdní, „late-onset sepsis“ (LOS).

Za EOS se považuje, pokud ke klinické manifestaci dojde do 72 hodin od narození. Většinou se jedná o rychle probíhající multisystémové onemocnění, které progreduje do septického šoku. Onemocnění se často manifestuje jako septikemie (masivní přítomnost bakterií v krvi) bez lokalizace, adnatní pneumonie či meningitida. Nejčastěji se jedná o vertikální přenos infekce z matky na plod. Cesta průniku může být hematogenní z krevního oběhu matky přes placentální bariéru. Další možností je skrz porodní cesty, kdy mohou být infikovány plodové obaly, plodová voda a následně i samotný plod. K přenosu infekce dochází také u porodu při průchodu porodním kanálem, který je kolonizován aerobními i anaerobními bakteriemi, či vdechnutím infekční plodové vody novorozencem (Straňák, 2015). Za nejčastější původce EOS jsou považovány: β-hemolytický streptokok skupiny B neboli *Streptococcus agalactiae* (GBS) a gramnegativní bakterie *Escherichia coli* (*E. coli*). Infekce *E. coli* se vyskytuje častěji u PNN a novorozenců s velmi nízkou porodní hmotností. Dalšími patogeny spojovanými s EOS jsou například *Listeria monocytogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus species*, *Streptococcus pneumoniae*, *Candida species* (Shane, 2017).

Pozdní forma sepse se klinicky manifestuje po 72 hodinách od porodu. Sepse má většinou pozvolný průběh s lokalizovanou infekcí. Projevuje se například jako meningitida, pneumonie či osteomyelitida. Většinou jde o horizontální přenos infekce a jedná se o tzv. nozokomiální nákazy. Ojedinele se může jednat o infekce intrauterinní či získané při porodu s pozdní manifestací. Výskyt LOS je častější u PNN z důvodu dlouhodobé hospitalizace na jednotkách intenzivní péče. Mezi nejčastější původce LOS patří koaguláza negativní stafylokoky, zejména *Staphylococcus epidermidis*. Dalšími patogeny jsou:

Staphylococcus aureus spojovaný s infekcí pocházející z vaskulárních katetrů, *Sterptococcus pyrogenes*, *Pseudomonas species*, *Klebsiella species*, *Enterobacter*, ale také GBS a *E. coli* (Straňák, 2015; Shane, 2017).

V průběhu evoluce došlo k vybudování řady mechanismů, pomocí nichž je schopen IS rozpoznávat patogenní mikroorganismy a adekvátním způsobem na ně reagovat. Systém vrozené imunitní odpovědi reaguje na strukturní a funkční rysy, které mají patogeny společné. Tyto strukturní rysy se označují jako pathogen associated molecular patterns (PAMP). Imunokompetentní buňky mají k dispozici tzv. pattern recognition receptors (PRR), pomocí nichž tyto strukturní rysy rozpoznávají. Uplatňují se zde tři rodiny receptorů, které infekční agens rozlišují. První rodinou jsou toll-like receptory (TLR), které reagují na strukturní rysy mikroorganismů v extracelulárním prostředí a endosomech. Mají zásadní význam pro přenos informace o přítomnosti infekčního agens. TLR receptory jsou také aktivovány pomocí mediátorů zvaných alarminy, které se uvolňují z poškozených buněk a iniciují tak neinfekční zánětlivou odpověď. Obecně se tyto molekuly označují damage associated molecular patterns (DAMP). NOD-like receptory jsou přítomny v intracelulárním prostředí a reagují na přítomnost bakteriálních struktur v cytoplazmě. Třetí rodinou jsou RIG-I-like receptory, které reagují na přítomnost virových struktur v cytoplazmě. Interakce PRR s PAMP spouští kaskádu zánětlivé odpovědi, jejímž výsledkem je exprese genů pro- a protizánětlivých cytokinů, které aktivují systém vrozené a adaptivní imunity. Důležitými cytokiny, které stimulují imunitní odpověď, jsou tumor nekrotizující faktor- α (TNF α) a interleukin-1 β (IL). Díky nim také dochází k produkci kyseliny arachidonové, aktivaci komplementu a neutrofilů, expresi integrinů, produkci oxidu dusnatého, zvýšení prokoagulační aktivity endoteliálních buněk a genové expresi adhezních molekul (Průcha, 2015). Souhra pro- a protizánětlivých mediátorů slouží k řízení imunitní odpovědi. Pokud nedojde k lokalizaci patogenů, dochází k translokaci patogenů do krevního oběhu a rozvoji SIRS, jež je spojená s MODS a následnou smrtí. Tímto způsobem tedy dochází k rozvoji sepse. Průběh sepse u novorozence je odlišný od průběhu u dospělého člověka. Novorozenci mají odlišnou jak vrozenou a adaptivní imunitní odpověď na infekci, tak i postnatální dynamiku mediátorů infekce.

1.4 Diagnostika sepse

Diagnostika, a to zejména u PNN, je obtížná z důvodu nespecifických a variabilních klinických příznaků. Všeobecně lze říci, že sepse se dá diagnostikovat třemi různými způsoby: na základě klinických příznaků, pomocí mikrobiální kultivace vzorku krve a pomocí laboratorních markerů.

1.4.1 Klinické příznaky

Klinickými příznaky počínající sepse může být teplotní instabilita projevující se hypotermií nebo hypertermií. Dále se může projevovat špatným prokrvením periférií, což lze pozorovat na prodlouženém kapilárním návratu delším než dvě sekundy. Kůže bývá bledá, chladná a nejčastěji dochází k cyanóze. Pokožka může mít mramorovanou kresbu. Na kůži se mohou objevit petechie, ikterus, exantém či pustulky. Z respiračních potíží je nejvíce specifický respirační distress syndrom. Jedná se o dechovou tíseň novorozence způsobenou anatomickou a funkční nezralostí plic s nedostatkem surfaktantu. Toto je typické u PNN. Příznakem dechové tísně je tachypnoe, dyspnoe a může také docházet k apnoickým pauzám. Častým příznakem je takzvaný grunting, což je zvukový fenomén způsobený výdechem proti uzavřené hlasivkové štěrbině napomáhající udržení funkční reziduální kapacity plic. Z neurologických projevů lze pozorovat křeče, letargii, svalovou hypotonii nebo hyperexcitabilitu. Novorozenec může mít také gastrointestinální potíže, kvůli kterým může docházet k potížím s krmením. Novorozenec s těmito potížemi netoleruje stravu a často zvrací. K centrálním oběhovým potížím patří bradykardie, tachykardie a hypotenze (Gerdes, 1991; Straňák, 2015; Rabasová, 2015).

1.4.2 Mikrobiologická diagnostika sepse

Za zlatý standard v diagnostice sepse je považována mikrobiologická kultivace vzorku krve, tzv. hemokultura. V některých případech se provádí kultivace vzorku mozkomíšního moku, moči nebo stěrů a výtěrů ze slizničních povrchů. Důležité je, aby byl vzorek krve odebrán před zahájením antimikrobiální terapie, jinak by výsledek mohl být falešně negativní. U dospělého člověka se standardně odebírá 10 ml krve do dvou hemokultivačních nádobek po 5 ml. Jedna je určená pro aerobní a druhá pro anaerobní kultivaci. U novorozenců se zpravidla odebírá 1 ml krve. Hemokultivační nádoby jsou vloženy do kultivátoru, kde je udržována stálá teplota 37 °C. Po pomnožení bakterií je obsah lahvičky vyočkován na tuhou kultivační půdu. Zároveň je také prováděna kultivace stěru z kůže pacienta v místě odběru krve pro vyloučení falešné positivity. Vykultivované bakteriální kmeny jsou identifikovány a je stanovena jejich citlivost na antibiotika. Pozitivní výsledek tedy potvrzuje přítomnost bakterií v krvi. Díky znalosti původce infekce může být následně zahájena specifická antibiotická terapie. Tento postup je v souladu s praxí ve fakultní nemocnici (FN) Olomouc .

V detekci patogenů se jeví perspektivní použití metod molekulární genetiky s využitím polymerázové řetězové reakce a sekvenování. Nově se však v mikrobiologických laboratořích dostává do popředí využití diagnostického nástroje označovaného jako MALDI/TOF MS. Jedná se o spektrofotometrickou metodu založenou na laserové

desorpci/ionizaci za účasti matrice. Je to rychlý a spolehlivý diagnostický nástroj s vysokou propustností pro identifikaci mikroorganismů. Díky této metodě je možné zkrátit čas potřebný k detekci a identifikaci patogenů na pouhých 24 hodin (Dingle, 2013).

I přes standardní používání má tato metoda značná negativa. Jednou z nevýhod je dlouhá detekční doba. Na výsledek hemokultury se řádově čeká 24-72 hodin. Včasná diagnostika zejména u PNN je zásadní, protože u novorozenců může být nástup sepse akutní a klinický průběh se může rychle zhoršit. Citlivost kultivačních metod je často nízká. Důvodem je antibiotická terapie matek v perinatálním období za účelem snížení rizika vzniku infekce. Souběžným negativním faktorem je kombinace malého objemu vzorku krve a v něm nízkého počtu bakteriálních kolonií (Chirico, 2011). Obecně u novorozenců a zvláště pak u novorozenců s velmi nízkou porodní hmotností je problém s odebráním dostatečného objemu krve. Například pokud by bylo k hemokultivaci použito 0,5 ml krve s nízkým počtem kolonií, přibližně v 60 % případů by byl výsledek falešně negativní. (Schelonka, 1996). Z tohoto důvodu je doporučován odběr nejméně 1 -2 ml krve.

1.4.3 Laboratorní markery

Laboratorní diagnostika sepse přesahuje do různých oborů, jimiž jsou hematologie, klinická biochemie, imunologie, molekulární biologie a dříve zmíněná mikrobiologie. Byly již publikovány a testovány stovky biomarkerů sepse a tato snaha o nalezení vhodného markeru neustále pokračuje. V současné době neexistuje validní test, který by umožnil její jednoznačnou diagnostiku (Singer, 2016). Sepse je velice komplexní děj a na její průběh má vliv spousta faktorů. Z toho důvodu není její diagnostika a celkově management tohoto onemocnění jednoduchý. Ideální marker pro stanovení sepse by měl mít vysokou senzitivitu, specificitu a negativní prediktivní hodnotu blížíci se ke 100 %. Pozitivní prediktivní hodnotu pak větší než 85 %. Měl by být časným markerem, který by rozlišil novorozence s infekcí ideálně před klinickou manifestací sepse nebo souběžně s ní. Podle jeho dynamiky by se měl dát rozpoznat vývoj nemoci a reakce na antibiotickou terapii. U jednotlivých markerů se musí také brát ohled na jejich postnatální fyziologickou dynamiku. Důležité je, aby takový marker měl definovanou optimální cut-off hodnotu. Vyšetření by mělo být především rychlé, jednoduché a finančně dostupné. S ohledem na skupinu PNN by vyšetření mělo být proveditelné z malého množství vzorku krve (Ng, 2015). Stanovení referenčních intervalů a cut-off hodnot v novorozeneckém období není jednoduché, protože v souvislosti s gestačním stářím a postnatálním věkem probíhá mnoho fyziologických adaptačních změn. V tomto smyslu nelze brát novorozence jako malé děti, natož jako malé dospělé (Chiesa, 2011).

Běžným screeningovým vyšetřením je stanovení krevního obrazu, diferenciálního rozpočtu leukocytů, absolutního počtu neutrofilů a určení tzv. I/T indexu, což je poměr počtu nezralých forem neutrofilů vůči všem neutrofilům. Jejich využití v diagnostice NS bylo hodnoceno v mnoha studiích. Obecně vykazují omezenou přesnost s širokým rozsahem senzitivity a specificity (Chirico, 2011). Avšak nízká hodnota počtu leukocytů a neutrofilů spolu s vysokým I/T indexem jsou spojovány s vyšší pravděpodobností přítomnosti infekce. (Hornik, 2012) Mezi nejvíce rozšířené markery sepse, které se rutinně používají, patří CRP, PCT a některé z cytokinů, například IL6 a IL8. Existuje mnoho dalších biomarkerů, které jsou testovány a hodnoceny ve výzkumných pracích. Příkladem může být sérový amyloid A, lipopolysacharid vázající protein, TNF α , hepcidin, CD11 β (Sharma, 2017). Jedním z nich je i marker CD64, který je předmětem této práce.

1.4.3.1 C-reaktivní protein

Jedná se o cyklický protein složený z pěti identických nekovalentně vázaných podjednotek a řadí se mezi proteiny akutní fáze. Je jedním z nejvíce prostudovaných a rutinně používaných markerů infekce. Byl objeven v roce 1930 Williamem S. Tillettem a Thomasem Francisem u pacientů s pneumokokovou pneumonií. (Tillett, 1930).

C-reaktivní protein je produkován jaterními hepatocyty a jeho tvorba je stimulována zejména IL-6, dále pak IL-1 a TNF α . Jedním z hlavních ligandů pro CRP je fosfocholin, který je součástí teichoové kyseliny u grampozitivních bakterií a lipopolysacharidů u gramnegativních bakterií. C-reaktivní protein se váže na povrchové struktury mikroorganismů, ale i na membránové struktury apoptotických, nekrotických a poškozených buněk. Má schopnost aktivovat systém komplementu klasickou i alternativní cestou, jehož hlavní funkcí je opsonizace patogenů, chemotaxe a osmotická lýza. Dále CRP aktivuje monocyty a makrofágy a stimuluje produkci prozánětlivých cytokinů (Peisajovich, 2014).

Obecně používanými cut-off hodnotami u novorozenců je hodnota CRP 5 mg/l první den a dále 10 mg/l. Biologický poločas označovaný $T_{1/2}$ je dle Vigushin *et al.* u CRP 19 hodin (Vigushin, 1993). Jeho plazmatická koncentrace se začíná zvyšovat po 6 -12 hodinách po zánětlivém podnětu. K maximu produkce dochází po 24 -48 hodinách (Póvoa, 2002). Z tohoto důvodu je CRP považován za pozdní marker infekce. Oddálený počátek syntézy CRP v průběhu zánětlivé odpovědi je důvodem nízké senzitivity v časně fázi infekce, a jeho využití v diagnostice časně sepse je tak sporné (Hofer, 2012).

Výsledkem studie autorů Benitz *et al.* je, že pokud je hladina CRP měřena sériově (nejprve na počátku, následně po 8 -24 hodinách a poté 24 hodin od druhého měření) a přetrvávají normální hodnoty, poukazuje to na nepřítomnost infekce. Uvedená negativní prediktivní hodnota v sérii tří po sobě jdoucích měření byla okolo 99 %. Pokud je eliminován

infekční podnět, dochází k rychlému poklesu hodnot CRP. Sériové měření hladiny CRP by tedy mohlo být použito pro sledování průběhu zánětu a případně pro bezpečné ukončení podávání antibiotik (Benitz, 1998).

Na některé otázky je však dosud nejasná odpověď. Jednou z nich je jaký vliv má na postnatální fyziologickou dynamiku CRP gestační a postnatální věk. Zdá se, že koncentrace CRP se u neinfikovaných novorozenců zvyšuje během několika prvních dní. Ve studii Ishibashi *et al.* byly sériově měřeny koncentrace CRP. Bylo zaznamenáno, že hodnoty se od narození exponenciálně zvýšily, maxima (okolo 10 mg/l) dosáhly během 48 hodin a pak postupně klesaly k normálním hodnotám, za které je považována koncentrace CRP pod 5 mg/l. Zajímavým zjištěním byl rozdíl mezi novorozenci narozenými přirozenou cestou a císařským řezem. U novorozenců narozených císařským řezem byly signifikantně nižší maximální koncentrace CRP, což dle autorů naznačuje, že fyzický stres při porodu může souviset s velikostí zvýšení CRP (Ishibashi, 2002). V souvislosti s těmito poznatky byla publikována studie autorů Chiesa *et al.*, která potvrzuje, že u zdravých PNN je nižší a kratší odpověď CRP v porovnání se zdravými, termínově narozenými novorozenci. Tento rozdíl je nejspíše zapříčiněn nezralostí jater a jejich funkcí u PNN s neschopností produkce takového množství některých proteinů zahrnujících CRP (Chiesa, 2011). Signifikantně nižší odpověď CRP na infekci u PNN ve srovnání s termínově narozenými novorozenci byla zaznamenána ve studii autorů Hofer *et al.* Bylo zde navrženo použití věkově specifických referenčních intervalů (Hofer, 2011). Další otázkou je, jaký mají neinfekční podněty vliv na hladinu CRP. Existují studie, které poukazují na to, že ke zvýšení hodnot CRP může dojít i vlivem neinfekčních podnětů v prvních dnech po narození. Zvýšené hodnoty CRP byly zaznamenány například v důsledku aspirace mekonie, předčasného odtoku plodové vody, po aplikaci surfaktantu, tkáňovém poškození či operaci (Hofer, 2012).

1.4.3.2 Prokalcitonin

Prokalcitonin se řadí mezi proteiny akutní fáze. Jedná se o protein o velikosti 14 kDa složený ze 116 aminokyselin. Je produktem Calc-I genu a poprvé byl popsán v roce 1984 (Le Moullec). V posledních letech se PCT stal jedním z významných biomarkerů v diagnostice bakteriální infekce.

Za fyziologických podmínek je tvořen c-buňkami štítné žlázy jako prekurzor hormonu kalcitoninu. Na rozdíl od jiných prekurzorů má však sám o sobě odlišnou biologickou funkci. Po rozvoji systémové zánětlivé odpovědi v reakci na bakteriální infekci byla zaznamenána produkce PCT v imunokompetentních buňkách, hepatocytech a po rozvoji sepse i u ostatních buněk (Meisner, 2002). Produkce PCT je stimulována bakteriálními endotoxiny a prozánětlivými cytokiny. U virových infekcí je vzestup PCT minimální. Jeho biologický

význam a funkce nejsou prozatím zcela objasněny. Je spojován s imunomodulační funkcí a popisován jako součást prozánětlivé odpovědi vrozené imunity (Liu, 2015)

Fyziologická koncentrace PCT u zdravých dospělých osob je menší než 0,2 ng/ml. Hodnota větší než 0,5 ng/ml je interpretována jako abnormální a značí přítomnost systémového zánětu a počínající sepse. Lokální bakteriální infekce nepůsobí významný vzestup PCT. Předností tohoto markeru je rychlý vzestup po 2 -4 hodinách s maximem produkce po 6 -8 hodinách. Zvýšené hodnoty následně přetrvávají po dobu 24 hodin. Díky rychlému vzestupu je považován PCT za časný marker sepse (Whicher, 2001). U novorozenců je však problémem jeho složitá postnatální dynamika. Po narození fyziologicky stoupá hladina PCT. Maxima dosahuje v průběhu 18 -36 hodin (okolo 10 ng/ml) a následně postupně klesá na normální hodnoty. Z tohoto důvodu je obtížná diagnostika EOS. Stejně jako CRP i hladina PCT může být ovlivněna neinfekčními podněty. Bylo také zjištěno, že gestační věk je jedním z faktorů, které ovlivňují hladinu PCT (Aydemir, 2018).

V diagnostice LOS vykazuje dobrou senzitivitu i specifitu. Obecně je PCT považován za středně dobrý marker sepse a ve srovnání s CRP vykazuje vyšší senzitivitu i specifitu. Při opakovaném měření je jeho negativní prediktivní hodnota vysoká. Toho se využívá ve vedení antibiotické terapie. Bylo také prokázáno, že PCT úzce koreluje se závažností infekce. (Meisner, 2014)

1.4.3.3 Marker CD64

Jedním z možných přístupů, jak diagnostikovat infekci a sepsi je sledování změn povrchových buněčných markerů u buněk podílejících se na imunitní odpovědi organismu. Marker CD64, známý také jako Fc-gamma receptor I, je vysokoafinitní receptor pro monomerní protilátky třídy G. Jedná se o membránový glykoprotein na povrchu neutrofilů a monocytů (Průcha, 2015).

Za normálních okolností je na neaktivovaných neutrofilech marker CD64 exprimován pouze slabě. Exprese CD64 je indukována pomocí cytokinů interferonu gamma (INF- γ) a granulocytárního, kolonie stimulujícího faktoru (G-CSF). Po stimulaci dochází k výraznému zvýšení četnosti receptoru, a to až desetkrát. (Davis, 2014; Fjaertoft, 1999; Gericke, 1995). Ve studii autorů van der Meer *et al.* byla zkoumána kinetika exprese CD64 na povrchu neutrofilů v průběhu 22 hodin po intravenózním podání *E. coli* lipopolysacharidů. První vzestup byl zaznamenán již po jedné hodině a následně k dalšímu vzestupu došlo po 6 hodinách (Van der Meer, 2016). Z toho také vyplývá vhodnost použití CD64 jako markeru časně fáze infekce. Exprese CD64 se zdá být stabilní a nedochází k výkyvům. Míra denzity

receptoru CD64 a jeho zvýšená exprese je spojována s intenzitou cytokinových stimulů (Hoffmeyer, 2003)

V jednotlivých studiích se se poměrně liší metody stanovení markeru CD64. Nejčastěji používaným způsobem je stanovení tzv. indexu CD64 (Bhandari, 2008; Dilli, 2010; Soni, 2013; Zeitoun, 2010; Groselj-Grenc, 2009). Tento index je vypočítán jako poměr střední intenzity fluorescence buněk a denzity receptoru (Icardi, 2009). Dalším často využívaným způsobem je stanovení průměrného počtu molekul protilátky s phycoerythrinem navázaných na jednu buňku (Ng, 2002; Du, 2014; Lam, 2011). V některých studiích je pak marker CD64 hodnocen pomocí střední intenzity fluorescence, nebo jako procento pozitivních buněk (Genel, 2012; Layseca-Espinosa, 2002; Elawady, 2015).

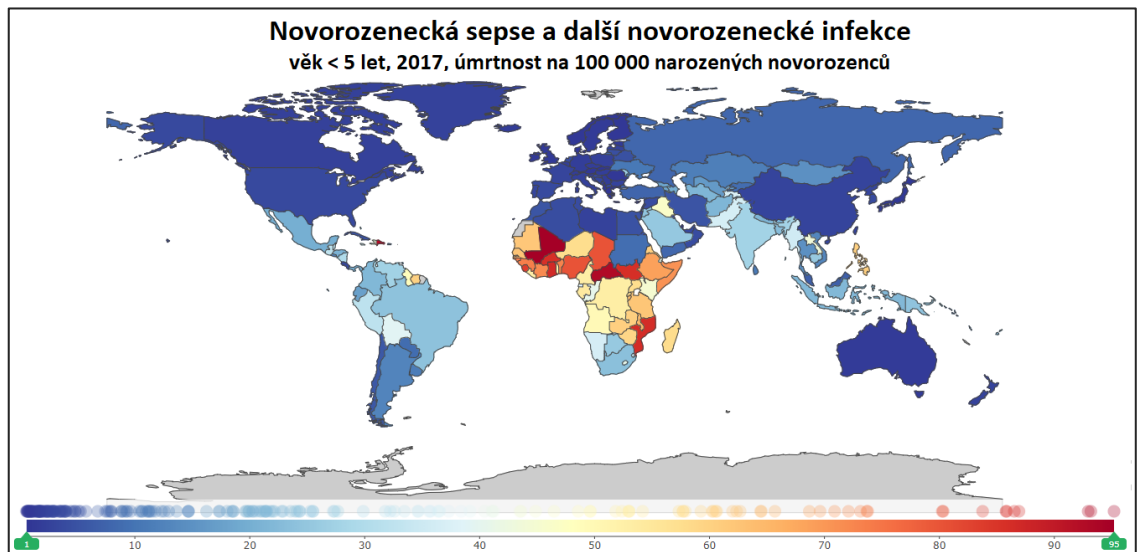
Neutrofilů jsou hlavní buněčnou složkou nespecifické imunitní odpovědi a představují první linii obrany vůči patogenním mikroorganismům. Po rozpoznání bakteriálních antigenů pomocí příslušných receptorů dochází k jejich aktivaci. Jejich hlavní funkcí je fagocytóza a mohou vyvolat i tzv. oxidační vzplanutí. Patogenní mikroorganismy jsou opsonizovány pomocí IgG protilátek. Fc-gamma receptor váže Fc doménu protilátky, a tím je usnadněn celý proces fagocytózy. Protilátky IgG jsou jako jediné schopny procházet přes placentální bariéru. K jejich aktivnímu transportu dochází na začátku třetího trimestru těhotenství (28. týden) a díky tomu se uplatňují v antiinfekční imunitní obraně i u PNN (Simister, 2003).

1.5 Mortalita a morbidita v novorozeneckém období

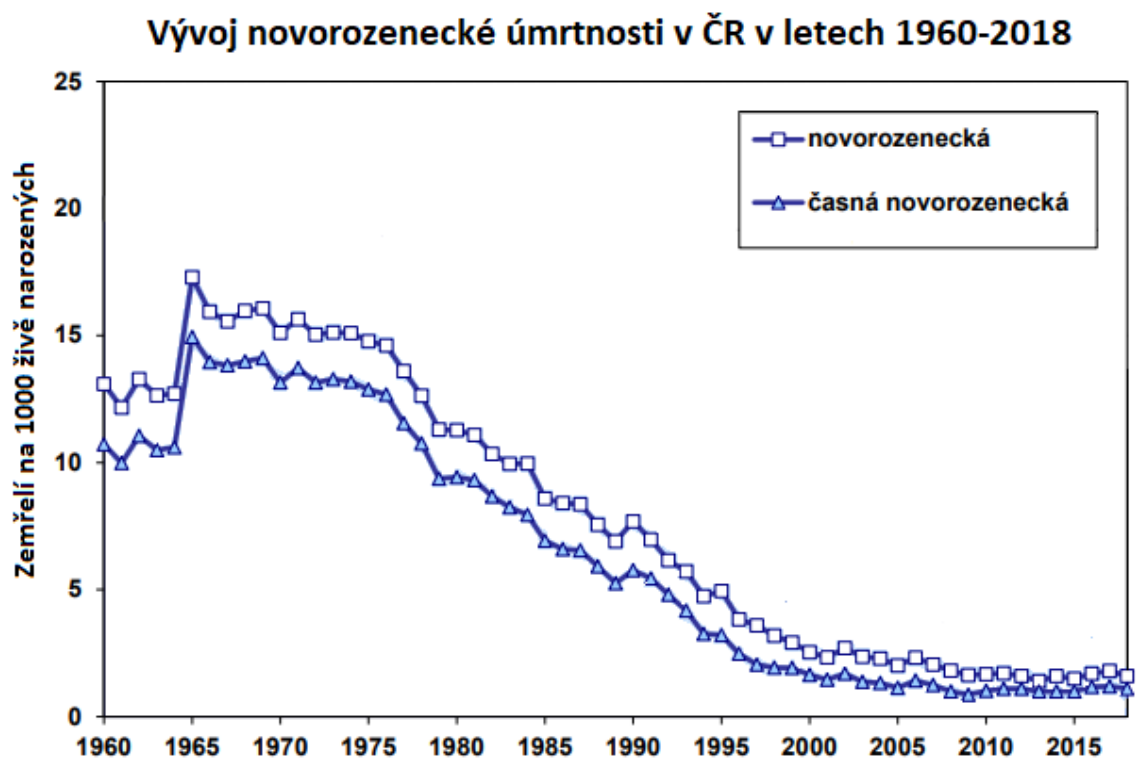
I přes značný pokrok v oboru neonatologie, který se zabývá péčí o novorozence je mortalita a morbidita v novorozeneckém období celosvětově vysoká. Novorozenecká úmrtnost (NÚ) se nejčastěji vyjadřuje počtem zemřelých na 1 000 živě narozených novorozenců, tedy v promilích. Celosvětově dle dat z roku 2017 je odhadována NÚ průměrně na 18 ‰. V rozvojových zemích, a to zejména v oblasti Subsaharské Afriky a jižní Asie, se NÚ pohybuje průměrně okolo 27 ‰. V zemích s vyšším středním a vysokým příjmem je průměr NÚ výrazně nižší a pohybuje se okolo 5 ‰. Například v Severní Americe je průměrná NÚ 3,6 ‰. V západní Evropě je průměrná NÚ 2,3 ‰ (Hug, 2019). Ze studie autorů Roth *et. al.*, která se opírá o data z Global Health Data Exchange, vyplývá, že v roce 2017, kdy celosvětově došlo k úmrtí 3 milionů novorozenců, sepse byla příčinou úmrtí okolo 20 % z nich (Roth, 2018; Popescu, 2020). V České republice (ČR) je NÚ poměrně nízká. V roce 2018 dle Ústavu zdravotnických informací a statistiky ČR byla NÚ 1,6 ‰. (Narození a zemřelí do 1 roku 2018, 2019) Dle České neonatologické společnosti byla v roce 2018 infekce příčinou úmrtnosti novorozenců z 35,3 % (Česká Neonatologická Společnost, c2011-2020).

Na incidenci sepse v novorozeneckém období se obecně podílí hned několik faktorů. Jedním z nich je nízký gestační věk novorozence a s ním související také nízká porodní hmotnost. Pokud dojde k porodu před 30. gestačním týdnem, tak je hladina transplacentárně přenesených mateřských IgG protilátek nízká. K tomu se také připojuje celková nezralost a nezkušenost IS. Kůže a sliznice především trávicího traktu a dýchacích cest mají v tomto období nedostatečnou ochrannou funkci. Negativním faktorem je vysoký selekční tlak antibiotik, jehož důsledkem je antimikrobiální rezistence. Rizikovým faktorem je také chorioamnitida, což je přítomnost zánětu v placentě a plodových obalech. Riziko vzniku infekce se zvyšuje, pokud dojde k předčasnému porušení plodových obalů a odtoku plodové vody. Vliv mají také invazivní výkony a neefektivní hygiena rukou personálu (Straňák, 2015; Polin, 2008).

Ve vyspělých státech je sepsa považována za syndrom s poměrně nízkou incidencí, avšak pokud k ní u novorozence dojde, riziko úmrtí je vysoké (Gerdes, 1991). Proto obavy z následků NS vedou v klinické praxi běžně k zahajování antibiotické terapie i při vzniku nespecifických klinických příznaků (Wagstaff, 2019). Nadužívání této terapie ovšem s sebou přináší i značná negativa. Důsledkem je nárůst rezistence mikroorganismů na antimikrobiální látky. Antibiotická terapie má negativní vliv na mikrobiom novorozence a bylo také prokázáno zvýšené riziko vzniku nekrotizující enterokolitidy (Cotten, 2009).



Obr. 1 Mapa světa znázorňující úmrtnost novorozenců na novorozeneckou sepsi a další novorozenecké infekce v jednotlivých zemích v roce 2017. Převzato a upraveno dle: <http://ihmeuw.org/52d4> ([Neonatal sepsis], 2015)



Obr. 2 Graf znázorňující vývoj novorozenecké úmrtnosti na území České republiky v letech 1960-2018. Časná novorozenecká úmrtnost značí, že k úmrtí došlo do sedmi dnů od narození novorozence. Novorozenecká úmrtnost značí, že k úmrtí došlo do 28 den od narození novorozence. Převzato a upraveno dle: <https://www.uzis.cz/res/f/008280/zdrroccz-2018.pdf> (Zdravotnická ročenka České republiky 2018, 2019)

1.6 Průtoková cytometrie

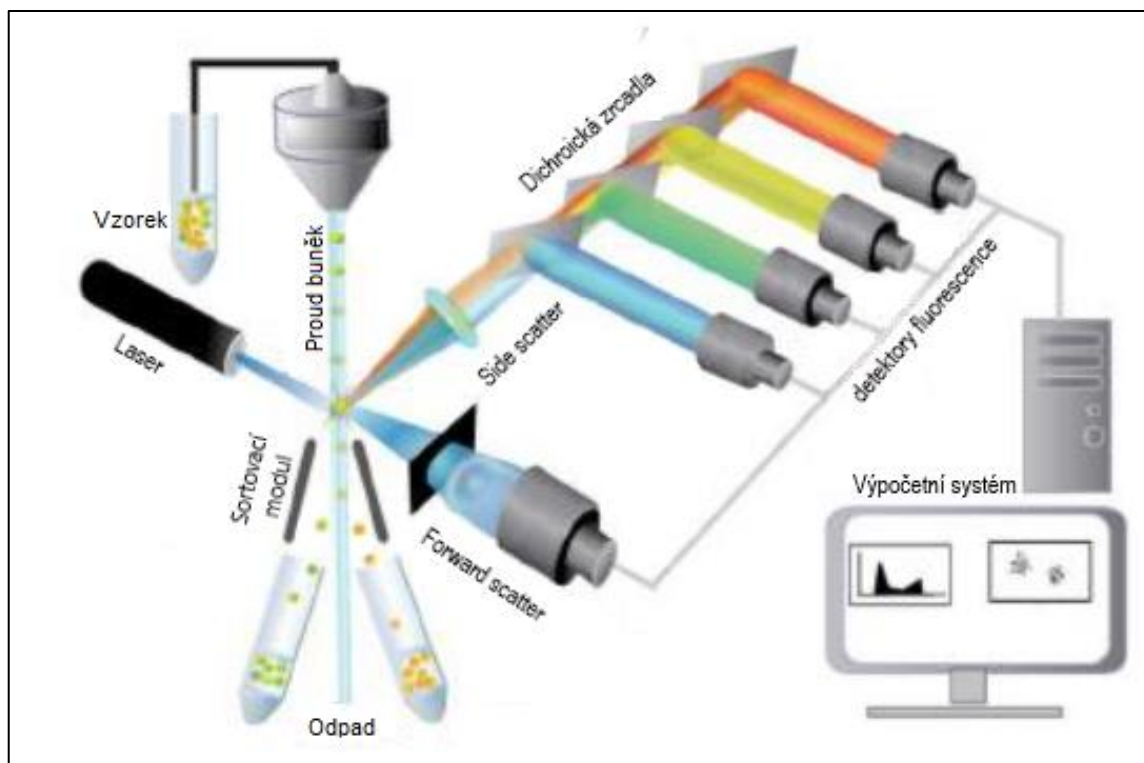
Průtoková cytometrie je moderní bioanalytická metoda, která se zabývá analýzou částic. Tato přístrojová metoda se využívá jak v klinické praxi, tak i ve výzkumných laboratořích. Umožňuje kvalitativní a kvantitativní analýzu fyzikálních a chemických vlastností částic. Cílem je zjištění jejich velikosti, denzity vnitřního obsahu, počtu a individuálních vlastností. Těmito částicemi jsou nejčastěji buňky živočišného nebo i rostlinného původu. Lze také analyzovat mnohem menší částice, jako jsou například viry, chromozomy či fragmenty DNA. Na povrchu nebo uvnitř analyzovaných částic mohou být na cílové struktury navázané fluorescenčně značené protilátky. Pro analýzu je nutné, aby se vzorek nacházel v suspenzi. Ideální velikost analyzovaných částic by měla být v průměru od 1 do 30 μm . Pro dosažení relevantních výsledků by analyzovaná suspenze měla obsahovat okolo 10^5 - 10^6 částic. V klinické praxi je nejčastějším materiálem krev, aspirát kostní dřeně, suspenze buněk připravené z tkání nebo buněčné kultury (Shapiro, 2003).

Průtokový cytometr se skládá z několika klíčových komponent. Je to systém fluidiky, optický systém, výpočetní systém a může být zařazen i sortovací modul. Systém fluidiky zajišťuje transport buněk do měřicí cely. Optický systém se skládá ze zdroje záření a optických cest, které vedou signál k detektorům. Výpočetní systém pak zpracovává signál z detektorů a umožňuje měnit parametry měření. Zároveň také zpracovává a uchovává naměřená data, která je následně možné hodnotit. Sortovací modul může být speciální součástí průtokového cytometru. V reálném čase dokáže izolovat cílovou populaci buněk z analyzovaného vzorku (Cibiček, 2014).

Po umístění zkumavky se vzorkem do průtokového cytometru je vzorek s buňkami nasáván a pomocí systému fluidiky je unášen nosnou kapalinou do měřicí cely. Pro analýzu je důležité, aby měřicím bodem prošla vždy jedna buňka. Toho je docíleno pomocí hydrodynamické fokusace. Vytvoří se takzvané koaxiální proudění. Kombinovaný proud tekutiny se vzorkem a nosnou tekutinou prochází kónicky zúženou sekci a tím je zajištěno, že měřicím bodem projde vždy právě jedna buňka. V měřicím bodě dochází k interakci buněk s monochromatickým světlem. Nejčastějším zdrojem světla bývají lasery či UV lampa. V momentě, kdy buňka prochází paprskem, dochází k rozptylu. Rozptýlené světlo dopadající na detektor v rovině procházejícího světla se nazývá přímý rozptyl neboli forward scatter. Jeho velikost odpovídá povrchu analyzované částice. Rozptýlené světlo dopadající na detektor umístěný kolmo na osu dopadajícího paprsku se nazývá boční rozptyl neboli side scatter. Jeho velikost v sobě odráží vnitřní strukturu a granularitu částice. Pokud je částice značena protilátkou s navázaným fluorochromem, po ozáření světlem příslušné vlnové délky dochází k excitaci fluorochromu a následné emisi záření o vyšší vlnové délce. Všechny tyto

získané signály jsou následně převáděny na elektrické impulzy a pomocí počítačového softwaru zpracovány. K zobrazení dat jsou využívány různé grafické záznamy. Příkladem takového zobrazení je jednoparametrový histogram. Nejpoužívanějším zobrazením však bývá dvouparametrový histogram zvaný „dot plot“.

Velkou předností tohoto přístroje je analýza velkého množství jednotlivých buněk v krátkém časovém úseku. Klinický význam této metody je velký a neustále se rozvíjí její aplikační potenciál. Největší uplatnění má v klinické hemato-onkologii, imunologii ale i v molekulární biologii (Cibiček, 2014).



Obr. 3 Schéma zobrazující základní komponenty průtokového cytometru. Převzato a upraveno dle: <https://biotech.illinois.edu/flowcytometry> (Pilas, b.r.)

2 Experimentální část

2.1 Cíle práce

Cílem této práce je ověření hypotézy, zda existuje statisticky významný vztah mezi expresí markeru CD64 na neutrofilech a přítomností sepse u skupiny PNN. Součástí této práce je popsání metodiky detekce markeru CD64 pomocí průtokové cytometrie. Výsledkem by pak mělo být stanovení cut-off hodnoty u pacientů ve skupině EOS a LOS.

3 Materiál a metodika

3.1 Biologický materiál

Krevní vzorky byly získány odběrem periferní krve PNN hospitalizovaných na Novorozeneckém oddělení Fakultní nemocnice Olomouc. Krev byla odebrána do antikoagulačních zkumavek Aquisel 0,5 ml s ethylendiamintetraacetátem tridraselným (K₃EDTA). Vzorky byly získávány v časovém období od prosince 2018 do ledna 2020. Celkově bylo analyzováno 81 vzorků krve PNN. V první skupině pacientů byl v rámci standardního postupu pracoviště odběr proveden mezi 12. a 24. hodinou života. Tito pacienti byli zařazeni do skupiny EOS. Ve druhé skupině pacientů byl odběr krve proveden v rámci kontrolního laboratorního vyšetření nebo při podezření na LOS. Tito pacienti byli zařazeni do skupiny LOS. Odběr byl proveden kdykoliv, ale ne dříve než 72 hodin od narození. Pro potřeby tohoto experimentu nebylo třeba zvláštního odběru krve. Vyšetření byla provedena z materiálu získaného pro standardní analýzu dle zvyklostí pracoviště. Toto doplňující vyšetření bylo provedeno s informovaným souhlasem stvrzeným zákonnými zástupci dítěte.

3.2 Chemikálie a protilátky

Lyzační roztok BD FACS lyse; Becton Dickinson, USA

Anti-Hu CD3 APC; Klon UCHT1; Invitrogen, USA

Anti-Hu CD4 Pacific Blue™; Klon MEM-241; EXBIO Praha, a.s, ČR

Anti-Hu CD8 PerCP-Cy™5.5; Klon MEM-31; EXBIO Praha, a.s, ČR

Anti-Hu CD45 Pacific Orange™; Klon HI30; EXBIO Praha, a.s, ČR

Anti-Hu CD 15 FITC; Klon MEM-158; EXBIO Praha, a.s, ČR

Anti-Hu CD64 PE; Klon 10.1; EXBIO Praha, a.s, ČR

BD FACS Diva™ CS&T IVD Beads; Becton-Dickinson Bioscience, USA

3.3 Přístrojové a laboratorní vybavení

Vortex Mixer 230V EU; Labnet International Incorporation, USA

Pipety s rozsahem 2 -200 µl; Eppendorf, Německo

Dávkovač Ceramus classic 1 -5 ml; Hirschmann, Německo

BD FACS Canto™ II Flow Cytometer; Becton-Dickinson Bioscience, USA

Analytický software BD FACS Diva verze 8.0; Becton-Dickinson Bioscience, USA

3.4 Příprava vzorků

Vzorky byly zpracovány metodou Lyse no wash. Do plastové zkumavky (5ml polystyrenová zkumavka s kulatým dnem o velikosti 12×75 mm) bylo napipetováno 3,5 µl z panelu protilátek CD3, CD4, CD8, CD45, CD15 a CD64. Následně bylo do zkumavky napipetováno 50 µl nesrážlivé krve PNN. Obsah zkumavky byl promíchán na vortexu. Vzorek byl inkubován ve tmě po dobu 10 minut při laboratorní teplotě 25 °C. Po uplynutí

doby inkubace byly pomocí dávkovače Ceramus classic ke vzorku přidány 2 ml lyzačního roztoku BD FACS lyse pro odstranění erytrocytů. Obsah zkumavky byl opět promíchán na vortexu. Následně probíhala lyze vzorku ve tmě po dobu 30 minut při laboratorní teplotě 25 °C.

3.5 Průtoková cytometrie

3.5.1 Analýza vzorků

Připravené vzorky byly analyzovány metodou vícebarevné průtokové cytometrie.

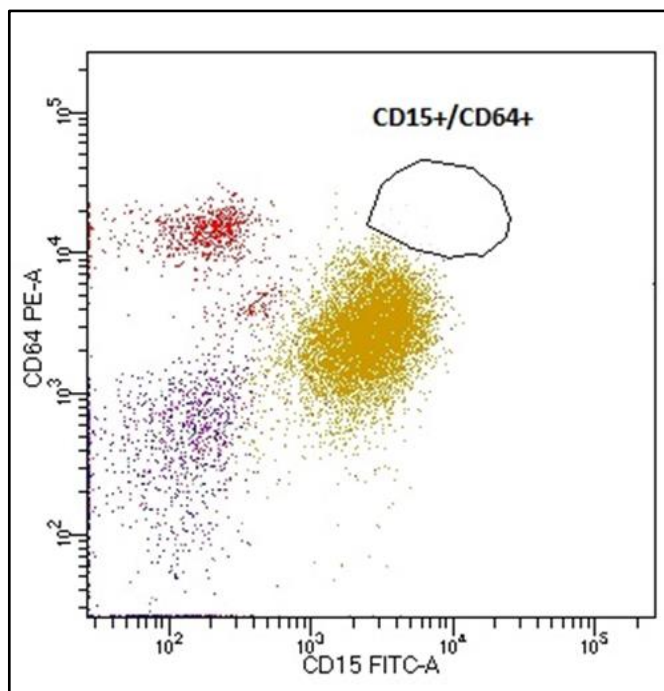
Pomocí protilátek proti CD3, CD4, CD8, CD45, CD15 a CD64 bylo provedeno určení a kvantifikace daných povrchových buněčných markerů. Analýza byla provedena na průtokovém cytometru BD FACS CantoTM II za použití analytického softwaru FACS Diva verze 8.0. K analýze dat bylo získáno minimálně 50 000 událostí v gatru granulocytů. Výsledkem bylo stanovení procentuálního zastoupení cílové populace CD64⁺/CD15⁺. Ověření pozitivivity bylo provedeno pomocí mediánu fluorescenční intenzity. Získaná data statisticky zpracoval RNDr. Tomáš Fürst, Ph.D. za použití softwaru MATLAB s využitím multivariační logistické regrese a Kruskal-Wallis testu.

3.5.2 Vnitřní kontrola kvality

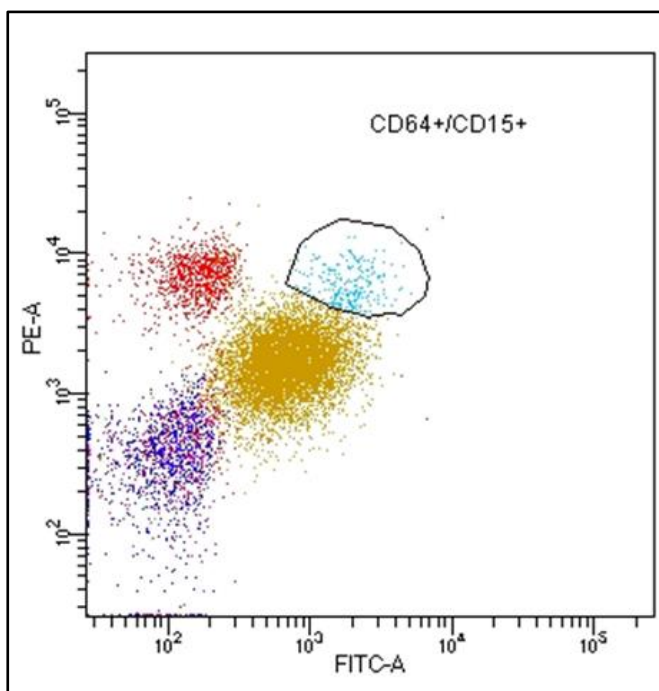
Průtokový cytometr BD FACS CantoTM II byl po celou dobu měření v pravidelných intervalech kalibrován. Přístroj byl kalibrován pomocí mikrosfér BD FACS DivaTM CS&T IVD beads.

3.5.3 Gatovací strategie

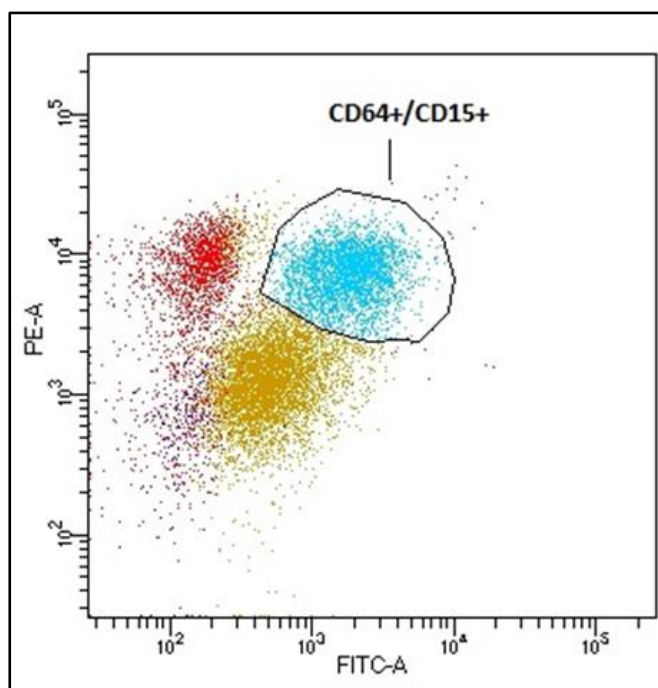
Pomocí protilátky anti CD45 byly označeny všechny buňky bílé krevní řady. Protilátka anti CD15 nám označila všechny neutrofile, eozinofily, monocyty a mastocyty. Antigen CD15 není exprimován na lymfocytech. Protilátka anti CD64 nám označila monocyty a neutrofile. Antigen CD64 je stabilně exprimován pouze na monocyttech, jejich tkáňové formě makrofázích a částečně i na neutrofilech. U neutrofilů však po indukci INF- γ a G-CSF dochází k několikanásobnému zvýšení jeho denzity. Cílem tohoto měření bylo sledování dvojité pozitivnosti CD 64⁺/CD15⁺ neutrofilů a stanovení jejich procentuálního zastoupení. Ve scattergramu na osu x byla tedy promítnuta intenzita fluorescence protilátky anti CD15 a na osu y pak intenzita protilátky anti CD64. V místě předpokládaného výskytu dvojité pozitivních neutrofilů byl vytvořen gate CD64⁺/CD15⁺. Monocyty, které exprimují antigen CD64 vždy, sloužily jako pozitivní kontrola. Na druhou stranu lymfocyty, které neexprimují antigen CD15 ani CD64 představovaly negativní kontrolu.



Obr. 4 Scattergram CD64 (PE-A) proti CD15 (FITC-A) s ukázkou gatovací strategie; červené signály odpovídají CD15⁺ populaci monocytů. Žluté signály odpovídají populaci granulocytů. Fialové signály odpovídají populaci lymfocytů. Tento scattergram je zároveň ukázkou vzorku, kde nebyly nalezeny CD64⁺/CD15⁺ pozitivní buňky. Jedná se o pacienta bez známek sepse.



Obr. 2 Scattergram CD64 (PE-A) proti CD15 (FITC-A). Ukázka nízkého zastoupení CD64⁺/CD15⁺ pozitivních buněk.



Obr. 4 Scattergram CD64 (PE-A) proti CD15 (FITC-A). Ukázka vysokého zastoupení CD64⁺/CD15⁺ pozitivních buněk. Jedná se o pacienta s potvrzenou sepsí.

3.6 Rozřazení novorozenců do příslušné kategorie

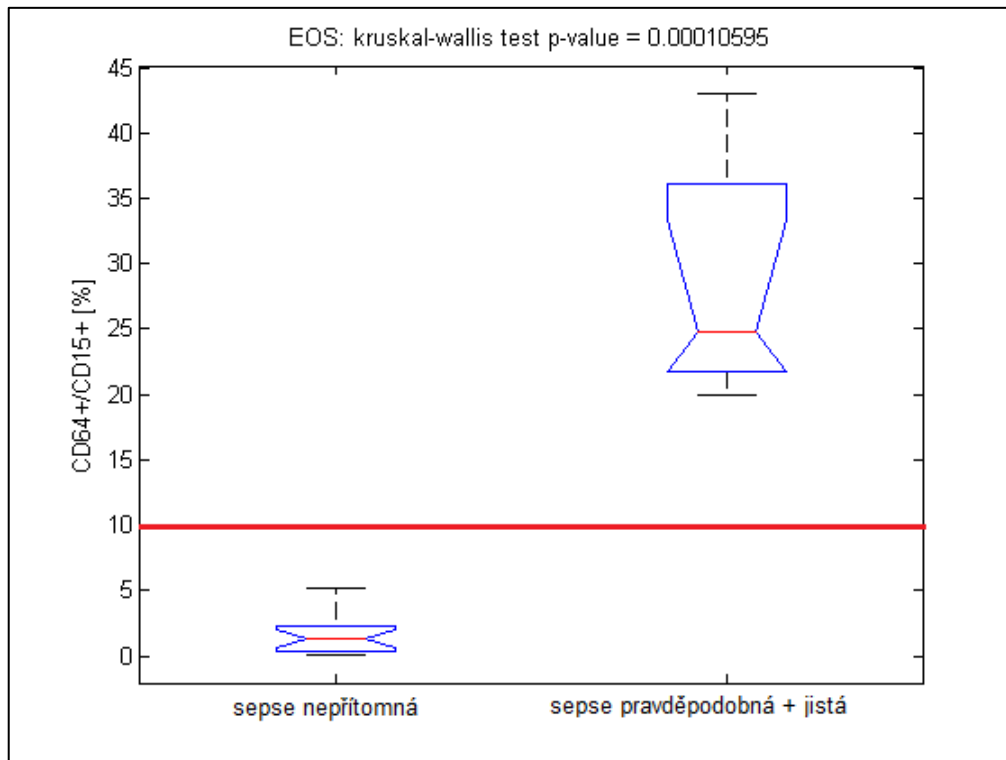
Diagnostika a terapie novorozenců byla prováděna dle standardů pracoviště nezávisle na výsledku průtokové cytometrie. U novorozenců bylo provedeno základní hematologické a biochemické vyšetření. Před zahájením antibiotické terapie byl také odebrán vzorek na mikrobiologické vyšetření. Na základě těchto vyšetření byli novorozenci zařazeni do příslušné kategorie:

- I. Sepse jistá– pozitivní hemokultura, laboratorní i klinické příznaky
- II. Sepse pravděpodobná– negativní hemokultura, pozitivní laboratorní či klinické příznaky
- III. Sepse nepřítomná– negativní hemokultura, laboratorní i klinické příznaky

4 Výsledky

4.1 Časná sepse

V této skupině bylo analyzováno 27 vzorků. U jednoho pacienta se jednalo o sepsi jistou. Pomocí hemokultury byla prokázána přítomnost *E. coli*. Pravděpodobnou sepsi mělo šest pacientů. U 20 pacientů se neprojevíly žádné známky infekční komplikace.

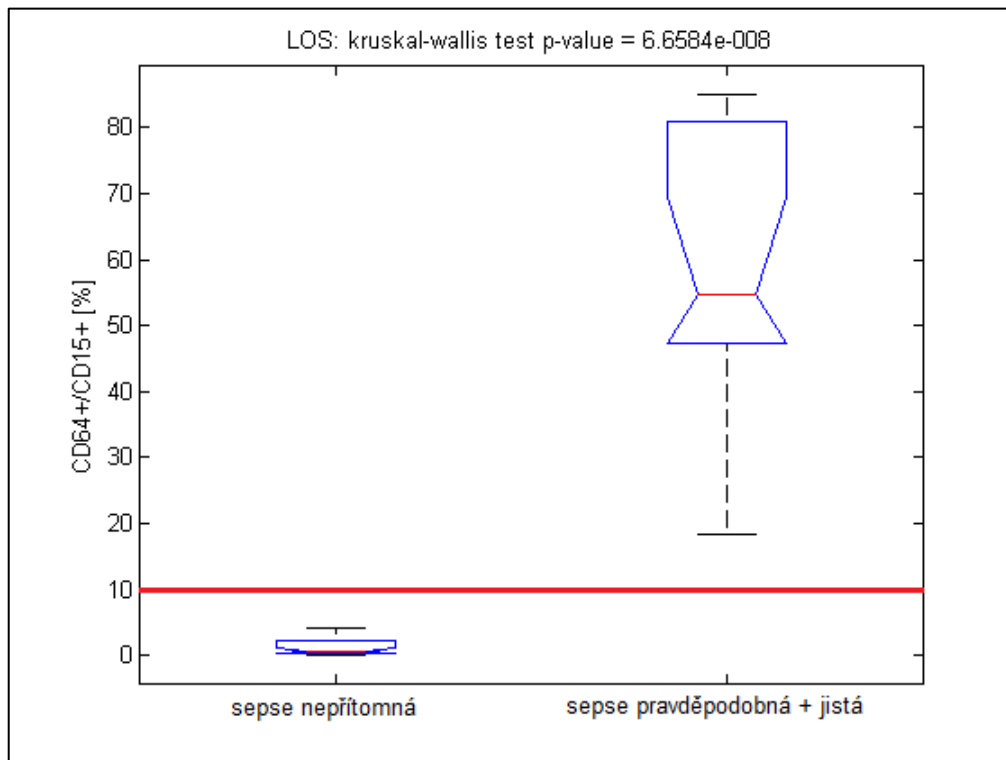


Obr. 5 Box plot znázorňující procentuální zastoupení CD64⁺/CD15⁺ neutrofilů u pacientů ve skupině EOS – sepsis nepřítomná (n=20); sepsis pravděpodobná (n=6) + jistá (n=1). Cut-off hodnota v grafu vyznačená červenou linií byla stanovena na 10 %.

Z výsledného grafu vyplývá významná asociace markeru CD64 s výskytem EOS u PNN. Jak lze vidět z grafu, hodnoty markeru CD64 u pacientů se sepsí pravděpodobnou nebo jistou se horizontálně zcela oddělují od hodnot pacientů, u kterých k sepsi nedošlo.

4.2 Pozdní sepse

V této skupině bylo analyzováno 54 vzorků. U dvou pacientů se jednalo o sepsi jistou. U těchto pacientů byla pomocí hemokultury prokázána přítomnost bakterií *E. coli* a *Staphylococcus aureus*. Pravděpodobnou sepsi mělo 11 pacientů. U 41 pacientů se neprojevily žádné známky infekční komplikace.

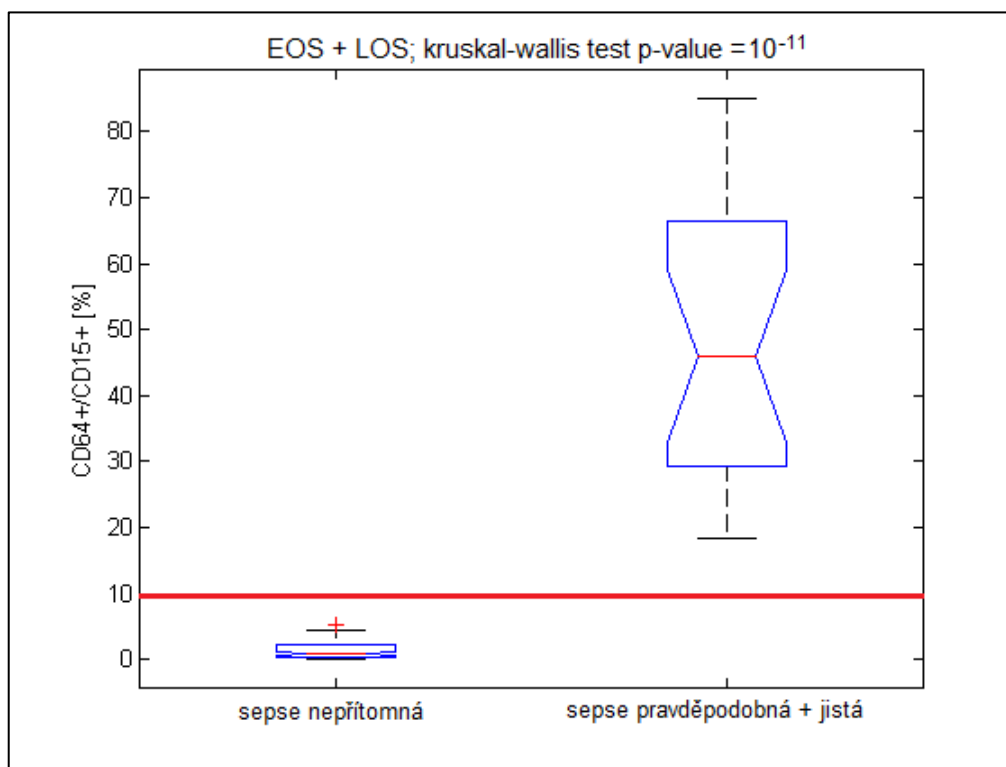


Obr. 6 Box plot znázorňující procentuální zastoupení CD64⁺/CD15⁺ u pacientů ve skupině LOS – sepsis nepřítomná (n=41); sepsis pravděpodobná (n=11) + jistá (n=2). Cut-off hodnota v grafu vyznačená červenou linií byla stanovena na 10 %.

Z výsledného grafu vyplývá významná asociace markeru CD64 s výskytem LOS u PNN. Jak lze vidět z grafu, hodnoty markeru CD64 u pacientů se sepsí pravděpodobnou nebo jistou se horizontálně zcela oddělují od hodnot pacientů, u kterých k sepsi nedošlo.

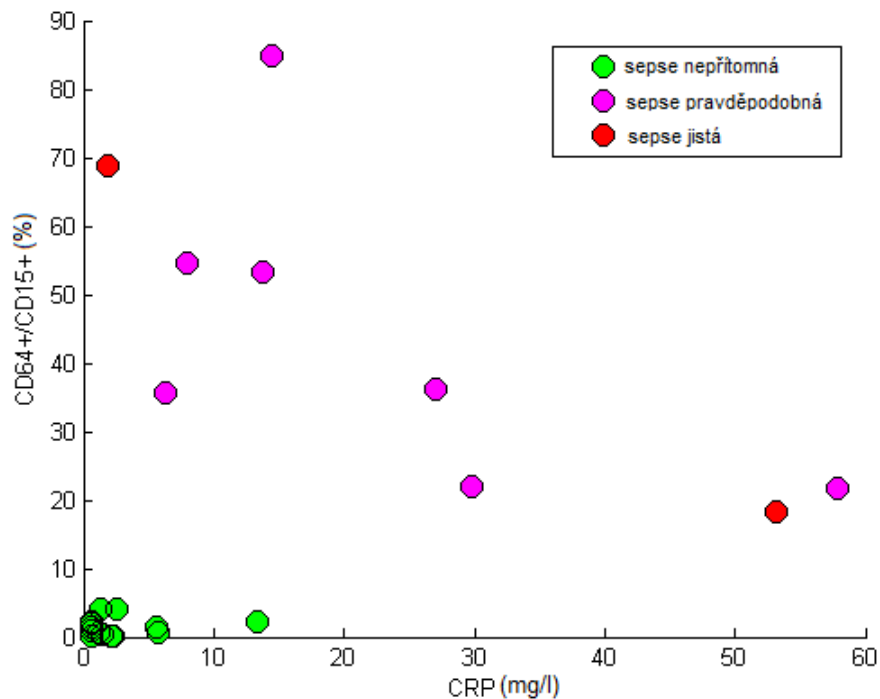
4.3 Časná a pozdní sepse

Celkově bylo analyzováno 81 vzorků PNN. U tří pacientů je jednalo o sepsi jistou. Pravděpodobnou sepsi mělo dohromady 17 pacientů. U 61 pacientů se neprojevily žádné známky infekční komplikace.



Obr. 7 Box plot znázorňující procentuální zastoupení CD64⁺/CD15⁺ neutrofilů u pacientů ve skupině EOS a LOS – sepsis nepřítomná (n=61); sepsis pravděpodobná (n=17) + jistá (n=3). Cut-off hodnota v grafu vyznačená červenou linií byla stanovena na 10 %.

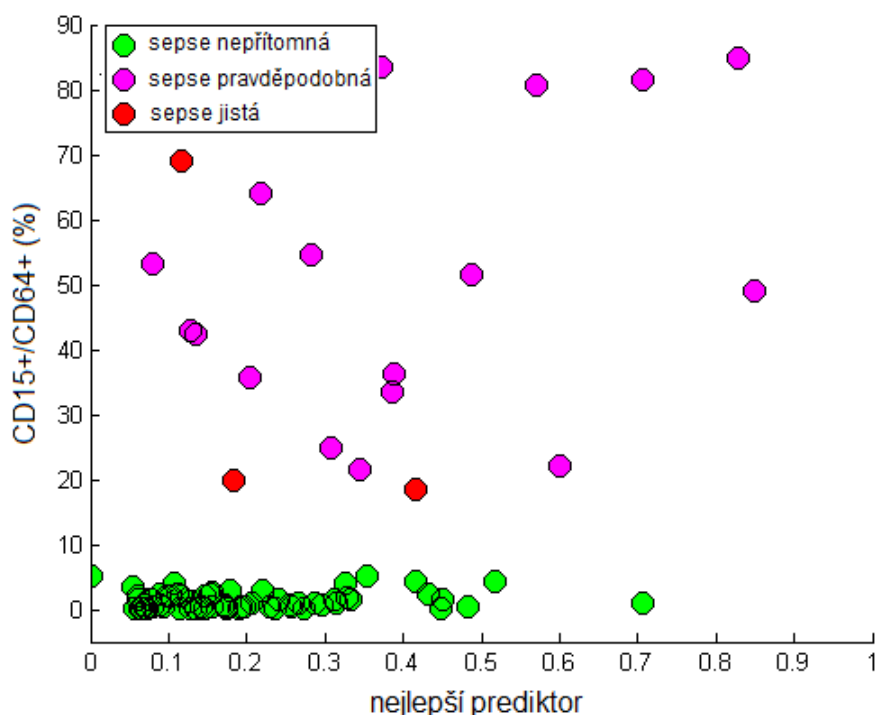
Asociace hodnot markeru CD64 s výskytem u EOS a LOS je významná. Jak lze vidět z grafu, hodnoty markeru CD64 u pacientů se sepsí pravděpodobnou nebo jistou se horizontálně zcela oddělují od hodnot pacientů, u kterých k sepsi nedošlo.



Obr. 8 Graf znázorňující závislost markeru CD64 proti CRP a jejich výtěžnost v diagnostice EOS + LOS. Zeleně vyznačené body přísluší pacientům bez sepse (n= 16; EOS n=5; LOS n=11). Fialově vyznačené body značí pacienty s pravděpodobnou sepsí (n=7; EOS n=4; LOS n=3). Červeně vyznačené body přísluší pacientům se sepsí jistou (n=2; EOS n=0; LOS n=2)

Jak můžeme vidět z grafu, pacienti se sepsí jistou nebo pravděpodobnou se u markeru CD64 při cut-off hodnotě 10 % vertikálně zcela oddělují od pacientů bez sepse. U markeru CRP tomu tak není. Pokud byl odběr krve proveden do 24 hodin od narození, je cut-off hodnota markeru CRP 5 mg/l. Při pozdějším odběru je cut-off hodnota CRP 10 mg/l. Jak je vidět z grafu, marker CRP nebyl schopný vertikálně oddělit pacienty bez sepse a pacienty se sepsí jistou nebo pravděpodobnou. Hodnota markeru CRP však byla dostupná pouze u 25 pacientů a proto není možné tyto markery adekvátním způsobem porovnat.

Ze všech dostupných markerů (WBC, NE, IG, ICIS skóre) kromě markeru CD64 byl pomocí multivariační logistické regrese vytvořen nejlepší možný prediktor. Tento prediktor nabývá hodnot od 0 do 1 a vyjadřuje pravděpodobnost, že daný novorozenec bude mít sepsi.



Obr. 9 Graf znázorňující procentuální zastoupení CD64⁺/CD15⁺ proti nejlepšímu prediktoru u pacientů ze skupiny EOS a LOS. Zeleně vyznačené body přísluší pacientům bez sepse (n= 61). Fialově vyznačené body značí pacienty s pravděpodobnou sepsí (n=17). Červeně vyznačené body přísluší pacientům se sepsí jistou (n=3).

Pokud by vytvořený prediktor fungoval dobře, všechny zelené body vyjadřující nepřítomnost sepse by byly umístěny vlevo. Na druhé straně vpravo by pak byly umístěny fialové a červené body. Jak je vidět z grafu, tento prediktor od sebe nijak neodlišuje pacienty bez sepse a pacienty s pravděpodobnou nebo jistou sepsí. Oproti tomu je vidět, že marker CD64 funguje výborně. Fialové a červené body představující pacienty s pravděpodobnou a jistou sepsí se význačně horizontálně oddělují od skupiny zelených bodů představujících pacienty bez sepse. Jako dělicí cut-off hodnota byla vypočtena hodnota 10 %. Tato hodnota značí procentuální zastoupení CD64⁺/CD15⁺ buněk v gatu granulocytů. Všechny zelené body se nacházejí pod 10 % a všechny fialové a červené body se nacházejí nad 10 %. Senzitivita a specifita tohoto testu je tedy 100 %. Hladina významnosti α byla nastavena na 0,05. P-hodnota tohoto testu se rovná nule. Rozdíl hodnot markeru CD64 mezi zdravými novorozenci bez sepse a novorozenci s pravděpodobnou nebo jistou sepsí je tedy statisticky významný.

5 Diskuze

Sepse je patofyziologický proces, který je příliš komplexní na to, aby mohl být popsán jedním testem. Z tohoto důvodu je zde neustálá snaha o hledání vhodných markerů sepse, které by napomohly k její včasné diagnostice, sledování průběhu a odpovědi na léčbu. Časná diagnostika je jedním z klíčových bodů pro snížení mortality a úspěšnou léčbu. Předmětem této práce je stanovení markeru CD64 a zhodnocení jeho využití v diagnostice sepse u PNN. Předčasně narození novorozenci jsou velmi specifickou skupinou. Co se laboratorní diagnostiky týče, postnatální dynamika jednotlivých markerů bývá komplikovaná a nejednoznačná. Problémem je i odběr dostatečného množství krve. Při hledání vhodného markeru sepse, a i následném hodnocení výsledků, je nutné brát na tyto skutečnosti ohled.

Výsledkem této práce je 100% senzitivita i specifická použitého testu. Cut-off hodnota markeru CD64 byla stanovena na 10 %. Tato hodnota vyjadřuje procentuální zastoupení subpopulace CD64 pozitivních neutrofilů v gatě granulocytů. Důležité je zmínit, že tato metoda stanovení markeru CD64 je odlišná od standardně používaných. U všech pacientů s pravděpodobnou nebo jistou sepsí byla naměřená hodnota větší než 10 %. Zároveň u všech pacientů, u kterých se neprojeví žádné známky infekční komplikace, byla vždy naměřená hodnota markeru CD64 menší než 10 %. Takto tomu bylo u všech PNN zařazených ve skupině EOS i LOS. Výsledek statistické analýzy tedy jasně poukazuje na významnou asociaci hodnot markeru CD64 vyšších než 10 % s přítomností pravděpodobné či jisté sepse.

V posledních letech v literatuře přibývá důkazů o možnosti využití markeru CD64 v diagnostice NS jak u termínově, tak u předčasně narozených novorozenců (Genel, 2012; Du, 2014; Dilli, 2010; Bhandari, 2008; Soni, 2013; Lam, 2011; Streimish, 2014; Elawady, 2015; Ng, 2002). Tyto studie potvrzují signifikantní nárůst exprese CD64 u novorozenců se sepsí a shodují se v názoru, že se jedná o časný markerem infekce. Jako přínosná se jeví kombinace markeru CD64 s dalšími používanými markery jako je například CRP, PCT či IL6, kdy výsledkem je pak zvýšení senzitivity a specifity. Celkové výsledky těchto studií jsou však nejednoznačné. Jednotlivé práce liší v použití metod stanovení markeru CD64. Z toho vyplývají i odlišné cut-off hodnoty. Ty se však výrazně liší i u studií používajících stejnou metodiku. V této práci bylo dosaženo srovnatelných výsledků s prací autorů Hálek et. al, kde se jako ideální cut-off hodnota markeru CD64 u PNN jevila 13 %. Data použitá pro tuto studii však byla získána ve shodných pracovištích s touto prací. Analýza byla pouze provedena na jiném datovém souboru s použitou mírně odlišnou metodikou přípravy vzorků (Hálek, 2018).

Na toto téma byly publikovány tři meta-analýzy týkající se NS zahrnující jak termínově, tak i předčasně narozené novorozence (Shi, 2016; Dai, 2017; Song, 2019). Ve svých

závěrech se však tyto meta-analýzy neshodují. V meta-analýze autorů Shi et. al se výsledná sdružená senzitivita (0,77; 95% CI: 0,74-0,79) a specifická (0,74; 95% CI: 0,72-0,75) markeru CD64 v porovnání s PCT a CRP jeví nižší. V závěru je samostatný marker CD64 hodnocen jako nepostačující. Není zde však vyloučena možnost jeho kombinace s dalšími markery. (Shi, 2016). Oproti tomu v práci autorů Dai et. al je marker CD64 hodnocen jako přínosný ([senzitivita 0,80; 95% CI: 0,69-0,88]; [specifická 0,83; 95% CI:0,71-0,90]). Je zde také poukázáno na možnost využití jeho vysoké negativní prediktivní hodnoty (Dai, 2017). Z výsledku meta-analýzy autorů Song et. al vyplývá, že pokud je hodnocen marker CD64 v kombinaci s CRP dochází ke zvýšení senzitivity (0,95; 95% CI: 0,86–0,98) i specifické (0,86; 95% CI: 0,74–0,93) (Song, 2019). Mezi jednotlivými studiemi zařazenými do těchto meta-analýz byla však zaznamenána signifikantní heterogenita. Shi et. al uvádí, že zdrojem heterogenity je kombinace dat předčasně a termínově narozených novorozenců a dále také kombinace dat novorozenců se sepsí jistou a klinickou. Dle Dai *et al.* k heterogenitě přispívá používání odlišných kritérií pro stanovení sepse. Často není možné také zjistit, zda se jedná o novorozence s EOS nebo LOS a nejsou rozlišovány jednotlivé skupiny předčasně a termínově narozených novorozenců. Není tak brána v potaz odlišná dynamika onemocnění. Byl zde také zaznamenán publikační bias.

Výsledky této práce poukazují na významnou asociaci hodnot markeru CD64 s výskytem NS jak u EOS, tak u pacientů s LOS. Tyto výsledky však není možné nijak zobecňovat. Datový soubor, na němž byla analýza provedena je příliš malý a výskyt novorozenců s jistou nebo pravděpodobnou sepsí byl nízký. Použitá metoda stanovení markeru CD64 je odlišná od standardně používaných metod, a tudíž není zcela možné přímé porovnávání výsledků. Zajímavé by mohlo být porovnání jednotlivých metod mezi sebou s hodnocením jejich výtěžnosti v diagnostice sepse. Dále nebylo možné porovnat v této práci výtěžnost markeru CD64 s dalšími markery sepse jako například CRP, PCT. U většiny vzorků totiž nebyly tyto hodnoty naměřeny. Na první pohled zjištěná extrémně vysoká senzitivita i specifická výsledku působí překvapivě a velkolepě. Následují ale pochybnosti o pravdivosti těchto výsledků. Z tohoto důvodu poskytl RNDr. Martin Novák, Ph.D. jako vedoucí této práce a odborný pracovník v laboratoři průtokové cytometrie Hemato-onkologické kliny FN Olomouc slovní komentář k výsledku: „Zjištěná extrémně vysoká senzitivita i specifická výsledku je sice velmi potěšující, nicméně je nepravděpodobné, že takto ideální výsledek bezesbytku odpovídal realitě klinické praxe. S největší pravděpodobností se na něm podílí jednak relativně nízký počet vyšetřených vzorků a rovněž je pravděpodobná přítomnost výběrového bias, způsobeného výběrem vzorků zaměstnanci Novorozeneckého oddělení. Na druhou stranu, řešitelské pracoviště se problematikou

cytometrické detekce sepse dlouhodobě zabývá a předchozí publikované výsledky detekce znaku CD64 u dětí, dospělých i kriticky nemocných a transplantovaných pacientů vykazují senzitivitu i specifitu blížící se 100%. V budoucnu je plánováno ověřit výsledek formou rozsáhlé prospektivní studie“ (ústní sdělení, Martin Novák, Hemato-onkologická klinika FN/LF Olomouc, 28.5.2020).

Průtoková cytometrie je bioanalytická metoda s širokým aplikačním potenciálem. V diagnostice sepse má své výhody i nevýhody. Velkou předností a to především u PNN je, že pro stanovení výsledku je zapotřebí minimálního objemu krve. Standardně je pro analýzu dostačující množství 50 µl krve. Stanovení tak může být například provedeno ze vzorku určeného k analýze krevního obrazu a diferenciálního rozpočtu leukocytů. Dále v porovnání s hemokulturou, která je považována za „zlatý standard“ v diagnostice sepse, je jednoznačnou výhodou krátká detekční doba. Na výsledek hemokultury se řádově čeká 48-72 hodin. Oproti tomu výsledek analýzy pomocí průtokového cytometru může být dostupný již do 4 hodin od odebrání vzorku. Analýza vzorků pomocí této metody je však většinou možná pouze na specializovaných pracovištích a vyžaduje odbornou znalost obsluhy. Možnost získání výsledku z analýzy na průtokovém cytometru je tedy prozatím dostupná pouze v pracovních dnech ve standardní pracovní době.

6 Závěr

Tato práce byla zaměřena na stanovení markeru CD64 a jeho využití v diagnostice novorozenecké sepse u předčasně narozených novorozenců.

Marker CD64 je vysokoafinitní receptor pro monomerní IgG protilátky. Po invazi patogenů dochází k aktivaci neutrofilů a zvýšení exprese tohoto receptoru na jejich povrchu. Protilátky třídy IgG opsonizují patogenní mikroorganismy, čímž je následně usnadněna jejich fagocytóza. Neutrofilové díky receptoru CD64 na svém povrchu jsou schopné vázat Fc konec IgG protilátek, a tím jsou přímo zapojeny v antiinfekční imunitní obraně organismu.

V rámci teoretické části byl nejprve definován předčasně narozený novorozenec. Následně byl zprostředkován pohled na vývoj definice sepse a s ní souvisejících pojmů. Dle klinické manifestace sepse byla odlišena její časná a pozdní forma. Byly zde uvedeny nejčastější původci jak EOS tak LOS a popsány imunitní mechanismy antiinfekční obrany organismu. Dále se teoretická část práce zabývala popisem možností diagnostiky sepse s ohledem na skupinu novorozenců. V závěru byla popsána metoda průtokové cytometrie, pomocí které byly analyzovány získané vzorky.

V praktické části bylo pomocí metody průtokové cytometrie stanoveno procentuální zastoupení subpopulace CD64 pozitivních neutrofilů v populaci CD15 pozitivních granulocytů. Celkově bylo analyzováno 81 vzorků PNN. Výsledkem statistické analýzy je významná asociace hodnot markeru CD64 s výskytem sepse jak u skupiny pacientů s podezřením na EOS, tak u pacientů s ve skupině LOS. Cut-off hodnota byla stanovena na 10 % a výsledná senzitivita a specifita tohoto testu byla 100 %. Jak již bylo zmíněno v diskuzi, vzhledem k okolnostem je nutné tento výsledek brát s určitou rezervou. Nicméně v kontextu s výsledky řešitelského pracoviště FN Olomouc dlouhodobě zabývajících se cytometrickou detekcí sepse senzitivita a specifita markeru CD64 blízkí se 100% není nereálná.

Tato metoda by tedy mohla být přínosem pro diagnostiku sepse u PNN zejména v časné fázi infekce a využita jako doplňující informace pro stanovení diagnózy. Vzhledem k nízkému zastoupení pacientů s jistou nebo pravděpodobnou sepsí je nutné do budoucna soubor adekvátním způsobem rozšířit. Přínosná by mohla být současná analýza dalších markerů sepse jako například CRP, PCT, IL6. Mohla by tak být porovnána jejich výtěžnost v diagnostice novorozenecké sepse a případně využita jejich kombinace s markerem CD64.

7 Bibliografie

AYDEMIR, C., H. AYDEMIR, F. KOKTURK, C. KULAH a A. G. MUNGAN, 2018. The cut-off levels of procalcitonin and C-reactive protein and the kinetics of mean platelet volume in preterm neonates with sepsis. *BMC Pediatrics*. vol. 18. **18**(1). DOI: 10.1186/s12887-018-1236-2. ISSN 1471-2431.

BENITZ, William E., Michael Y. HAN, Ashima MADAN a Pramela RAMACHANDRA, 1998. Serial Serum C-Reactive Protein Levels in the Diagnosis of Neonatal Infection. *Pediatrics*. vol. 102. **102**(4), 41-41. DOI: 10.1542/peds.102.4.e41. ISSN 0031-4005.

BHANDARI, V., C. WANG, C. RINDER a H. RINDER, 2008. Hematologic Profile of Sepsis in Neonates: Neutrophil CD64 as a Diagnostic Marker. *PEDIATRICS*. vol. 121. **121**(1), 129-134. DOI: 10.1542/peds.2007-1308. ISSN 0031-4005.

BONE, Roger C., Robert A. BALK, Frank B. CERRA, R. Phillip DELLINGER, Alan M. FEIN, William A. KNAUS, Roland M.H. SCHEIN a William J. SIBBALD, 1992. Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis. *Chest*. vol. 101. **101**(6), 1644-1655. DOI: 10.1378/chest.101.6.1644. ISSN 00123692.

BUONOCORE, Giuseppe, 2018. *Neonatology: a practical approach to neonatal diseases*. 1st edition. New York, NY: Springer Berlin Heidelberg. ISBN isbn978-3-319-29487-2.

CIBÍČEK, Norbert a Jan VACEK, 2014. *Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicíně*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci. ISBN 978-80-244-3951-8.

COTTEN, C. M., S. TAYLOR, B. STOLL, R. N. GOLDBERG, N. I. HANSEN, P. J. SANCHEZ, N. AMBALAVANAN a D. K. BENJAMIN, 2009. Prolonged Duration of Initial Empirical Antibiotic Treatment Is Associated With Increased Rates of Necrotizing Enterocolitis and Death for Extremely Low Birth Weight Infants. *PEDIATRICS*. vol. 123. **123**(1), 58-66. DOI: 10.1542/peds.2007-3423. ISSN 0031-4005.

Česká Neonatologická Společnost: České Lékařské Společnosti JEP [online], c2011-2020. Plzeň [cit. 2020-02-18]. Dostupné z: <http://www.neonatology.cz/2018>

DAI, Ji, Wenjie JIANG, Zhigang MIN, Jian YANG, Yongfei TAN, Tieliang MA a Zhijun GE, 2017. Neutrophil CD64 as a diagnostic marker for neonatal sepsis: Meta-analysis. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*. vol. 26. **26**(2), 327-332. DOI: 10.17219/acem/58782. ISSN 1899-5276.

DAVIS, Bruce H, 2014. Improved diagnostic approaches to infection/sepsis detection. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. vol. 5. **5**(2), 193-207. DOI: 10.1586/14737159.5.2.193. ISSN 1473-7159.

DILLI, Dilek, Ş. Suna OG'UZ, Ug'ur DILMEN, M. Yavuz KÖKER a Murat KızıLGÜN, 2010. Predictive values of neutrophil CD64 expression compared with interleukin-6 and C-reactive protein in early diagnosis of neonatal sepsis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. vol. 24. **24**(6), 363-370. DOI: 10.1002/jcla.20370. ISSN 08878013.

DINGLE, Tanis C. a Susan M. BUTLER-WU, 2013. MALDI-TOF Mass Spectrometry for Microorganism Identification. *Clinics in Laboratory Medicine*. vol. 33. **33**(3), 589-609. DOI: 10.1016/j.cll.2013.03.001. ISSN 02722712.

DU, Jikun, Li LI, Yuhong DOU, Peipei LI, Rui CHEN, Helu LIU a Ofer LEVY, 2014. Diagnostic Utility of Neutrophil CD64 as a Marker for Early-Onset Sepsis in Preterm Neonates. *PLoS ONE*. vol. 9. **9**(7), 1-7. DOI: 10.1371/journal.pone.0102647. ISSN 1932-6203.

ELAWADY, Sanaa, Shahira K. BOTROS, Ashraf E. SOROUR, Eman Abdel GHANY, Gamal ELBATRAN a Raghdaa ALI, 2015. Neutrophil CD64 as a Diagnostic Marker of Sepsis in Neonates. *Journal of Investigative Medicine*. vol. 62. **62**(3), 644-649. DOI: 10.2310/JIM.0000000000000060. ISSN 1081-5589.

FJAERTOFT, Gustav, Lena HÅKANSSON, Uwe EWALD, Tony FOUCARD a Per VENGE, 1999. Neutrophils from Term and Preterm Newborn Infants Express the High Affinity Fcγ-Receptor I (CD64) During Bacterial Infections. *Pediatric Research*. vol. 45. **45**(6), 871-876. DOI: 10.1203/00006450-199906000-00016. ISSN 0031-3998.

GENEL, Ferah, Fusun ATLIHAN, Nesrin GULEZ, Elif KAZANCI, Canan VERGIN, Demet Tumay TEREK a Ozlem Cengel YURDUN, 2012. Evaluation of adhesion molecules CD64, CD11b and CD62L in neutrophils and monocytes of peripheral blood for early diagnosis of neonatal infection. *World Journal of Pediatrics*. vol. 8. **8**(1), 72-75. DOI: 10.1007/s12519-011-0304-6. ISSN 1708-8569.

GERDES, Jeffrey S., 1991. Clinicopathologic Approach to the Diagnosis of Neonatal Sepsis. *Clinics in Perinatology*. vol. 18. **18**(2), 361-381. DOI: 10.1016/S0095-5108(18)30528-1. ISSN 00955108.

GERICKE, Germa H., Solveig G. ERICSON, Luying PAN, Letha E. MILLS, Paul M. GUYRE a Pamela ELY, 1995. Mature polymorphonuclear leukocytes express high-affinity receptors for IgG (FcγRI) after stimulation with granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF). *Journal of Leukocyte Biology*. vol. 57. **57**(3), 455-461. DOI: 10.1002/jlb.57.3.455. ISSN 07415400.

GOLDSTEIN, Brahm, Brett GIROIR a Adrienne RANDOLPH, 2005. International pediatric sepsis consensus conference: Definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics*. *Pediatric Critical Care Medicine*. vol. 6. **6**(1), 2-8. DOI: 10.1097/01.PCC.0000149131.72248.E6. ISSN 1529-7535.

GROSELJ-GRENC, Mojca, Alojz IHAN, Maja PAVCNIK-ARNOL, Andreja Natasa KOPITAR, Tanja GMEINER-STOPAR a Metka DERGANČ, 2009. Neutrophil and monocyte CD64 indexes, lipopolysaccharide-binding protein, procalcitonin and C-reactive protein in sepsis of critically ill neonates and children. *Intensive Care Medicine*. vol. 35. **35**(11), 1950-1958. DOI: 10.1007/s00134-009-1637-7. ISSN 0342-4642.

HALEK, Jan, Martin NOVAK, Anna MEDKOVA, Tomas FURST a Jarmila JURANOVA, 2018. The role of nCD64 in the diagnosis of neonatal sepsis in preterm newborns. *Biomedical Papers*. vol. 162. **162**(4), 284-288. DOI: 10.5507/bp.2018.033. ISSN 12138118.

HOFER, Nora, Wilhelm MÜLLER a Bernhard RESCH, 2011. Non-infectious conditions and gestational age influence C-reactive protein values in newborns during the first 3 days of life. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. vol. 49. **49**(2), 297-302. DOI: 10.1515/CCLM.2011.048. ISSN 1437-4331.

HOFER, Nora, Wilhelm MÜLLER a Bernhard RESCH, 2015. Definitions of SIRS and sepsis in correlation with early and late onset neonatal sepsis. *Journal of Pediatric Intensive Care*. vol. 01. **01**(01), 017-023. DOI: 10.3233/PIC-2012-004. ISSN 2146-4618.

HOFER, Nora, Eva ZACHARIAS, Wilhelm MÜLLER a Bernhard RESCH, 2012. An Update on the Use of C-Reactive Protein in Early-Onset Neonatal Sepsis: Current Insights and New Tasks. *Neonatology*. vol. 102. **102**(1), 25-36. DOI: 10.1159/000336629. ISSN 1661-7819.

HOFFMEYER, F., K. WITTE a R. E. SCHMIDT, 2003. The high-affinity FcγRI on PMN: regulation of expression and signal transduction. *Immunology*. vol. 92. **92**(4), 544-552. DOI: 10.1046/j.1365-2567.1997.00381.x. ISSN 0019-2805.

HORNIK, Christoph P., Daniel K. BENJAMIN, Kristian C. BECKER, Daniel K. BENJAMIN, Jennifer LI, Reese H. CLARK, Michael COHEN-WOLKOWIEZ a P. Brian SMITH, 2012. Use of the Complete Blood Cell Count in Early-onset Neonatal Sepsis. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. vol. 31. **31**(8), 799-802. DOI: 10.1097/INF.0b013e318256905c. ISSN 0891-3668.

HOŘEJŠÍ, Václav a Jiřina BARTŮŇKOVÁ, 2005. *Základy imunologie*. Vyd. 3. Praha: Triton. ISBN 80-725-4686-4.

HUG, Lucia, Monica ALEXANDER, Danzhen YOU a Leontine ALKEMA, 2019. National, regional, and global levels and trends in neonatal mortality between 1990 and 2017, with scenario-based projections to 2030: a systematic analysis. *The Lancet Global Health*. vol. 7. **7**(6), 710-720. DOI: 10.1016/S2214-109X(19)30163-9. ISSN 2214109X.

CHIESA, Claudio, Fabio NATALE, Roberto PASCONI, John F. OSBORN, Lucia PACIFICO, Enea BONCI a Mario DE CURTIS, 2011. C reactive protein and procalcitonin: Reference intervals for preterm and term newborns during the early neonatal period. *Clinica Chimica Acta*. vol. 412. **412**(11-12), 1053-1059 . DOI: 10.1016/j.cca.2011.02.020. ISSN 00098981.

CHIESA, Claudio, John F. OSBORN, Lucia PACIFICO, Fabio NATALE a Mario DE CURTIS, 2011. Gestational- and age-specific CRP reference intervals in the newborn. *Clinica Chimica Acta*. vol. 412. **412**(19-20), 1889-1890. DOI: 10.1016/j.cca.2011.06.022. ISSN 00098981.

CHIRICO, Gaetano a Cristina LODA, 2011. Laboratory aid to the diagnosis and therapy of infection in the neonate. *Pediatric Reports*. vol. 3. **3**(1). DOI: 10.4081/pr.2011.e1. ISSN 2036-7503.

ICARDI, M., Y. ERICKSON, S. KILBORN, B. STEWART, B. GRIEF a G. SCHARNWEBER, 2009. CD64 Index Provides Simple and Predictive Testing for Detection and Monitoring of Sepsis and Bacterial Infection in Hospital Patients. *Journal of Clinical Microbiology*. vol. 47. **47**(12), 3914-3919. DOI: 10.1128/JCM.00628-09. ISSN 0095-1137.

ISHIBASHI, Midori, Yuzuru TAKEMURA, Haku ISHIDA, Kiyooki WATANABE a Tadashi KAWAI, 2002. C-Reactive Protein Kinetics in Newborns: Application of a High-Sensitivity Analytic Method in Its Determination. *Clinical Chemistry*. vol. 48. **48**(7), 1103-1106. DOI: 10.1093/clinchem/48.7.1103. ISSN 0009-9147.

JESSNEY, Benn, 2012. Joseph Lister (1827–1912): a pioneer of antiseptic surgery remembered a century after his death. *Journal of Medical Biography*. vol. 20. **20**(3), 107-110. DOI: 10.1258/jmb.2011.011074. ISSN 0967-7720.

LAM, Hugh Simon, Samuel Po Shing WONG, Hon Ming CHEUNG et al., 2011. Early Diagnosis of Intra-Abdominal Inflammation and Sepsis by Neutrophil CD64 Expression in Newborns. *Neonatology*. vol. 99. **99**(2), 118-124. DOI: 10.1159/000311289. ISSN 1661-7800.

LAYSECA-ESPINOSA, Esther, Luis F. PEREZ-GONZALEZ, Abraham TORRES-MONTES, Lourdes BARANDA, Hortensia DE LA FUENTE, Yvonne ROSENSTEIN a Roberto GONZALEZ-AMARO, 2002. Expression of CD64 as a potential marker of neonatal sepsis. *Pediatric Allergy and Immunology*. vol. 13. **13**(5), 319-327. DOI: 10.1034/j.1399-3038.2002.01064.x. ISSN 0905-6157.

LE MOULLEC, J.M., A. JULLIENNE, J. CHENAIS, F. LASMOLES, J.M. GULIANA, G. MILHAUD a M.S. MOUKHTAR, 1984. The complete sequence of human preprocalcitonin. *FEBS Letters*. vol. 167. **167**(1), 93-97. DOI: 10.1016/0014-5793(84)80839-X. ISSN 00145793.

LEVY, Mitchell M., Mitchell P. FINK, John C. MARSHALL et al., 2003. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Critical Care Medicine*. vol. 31. **31**(4), 1250-1256. DOI: 10.1097/01.CCM.0000050454.01978.3B. ISSN 0090-3493.

LIU, H. H., J. B. GUO, Y. GENG a L. SU, 2015. Procalcitonin: present and future. *Irish Journal of Medical Science (1971 -)*. vol. 184. **184**(3), 597-605. DOI: 10.1007/s11845-015-1327-0. ISSN 0021-1265.

MEISNER, Michael, 2002. Pathobiochemistry and clinical use of procalcitonin. *Clinica Chimica Acta*. vol. 323. **323**(1-2), 17-29. DOI: 10.1016/S0009-8981(02)00101-8. ISSN 00098981.

MEISNER, Michael, 2014. Update on Procalcitonin Measurements. *Annals of Laboratory Medicine*. vol. 34. **34**(4). DOI: 10.3343/alm.2014.34.4.263. ISSN 2234-3806.

Narození a zemřelí do 1 roku 2018, 2019. *Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR* [online]. Praha 2 [cit. 2020-02-16]. Dostupné z: <https://www.uzis.cz/index.php?pg=record&id=8279>

[Neonatal sepsis], 2015. *Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME): GBD Compare* [online]. Seattle [cit. 2020-05-20]. Dostupné z: <https://vizhub.healthdata.org/gbd-compare/#>

- NG, Pak C, Karen LI, Raymond P O WONG, Kit M CHUI, Eric WONG a Tai F FOK, 2002. Neutrophil CD64 Expression: A Sensitive Diagnostic Marker for Late-Onset Nosocomial Infection in Very Low Birthweight Infants. *Pediatric Research*. vol. 51. **51**(3), 296-303. DOI: 10.1203/00006450-200203000-00006. ISSN 0031-3998.
- NG, Pak Cheung, Terence Ping Yuen MA a Hugh Simon LAM, 2015. The use of laboratory biomarkers for surveillance, diagnosis and prediction of clinical outcomes in neonatal sepsis and necrotising enterocolitis. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition*. vol. 100. **100**(5), 448-452. DOI: 10.1136/archdischild-2014-307656. ISSN 1359-2998.
- PEISAJOVICH, Andres, Lorraine MARNELL, Carolyn MOLD a Terry W DU CLOS, 2014. C-reactive protein at the interface between innate immunity and inflammation. *Expert Review of Clinical Immunology*. vol. 4. **4**(3), 379-390. DOI: 10.1586/1744666X.4.3.379. ISSN 1744-666X.
- PILAS, Barbara, b.r. Flow Cytometry Facility. In: *ROY J. CARVER BIOTECHNOLOGY CENTER: UNIVERSITY OF ILLINOIS* [online]. [cit. 2020-05-20].
- POLIN, Richard A. a John M. LORENZ, 2008. Sepsis/Pneumonia, Early-Onset to Subgaleal Hematoma. POLIN, Richard A. a John M. LORENZ, ed. *Neonatology* [online]. Cambridge: Cambridge University Press. DOI: 10.1017/CBO9780511547270.030. ISBN 9780511547270.
- POPESCU, Constantin Radu, Miranda M. M. CAVANAGH, Bentry TEMBO, Msandeni CHIUME, Norman LUFESI, David M. GOLDFARB, Niranjana KISSOON a Pascal M. LAVOIE, 2020. Neonatal sepsis in low-income countries: epidemiology, diagnosis and prevention. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 1-10. DOI: 10.1080/14787210.2020.1732818. ISSN 1478-7210.
- PÓVOA, Pedro, 2002. C-reactive protein: a valuable marker of sepsis. *Intensive Care Medicine*. vol. 28. **28**(3), 235-243. DOI: 10.1007/s00134-002-1209-6. ISSN 0342-4642.
- PRŮCHA, Miroslav, Michal FEDORA, Eva KIESLICOVÁ a Vladimír ŠRÁMEK, ed., 2015. *Sepse*. 1. vydání. Praha: Maxdorf. Jessenius. ISBN isbn978-80-7345-448-7.
- RABASOVÁ, P. a L. SIKOROVÁ, 2015. Spolehlivost klinických ukazatelů novorozenecké sepse. *Praktický lékař*. 2015. **2015**(3), 131-140.
- ROTH, Gregory A, Degu ABATE, Kalkidan Hassen ABATE et al., 2018. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet*. vol. 392. **392**(10159), 1736-1788. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)32203-7. ISSN 01406736.
- SHANE, Andi L, Pablo J SÁNCHEZ a Barbara J STOLL, 2017. Neonatal sepsis. *The Lancet*. vol. 390. **390**(10104), 1770-1780. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)31002-4. ISSN 01406736.
- SHAPIRO, Howard M., 2003. *Practical flow cytometry*. 4th ed. New York: Wiley-Liss. ISBN 0471411256.
- SHARMA, Deepak, Nazanin FARAHBAKHSI, Sweta SHASTRI a Pradeep SHARMA, 2017. Biomarkers for diagnosis of neonatal sepsis: a literature review. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. vol. 31. **31**(12), 1646-1659. DOI: 10.1080/14767058.2017.1322060. ISSN 1476-7058.
- SHI, Jing, Jun TANG a Dapeng CHEN, 2016. Meta-analysis of diagnostic accuracy of neutrophil CD64 for neonatal sepsis. *Italian Journal of Pediatrics*. vol. 42. **42**(1), 1-9. DOI: 10.1186/s13052-016-0268-1. ISSN 1824-7288.
- SCHELONKA, Robert L., Michele K. CHAI, Bradley A. YODER, Donna HENSLEY, Royce M. BROCKETT a David P. ASCHER, 1996. Volume of blood required to detect common neonatal pathogens. *The Journal of Pediatrics*. vol. 129. **129**(2), 275-278. DOI: 10.1016/S0022-3476(96)70254-8. ISSN 00223476.

- SCHLAPBACH, Luregn J., Lahn STRANEY, Rinaldo BELLOMO, Graeme MACLAREN a David PILCHER, 2018. Prognostic accuracy of age-adapted SOFA, SIRS, PELOD-2, and qSOFA for in-hospital mortality among children with suspected infection admitted to the intensive care unit. *Intensive Care Medicine*. vol. 44. **44**(2), 179-188. DOI: 10.1007/s00134-017-5021-8. ISSN 0342-4642.
- SIMISTER, N, 2003. Placental transport of immunoglobulin G. *Vaccine*. vol. 21. **21**(24), 3365-3369. DOI: 10.1016/S0264-410X(03)00334-7. ISSN 0264410X.
- SINGER, Mervyn, Clifford S. DEUTSCHMAN, Christopher Warren SEYMOUR et al., 2016. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. vol. 315. **315**(8). DOI: 10.1001/jama.2016.0287. ISSN 0098-7484.
- SONG, Yan, Yuanchun CHEN, Xue DONG a Xiaohua JIANG, 2019. Diagnostic value of neutrophil CD64 combined with CRP for neonatal sepsis: A meta-analysis. *The American Journal of Emergency Medicine*. vol. 37. **37**(8), 1571-1576. DOI: 10.1016/j.ajem.2019.05.001. ISSN 07356757.
- SONI, Sushant, Neelam WADHWA, Rajive KUMAR, M.M.A. FARIDI, Satendra SHARMA, Anita CHOPRA a Saroj SINGH, 2013. Evaluation of CD64 Expression on Neutrophils as an Early Indicator of Neonatal Sepsis. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. vol. 32. **32**(1), 33-37. DOI: 10.1097/INF.0b013e31826faede. ISSN 0891-3668.
- STRAŇÁK, Zbyněk a Jan JANOTA, 2015. *Neonatologie*. 2., přepracované a rozšířené vydání. Praha: Mladá fronta. Aeskulap. ISBN 978-80-204-3861-4.
- STREIMISH, Iris, Matthew BIZZARRO, Veronika NORTHRUP et al., 2014. Neutrophil CD64 with Hematologic Criteria for Diagnosis of Neonatal Sepsis. *American Journal of Perinatology*. vol. 31. **31**(01), 021-030. DOI: 10.1055/s-0033-1334453. ISSN 0735-1631.
- TILLET, William S. a Thomas FRANCIS, 1930. SEROLOGICAL REACTIONS IN PNEUMONIA WITH A NON-PROTEIN SOMATIC FRACTION OF PNEUMOCOCCUS. *The Journal of Experimental Medicine*. vol. 52. **52**(4), 561-571. DOI: 10.1084/jem.52.4.561. ISSN 1540-9538.
- VAN DER MEER, Wim, Peter PICKKERS, Colin S. SCOTT, Johannes G. VAN DER HOEVEN a Jacqueline Klein GUNNEWIEK, 2016. Hematological indices, inflammatory markers and neutrophil CD64 expression: comparative trends during experimental human endotoxemia. *Journal of Endotoxin Research*. vol. 13. **13**(2), 94-100. DOI: 10.1177/0968051907079101. ISSN 0968-0519.
- VIGUSHIN, D M, M B PEPYS a P N HAWKINS, 1993. Metabolic and scintigraphic studies of radioiodinated human C-reactive protein in health and disease. *Journal of Clinical Investigation*. vol. 91. **91**(4), 1351-1357. DOI: 10.1172/JCI116336. ISSN 0021-9738.
- WAGSTAFF, Jadon S., Robert J. DURRANT, Michael G. NEWMAN, Rachael EASON, Robert M. WARD, Catherine M. T. SHERWIN a Elena Y. ENIOUTINA, 2019. Antibiotic Treatment of Suspected and Confirmed Neonatal Sepsis Within 28 Days of Birth: A Retrospective Analysis. *Frontiers in Pharmacology*. vol. 10. **10**. DOI: 10.3389/fphar.2019.01191. ISSN 1663-9812.
- WHICHER, J., J. BIENVENU a G. MONNERET, 2001. Procalcitonin as an Acute Phase Marker. *Annals of Clinical Biochemistry: An international journal of biochemistry and laboratory medicine*. vol. 38. **38**(5), 483-493. DOI: 10.1177/000456320103800505. ISSN 0004-5632.
- WYNN, James L., 2016. Defining neonatal sepsis. *Current Opinion in Pediatrics*. vol. 28. **28**(2), 135-140. DOI: 10.1097/MOP.0000000000000315. ISSN 1040-8703.
- Zdravotnická ročenka České republiky 2018: Zdravotnická statistika ČR* [online], 2019. Praha 2, Palackého nám. 4 [cit. 2020-05-20]. ISSN 1210-9991. Dostupné z: <https://www.uzis.cz/res/f/008280/zdroccz-2018.pdf>

ZEITOUN, Alaa A.H., Suzan S. GAD, Fadia M. ATTIA, Asmaa S. ABU MAZIAD a Edward F. BELL, 2010. Evaluation of neutrophilic CD64, interleukin 10 and procalcitonin as diagnostic markers of early- and late-onset neonatal sepsis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. vol. 42. 42(4), 299-30. DOI: 10.3109/00365540903449832. ISSN 0036-5548.

8 Seznam příloh

Příloha 1 Data pacientů s podezřením na EOS

Příloha 2 Data pacientů s podezřením na LOS

Příloha 1

Tabulka č. 2: Data pacientů s podezřením na EOS

pacient	pohlaví	rok narození	WBC (10 ⁹ /L)	Ne (10 ⁹ /L)	IG (10 ⁹ /L)	CD64+/CD15+ (%)	CRP	PCT	status sepse
1	m	2018	11,76	7,96	0,05	1,00	—	—	nepřítomná
2	m	2018	24,24	4,22	0,50	4,20	2,60	—	nepřítomná
3	ž	2018	9,57	3,91	0,10	1,30	—	—	nepřítomná
4	ž	2018	6,30	2,60	0,01	24,80	—	—	pravděpodobná
5	m	2018	5,20	3,51	0,02	19,90	—	—	jistá - hemokultura - E.coli
6	m	2018	15,58	9,05	0,18	0,40	—	—	nepřítomná
7	m	2018	9,88	5,65	0,89	5,20	—	—	nepřítomná
8	ž	2019	14,91	5,98	0,13	0,20	< 0,6	—	nepřítomná
9	m	2019	5,64	1,89	0,04	0,10	—	—	nepřítomná
10	m	2019	11,52	7,92	0,13	22,10	29,80	—	pravděpodobná - hemokultura negativní
11	ž	2019	9,12	4,66	0,07	35,70	6,30	—	pravděpodobná
12	ž	2019	16,21	8,86	0,19	2,00	< 0,6	—	nepřítomná
13	m	2008	17,52	12,77	0,10	21,60	57,90	—	sepse pravděpodobná
14	ž	2019	7,53	3,21	0,05	36,30	27,00	—	sepse pravděpodobná
15	ž	2019	5,53	3,08	0,02	1,40	5,60	—	nepřítomná
16	m	2019	8,16	2,71	0,05	1,40	<0,6	—	nepřítomná
17	m	2019	6,86	3,13	0,06	2,30	—	—	nepřítomná
18	ž	2019	7,45	4,27	0,05	1,50	—	—	nepřítomná
19	ž	2019	12,23	7,27	0,09	2,40	—	—	nepřítomná
20	m	2019	14,73	7,49	60,00	5,20	—	—	nepřítomná
21	ž	2019	13,62	7,47	0,60	4,40	—	—	nepřítomná
22	m	2019	10,47	4,71	0,04	43,00	—	—	pravděpodobná - hemokultura negativní
23	ž	2019	18,85	12,68	0,72	0,60	—	—	nepřítomná
24	m	2019	15,86	6,82	0,24	0,30	—	—	nepřítomná
25	m	2019	11,18	4,65	0,09	0,70	—	—	nepřítomná
26	m	2020	8,67	5,02	0,06	0,10	—	—	nepřítomná
27	ž	2020	9,48	5,45	0,06	0,10	—	—	nepřítomná

Příloha 2

Tabulka č. 3 Data pacientů s podezřením na LOS

pacient	pohlaví	rok narození	WBC (10 ⁹ /L)	Ne (10 ⁹ /L)	IG (10 ⁹ /L)	CD64+/CD15+ (%)	CRP (mg/L)	PCT (ng/mL)	status sepse
1	ž	2018	5,36	0,80	0,01	48,90	—	—	pravděpodobná
2	m	2018	9,47	6,29	0,06	2,60	—	—	nepřítomná
3	m	2018	10,60	6,75	0,25	51,40	—	—	pravděpodobná - pneumonie
4	ž	2018	9,63	3,87	0,10	0,20	—	—	nepřítomná
5	ž	2019	13,26	9,39	3,70	0,90	< 0,6	—	nepřítomná
6	m	2019	10,00	3,33	0,16	1,50	0,60	—	nepřítomná
7	ž	2019	15,76	5,62	0,20	0,10	< 0,6	—	nepřítomná
8	m	2019	7,05	2,50	0,03	0,20	< 0,6	—	nepřítomná
9	m	2019	1,55	5,17	0,03	0,10	2,10	0,21	nepřítomná
10	m	2019	11,37	7,28	0,11	0,50	1,40	—	nepřítomná
11	ž	2019	14,12	6,12	0,38	2,20	< 0,6	—	nepřítomná
12	ž	2019	18,37	11,06	0,23	2,20	0,60	—	nepřítomná
13	m	2019	9,81	5,39	0,08	54,70	7,90	1,57	pravděpodobná - hemokultura kontaminovaná
14	ž	2019	12,89	6,74	0,26	68,90	1,80	8,71	jistá - hemokultura - Staphylococcus aureus
15	m	2016	14,66	8,48	0,22	0,20	2,30	—	nepřítomná
16	ž	2019	13,36	6,80	0,11	0,20	< 0,6	—	nepřítomná
17	m	2019	7,70	5,15	0,30	18,40	53,20	—	jistá - hemokultura - E. Coli
18	m	2019	11,57	6,58	0,09	0,60	5,80	48,32	nepřítomná
19	m	2019	37,81	14,95	3,01	53,20	13,80	4,53	pravděpodobná - hemokultura negativní
20	m	2019	15,15	10,71	1,02	2,30	13,30	—	nepřítomná
21	ž	2019	22,13	5,12	0,13	0,70	1,20	0,10	nepřítomná
22	ž	2019	20,83	12,43	1,62	0,90	0,60	2,23	nepřítomná
23	ž	2019	19,17	11,68	1,10	85,00	14,40	—	pravděpodobná, hemokultura negativní
24	ž	2019	22,25	10,55	1,13	0,20	< 0,6	—	nepřítomná
25	m	2019	20,83	13,69	2,02	4,10	1,30	—	nepřítomná
26	m	2019	9,00	2,81	0,05	0,70	—	—	nepřítomná
27	ž	2019	11,06	4,15	0,11	1,60	—	—	nepřítomná
28	m	2019	20,92	14,09	0,33	33,60	—	—	pravděpodobná, hemokultura negativní
29	m	2019	14,57	8,00	0,26	2,50	—	—	nepřítomná
30	m	2017	8,25	6,15	0,11	1,70	—	—	nepřítomná
31	m	2019	37,62	29,31	1,76	80,80	—	—	pravděpodobná - hemokultura negativní
32	m	2019	19,95	13,51	0,23	3,00	—	—	nepřítomná
33	ž	2019	33,38	25,62	1,36	81,60	—	—	pravděpodobná, hemokultura negativní
34	m	2019	18,53	13,69	0,09	3,00	—	—	nepřítomná
35	m	2019	10,81	6,21	0,07	0,50	—	—	nepřítomná
36	m	2019	14,94	11,47	0,28	83,50	—	—	pravděpodobná
37	ž	2019	33,38	25,62	1,36	1,10	—	—	nepřítomná
38	ž	2019	14,02	10,24	0,10	0,40	—	—	nepřítomná
39	m	2019	13,69	5,56	0,84	42,40	—	—	pravděpodobná, hemokultura negativní
40	m	2019	9,67	5,63	0,12	1,00	—	—	nepřítomná
41	m	2019	8,74	3,49	0,07	2,10	—	—	nepřítomná
42	ž	2019	13,34	6,18	0,28	0,40	—	—	nepřítomná
43	m	2019	12,77	6,32	0,07	2,20	—	—	nepřítomná
44	m	2019	19,02	13,41	0,92	64,00	—	—	pravděpodobná - hemokultura negativní
45	m	2019	17,34	10,60	0,19	4,00	—	—	nepřítomná
46	m	2019	12,52	6,39	0,07	3,40	—	—	nepřítomná
47	ž	2019	20,80	13,24	1,15	0,20	—	—	nepřítomná
48	ž	2019	14,05	8,55	0,37	0,10	—	—	nepřítomná
49	f	2019	12,68	8,36	0,13	0,40	—	—	nepřítomná
50	m	2019	11,20	5,90	0,33	0,30	—	—	nepřítomná
51	ž	2019	10,31	5,43	0,06	0,20	—	—	nepřítomná
52	m	2019	10,35	3,82	0,09	0,40	—	—	nepřítomná
53	ž	2020	13,99	2,99	0,18	0,30	—	—	nepřítomná
54	ž	2020	22,47	15,04	1,05	1,60	—	—	nepřítomná