

Univerzita Palackého v Olomouci
Lékařská fakulta

Předčasný odtok plodové vody před termínem porodu

Dizertační práce

MUDr. Veronika Fulová

Školitel: prof. MUDr. Radovan Pilka, Ph.D.

Školící pracoviště: Porodnicko-gynekologická klinika, LF UP

OLOMOUC 2022

Prohlašuji, že jsem svou disertační práci vypracovala samostatně s využitím citované literatury uvedené v závěru práce.

Olomouc 2022

MUDr. Veronika Fulová

.....

Ráda bych poděkovala svému školiteli, prof. MUDr. Radovanovi Pilkovi, Ph.D. za odborné vedení, podporu, motivaci, za cenné rady, připomínky i za pozitivní lidský přístup. Děkuji Mgr. Janě Zapletalové, Dr. za pomoc se statistickým zpracováním výsledků. Celému kolektivu Porodnicko-gynekologické kliniky děkuji za přátelské prostředí a vytvoření zázemí pro mou práci.

Obsah

Seznam použitých zkratk.....	6
Souhrn	8
Summary	9
1 Úvod.....	10
2 Patofyziologie předčasného porodu v souvislosti s pPROM.....	11
2.1 Intraamniální infekce.....	11
2.2 Chorioamnionitida a mateřské a novorozenecké výsledky	12
2.3 Souvislost pPROM s poruchami hemostázy	12
2.4 Genetické predispozice.....	13
3 Diagnostika pPROM	19
4 Management pPROM.....	21
5 Cíl práce	22
6 Metodika.....	23
6.1 Soubor pacientek a metodika pro hodnocení role IL-6 point-of-care testu v plodové vodě získané z amniocentéz u žen s pPROM mezi 24. a 34. týdnem těhotenství.....	23
6.1.1 Soubor pacientek a management pPROM.....	23
6.1.2 Analýza koncentrace IL-6 ze vzorků z plodové vody	25
6.1.3 Detekce Ureaplasma a Mycoplasma hominis v plodové vodě	26
6.1.4 Detekce novorozenecké sepse	26
6.1.5 Histologická chorioamnionitida a histopatologické hodnocení placenty na přítomnost zánětlivých změn podle Salafia	26
6.1.6 Statistická analýza	27
6.2 Soubor pacientek a metodika měření interleukinu-6 pomocí automatizované elektrochemiluminiscenční imunoanalytické metody a ELISA pro identifikaci intraamniálního zánětu po pPROM ve spolupráci s Fakultní nemocnicí Hradec Králové	28
6.2.1 Soubor pacientek	28
6.2.2 Analýza koncentrace IL-6 z plodové vody.....	28
6.2.3 Detekce Ureaplasma, Mycoplasma hominis a Chlamydia trachomatis v plodové vodě.....	29
6.2.4 Detekce dalších bakterií v plodové vodě.....	30
6.2.5 Diagnostika mikrobiální invaze do amniální dutiny (MIAC).....	30
6.2.6 Diagnóza IAI	30
7 Výsledky.....	31
7.1 Hodnocení role IL-6 point-of-care testu v plodové vodě získané z amniocentéz u žen s pPROM mezi 24. a 34. týdnem těhotenství a management.....	31
7.2 Výsledky měření interleukinu-6 pomocí automatizované elektrochemiluminiscenční imunoanalytické metody a ELISA pro identifikaci intraamniálního zánětu po pPROM ve spolupráci s Fakultní nemocnicí Hradec Králové	40
8 Diskuze.....	49

8.1	Intraamniální IL-6	49
8.2	CRP z krve matky.....	50
8.3	Leukocyty	50
8.4	Mikrobiální nálezy v cervikálních kulturách.....	50
8.5	Antibiotická léčba.....	51
8.6	Séřiový intraamniální zánět.....	52
8.7	Chorioamnionitida a časná novorozenecká sepe	52
8.8	Analytické metody pro hodnocení IL-6	53
9	Závěr.....	55
10	Seznam použité literatury	56
11	Publikační činnost autorky	75

Seznam použitých zkratek

pPROM	(preterm prelabor rupture of membranes) předčasný odtok plodové vody před termínem porodu
MIAC	mikrobiální invaze do amniální dutiny
GBS	streptokok skupiny B
HCA	histologická chorioamnionitida
IL-1	Interleukin 1
IL-1 β	Interleukin 1 β
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
sRAGE	solubilní receptor pro produkty pokročilé glykace
TLR	Toll-like receptor
TNF	tumor necrosis faktor
TNF- α	tumor necrosis faktor α
AMC	aminocentéza
MMP	matrixmetalloproteinázy
TAT	trombin-antitrombinový komplex
TF	tkáňový faktor
TFPI	inhibitor tkáňového faktoru
AT	Antitrombin
fFN	fetální fibronektin
V-Leiden	Leidenská mutace
IAI	intraamniální zánět
CRP	C-reaktivní protein
AFI	index plodové vody
LF UP	Lékařská fakulta Univerzity Palackého
FN Olomouc	Fakultní nemocnice Olomouc
WBC	počet leukocytů
T	testovací pás
anti-hIL-6	monoklonální protilátka specifická pro interleukin 6

EOS	časná novorozenecká sepe
LOS	pozdní novorozenecká sepe
PMNs	polymorfonukleáry
NOD	proteiny nukleotidové oligomerizační domény
SNP	(single nucleotide polymorphisms) jednonukleotidové polymorfizmy
CASP-1	kaspáza-1
AFP	Alfa fetoprotein
SD	směrodatná odchylka
PNC	Penicilin
IQR	interkvartilní rozmezí
CI	interval spolehlivosti
RCO	Receiver Operating Characteristic
AUC	(area under the ROC Curve) plocha pod křivkou
PAMS	molekulární vzor asociovaný s patogeny
FDIU	Intrauterinní fetální úmrtnost
DNA	(deoxyribonucleotic acid) kyselina deoxyribonukleová
FPR	(false positive rate) falešná pozitivita
GA	(gestational age) gestační stáří
PCR	(Polymerase chain reaction) polymerázová řetězová reakce

Souhrn

Disertační práce je zaměřená na studium příčin a důsledků předčasného odtoku plodové vody před termínem porodu (pPROM). Cílem předložené práce je shrnutí současných znalostí o patofyziologii předčasného porodu v souvislosti s předčasným odtokem plodové vody a posouzení role transabdominální amniocentézy v expektačním managementu u pPROM. Dalším cílem práce bylo vyhodnotit koncentrace IL-6 v plodové vodě získané z amniocentéz u žen s pPROM různými metodami a stanovit cut-off (hraniční) hodnoty pro diagnostiku intraamniálního zánětu. Na našem pracovišti jsme s využitím point of care testu stanovili cut-off hodnotu koncentrace IL-6 v plodové vodě 1000 pg/ml. Studie zahrnovala 62 těhotných žen s pPROM v gestačních týdnech mezi 22+0 a 34+0. Průměrný gestační věk v době pPROM byl 31+0, průměrný gestační věk při porodu byl 32+1 a medián od pPROM do porodu byl 112 hod. Test s hodnotou IL-6 nad 1000 pg/ml (pozitivní Il-6 AMC) byl potvrzen u 12 žen (19,4 %) medián intervalu od pPROM do porodu byl 56 h (min-max: 6,4-288). Test s hodnotou IL-6 pod 1000 pg/ml (negativní Il-6 AMC) byl potvrzen u 51 žen (81,0 %). Novorozenecká úmrtnost byla 1,9 % a byla spojena s prematuritou. V další studii ve spolupráci s FN v Hradci Králové, která zahrnovala 121 těhotných žen mezi gestačním týdnem 24 + 0 a 36 + 6, byla použita pro stanovení koncentrace IL-6 v plodové vodě metoda automatizovaného elektrochemiluminiscenčního imunotestu a ELISA testu. Prokázali jsme, že koncentrace IL-6 v plodové vodě měřené pomocí metody automatizovaného elektrochemiluminiscenčního imunotestu silně koreluje s hodnotami naměřenými pomocí ELISA testu. Hraniční hodnota koncentrace IL-6 v plodové vodě stanovená pomocí automatizované elektrochemiluminiscenční imunoanalytické metody je 3000 pg/ml a tato je indikací k diagnostice intraamniálního zánětu u žen s pPROM.

Závěrem lze říct, že sériová transabdominální amniocentéza a stanovení koncentrace IL-6 v plodové vodě pomáhá identifikovat vysoký stupeň zánětu v plodové vodě u žen s pPROM. Je to rozhodující faktor pro výběr mezi aktivním a expektačním managementem u žen s pPROM. Prodloužení období latence s expektačním managementem nevedlo ke zvýšení novorozenecké úmrtnosti. Nejvýznamnějším faktorem ovlivňujícím neonatální morbiditu a mortalitu je gestační stáří. Časná novorozenecká sepse se s vysokým rizikem vyskytuje po předčasném odtoku plodové vody spojeným se zánětlivými komplikacemi. Bylo by potřebné provést další studie, aby se zjistilo, zda se dlouhodobé neonatální výsledky liší podle specifické zánětlivé reakce.

Summary

The dissertation is focused on the study of the causes and consequences of preterm prelabour rupture of membranes (pPROM). The aim of the presented work is to summarize current knowledge about the pathophysiology of preterm labor in connection with preterm prelabour rupture of membranes and to assess the role of transabdominal amniocentesis in the expectant management of pPROM. Another goal of the work was to evaluate the concentration of IL-6 in amniotic fluid obtained from amniocentesis in women with pPROM using different methods and to establish cut-off values for the diagnosis of intra-amniotic inflammation. At our workplace, using the point of care test, we set a cut-off value for IL-6 concentration in amniotic fluid of 1000 pg/ml. The study included 62 pregnant women with pPROM between 22+0 and 34+0 gestational weeks. The mean gestational age at the time of pPROM was 31+0, the mean gestational age at delivery was 32+1, and the median from pPROM to delivery was 112 hours. An IL-6 test above 1000 pg/ml (positive IL-6 AMC) was confirmed in 12 women (19.4%), the median interval from pPROM to delivery was 56 h (min-max: 6.4-288). A test with an IL-6 value below 1000 pg/ml (negative IL-6 AMC) was confirmed in 51 women (81.0%). Neonatal mortality was 1.9% and was associated with prematurity. In another study in collaboration with the National University of Health in Hradec Králové, which included 121 pregnant women between gestational weeks 24 + 0 and 36 + 6, the method of automated electrochemiluminescence immunoassay and ELISA test was used to determine the concentration of IL-6 in amniotic fluid. We have shown that amniotic fluid IL-6 concentrations measured using automated electrochemiluminescence immunoassay methods are strongly correlated with values measured using an ELISA test. The cut-off value of IL-6 concentration in amniotic fluid determined using an automated electrochemiluminescence immunoanalytical method is 3000 pg/ml and this is an indication for the diagnosis of intra-amniotic inflammation in women with pPROM. In conclusion, serial transabdominal amniocentesis and determination of IL-6 concentration in amniotic fluid helps to identify a high degree of inflammation in amniotic fluid in women with pPROM. It is the deciding factor for choosing between active and expectant management in women with pPROM. Extending the latency period with expectant management did not lead to an increase in neonatal mortality. The most significant factor affecting neonatal morbidity and mortality is gestational age. Early neonatal sepsis occurs with high risks after preterm prelabour rupture of membranes associated with inflammatory complications. Further studies would be needed to determine whether long-term neonatal outcomes differ according to the specific inflammatory response.

1 Úvod

Předčasný odtok plodové vody před termínem porodu (preterm prelabor rupture of membranes; pPROM) je definovaný jako porušení plodových obalů s odtokem plodové vody před 37. týdnem těhotenství, předcházející minimálně 2 hodiny nástupu pravidelné děložní činnosti [1]. Komplikuje více než 3 % všech porodů. Přibližně ve 30 % je pPROM příčinou předčasného porodu, a podílí se tak významně na perinatální morbiditě i mortalitě. pPROM lze rozdělit podle gestačního stáří na časný (od 24+0 až 33+6 týdne těhotenství) a pozdní (od 34+0 až 36+6 týdne těhotenství). Největší počet případů tvoří pPROM mezi 34. a 37. týdnem těhotenství (tzv. pozdní pPROM).

Etiologie pPROM není známá, ale faktory zvyšující riziko předčasného odtoku plodové vody jsou zkrácené děložní hrdlo či intraamniální infekce [2]. Počet předčasných porodů závisí i na věku rodičky, jak je ukázáno v tabulce, kterou zpracoval Český statistický úřad pro Českou republiku. (tab. 1).

Věk	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
-19	10,1%	10,7%	10,7%	10,2%	10,6%	10,6%	9,7%	10,4%	10,4%	10,2%
20-24	7,8 %	8,3 %	8,6%	7,8%	7,9%	8,0%	8,3%	7,5%	7,4%	7,4%
25-29	7,8%	7,9%	7,7%	7,4%	7,0%	7,4%	6,9%	6,6%	6,6%	6,1%
30-34	7,7%	7,9%	8,0%	7,3%	7,3%	6,9%	6,8%	6,6%	6,2%	6,4%
35-39	8,3%	8,9%	9,3%	8,4%	7,9%	7,9%	7,9%	7,1%	7,6%	7,1%
40+	11,7%	10,9%	10,5%	10,8%	9,5%	10,0%	8,0%	8,5%	8,6%	8,5%
Celkem	8,0%	8,3%	8,4%	7,8%	7,5%	7,5%	7,3%	6,9%	6,9%	6,7%

Tabulka č. 1. Předčasně narozené děti v České republice v závislosti na věku rodičky v letech 2011-2020

2 Patofyziologie předčasného porodu v souvislosti s pPROM

Klíčovou roli v etiologii pPROM má však infekce v choriodeciduálním prostoru a zánět. Biochemické procesy u žen s pPROM jsou provázeny nárůstem matrixmetalloproteináz MMP v plodové vodě a poklesem jejich inhibitorů. Během předčasného porodu stimuluje tvorbu MMP především prozánětlivé cytokiny a prostaglandiny [3]. Tyto procesy vedou k porušení celistvosti plodových membrán, lokálnímu zánětu a ascendentní bakteriální kolonizaci s rozvojem intraamniální zánětlivé invaze (MIAC-microbial invasion of the amniotic cavity) [4]. S rozvojem pPROM mohou souviset vaskulární léze v placentě, případně i patologické transformace spirálních arterií, ateróza a deciduální vaskulopatie, tedy fibrinoidní nekróza a trombóza deciduálních cév či genetické predispozice [5].

2.1 Intraamniální infekce

Intraamniální infekce (MIAC) závisí na gestačním stáří a komplikuje pPROM u 20–50 % případů [6]. Nejčastěji se vyskytující bakterie v plodové vodě jsou genitální mykoplazmata (*Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* a *Mycoplasma hominis*). Tyto mikroorganismy jsou součástí poševní flóry a běžně kolonizují i choriodeciduální prostor. U pacientek s pPROM tvoří 70–80 % všech mikrobiálních nálezů v plodové vodě. [7]. Intenzita zánětu, který genitální mykoplazmata vyvolávají, je závislá na jejich množství v plodové vodě. Velké množství mykoplazmat vede k velmi závažnému a intenzivnímu intraamniálnímu zánětu. [8]. Na rozdíl od ostatních bakterií genitální mykoplazmata vyvolávají zánětlivou odpověď, která však není spojena s produkcí prostaglandinů, a tedy jejich přítomnost v plodové vodě většinou nevyvolává nástup děložní činnosti. Slabý intraamniální zánět vyvolá jen malé množství genitálních mykoplazmat a při nálezu genitálních mykoplazmat v plodové vodě z druhotrimestrální aminocentézy z genetické indikace nemusí vést ke vzniku histologické chorioamnionitidy (HCA) a nemusí být vždy spojen se špatným těhotenským výsledkem [9].

HCA souvisí s vysokou koncentrací zánětlivých mediátorů v plodové vodě, včetně přirozených inhibitorů cytokinů (solubilní TNF receptory p55 a p75) a proinflatorních cytokinů (TNF- α ,

IL-1 β , IL-6 a IL-8) [10]. Mikrobiologické vyšetření se provádí po odběru vzorku plodové vody transabdominální amniocentézou. Intrauterinní infekce je pak jednou z příčin, které vedou k nástupu předčasné děložní aktivity a k pPROM. HCA tedy úzce souvisí s pPROM, zhoršuje perinatální morbiditu [11] a zvyšuje riziko předčasného porodu [12]. Uplatňují se bakteriální fosfolipázy [13], bakteriální endotoxiny [14] a cytokiny (např. interleukin 1 (IL-1) [15], tumor necrosis faktor α (TNF- α) a interleukin 6 (IL-6) [16]. Diagnóza HCA je stanovena až na podkladě difuzní infiltrace placentárních tkání leukocyty, protože většinou probíhá bez zřejmých klinických příznaků [17]. IL-6 je především mediátorem zánětu, inflamatorní cytokin, který se účastní patogeneze různých onemocnění [18]. Produkují ho zejména makrofágy, fibroblasty, endometriální stromální buňky a také trofoblasty [19]. Cytokiny jsou produkovány infiltrujícími makrofágy a fetálními krevními elementy v decidui a v chorionu [6]. Zvýšené hladiny IL-6 ve fetální krvi korelují se zvýšeným rizikem vzniku závažných perinatálních postižení plodu typu bronchopulmonální dysplazie či periventrikulární leukomalacie [20]. Také je třeba vzít v úvahu roli neutrofilů plodu, které poskytují důležitou obranu proti bakteriím. Z důvodu nezralosti fetálních neutrofilů je narušena jejich funkce. U předčasně narozených novorozenců je schopnost zabít bakterie extracelulárně snížena [6].

2.2 Chorioamnionitida a mateřské a novorozenecké výsledky

Chorioamnionitida je spojena s vysokým rizikem časně novorozenecké sepse a nekrotizující enterokolitidou u novorozenců. Histologická chorioamnionitida (difuzní infiltrace placenty, plodových obalů či pupečníku neutrofilů, nejtěžší formou je funisitida, přítomnost neutrofilů v pupečníku) souvisí s poškozením mozku u předčasně narozených dětí. Po pPROM v druhém trimestru bakterie rychle kolonizují povrchy amniální membrány, chorionu, decidui, kůže plodu a sliznice, tak i pupeční šňůru [6].

2.3 Souvislost pPROM s poruchami hemostázy

U pacientek s pPROM byla prokázána vyšší střední plazmatická koncentrace trombin-antitrombinových (TAT) komplexů ve srovnání s těhotnými s normálním průběhem těhotenství [21,22]. Jedním z mechanismů pPROM je tedy aktivace koagulační kaskády, která vede ke zvýšené tvorbě trombinu a může být důsledkem deciduálního krvácení, které vede k tvorbě retroplacentární sraženiny nebo k intraamniotické infekci, která může vyvolat deciduální krvácení a subklinickou abrupci stejně jako zvýšené intraamniotické TAT komplexy [23,24].

Dále může aktivace koagulační kaskády vést ke zvýšení mateřské systémové zánětlivé odpovědi, která může aktivovat vnější cestu koagulace v důsledku exprese a uvolňování tkáňového faktoru (TF) aktivovanými monocyty [25,26]. Tyto mechanismy vedou ke zvýšené tvorbě trombinu, která je spojena se stimulací sekrece matrix metaloproteináz (MMP) deciduálními buňkami (tj. MMP-1 a MMP-3), které mohou degradovat extracelulární matrix chorioamniotických membrán [27,28]. Dále může dojít k aktivaci myometria a tvorbě děložních kontrakcí, které mohou vést k předčasnému porodu s nebo bez ruptury membrán a následnému předčasnému porodu [29,30]. Tkáňový faktor je součástí účinného hemostatického mechanismu v děložní stěně, který je aktivován v průběhu normálního těhotenství během implantace a po porodu. Tento hemostatický mechanismus však může být aktivován i v důsledku patologického deciduálního krvácení u těhotenství komplikovaných abrupcí placenty a intraamniotickou infekcí [31,32].

Těhotenské komplikace souvisí tedy se změnami koncentrací TF a inhibitoru tkáňového faktoru TFPI v plazmě matky a v placentě. Plazmatické koncentrace TF a volného TFPI u matky jsou vyšší u žen s preeklampsií než u pacientek s normálním těhotenstvím [33]. Koncentrace placentárního TF a exprese mRNA jsou vyšší u pacientek s těžkou preeklampsií než u pacientek s normálním těhotenstvím [34]. Naproti tomu placenty pacientek s gestačními vaskulárními komplikacemi (preeklampsie, eklampsie, fetální růstová restrikce, abrupce placenty a smrt plodu) mají nižší koncentrace celkového TFPI a exprese mRNA v placentách než u pacientek s normálním těhotenstvím [35].

U pacientek s pPROM byla v plazmě prokázána zvýšená tvorba trombinu jako důsledek aktivace koagulační kaskády a významně vyšší střední plazmatická koncentrace TF než u žen s normálním těhotenstvím. Naopak střední plazmatická koncentrace TFPI byla významně nižší u pacientek s předčasným PROM než u pacientek s normálním těhotenstvím [36].

2.4 Genetické predispozice

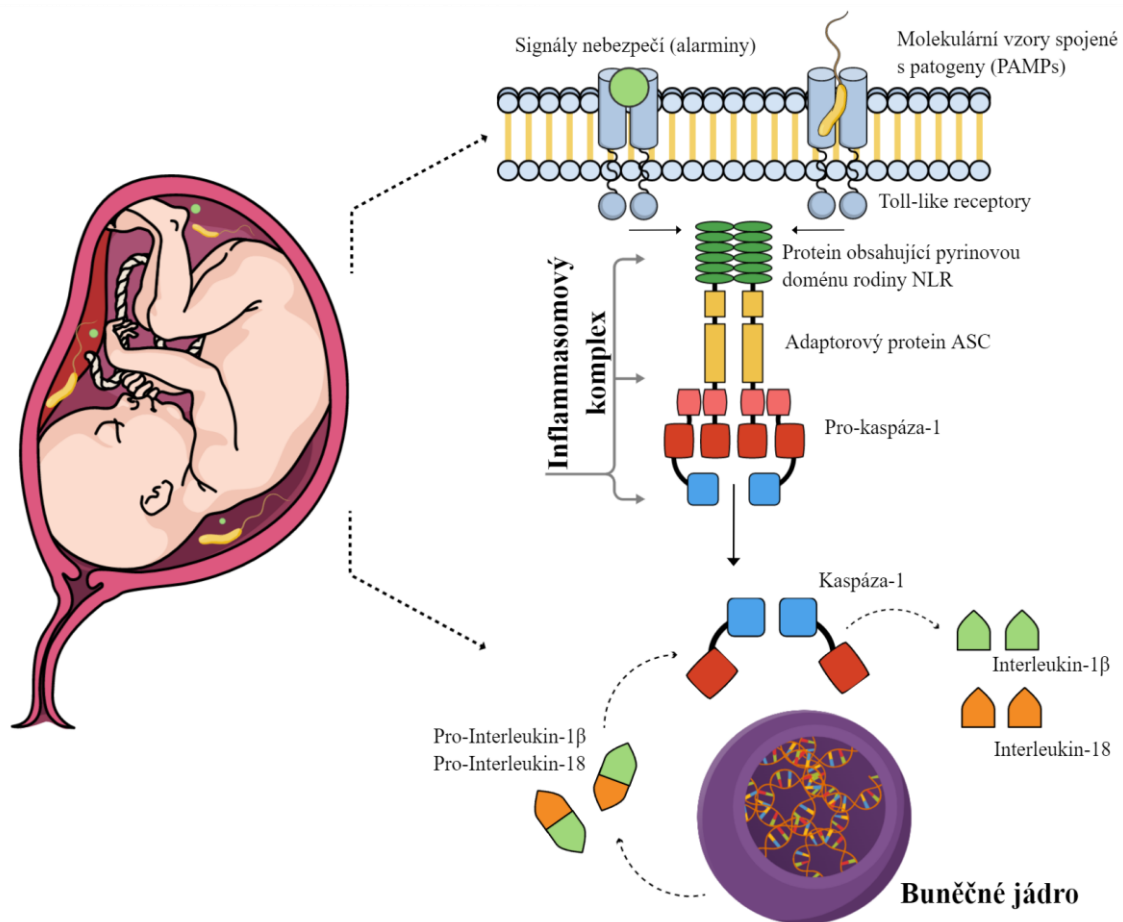
Významnou oblast v rámci etiologie předčasného porodu představuje i ověření genetické predispozice. Studie na dvojčatech prokázaly souvislost s dědičností v rozsahu od 17–40 % [37]. Polymorfismy v několika genech byly spojeny se spontánním předčasným porodem. Výsledky studií na dvojčatech ukázaly, že jak mateřské, tak i fetální genomy přispívají k

načasování porodu. Odhaduje se, že kombinované mateřské a fetální genetické faktory přispívají více jak 30 % k riziku předčasného porodu [38,39,40].

Jednou z často používaných technik k identifikaci genetických rizikových faktorů je studium polymorfizmů kandidátních genů, které přímo ověřují expresi a funkci vybraných genů jako i ověření specifických genetických variant. Studie kandidátních genů ukázaly, že některé polymorfismy v genech kódujících matrix metaloproteinázy, cytokinové receptory a další složky vrozeného imunitního systému významně souvisí s předčasným porodem [41,42].

Se spontánním předčasným porodem je spojen především intraamniální zánět. Tento patologický zánětlivý proces může být způsoben mikroorganismy, které napadají amniální dutinu (tj. intraamniální infekce) nebo na molekulární úrovni nebezpečnými alarminy uvolněnými během buněčného stresu (tj. sterilní intraamniální zánět) [43,44]. V obou případech cytokiny, jako je interleukin (IL)-1 [45], IL-6 [46], IL-8 [47,48] a tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- α) [49,50] hrají ústřední roli v patofyziologii předčasného porodu. Ze všech těchto cytokinů je IL-1 β centrálním mediátorem v patologickém procesu předčasného porodu, protože může stimulovat expresi a uvolňování dalších mediátorů porodu, jako jsou prostaglandiny [51,52]. Podávání IL-1 β způsobuje předčasný porod u myši a jiných než lidských primátů, který lze přerušit podáním antagonisty receptoru IL-1 β , což potvrzuje klíčovou roli tohoto cytokinu v mechanismech odpovědných za předčasný porod v rámci zánětu [47,53,54,55].

U spontánních předčasných porodů je zkoumáný inflammasom, který představuje multiproteinový komplex umístěný v cytoplazmě buněk, jejíž aktivace indukuje transformaci pro-IL-1 β [56] (nezralé formy) na zralé/bioaktivní formy IL-1 β působením aktivní kaspázy-1 (CASP-1) [57]. (obr. 1)



Obrázek 1. Základní mechanismus aktivace inflammasomu v chorioamniálních membránách. Patogeny asociované molekulárními vzory (PAMP) a/nebo signály nebezpečí (tj. alarminy) v amniální dutině mohou indukovat aktivaci inflammasomového komplexu [NLR rodina pyrinové domény obsahující protein (např. NLRP3) + adaptorový protein nebo ASC (Apoptosis Associated Speck-Like Protein) + pro-kaspáza-1] v chorioamniálních membránách. Aktivace inflammasomu vyvolá uvolnění aktivních forem kaspázy-1, které se podílí na zpracování interleukinu (IL)-1 β a IL-18 v plodové vodě.

Převzato z Strauss J. F., Romero R., Gomez-Lopez N., Spontaneous preterm birth: advances toward the discovery of genetic predisposition. *Am J Obstet Gynecol.* 2018 March ; 218(3): 294–314.e2. doi:10.1016/j.ajog.2017.12.009. DOI: 10.1016/j.ajog.2017.12.009

Inflammasomový komplex obsahuje:

- 1) senzorké místo receptoru
- 2) adaptorový protein ASC (speck-like protein spojený s apoptózou)
- 3) pro-kaspáza-1 (pro-CASP-1) [57,58].

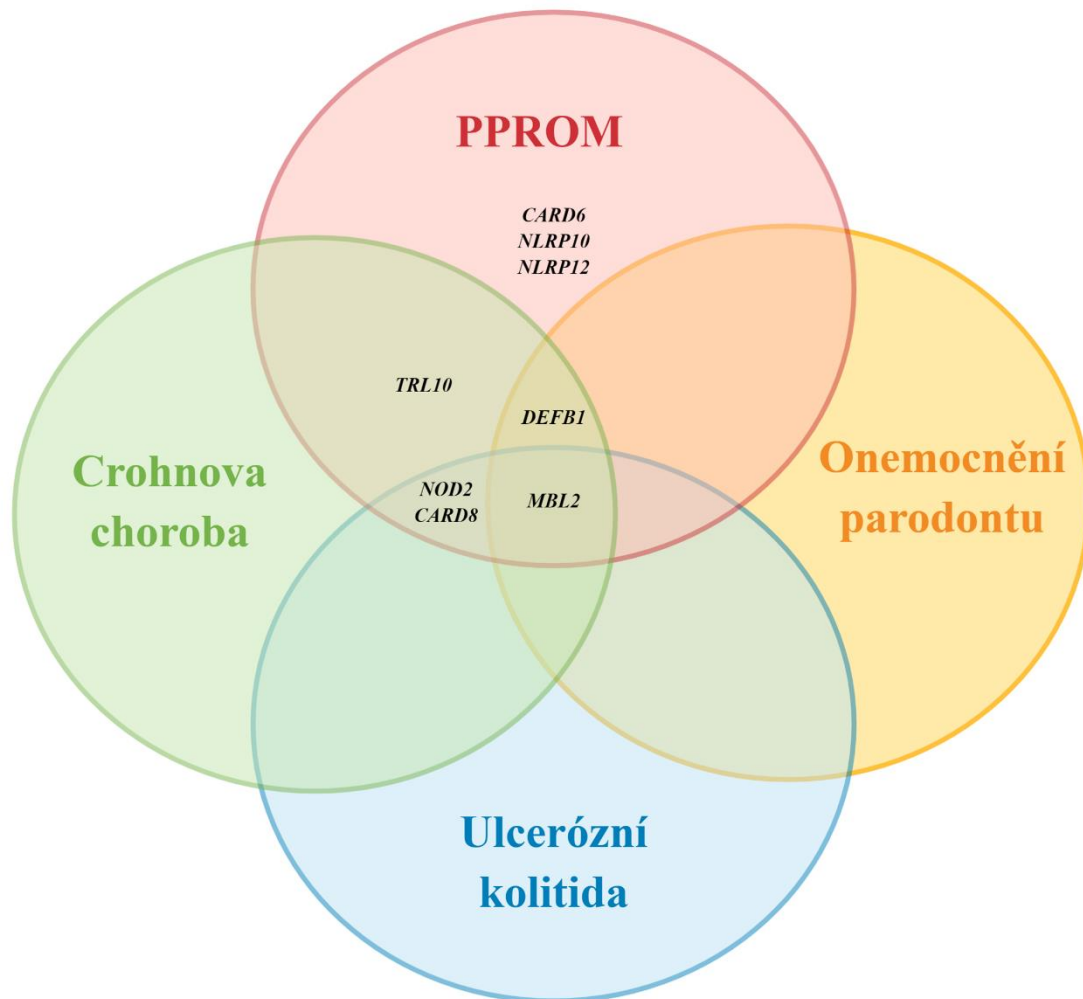
ASC složka inflammasomového proteinu je kódována genem PYCARD a zahrnuje dvě domény: jednu pyrinovou doménu a jednu aktivační a rekrutační doménu kaspázy (CARD) [59].

Po aktivaci inflammasom indukuje uvolnění aktivních forem CASP-1, který se zase podílí na zpracování IL-1 β a IL-18 [56] (obr. 1), vyvolávající prozánětlivou programovanou buněčnou smrt nazývanou pyroptóza [60]. Důkazem na podporu účasti inflammasomu na mechanismech porodu se zánětlivou komplikací je to, že koncentrace CASP-1 v plodové vodě, IL-1 β a IL-18 jsou vyšší u žen, které mají v anamnéze spontánní předčasný porod s intraamniální infekcí než u pacientů bez tohoto klinického stavu. Kromě toho množství proteinu 3 obsahujícího pyrinovou doménu rodiny NLR (NLRP3, (inflammasom-recruiting pattern recognition receptor), aktivní formy CASP-1 stejně jako zralé formy IL-1 β a IL-18 jsou zvýšeny v chorioamniotických membránách u žen, které podstoupily spontánní předčasný nebo porod v termínu s akutním histologickým nálezem chorioamnionitidy ve srovnání s pacientkami bez této placentární léze. Akutní histologická chorioamnionitida je spojena s intraamniální infekcí a sterilním intraamniálním zánětem [43,46,61]. Inflammasom se tedy podílí na fyziologických a patologických zánětlivých procesech [62,63] (obr. 1).

Další receptory, které se podílí na mechanismech vedoucích k zánětlivým procesům spojených s porodem jsou proteiny 1 a 2 kódované nukleotidy vázanými oligomerizačními doménami (NOD1, NOD2) [63, 64]. Tyto intracelulární molekuly rozpoznávají bakteriální peptidoglykanové segmenty a alarminy bez tvorby zánětů. NOD proteiny přímo aktivují nukleární faktor kappa B (NF- κ B) prozánětlivě signalizace, indukující expresi pro-IL-1 β a pro-IL-18. V myších dendritických buňkách bylo prokázáno, že NOD proteiny mohou také působit synergicky s inflammasomovými složkami (např. NLRP3) pro posílení imunitní reakce [65]. Chorioamniální membrána a myometrium exprimují oba NOD proteiny během fyziologických a patologických zánětlivých procesů předčasného porodu a porodu v termín [66].

Dále byly studovány u PPROM geny, které jsou spojené se zánětlivým onemocněním střev a s PROM (CARD8, NOD2, TLR10, DEFB1, MBL2) a s periodontálním onemocněním (DEFB1, MBL2). Na základě objevu mutací v genech u pacientek s PROM, kdy tyto mutace byly dříve spojovány se zánětlivým onemocněním střev (CARD8, NOD2, TLR10, DEFB1,

MBL2) a periodontálním onemocnění (DEFB1, MBL2), se odhaduje, že existuje společný genetický substrát, který je základem asociace zánětlivého onemocnění střev, periodontálního onemocnění a spontánního předčasného porodu. Z tohoto modelu vyplývá, že se jejich výskyt překrývá spíše kvůli genetické podobnosti než kvůli kauzálnímu vztahu, jak bylo navrženo pro periodontální onemocnění a předčasný porod [67,68] (obr. 2).



Obrázek 2. Překrývající se genové mutace u PPROM, Crohnovy choroby, ulcerózní kolitidy a periodontálního onemocnění.

Převzato z Strauss J. F., Romero R., Gomez-Lopez N., Spontaneous preterm birth: advances toward the discovery of genetic predisposition. *Am J Obstet Gynecol.* 2018 March; 218(3): 294–314.e2. doi:10.1016/j.ajog.2017.12.009. DOI: 10.1016/j.ajog.2017.12.009

Zánětlivé onemocnění střev (Crohnova choroba a ulcerózní kolitida) je spojeno s nepříznivými výsledky těhotenství včetně předčasného porodu, porodu v nízkém gestačním stáří, nízké hmotnosti plodu a vrozených anomálií. Těhotné ženy se zánětlivým onemocněním střev, které mají vysoký stupeň aktivity onemocnění, jsou vystaveny mnohem vyššímu riziku předčasného porodu než ty, které během těhotenství nevykazují aktivitu onemocnění [67,68].

Další studie dokazují, že zánětlivé onemocnění střev je spojeno se zvýšeným rizikem onemocnění parodontu. Onemocnění parodontu souvisí jak se zánětlivým onemocněním střev, tak i s předčasným porodem [69]. Souvislost mezi předčasným porodem a periodontálním onemocněním je daná translokací bakterií do placenty a do plodové vody, stejně jako systémová zánětlivá reakce na periodontální onemocnění, která má chronickou povahu. Nedávná studie neprokázala žádnou souvislost mezi parodontózou a mikrobiální invazí do amniotické dutiny (MAIC) a intraamniálním zánětem (IAI). Je možné, že souvislost mezi předčasným PROM a parodontózou může být způsobena přehnanou systémovou zánětlivou reakcí [70,71,72].

Dále byly sledovány ženy s bakteriální vaginózou a současně s mutací genu pro TNF-alfa (Tumor necrosis factor alfa), které následně mají 10krát vyšší riziko předčasného porodu než ženy s bakteriální vaginózou bez výše uvedené mutace [73]. Významnou úlohu v etiopatogenezi mnoha závažných stavů má geneticky podmíněná trombofilie, která je spojena se zvýšeným rizikem nejen předčasného porodu, ale i mateřské a perinatální morbidity a mortality. Trombofilní stavy se významně uplatňují v etiopatogenezi preeklampsie, intrauterinního úmrtí a růstové retardace plodu, abrupce placenty, předčasných porodů a recidivujících spontánních potratů [74,75,76,77]. Trombofilie je vrozená nebo získaná porucha hemostatického mechanismu, charakterizovaná zvýšenou tendencí ke krevnímu srážení a trombotizaci [74]. Vrozená forma souvisí s mutací genů kódujících faktor V-Leiden (Leidenská mutace), protrombin G20210A, dále hyperhomocysteinemii, autozomálně dědičný deficit antitrombinu (AT), proteinu C a proteinu S. Leidenská mutace je nejčastějším diagnostikovaným geneticky podmíněným trombofilním stavem. Vyskytuje se až u pěti procent evropské populace. Vrozené trombofilní stavy jsou odpovědné za značnou část závažných stavů v průběhu těhotenství, porodu a šestinedělí. Riziko tromboembolie je přibližně 8krát vyšší u nositelů těchto poruch ve srovnání se zdravou populací těhotných [74,78,79].

Kromě trombózy hlubokého žilního systému dolních končetin a plicní embolie může docházet k trombóze např. sagitálního sinu, případně mezenterické nebo portální žíly. Specifické postavení má antifosfolipidový syndrom [80]. Některé studie ukazují na 33 % incidenci u příbuzných osob s APS. Další studie prokázala asociaci mezi výskytem aCL

(antikardiolipidových) protilátek a skupinou lidí nesoucích některé z HLA genů, např. DRw53, DR7 (většinou u lidí hispánského původu) a DR4 (většinou u bělochů). V USA byly antifosfolipidové protilátky nalezeny až u 5% zdravé populace. Existuje tedy předpoklad, že tento výskyt bude stejný i v evropské populaci.¹ Těhotné s antifosfolipidovým syndromem mají vyšší výskyt těhotenských komplikací jako je předčasný odtok plodové vody, preeklampsie, těhotenská ztráta a předčasný porod před 34 týdnem [81]. Při přítomnosti antifosfolipidových protilátek je vyšší pravděpodobnost nepříznivého výsledku těhotenství. Těhotné s těmito rizikovými faktory by měly být pečlivě sledovány během těhotenství [80].

3 Diagnostika pPROM

Ideální diagnostický test by měl být neinvazivní, rychlý, přesný, cenově dostupný, jednoduše použitelný a snadno dostupný. Porušení plodových obalů není výrazně patrné přibližně u 20–25 % těhotných žen, proto je výzkum pro identifikaci ideálního diagnostického testu je nezbytný [82]. V posledních desetiletích bylo vyvinuto několik technik pro hodnocení PROM. Tyto metody zahrnují nitrazinový test, Fernův test, test pro stanovení fetálního fibronektinu (fFN) v cervikovaginálním sekretu, intraamniální injekce barviva a různé rychlé imunotesty pro detekci proteinových markerů přítomných ve vaginální tekutině. Diagnóza pPROM je z 90 % případů stanovena pomocí anamnestického údaje o odtoku plodové vody a průkazem plodové vody v zadní klenbě poševní při vyšetření v zrcadlech [83].

Konvenční diagnostické testy zahrnují „Nitrazinový test“ a „Fernův test“. Nitrazinový test je konvenční test, který se používá od roku 1938 pro hodnocení PROM. Tento přístup využívá testování pH uniklé plodové vody, ale může vést k nejednoznačným výsledkům, zejména pokud dojde k úniku plodové vody po hodině nebo déle. Fernův test je mikroskopická metoda, která byla poprvé popsána pro diagnostiku PROM v roce 1946. Je založen na zobrazení plodové vody v podobě arborizovaných krystalů ve „vzoru palmových listů“, kdy se používají k hodnocení mikroskopické techniky. Diagnostickou přesnost Fernova testu ovlivňuje přítomnost krve, cervikálního hlenu, semenné tekutiny nebo antiseptického roztoku v plodové vodě. Nález fFN v cervikovaginálním sekretu může být známkou degradace extracelulární matrix ve druhém a třetím trimestru. Tento test je vysoce citlivý, ale s nízkou specificitou pro diagnózu PROM. S využitím tohoto testu se dá předvídat předčasný porod od 24 do 30 týdne těhotenství [84,85].

Výzkumná studie z 90. let stanovila 100 % diagnostickou přesnost s AFP (Alfa fetoprotein) testovací soupravou (monoklonální anti-AFP sada protilátek) v diagnostice PROM nebo podezření na PROM mezi 11. a 40. týdnem těhotenství. Kishida a kol. [86] popsali vylepšený AFP test s 95,7 % diagnostickou přesností s využitím AFP monoklonální protilátky u pPROM. Systematický přehled od van der Ham et al. [87] posuzoval přesnost různých testů v diagnostikování nejednoznačných případů PROM a porovnal AFP test s metodami, které používají měření pH a IGFBP-1. Zjistil, že test AFP má 100% citlivost a specificitu; výzkumníci však nedoporučili tento konkrétní test vzhledem k omezeným důkazům pro diagnostickou přesnost u PROM. Singh a Bhat [88] provedli prospektivní studii k posouzení účinnosti AFP testu v cervikovaginálním sekretu k diagnostice PPROM ve 24 gestačním týdnu a zjistili, že tento test má 88,9% citlivost a 98,5% specificitu. Kvalitní imunochromatografický diagnostický test byl navržen jako rychlý point-of-care test, který využívá monoklonální protilátku k detekci AFP a IGFBP-1 [89]. Komerčně dostupné imunotesty, které detekují dva proteiny z plodové vody, tj. IGFBP-1 a AFP, fungují dobře i při kontaminaci plodové vody krví. Rovněž byla zkoumána role močoviny a kreatininu v tekutině po výplachu pochvy jako diagnostické metody u pacientek s PROM a považovali je za spolehlivé a jednoduché diagnostické testy pro PROM. Nedávno byl představen nový neinvazivní a rychlý test pro diagnostiku pPROM, který stanovuje interleukin-8 (IL-8) v plodové vodě získané pomocí zařízení označovaného jako cervikální sběrač plodové vody. Interleukin-8 je v plodové vodě analyzován za účelem predikce a monitorování intraamniálního zánětu u pPROM [90]. Nicméně je zapotřebí další výzkum k identifikaci biologických markerů k diagnóze pPROM. Food and Drug Administration (USFDA) v USA doporučila testy používané pro diagnostiku odtoku plodové vody, které by měly být součástí celkového klinického stavu těhotných. Testy pro detekci předčasného odtoku plodové vody by se neměly používat bez zhodnocení celkového klinického stavu kvůli obavám z nepřesné interpretace výsledků laboratorních testů. Rychlá a přesná diagnóza je charakteristickým znakem specifického managementu pro dané gestační stáří bez nežádoucích následků [91].

4 Management pPROM

Ve většině případů diagnostikujeme pPROM na základě klinického vyšetření a semikvantitativního ultrazvukového hodnocení (určení počtu plodů, polohy plodu, lokalizaci placenty, množství plodové vody, odhadovanou hmotnost plodu). Zlatým standardem pro diagnostiku je pozorování úniku plodové vody. Odebereme materiál pro mikrobiologický rozbor ke stanovení vagino-rektální kolonizace beta hemolytickým streptokokem. Diagnóza chorioamnionitidy je založena na přítomnosti jednoho z následujících příznaků: fetální tachykardie, horečka (nad 37,8 °C), tachykardie matky (nad 100 tepů za minutu), vysoká hodnota leukocytů matky (přes 15 000 leukocytů/mm). Provádíme následující laboratorní vyšetření: kompletní krevní obraz, C-reaktivní protein (CRP), analýzu moči a kultivaci moči. Ultrazvukové vyšetření ke stanovení biometrie plodu, reziduálního objemu plodové vody, abnormalit placenty. Ve většině případů vidíme oligohydramnion, který je definován jako maximální vertikální osa plodové vody do hloubky <2 cm nebo index plodové vody (AFI) <5 cm). Kdykoli je to možné, volíme odklad porodu minimálně o 48 hodin. Pokud je gestační věk vyšší než 24 týdnů a menší než 35 týdnů a nejsou žádné známky chorioamnionitidy, abrupce placenty, úmrtí plodu nebo postupující porod, volíme expektační management. Vzhledem k vysokému riziku infekce považujeme antibiotickou terapii za povinnou. Z léčby empirické při znalosti mikrobiologického výsledku přecházíme na cílenou antibiotickou terapii dle citlivosti [5,99]. Také je zahájena indukce plicní zralosti plodu kortikoidy. Pokud dojde k nástupu děložní činnosti je přidána tokolytická terapie po dobu 48 hodin. Po ukončení indukce plicní zralosti plodu kortikoidy porod již netlumíme a při nástupu pravidelné děložní činnosti ukončujeme těhotenství dle indikačních kritérií. Pokud nedojde k nástupu pravidelné děložní činnosti kontrolujeme klinický stav těhotné denně pomocí měření tělesné teploty, odběru CRP a leukocytů z periferní krve matky. Při nárůstu těchto hodnot či klinických známkách chorioamnionitidy těhotenství ukončujeme indukovaným porodem či císařským řezem.

Klinické známky chorioamnionitidy, hypoxie plodu nebo závažného vaginálního krvácení jsou indikací k ukončení těhotenství. Způsob ukončení těhotenství závisí na porodnickém nález, stavu těhotné a plodu. V ostatních případech pPROM před týdnem těhotenství 34+0 je vhodné postupovat konzervativně. U těhotných s pPROM v týdnu těhotenství 22+0 až 24+0, tzv. šedá zóna, je nutné postupovat individuálně po předchozí konzultaci s neonatologem, těhotnou a její rodinou [92].

5 Cíl práce

Cílem předložené práce je:

- shrnutí současných znalostí o patofyziologii předčasného porodu v souvislosti s pPROM
- srovnání koncentrací interleukinu (IL)-6 v plodové vodě naměřených pomocí metody automatizovaného elektrochemiluminiscenčního imunotestu a ELISA testu a stanovení cut-off hodnoty koncentrace IL-6 pro intraamniální zánět (IAI) u pPROM
- analyzování výsledků z vyšetření IL6 z aminocentézy, dále z výsledků kultivace z hrdla děložního a kultivace z plodové vody z aminocentézy vybraných pacientek
- zpracování vlastních výsledků získaných na Porodnicko-gynekologické klinice LF UP a FN Olomouc
- porovnání vlastních výsledků s výsledky ostatních autorů
- optimalizace managementu péče o pacientky s předčasným odtokem plodové vody před dokončeným 34. týdnem těhotenství (pPROM).

6 Metodika

6.1 Soubor pacientek a metodika pro hodnocení role IL-6 point-of-care testu v plodové vodě získané z amniocentéz u žen s pPROM mezi 24. a 34. týdnem těhotenství

6.1.1 Soubor pacientek a management pPROM

Studie zahrnovala 62 těhotných žen s pPROM v gestačním týdnu 22+0 až 34+0, které byly přijaty na Porodnicko-gynekologickou kliniku, Fakultní nemocnice Olomouc od května 2015 do září 2018. Do studie byly zahrnuty ženy ve věku >18let s diagnózou pPROM a s jednočetným těhotenstvím. Zahrnuty byly pouze ženy, které porodily po 24 týdnu těhotenství. Ze studie byly vyloučeny těhotné, které měly známky klinické chorioamnionitidy, hypoxie plodu, vícečetné těhotenství nebo pokud byly přítomné buď vrozené nebo chromozomální abnormality plodu a případy, kdy amniocentéza nebyla možná. (tabulka 1 a obr. 5 kap. 7.1) Klinická chorioamnionitida byla diagnostikována při teplotě matky $\geq 37,8$ °C a ≥ 2 z následujících kritérií:

- (1) citlivost dělohy
- (2) zapáchající vaginální výtok;
- (3) mateřská leukocytóza (počet leukocytů $> 15\,000$ buněk/mm³);
- (4) mateřská tachykardie (>100 tepů/min);
- (5) fetální tachykardie (>160 tepů/min) [93].

Do studie byly zahrnuty všechny ženy, které podepsaly informovaný souhlas a absolvovaly rutinní prenatalní péči v souvislosti s pPROM. To zahrnovalo hospitalizaci, aplikaci prenatalních steroidů (betamethason acetát/fosfát 12 mg intramuskulárně ve dvou dávkách s odstupem 24 hodin) a standartní aplikace antibiotik (parenterální penicilin) (tabulka 4 v kap.7.1). Tokolýza byla podávána po dobu 48 hodin při nepřítomnosti klinické chorioamnionitidy, abrupce placenty a hypoxie plodu. Těhotenství bylo ukončeno po nástupu pravidelné děložní činnosti spontánním předčasným porodem z důvodu stavu matky nebo stavu

plodu, klinických známek infekce nebo pokud těhotenství přesáhlo 34 týdnů. Klinická diagnóza odtoku plodové vody byla založena na anamnéze úniku plodové vody, množství plodové vody zjištěné ultrazvukem, vyšetření sterilním zrcátkem potvrzující odtok plodové vody z děložního hrdla. V případě pochybností byly použity biochemické testy (AmniSure) [93,94]. Indikací k císařskému řezu byla klinická chorioamnionitida, abrupce placenty, prolaps pupečníku, rozvoj hypoxie plodu a operace dělohy v anamnéze.

Při příjmu byly odebrány stěry z děložního hrdla k identifikaci bakterií (tabulka 2, kapitola 7.1). Ženy s pozitivní cervikální kulturou byly léčeny parenterálně podle mikrobiálních výsledků. V případě negativního nálezu byla antibiotika vysazena. U všech žen byla odebrána krev a byla provedena transabdominální amniocentéza při přijetí k hospitalizaci a před podáním kortikosteroidů, antibiotik nebo tokolytik, aby se vyloučily známky chorioamnionitidy. Byl odebrán vzorek mateřské krve na laboratorní vyšetření k posouzení hladiny zánětlivých markerů (c-reaktivního proteinu (CRP) a počtu leukocytů (WBC)) [95].

Preferovanou strategií managementu pacientek s pPROM v našem perinatálním postupu byla rutinní amniocentéza. Plodová voda byla odebrána za sterilních podmínek transabdominální amniocentézou pod ultrazvukovou kontrolou a použita pro klinické hodnocení pomocí IL-6 point-of-care testu a dále byly identifikovány mikroorganismy v plodové vodě. Zbývající tekutina byla následně odstředěna a supernatant skladován při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do analýzy. Mikrobiální invaze do amniální dutiny (MIAC) byla definována jako pozitivní PCR pro genitální mykoplazmata a/nebo pozitivní výsledek kultivace z plodové vody [96]. Postup byl odložen u 5 pacientek s výrazným oligohydramniem nebo pokud byla jediná dostupná plodová voda pod centrální částí placenty, která byla lokalizovaná na přední stěně děložní (obr. 7). U žen s hodnotou IL-6 point-of-care test $> 1000\text{ pg/ml}$ z plodové vody bylo zahájeno aktivní vedení porodu. Těhotné, kterým nepostupoval porod spontánně, neměly žádné indikace k císařskému řezu, byly bez známek klinické chorioamnionitidy, test z plodové vody IL-6 point-of-care $<1000\text{ pg/ml}$ a byly bez zvýšeného počtu leukocytů a CRP z krve matky, byly dále sledovány. V podskupině pacientek s gestačním stářím do 26 týdne převládá konzervativní klinický management i v případech s pozitivním IL-6 point-of-care testem 1. Každý den byla měřena teplota matky jako klinická známka chorioamnionitidy a dále byl prováděn odběr z periferní krve matky pro stanovení CRP (c-reaktivního proteinu) a počtu leukocytů (WBC).

Po jednom týdnu expektačního vedení pPROM u 10 těhotných, které ještě neporodily, byla provedena druhá amniocentéza s odběrem plodové vody. U těhotných s hodnotou IL-6 point-of-care testem > 1000 pg/ml z plodové vody bylo zahájeno aktivní vedení porodu. Podskupina těhotných s IL-6 point-of-care testem <1000 pg/ml pokračovala v expektačním managementu pPROM.

6.1.2 Analýza koncentrace IL-6 ze vzorků z plodové vody

Ke klinickému hodnocení byla použita plodová voda (IL-6 point-of-care test, identifikace mikroorganismů z plodové vody). Koncentrace IL-6 (pg/ml) v plodové vodě byly naměřené pomocí imunoanalyzátoru Milenia POCScan (Milenia Biotec, Giesen, Německo [97]). Milenia QuickLine IL-6 je metodou zvanou laterální imunodifuze a je určena pro kvantitativní měření lidského interleukinu-6 (IL-6). Vzorky jsou napipetovány do místa určeného pro aplikaci vzorku. IL-6 obsažený ve vzorku pacienta se naváže na první monoklonální anti-IL-6 protilátku konjugovanou s částicemi zlata. IL-6 navázaný na protilátku proti IL-6 konjugovanou s částicemi zlata proniká skrz membránu a prochází přes testovací pás (T) dále. Tato oblast (pás) je pokrytá druhou monoklonální protilátkou specifickou pro IL-6, která ho zachycuje. Částice zlata navázané na IL-6 první protilátkou se zde tedy stávají viditelnými jako červeno-modrý proužek. Intenzita vzniklého zabarvení je přímo úměrná koncentraci IL-6 ve vzorku a roste během inkubační doby. Přebytečné částice zlata pokračují v průniku testovacím zařízením. Konjugát specifické protilátky nanesené na membráně o něco dále jako pás (kontrolní pás, C) zachycují zbytky pronikajícího konjugátu zlata a během inkubační doby zde vznikne dobře viditelná kontrolní linie (pás). Interpretace výsledků je možná pouze se snímači Milenia POCScan nebo PicoScan, které umožňují objektivní interpretaci a dokumentaci výsledku. Koncentrace IL-6 přímo koreluje s barevnou intenzitou testovacího pásu (T). Snímač Milenia POCScan měří barevnou reflexi testovacího pásu, PicoScan barevnou intenzitu testovacího pásu. Výsledek je vypočítán podle naprogramované standardní křivky. Od každé pacientky bylo pipetováno 0,1 ml plodové vody do jamky pro vzorky v testovací jednotce Picoscanu, což je membrána pokrytá monoklonální (myší) anti-hIL-6 protilátkou konjugovanou s částicemi zlata. Analyzátor Picoscan měří intenzitu barvy testu a vypočítá koncentraci IL-6 (pg/ml) podle uložené standardní křivky.

6.1.3 Detekce Ureaplasma a Mycoplasma hominis v plodové vodě

DNA byla izolována z plodové vody pomocí Mini kit QIAamp DNA (Qiagen, Hilden, Německo) podle pokynů výrobce (s použitím protokolu pro izolaci bakteriální DNA z biologických tekutin). RT-PCR byla provedena s použitím přístroje Rotor-Gene 6000 (Qiagen, Hilden, Německo) s použitím komerčního AmpliSens®C. Ureaplasma/M. hominis-FRT soupravy k detekci DNA z Ureaplasma species a Mycoplasma z běžné PCR zkumavky. Jako kontrolu jsme zařadili PCRrun pro beta-aktin, aby se vyloučila přítomnost inhibitorů PCR 24. (tabulka 3, kapitola 7.1)

6.1.4 Detekce novorozenecké sepse

U všech novorozenců byly evidovány lékařské záznamy týkající se novorozenecké morbidity a mortality. Krátkodobé neonatální výsledky zahrnovaly: výskyt časně novorozenecké sepse (EOS) a pozdní sepse (LOS). Jako definitivní případy sepse byly uznáni ti kojenci, kteří měli pozitivní hemokulturou. Jako časná novorozenecká sepse byly uznány případy sepse v prvních 7 dnech a případy sepse po sedmém dni byly definovány jako pozdní sepse (obr. 7, kapitola 7.1).

6.1.5 Histologická chorioamnionitida a histopatologické hodnocení placenty na přítomnost zánětlivých změn podle Salafia [32]

V 56 případech byla placenta odeslána po porodu na histologické vyšetření. Akutní chorioamnionitida byla diagnostikována na základě stupně infiltrace polymorfonukleárními leukocyty, která byla vyšetřena samostatně z volné membrány (amnionu a choriondecidui), choriové ploténky a pupeční šňůry, podle navržených kritérií od Salafia a kol. Chronická chorioamnionitida byla definována infiltrací orgánu lymfocyty, plazmatickými buňkami a/nebo makrofágy.

Placenta včetně plodových obalů a pupečníku byla po porodu fixována ve formaldehydu a histopatologicky vyšetřena na přítomnost zánětlivých změn. Nálezy byly klasifikovány podle Salafii [32]. Tato klasifikace jednotlivě popisuje zánětlivé změny v amniu, choriondecidui, pupečníku a choriové plotně (stage). Každá skupina je rozdělena do čtyř podskupin podle

intenzity zánětlivých změn (grade), viz tabulka 1. Histopatologická chorioamnionitida (HCA) byla definována jako: amnion grade 1-4 a/nebo chorion-decidua grade 3-4 a/nebo choriová plotna grade 3-4 a/nebo pupečník grade 1-4.

Amnion a chorion/decidua Grade 1 – jeden fokus s alespoň 5 polymorfonukleáry (PMNs)
Grade 2 – více než jeden fokus typu grade 1, nebo minimálně jeden fokus s 6 až 20 PMNs
Grade 3 – mnohočetné a/nebo splývající fokusy grade 2
Grade 4 – difuzní a těžký akutní zánět

Pupečník Grade 1 – PMNs v jedné třetině stěny umbilikální žíly
Grade 2 – PMNs v jedné třetině stěny alespoň dvou umbilikálních cév
Grade 3 – PMNs v perivaskulárním whartonském rosolu
Grade 4 – panvaskulitida a funisitidy šířící se hluboko do whartonského rosolu

Choriová plotna Grade 1 – jeden fokus s alespoň 5 PMNs v subchoriovém fibrinu
Grade 2 – mnohočetné fokusy grade 1 v subchoriovém fibrinu
Grade 3 – málo PMNs v pojivové tkáni nebo choriové plotně
Grade 4 – početná přítomnost PMNs v choriové plotně a vaskulitida choriových cév

6.1.6 Statistická analýza

Statistická analýza výsledků byla provedena pomocí IBM SPSS Verze statistiky 22. Normalita byla testována pomocí dat Shapiro-Wilkova testu. K analýze korelace mezi mateřským CRP a IL-6 point-of-care testem byl použit Spearmanův korelační koeficient (obr. 6, kapitola 7.1). Fisherův exaktní test byl použit k porovnání v kategorických parametrech pozitivních a negativních skupin IL-6 AMC. Studentův test nebo Mann Whitney U-test byly použity k porovnání rozdílů mezi skupinami pro kvantitativní proměnné. Testy byly provedeny na 5 % hladině významnosti.

6.2 Soubor pacientek a metodika měření interleukinu-6 pomocí automatizované elektrochemiluminiscenční imunoanalytické metody a ELISA pro identifikaci intraamniálního zánětu po pPROM ve spolupráci s Fakultní nemocnicí Hradec Králové

6.2.1 Soubor pacientek

Byla provedena retrospektivní kohortová studie u 121 těhotných žen mezi gestačním týdnem 24 + 0 a 36 + 6, které byly přijaté na Gynekologicko porodnickou kliniku Fakultní nemocnice Olomouc a Hradec Králové od února 2017 do ledna 2018. Do studie byly zařazeny ženy s věkem matky ≥ 18 let s jednočetným těhotenstvím komplikovaným pPROM. Ženy se zdravotními komplikacemi v souvislosti s těhotenstvím, jako je omezení růstu plodu, strukturální nebo chromozomální fetální abnormality, gestační nebo pregestační diabetes, gestační hypertenze, preeklampsie, známky hypoxie plodu nebo významné vaginální krvácení byly vyloučeny ze studie. Gestační věk byl stanoven pomocí biometrie plodu v prvním trimestru. pPROM byl diagnostikován vyšetřením těhotných za použití sterilního zrcátka k ověření plodové vody v pochvě. V případě pochybností se jednalo o únik plodové vody potvrzený přítomností proteinů vázajících růstový faktor podobný inzulinu (Actim PROM test; Medix Biochemica, Kauniainen, Finsko) ve vaginální tekutině. Při příjmu byla provedena transabdominální amniocentéza za kontroly ultrazvukem, kdy byly odebrány asi 2-3 ml plodové vody před podáním antibiotik, kortikosteroidů a tokolytik. Pro klinické hodnocení byla použita plodová voda s využitím IL-6 point-of-care testu a dále z ní byly identifikovány mikroorganismy. Zbývající plodová voda byla centrifugována po dobu 15 minut při 2000 x g a skladována při -70 °C až do analýzy. Tato studie byla schválena etickou komisí (červenec 2014, č. 201407 S14P) a informovaný souhlas byl získán od všech účastníků studie.

6.2.2 Analýza koncentrace IL-6 z plodové vody

Těhotenství s pPROM je často komplikováno zvýšenou koncentrací zánětlivých mediátorů v plodové vodě, tj. intraamniální zánět (IAI), který může být buď mikrobiálně asociovaný, nebo sterilní [92,93,94]. IAI je spojen se zvýšeným rizikem nežádoucích krátkodobých a dlouhodobých perinatálních výsledků, bez ohledu na přítomnost

mikroorganismů v plodové vodě [95,96]. K identifikaci přítomnosti IAI se považuje za zlatý standard hodnocení vzorku z plodové vody [97]. Stanovení koncentrace interleukinu (IL)-6 v plodové vodě se jeví průkaznější než koncentrace standardních markerů z plodové vody, jako je např. glukóza, počet leukocytů a laktátu, ale nejsou horší než moderní proteomické markery [98]. Nová automatizovaná elektrochemiluminiscenční imunoanalytická metoda, která měří koncentrace IL-6 v tělesných tekutinách za méně než 20 minut, byla vyvinuta pro využití ve velkoobjemových klinických biochemických laboratořích. Nicméně vhodná cut-off hodnota pro tuto metodu pro IAI dosud nebyla stanovena. Proto bylo cílem této studie porovnat koncentrace IL-6 v plodové vodě měřené pomocí automatizované elektrochemiluminiscenční imunoanalýzy a pomocí ELISA testu, a stanovení cut-off hodnoty koncentrace IL-6 pro IAI, které mohou být zjištěny metodou automatizované elektrochemiluminiscenční imunoanalýzy.

Koncentrace IL-6 v plodové vodě (pg/ml) byly hodnoceny pomocí automatizované elektrochemiluminiscenční imunoanalytické metody a ELISY. Koncentrace IL-6 v plodové vodě byly měřeny automatizovanou elektrochemiluminiscenční imunoanalytickou metodou pomocí imunoanalýzátoru Cobas e602, který je součástí Cobas platformy 8000 (Roche Diagnostics, Basilej, Švýcarsko) [99]. Základní rozsah měření byl 1,5-5000 pg/ml, který mohl být rozšířen na 50000 pg/ml s 10násobným ředěním vzorku; variační koeficienty pro přesnost mezi testy a uvnitř testu byly <10 %. Pro ELISU byly koncentrace IL-6 z plodové vody stanoveny pomocí Human IL-6 Quantikine (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA). Citlivost testu byla <0,70 pg/ml a variační koeficienty pro přesnost inter-test a intra-test byla <10 %.

6.2.3 Detekce Ureaplasma, Mycoplasma hominis a Chlamydia trachomatis v plodové vodě

DNA byla izolována z plodové vody pomocí sady QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Německo) podle pokynů výrobce (s použitím protokolu pro izolaci bakteriální DNA z biologických tekutin). RT-PCR byla provedena za použití Přístroje Rotor-Gene 6000 (Qiagen, Hilden, Německo) využívající komerční AmpliSens® C. trachomatis/Ureaplasma/M. hominis-

FRT kit k detekci DNA z *Ureaplasma species*, *Mycoplasma hominis* a *Chlamydia trachomatis* v PCR zkumavce.

6.2.4 Detekce dalších bakterií v plodové vodě

Bakteriální DNA byla identifikována pomocí PCR zacílením na gen 16S rRNA za použití následujících primerů: 5'-CCAGACTCCTACGGGAGGCAG-3' (oblast V3) a 5'-ACATTTTCAACACGAGCTGACGA-3' (oblast V6) [100, 101]. Každá reakce obsahovala 3 µl cílové DNA, 500 nM primerů a Q5 High-Fidelity DNA polymeráza (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) v celkovém objemu 25 µL. Amplifikace byla provedena pomocí 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Produkty byly vizualizovány na agarózovém gelu. Pozitivní reakce poskytly produkty o 950 párech bází, které byly následně analyzovány pomocí sekvenování. Produkty 16S PCR byly vyčištěny a použity pro sekvenování PCR za využití výše uvedených primerů a BigDye Terminator kit, v3.1 (Thermo Fisher Scientific). Poté byly bakterie typizovány pomocí sekvencí získaných z BLAST® a SepsisTest™ BLAST.

6.2.5 Diagnostika mikrobiální invaze do amniální dutiny (MIAC)

MIAC byla stanovena na základě pozitivního PCR nálezu *Ureaplasma*, *Mycoplasma hominis*, *Chlamydia trachomatis* nebo kombinací těchto druhů nebo pozitivitou 16S rRNA genu.

6.2.6 Diagnóza IAI

IAI byla definována pro měření pomocí ELISA jako koncentrace IL-6 v plodové vodě ≥ 2600 pg/ml [102,103].

7 Výsledky

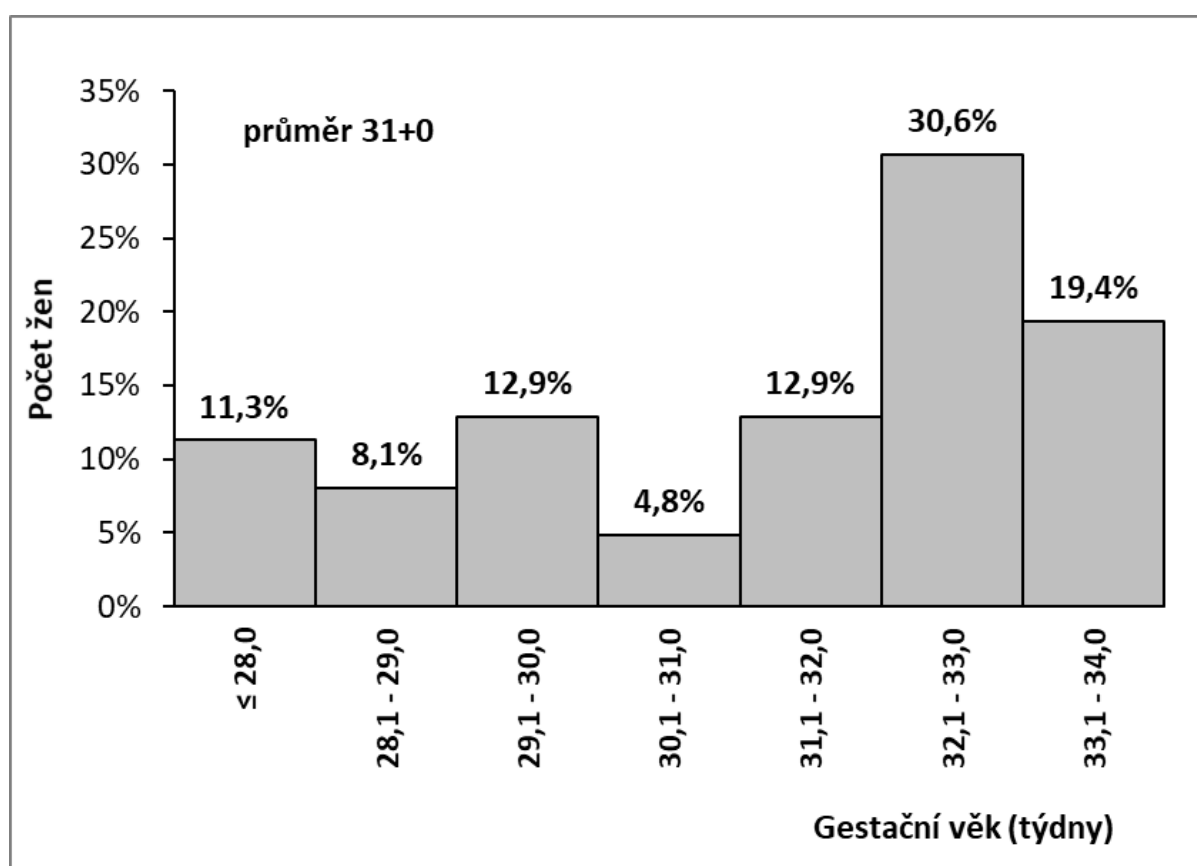
7.1 Hodnocení role IL-6 point-of-care testu v plodové vodě získané z amniocentéz u žen s pPROM mezi 24. a 34. týdnem těhotenství a management

Do studie bylo přijato celkem 62 žen ve věku 19 až 41 let. Průměrný věk žen byl 30,9 let. Průměrný gestační věk v době pPROM byl 31+0, medián 31+6, minimum 22+2 a maximum 34+0 (tab 1, obr. 5).

Tabulka 1. Základní charakteristiky žen s pPROM. Data v tabulce jsou prezentována jako počet (procento), resp. průměr \pm SD (směrodatná odchylka), nebo medián (minimum – maximum).

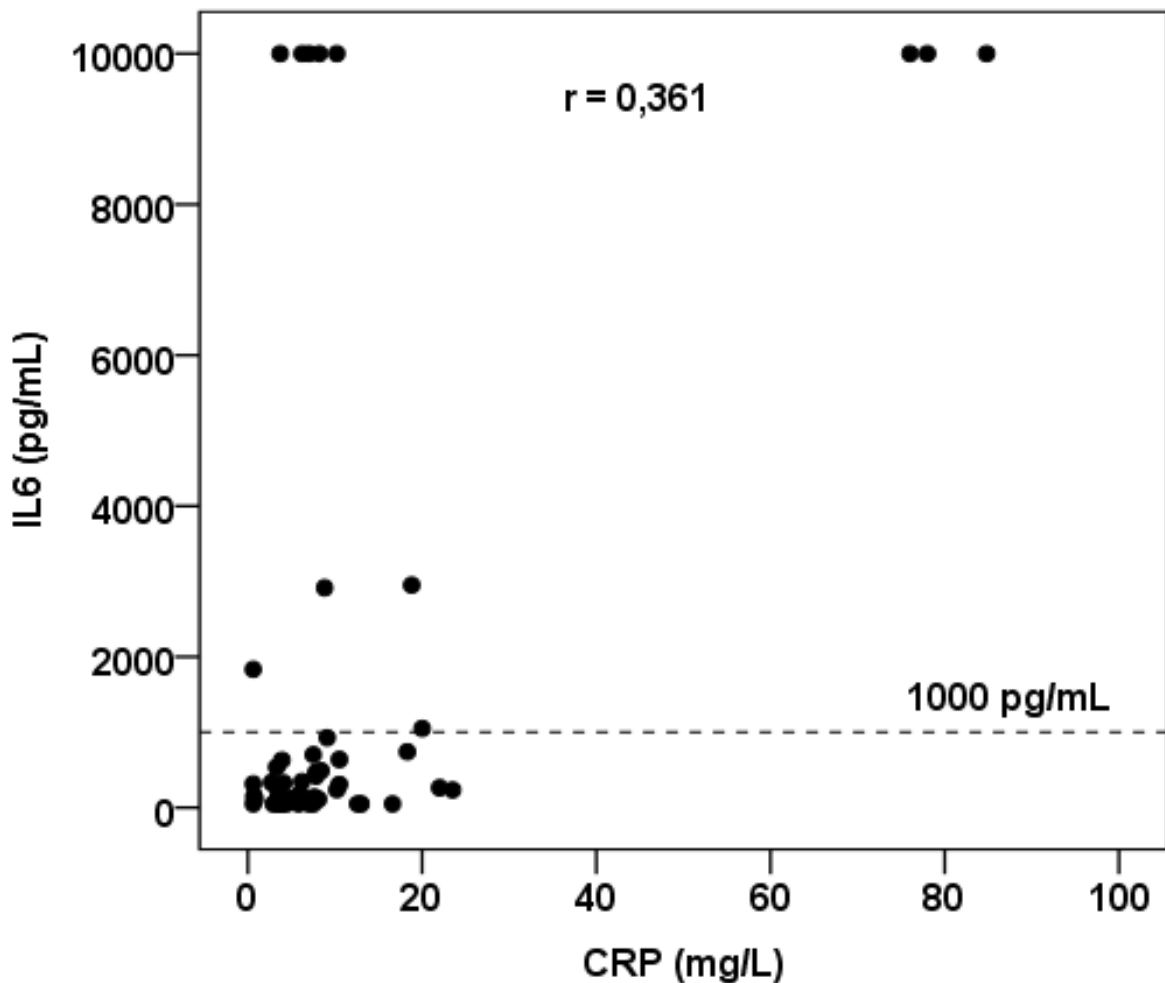
	CELKEM	IL-6 AMC pozitivní	IL-6 AMC negativní	p
Počet pacientek	62	12	50	-
Věk pacientek (roky) <i>průměr \pm SD (min-max)</i>	30,9 \pm 5,4 (19 - 41)	29,9 \pm 5,4 (22 - 39)	31,1 \pm 5,5 (19 - 41)	0,406
Kouření	12 (19,4%)	4 (33,3%)	8 (16,0%)	0,223
Parita				
0	4 (6,5%)	1 (8,3%)	3 (6,0%)	
1	34 (54,8%)	4 (33,3%)	30 (60,0%)	
2	16 (25,8%)	4 (33,3%)	12 (24,0%)	
3	5 (8,1%)	2 (16,7%)	3 (6,0%)	0,213
4	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
5	1 (1,6%)	0 (0%)	1 (2,0%)	
6	1 (1,6%)	0 (0%)	1 (2,0%)	
7	1 (1,6%)	1 (0%)	0 (0%)	
Gestační věk v době pPROM (týden+den) <i>průměr (min-max)</i>	31+0 (22+2 - 34+0)	29+4 (25+1 - 32+4)	31+3 (22+2 - 34+0)	0,009

Gestační věk v době porodu (týden+den) <i>průměr (min-max)</i>	32+1 (26+1 - 35+0)	30+1 (26+1 - 33+1)	32+4 (27+2 - 35+2)	0,001
Latence od pPROM do porodu (hodiny) <i>medián (min-max)</i>	112 (4 - 606)	55,9 (6 - 288)	118,5 (4 - 606)	0,042
Způsob porodu				
vaginální	41 (66,1%)	9 (75,0%)	31 (64,6%)	0,773
císařský řez	20 (32,3%)	3 (25,0%)	17 (35,4%)	
CRP <i>medián (min-max)</i>	6,2 (0,6 – 84,8)	9,5 (0,6 – 84,8)	5,8 (0,6 – 23,5)	0,012
WBC <i>medián (min-max)</i>	11,9 (6,9 – 24,0)	12,4 (7,0 – 24,0)	11,9, (6,9 – 21,5)	0,514



Obrázek 3. Distribuce žen podle gestačního věku v době pPROM.

Průměrný gestační věk při porodu byl 32+1, medián 32+4, minimum 26+1 a maximum 35+0. Střední hodnota doby od pPROM do porodu byla 112 hodin (4,7 dní), minimální délka latence byla 4 hodiny a maximální 606 h (25,3 dne). Hodnoty CRP u matky se pohybovaly od 0,6 do 84,8 mg/l s mediánem 6,2 mg/l. U 31 žen (49,2 %) byla hodnota CRP u matky nad 6 mg/l. Na hodnocení korelace mezi mateřským CRP a IL-6 point of care testem byla použita Spearmanova korelační analýza. To prokázalo významnou pozitivní korelaci mezi mateřským CRP a IL-6 point of care testem ($r=0,364$; $P=0,006$) (obr. 4).



Obrázek 4. Korelace mezi CRP a hladinou IL-6 u žen s pPROM.

Většina pacientek 41 (66,1 %) porodila vaginálně, císařský řez byl proveden u 20 (32,3 %) žen (tabulka 1). Negativní mikrobiální nález byl nalezen u 21 (33,9 %) a u 48 (77,4 %) vzorků z plodové vody a ze stěrů z děložního čípku byl nejvíce běžný mikrobiální nález *Ureaplasma spp.* přítomný u 20 (32,3 %) cervikálních stěrů a u 10 (16,1 %) ze vzorků z plodové

vody (tabulka 2 a 3). Medián intervalu léčby antibiotiky byl 3 dny (min-max: 1-9). U všech žen byla zahájena antibiotická terapie penicilinem G parenterálně (PNC), která byla následně upravena podle mikrobiálních výsledků. V 18 případech (28,6 %) byla podána makrolidová antibiotika. PNC samotný nebo v kombinaci s klarithromycinem byl podán 44 (71,0 %) a 11 (17,7 %) pacientům (Tabulka 4).

Tabulka 2. Mikroby identifikované ve stěrech z děložního čípku u žen s pPROM.

	CELKEM (n=62)	IL-6 AMC pozitivní (n=12)	IL-6 AMC negativní (n=50)	p
Mikrob				
Negativní nález	21 (33,9%)	3 (25,0%)	18 (36,0%)	0,735
<i>Ureaplasma spp.</i>	20 (32,3%)	5 (41,7%)	15 (30,0%)	0,500
<i>Escherichia coli</i>	10 (16,4%)	2 (16,7%)	10 (20,0%)	1,000
<i>Skupina B</i>	7 (11,3%)	1 (8,3%)	6 (12,0%)	1,000
<i>Streptococcus spp.</i>				
<i>Mycoplasma spp.</i>	7 (11,5%)	2 (16,7%)	5 (10,0%)	0,612
<i>Enterococcus spp.</i>	7 (11,3%)	1 (8,3%)	6 (12,0%)	1,000
<i>Klebsiella spp.</i>	2 (3,3%)	2 (16,7%)	0 (0%)	0,035
<i>Pseudomonas</i>	1 (1,6%)	0 (0%)	1 (2,0%)	1,000
<i>Kvasinky</i>	1 (1,6%)	0 (0%)	1 (2,0%)	1,000

Tabulka 3. Mikroby identifikované v plodové vodě z amniocentézy u žen s pPROM.

	CELKEM (n=62)	IL-6 AMC pozitivní (n=12)	IL-6 AMC negativní (n=50)	p
Mikrob	Počet případů			
<i>Negativní nález</i>	48 (78,7%)	5 (41,7%)	43 (87,8%)	0,002
<i>Ureaplasma spp,</i>	10 (16,4%)	6 (50,0%)	4 (8,2%)	0,002
<i>Skupina B</i>	1 (1,6%)	1 (8,3%)	0 (0%)	0,197
<i>Streptococcus spp,</i>				
<i>Peptostreptococcus</i>	1 (1,6%)	0 (0%)	1 (2,0%)	1,000
<i>Lactobacillus</i>	1 (1,6%)	0 (0%)	1 (2,0%)	1,000
<i>Klebsiella spp,</i>	1 (1,6%)	0 (0%)	1 (2,0%)	1,000
<i>Citrobacter</i>	1 (1,6%)	0 (0%)	1 (2,0%)	1,000
<i>Mycoplasma</i>	1 (1,6%)	1 (8,3%)	0 (0%)	0,197
<i>Haemophilus</i>	1 (1,6%)	0 (0%)	1 (2,0%)	1,000

Tabulka 4. Antibiotická léčba u žen s pPROM.

	CELKEM (n=62)	IL-6 AMC pozitivní (n=12)	IL-6 AMC negativní (n=50)	p
Antibiotika	Počet případů			
PNC	44 (71,0%)	7 (58,3%)	37 (74,0%)	0,305
PNC + Clarithromycin	11 (17,7%)	2 (16,7%)	9 (18,0%)	1,000
PNC + Azithromycin	2 (3,2%)	0 (0%)	2 (4,0%)	1,000
Clindamycin	2 (3,2%)	2 (16,7%)	0 (0%)	0,035
Clarithromycin	1 (1,6%)	0 (0%)	1 (2,0%)	1,000
Ampicillin a Sulbactam + Azithromycin	1 (1,6%)	0 (0%)	1 (2,0%)	1,000
Amoxicillin + Clavulanic Acid + Azithromycin	1 (1,6%)	1 (8,3%)	0 (0%)	0,194

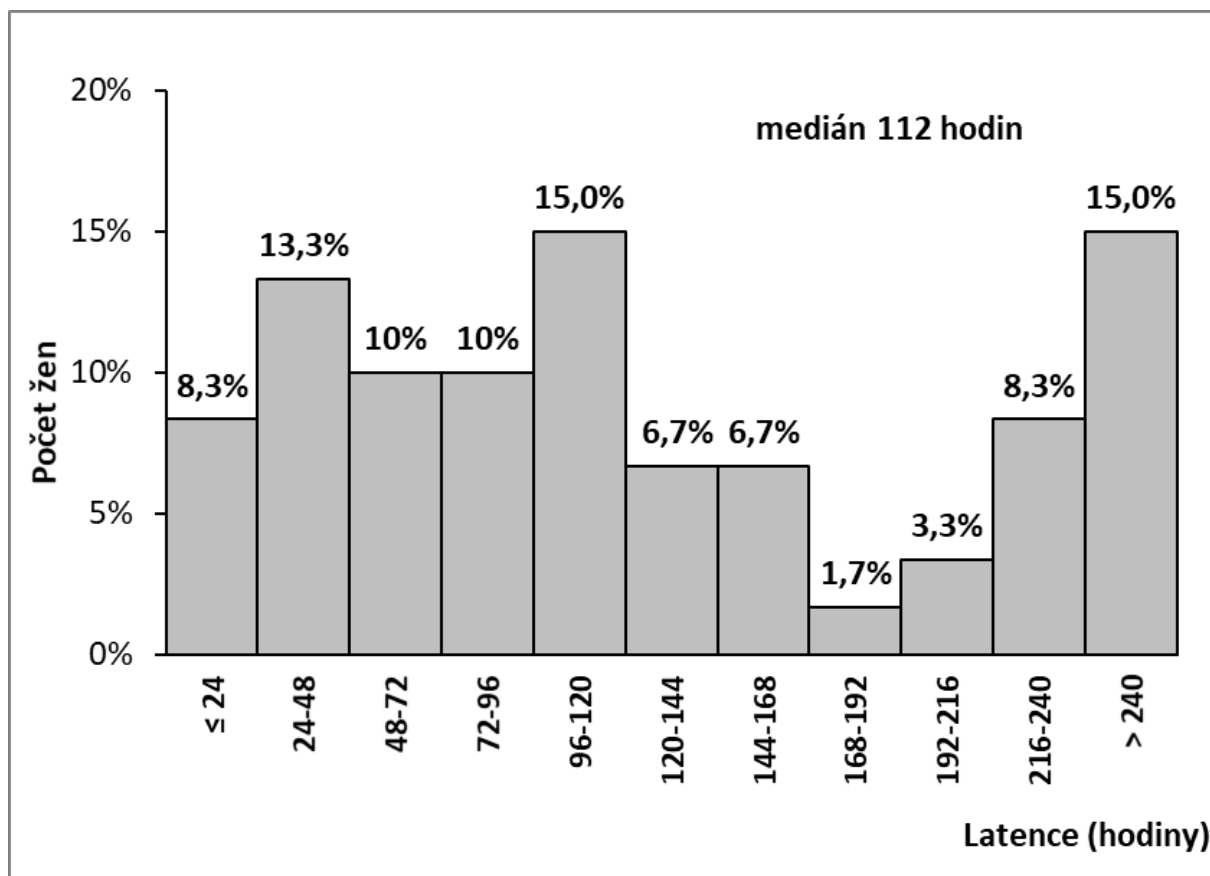
Tabulka 5. Histopatologie placenty u žen s pPROM.

Histologický nále	CELKEM	IL-6 AMC	IL-6 AMC	p
	(n=62)	pozitivní (n=12)	negativní (n=50)	
Akutní zánět	20 (35,7%)	8 (72,7%)	12 (26,7%)	0,011
Hnisavý zánět	7 (12,5%)	2 (18,2%)	5 (11,1%)	0,614
Chronický zánět	3 (5,4%)	0 (0%)	3 (5,4%)	1,000
Bez zánětu	36 (64,3%)	3 (27,3%)	33 (73,3%)	0,011

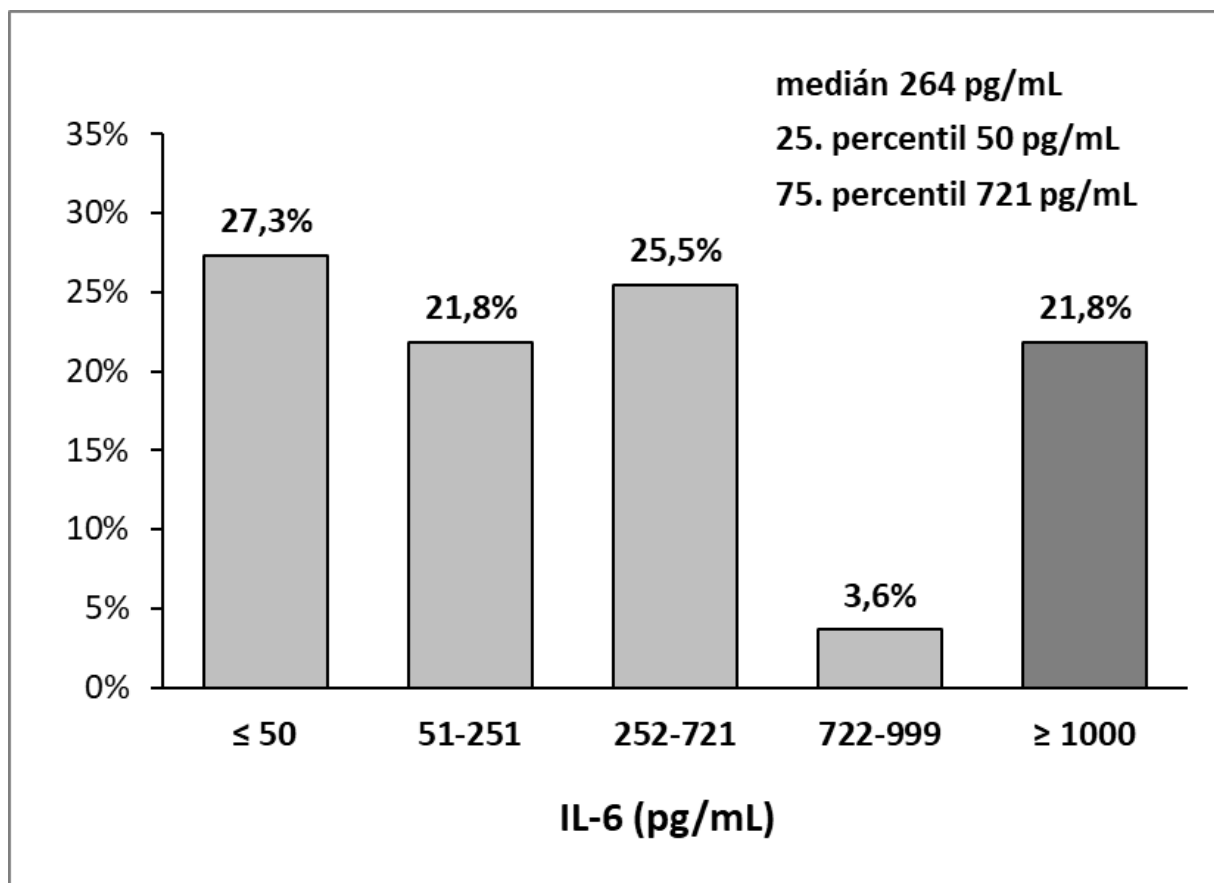
Známky akutní nebo chronické chorioamnionitidy se objevily u 16 (25,8 %) a 3 (4,8 %) pacientů (Tabulka 3).

Střední hodnota IL-6 point of care testu (IL-6 AMC) z amniocentézy byla 264 pg/ml (min-max: 50-10 000) (obr. 6).

Hodnoty nad 1000 pg/ml (pozitivní IL-6 AMC) z IL-6 point of care testu byly nalezeny u 12 žen (19,4 %). Průměrný věk žen byl 29,9 let (min-max: 22-39). Průměrný gestační věk při pPROM byl 29+4, medián 29+5, minimálně 25+1 a maximálně 32+4. Průměrný gestační věk při narození byl 30+1, medián 29+6, minimum 26+1 a maximum 33+1. Medián intervalu od pPROM do porodu byl 56 h (min-max: 6,4-288) (tabulka 1). Hodnoty z IL-6 point of care testu pod 1 000 pg/ml (negativní IL-6 AMC) byly zjištěny u 50 žen (80,6 %). Nižší gestační věk v době pPROM (P=0,009), nižší gestační věk v době porodu (P=0,001) a kratší doba latence od pPROM do porodu (P=0,042) byly prokázány u žen s pozitivitou IL-6 z AMC. Hodnoty CRP z krve matky u žen s hodnotou IL-6 point of care testu > 1 000 pg/ml se pohybovala od 0,6 do 85 mg/l s mediánem 9,5 mg/l. U 10 žen (83,3 %) bylo mateřské CRP nad 6 mg/l. Hodnoty CRP u matky byly nižší (medián 5,8; rozmezí 0,6 – 23,5) ve skupině s IL-6 negativní AMC (P=0,012), zatímco počet leukocytů se mezi oběma skupinami nelišil. Ze stěrů z děložního čípku byla pozorována přítomnost Klebsielly spp. u žen s pozitivitou IL-6 AMC (16,7 %), zatímco negativita (0 %) byla zjištěna u pacientů s IL-6 point of care testem pod 1000 pg/ml, P=0,035. Přítomnost Ureplasma spp. v plodové vodě byla vyšší u pacientů s pozitivitou IL-6 AMC (50,0 %) ve srovnání se ženami s negativitou IL-6 AMC (8,2 %), P=0,002. Přítomnost dalších mikrobů se významně nelišila mezi skupinami (tabulka 3). Věk, kouření, parita a způsob porodu se nelišil mezi skupinami žen s negativní nebo pozitivní IL-6 AMC (tabulka 1, obr. 6).



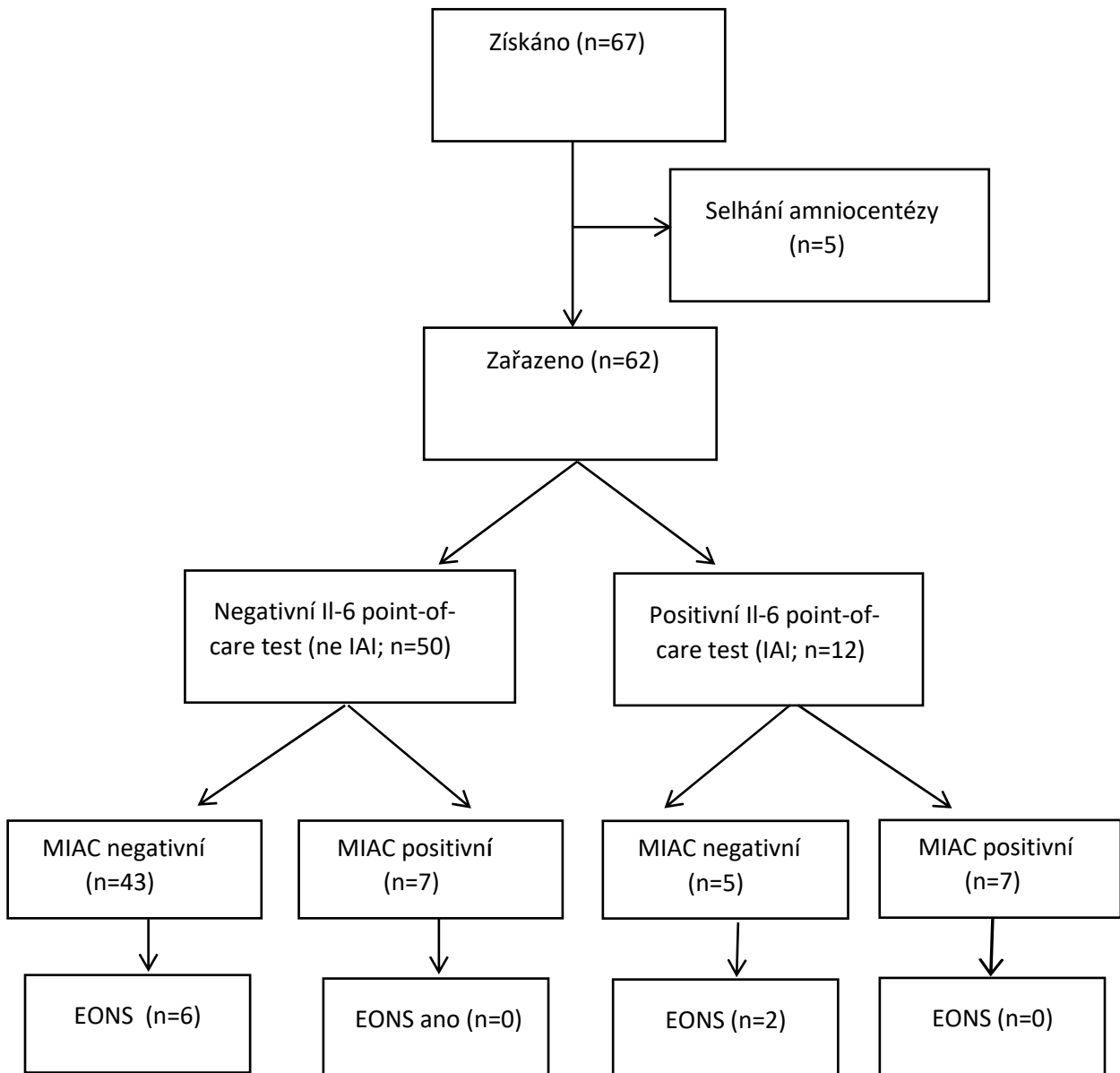
Obrázek 5. Distribuce doby latence od pPROM do porodu.



Obrázek 6. Distribuce hladiny IL-6 u žen s pPROM.

Akutní chorioamnionitida byla nalezena častěji u žen s pozitivitou IL-6 AMC ve srovnání s podskupinou žen s negativitou IL-6 AMC (66,8 % vs. 16,0 %), $P=0,011$. Chronická chorioamnionitida nebo placenty bez známek zánětu byly nalezeny častěji u žen s negativitou IL-6 AMC ($P=0,011$) (tabulka 7).

Časná novorozenecká sepe byla diagnostikována u 8 novorozenců (12,7 %)



Obrázek 7. Časná novorozenecká sepe

U 4 z 8 novorozenců byly prokázány placentární známky akutní chorioamnionitidy a ve 3 případech byla histopatologie placenty negativní. V 1 případě nebyla histologie placenty provedena. Tento pacient byl zaznamenán jako IL-6 AMC negativní, s negativním mikrobiálním nálezem z plodové vody a CRP matky s hodnotou 8,1 mg/l. Porodila ve 34+3 týdnů těhotenství s pozitivním mikrobiálním nálezem ze stěru z děložního čípku (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosae*) V jednom z 8 případů (z IL-6 AMC pozitivní podskupiny) novorozenec po šesti dnech latence zemřel (7 den po porodu; 26+1, 700 g) z důvodu nedonošenosti (syndrom respirační tísně). V tomto případě měla placenta známky akutní purulentní chorioamnionitidy. Pozdní novorozenecká seps byla pozorována u 2 novorozenců (3,2 %) (obr. 7). V jednom případě porodila žena IL-6 AMC z pozitivní podskupiny ve 26+1 (850 g) týdnů těhotenství, ve druhém případě v IL-6 AMC z negativní podskupiny porodila ve 27+2 (1025 g) týdnů. V obou případech byla histologie placenty negativní.

7.2 Výsledky měření interleukinu-6 pomocí automatizované elektrochemiluminiscenční imunoanalytické metody a ELISA pro identifikaci intraamniálního zánětu po pPROM ve spolupráci s Fakultní nemocnicí Hradec Králové

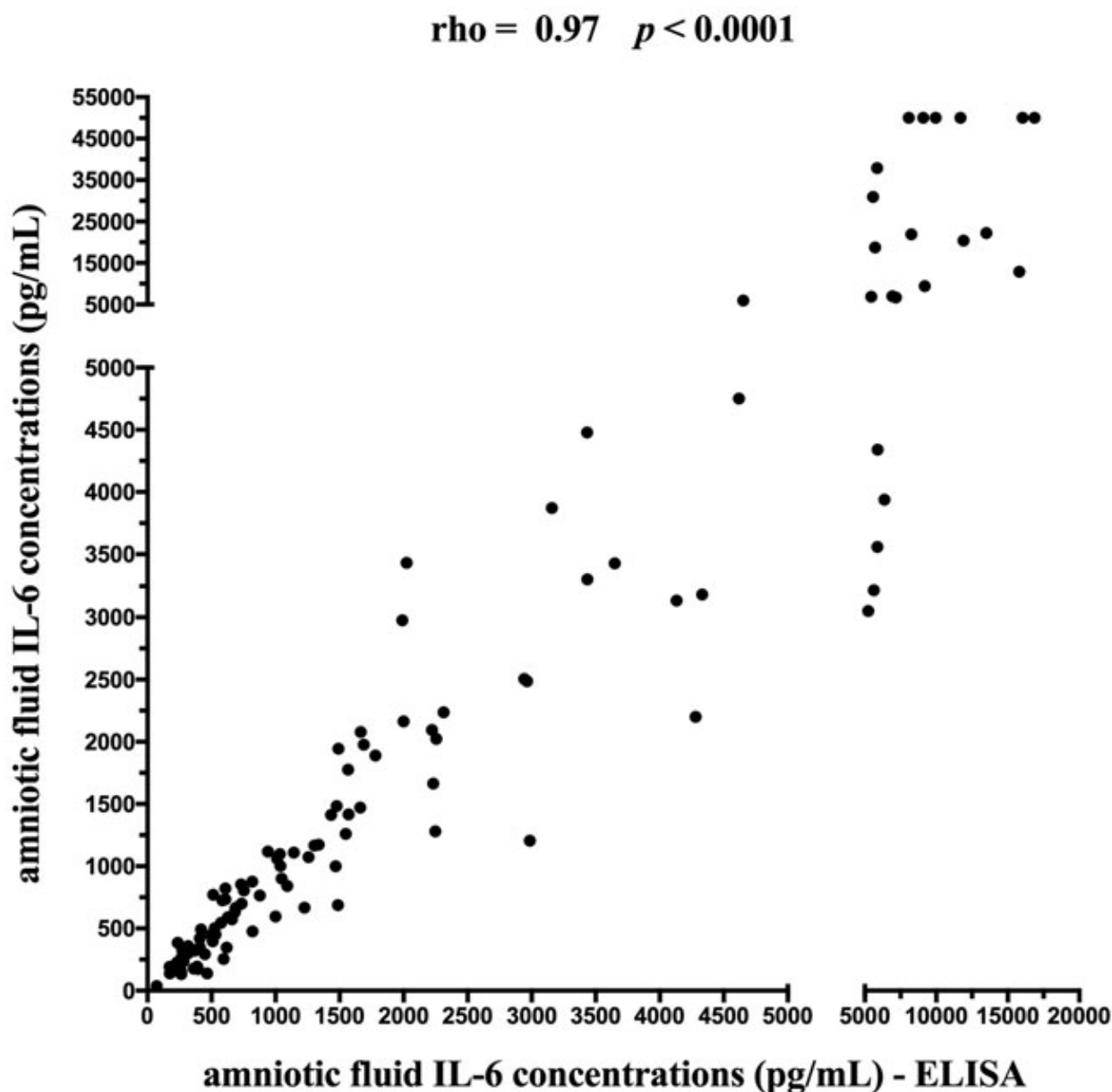
Do studie bylo zařazeno celkem 121 žen s jednočetným těhotenstvím komplikovaných pPROM v gestačních týdnech mezi 24 + 0 a 36 + 6; 87 žen bylo z Fakultní nemocnice Hradec Králové a 34 žen bylo z Fakultní nemocnice Olomouc. Jedna žena byla ze studie vyloučena kvůli selhání metody měření koncentrace IL-6 v plodové vodě pomocí automatizovaného elektrochemiluminiscenčního imunotestu (nenapipetování vzorku analyzátozem). Nakonec bylo zařazeno do studie 120 žen. Přítomnost MIAC a IAI byla identifikována u 31 % (37/120) a 28 % (34/120) z žen. Demografické a klinické údaje jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6. Charakteristiky matek a novorozenců u těhotenství komplikovaných předčasným odtokem plodové vody podle přítomnosti či nepřítomnosti intraamniálního zánětu

Charakteristika	S IAI (n = 34)	Bez IAI (n = 86)	p value
Věk matky [median (IQR)]	30 (26–33)	31 (26–34)	.41
Primipary [(%)]	17 (50 %)	53 (62%)	.31
Těhotenský body mass index [kg/m ² , median (IQR)]	24 (21–27)	24 (22–27)	.71
Kouření [(%)]	10 (29%)	13 (15%)	.12
Gestační věk při přijetí [týdny, median (IQR)]	30+1 (28+3 - 32+4)	33+4 (32+0 - 34+6)	<.0001
Gestační věk v době porodu [týdny, median (IQR)]	31+0 (29+1 - 33+5)	33+5 (32+3 - 35+0)	<.0001
Microbiální invaze do amniální dutiny [(%)]	24 (71%)	13 (15%)	<.0001
Hodnota CRP při přijetí [mg/L, median (IQR)]	6.3 (3.3– 19.6)	5.2 (2.7– 8.7)	.13
Počet WBC při přijetí [10 ⁹ L, median (IQR)]	11.2 (9.9–14.2)	12.3 (10.7–14.9)	.14

Podávání antibiotik [(%)]	34 (100 %)	86 (100 %)	-
Podávání kortikosteroidů [number (%)]	30 (88 %)	60 (70 %)	.21
Spontánní porod [(%)]	21 (62 %)	59 (70 %)	.66
Klešťový porod [(%)]	13 (38 %)	26 (31 %)	.40
Císařský řez [(%)]	0 (0 %)	1 (1 %)	1.00
Porodní váha [grams, median (IQR)]	1535 (1238– 1995)	2115 (1848– 2509)	<.0001
Apgar score <7; 5 minutes [(%)]	4 (12 %)	3 (3 %)	.09
Apgar score <7; 10 minutes [(%)]	2 (6 %)	2 (2 %)	.32

Spojité proměnné byly porovnány pomocí neparametrického Mann–Whitneyho U-testu. Kategorické proměnné byly porovnány pomocí chi-square testu. Spojité proměnné jsou prezentovány jako medián (interkvartilní rozmezí [IQR]) a kategorické jako číslo (%). CRP: C-reaktivní protein; WBC: leukocyty; IAI: intraamniální zánět; IQR: interkvartilní rozmezí.

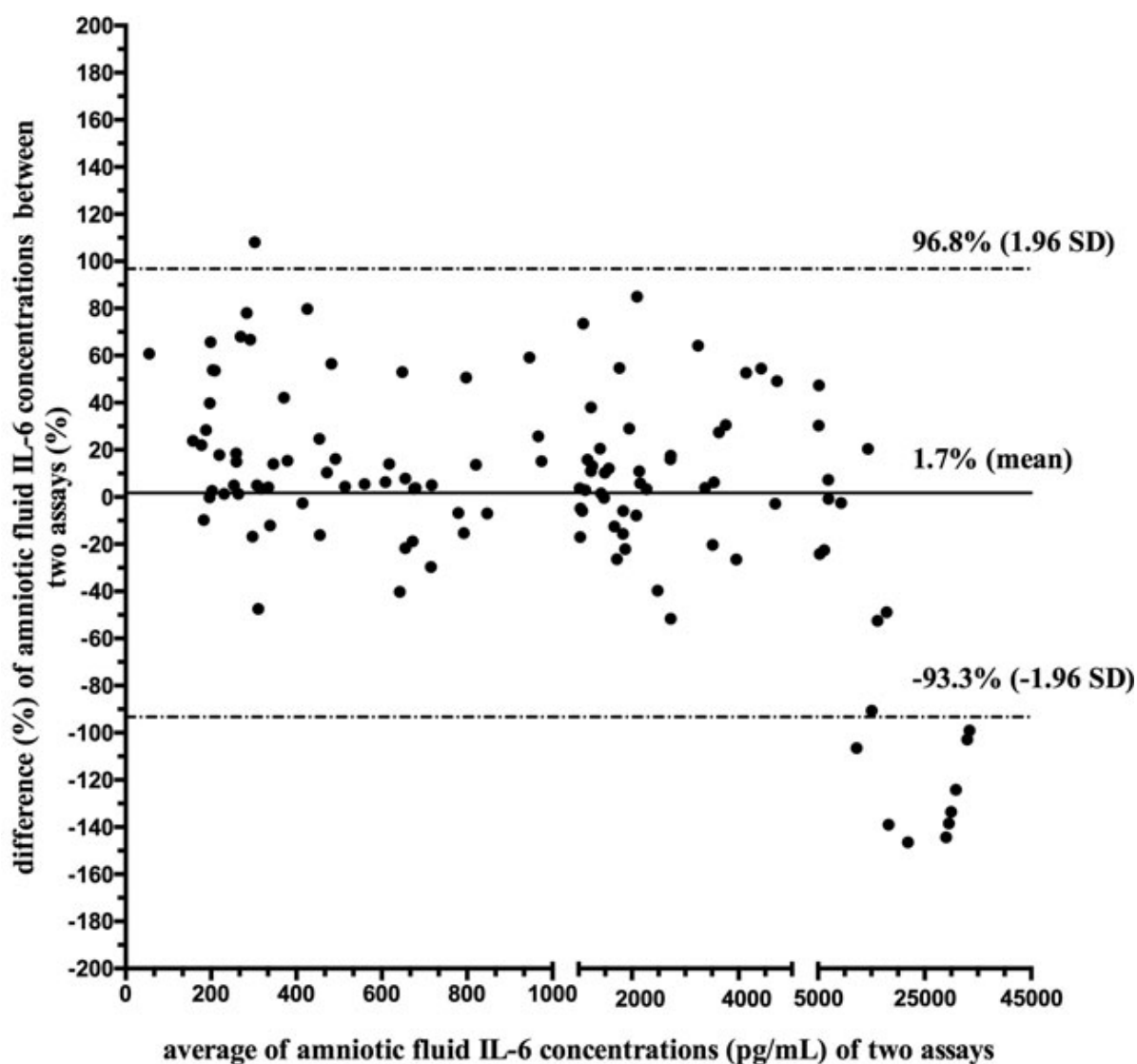


Obrázek 8. Korelace mezi koncentrací IL-6 v plodové vodě měřené pomocí automatizované elektrochemiluminiscenční imunoanalytické metody a ELISY.

Mikrobiální nálezy v plodové vodě byly následující: *Ureaplasma species* + *M. hominis* (n = 2), druhy *Ureaplasma* + druhy *Streptococcus* (n = 1), *Ureaplasma species* + *C. trachomatis* (n = 1), *Ureaplasma species* (n = 20), *Haemophilus influenzae* (n = 4), *Lactobacillus crispatus* (n = 2), *Streptococcus species* (n = 1), *Gardnerella vaginalis* (n = 1), *C. trachomatis* (n = 1), *M. hominis*

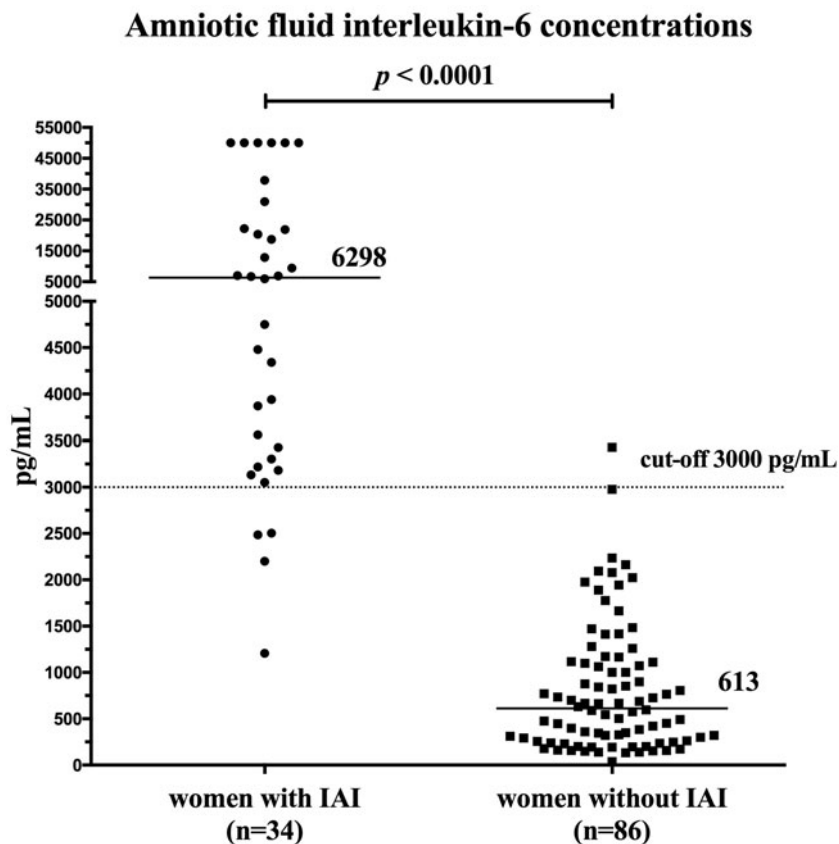
(n = 1), Anaerococcus tetradius (n = 1), Lactobacillus jenseni (n = 1) a Lactobacillus iners (n = 1).

Všechny vzorky měly koncentrace IL-6 nad nejnižším detekčním limitem pro oba testy. Byla zjištěna silná korelace mezi naměřenými koncentracemi IL-6 v plodové vodě za použití automatizované elektrochemiluminiscenční imunoanalytické metody a ELISOU (ρ , 0,97; $p < 0,0001$; obr. 8). Dále byl vytvořen Bland-Altmanův graf, který srovnává koncentrace IL-6 v plodové vodě měřené pomocí metody automatizované elektrochemiluminiscenční imunoanalýzy a ELISY (obr. 9).

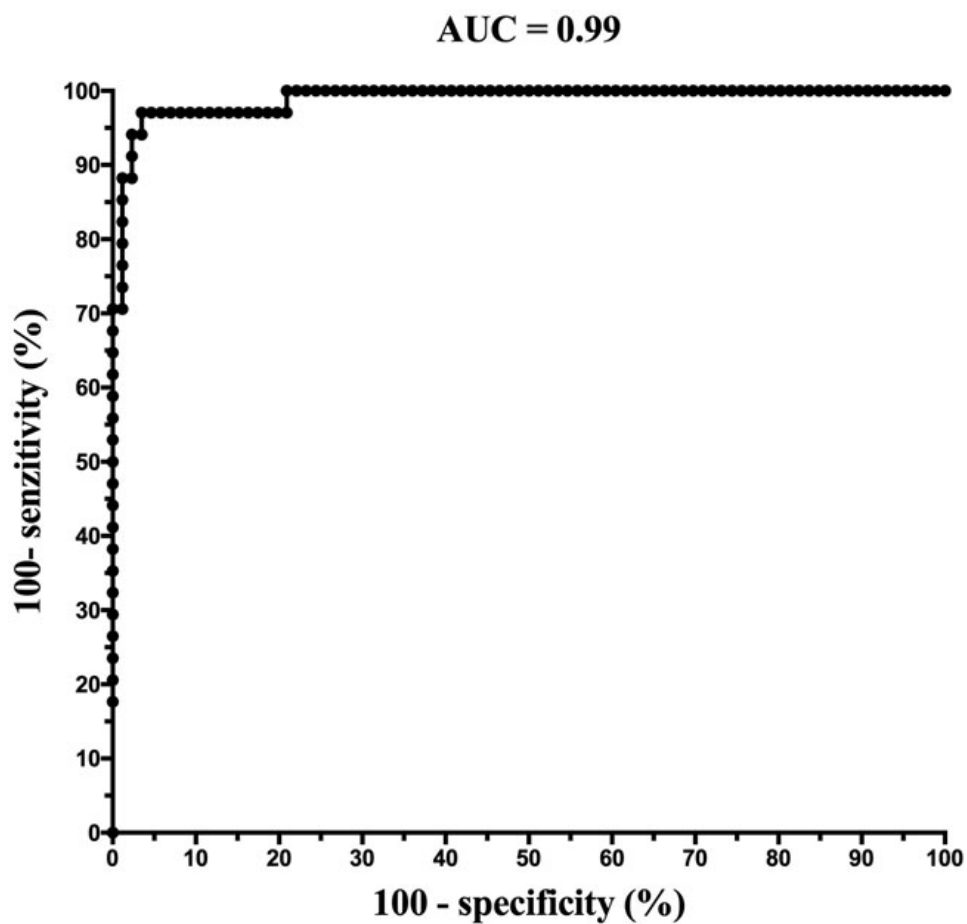


Obrázek 9. Bland-Altmanův graf: srovnání koncentrace interleukinu-6 v plodové vodě měřené pomocí metody automatizované elektrochemiluminiscenční imunoanalýzy a ELISY.

Koncentrace IL-6 v plodové vodě byly měřeny pomocí automatizované elektrochemiluminiscenční imunoanalýzy a byly vyšší u žen s IAI než u žen bez IAI (s IAI: medián, 6298 pg/ml; IQR, 3283-24401 vs. bez IAI: medián, 613 pg/ml; IQR, 261-1112; $p < 0,0001$; Obrázek 8). Na základě ROC křivky pro identifikaci IAI (plocha pod ROC křivkou = 0,99; 95% interval spolehlivosti [CI], 0,97-1,0; Obr. 9), hraniční hodnota ≥ 3000 pg/ml byla vybrána pro metodu automatizovaného elektrochemiluminiscenčního imunotestu s senzitivitou 88 % (30/35; 95 % CI, 73-97), specificitou 99 % (85/86; 95 % CI, 94-100), pozitivní prediktivní hodnotou 97 % (30/31; 95 % CI, 83-100), negativní prediktivní hodnotou 96 % (85/89; 95 % CI, 89-99) a poměrem pravděpodobnosti 76 (95 % CI, 11-534) (tabulka 7).



Obrázek 10. Koncentrace IL-6 v plodové vodě měřené pomocí automatizované elektrochemiluminiscenční metody mezi ženami s nebo bez intramaniálního zánětu. (koncentrace IL-6 v plodové vodě ≥ 2600 pg/mL stanovené pomocí metody ELISA).



Obrázek 11. Identifikace intraamniálního zánětu (stanoveno metodou ELISA s koncentrací IL-6 v plodové vodě ≥ 2600 pg/ml).

Tabulka 7. Diagnostika IL-6 z plodové vody pomocí automatizované elektrochemiluminiscenční imunoanalytické metody a ELISY k identifikaci intraamniálního zánětu a mikrobiální invaze do amniální dutiny.

		Automatizovaná metoda IL-6 (cut-off 3000 pg/ml)	ELISA IL- 6 (cut-off 2600pg/ml)		
Výsledky	Diagnostika	% (n)	95% CI	% (n)	95% CI
Intraamniální zánět (28% (34/100))	Senzitivita	88 % (30/34)	73- 97%		
	Specifická	99 % (85/86)	94- 100%		
	Pozitivní prediktivní hodnota	97 % (30/31)	83- 100%		
	Negativní prediktivní hodnota	96 % (85/89)	89- 99%		
	Pozitivní likelihood ratio	76 (88.2/1.2)	11-534		
	Negativní likelihood ratio	0.1 (11.2/98.8)	0.05- 0.30		
	Mikrobiální invaze do amniální dutiny	Senzitivita	62 % (23/37)	45- 78%	65% (24/37)

zjištěná
nekultivačními
metodami [31 %
(37/120)]

Specificita	90 % (75/83)	90% (75/89)	88% (73/83)	79- 80%
Pozitivní prediktivní hodnota	74 % (23/31)	55- 88%	71% (24/34)	53- 85%
Negativní prediktivní hodnota	84 % (75/89)	75- 91%	85% (73/86)	76- 92%
Pozitivní likelihood ratio	6.4 (62.2/9.4)	3.2-6.1	5.4 (64.9/13.1)	2.9- 10.1
Negativní likelihood ratio	0.4 (37.8/90.4)	0.3-0.6	0.4 (37.8/90.4)	0.3- 0.6

CI: interval spolehlivosti, IL: interleukin

8 Diskuze

Ke snížení mateřských a neonatálních infekcí a morbiditě závislé na gestačním věku u expektačního managementu se doporučuje 7denní léčebný cyklus s kombinací intravenózního ampicilinu a erythromycinu s následným perorálním podáním amoxicilinu a erythromycinu po předčasném odtoku plodové vody u žen, které jsou méně než 34+0 týdnů těhotenství [104,105]. neexistují však jednoznačná doporučení, jak často a pomocí jakých parametrů by se měl provádět expektační management. V této prospektivní studii jsme zařadili opakovanou transabdominální amniocentézu do expektačního managementu žen s pPROM, abychom byli schopni přesněji vyhodnotit riziko MIAC a následné HCA. Hodnocení IL-6 z plodové vody je jedním z nejvýznamnějších přístupů při hodnocení systémové zánětlivé odpovědi a její intenzity u žen s pPROM.

Na našem pracovišti jsme používali pro hodnocení IL-6 z plodové vody především point-of-care test. Naši práci jsme rozšířili v rámci spolupráce s Fakultní nemocnicí Hradec Králové, kde jsme srovnávali stanovení koncentrací IL-6 v plodové vodě pomocí automatizované elektrochemiluminiscenční imunoanalytické metody s metodou ELISA na vybraném souboru pacientek. Pro jednotlivé metody jsme stanovili cut-off hodnoty v souvislosti s možností využití těchto metod pro management pPROM.

8.1 Intraamniální IL-6

V naší studii jsme zaznamenali 12 (19,4 %) (tabulka 1) případů pPROM IL-6 pozitivních se stanovenou cut-off hodnotou >1000 pg/ml. V minulých letech byly ověřovány hodnoty koncentrace IL-6 z plodové vody k identifikaci IAI u žen s pPROM. V roce 1993 Romero a spol. stanovili hranici koncentrace IL-6 z plodové vody na hodnotu 7,9 ng/mL u žen s pPROM se senzitivitou 81 %, specificitou 75 %, pozitivní prediktivní hodnotou 67 % a negativní prediktivní hodnotou 86 % [66]. Musilová a kol. pomocí point-of-care testu, stejného detekčního systému jako naše skupina pozorovala přítomnost mikrobiálně asociované IAI (jak IAI, tak MIAC) u 21 % (34/166) žen. Pokud by byla rozšířena diagnostika IAI zahrnovala by jak pozitivitu IL-6, tak neutrofilní infiltraci amnia (histologická amnionitida), pak podíl žen s IAI by byl 23 % [106]. Tyto údaje korelují s našimi výsledky, i když o něco vyšší podíl IAI byl zjištěn ve skupině Musilové et al., což lze vysvětlit jejich nižší cut-off hodnotou pro IL-6 (745 pg/ml).

8.2 CRP z krve matky

V podskupině pacientů s pozitivitou IL-6 z AMC jsme zjistili vyšší hladiny CRP z krve matky ve srovnání s negativitou IL-6 z AMC. CRP z krve matky byl navržen jako marker infekce a zánětu u několika onemocnění [107]. S MIAC a HCA, CRP vykazovalo slabou a rozporuplnou asociaci. Systematická studie od Martineze a kol. dospěla k závěru, že neexistují žádné důkazy na podporu využití CRP jako nástroje pro predikci HCA. Byly zjištěny významné rozdíly při srovnávání hladin CRP mezi ženami s nebo bez MIAC po pPROM [108,109]. Stepan a kol. v jejich studii zjistili, že pouze extrémní cut-off hodnoty CRP, reprezentované 95. percentilem, předpovídaly přítomnost MIAC a HCA pod 32. týdnem těhotenství. Nízká citlivost však omezuje klinickou využitelnost této detekční metody. V našich datech jsme také zjistili velmi nízkou korelaci mezi IL-6 point-of-care testem a hladinou mateřského CRP (obr. 4).

8.3 Leukocyty

V naší studii nebyl žádný rozdíl v počtu leukocytů mezi pozitivní a negativní podskupinou IL-6 z AMC. Pro predikci MIAC, histologické nebo klinické chorioamnionitidy a neonatální infekce byly navrženy různé cut-off hodnoty počtu leukocytů u matky [110,111]. Žádná z těchto hodnot však neměla dobrý prediktivní význam. Musilová a kol. stanovili hranici počtu leukocytů u matky na $14,0 \times 10^9/L$, která měla dobrou negativní prediktivní hodnotu, ale špatnou pozitivní prediktivní hodnotu a poměr pravděpodobnosti. Naše data jsou v souladu s jejich závěrem a tím se zabrání použití cut-off hodnoty počtu WBC ke klinickému testování [95].

8.4 Mikrobiální nálezy v cervikálních kulturách

Ureaplasma species byla detekována v kulturách děložního čípku ve 20 (32,3 %) případech a v 10 (16,1 %) vzorcích z plodové vody a byl to nejčastější mikrobiální patogen v naší sledované skupině (tabulka 2). Ureaplasma spp. jsou považované za součást normální genitální flóry a jejich průměrná míra kolonizace je 40-80 % [112]. Ve studii Gupta a kol. zjistili přítomnost Ureaplasma urealyticum v dolním genitálním traktu u 32 % neplodných žen [113].

Podle nedávno publikovaných studií se však *U. urealyticum*, *U. parvum* a *Mycoplasma hominis*, která se nejčastěji spojuje se spontánními PTL a PROM a izoluje se z plodové vody, v případech histologické a klinické chorioamnionitidy z placenty [114,115]. Kacerovský a kol. zjistili, že *Ureaplasma* spp. se vyskytuje u 21 % žen s pPROM [96]. Nověji Pavlidis et al. použil myší model k ukázce jak je spojena ascendentní infekce *Ureaplasma parvum* s předčasným porodem. Studie uvádí nárůst předčasných porodů z 13 % na 28 % po vaginální kolonizaci *Ureaplasma* a upregulací prozánětlivými cytokiny, což je v souladu s klinickou odpovědí člověka [116]. Naše data jsou tedy v souladu s aktuální literaturou zobrazující *Ureaplasma* spp. jako jeden z nejběžnějších mikrobů v ženském genitálním traktu, který je spojen s nežádoucími účinky na těhotenství, jako je předčasný porod, mrtvorozenost, histologická chorioamnionitida a neonatální morbidita.

8.5 Antibiotická léčba

Nejběžnější antibiotický režim používaný v naší studii byl parenterální PNC, který byl podáván samostatně u 71,0 % pacientů, následně kombinace PNC s Klarithromycin, který byl podán v 17,7 % případů (tabulka 4). Praxe podávání antibiotik pacientům s předčasným PROM je založena na výsledcích mnoha randomizovaných klinických studií, velkých systematických přehledů a metaanalýz [117,118,119]. Je prokázáno, že antimikrobiální látky prodlužují dobu latence, mohou zmírnit neonatální infekci a zmírnit respirační morbiditu novorozenců [119,120]. U těhotných po pPROM bylo použito několik antibiotických režimů, včetně ampicilinu, amoxicillin-klavulanátu, penicilinu, erythromycinu, mezlocilinu, piperacilinu, cefexinu, cefizoxu, gentamicinu, klindamycinu, azithromycinu a různé kombinace⁴⁴. Současné doporučení v České republice zahrnuje podání intravenózního PNC G [97]. Penicilin však není účinný v léčbě pPROM [119]. Proto jsme upravili parenterální antibiotickou terapii podle mikroorganismů izolovaných z plodové vody. Gomez a kol. sledoval 46 pacientek s předčasným PROM, kterým byla provedena amniocentéza mezi 18.–32. týdnem. V jejich studii byla prevalence intraamniálního zánětu po první amniocentéze 39 %, sedm pacientek mělo pozitivní bakteriální kultivaci z plodové vody [121]. Nicméně, po následující amniocentéze, šest z těchto sedmi pacientek mělo stále pozitivní kultivaci z plodové vody i přes podání antibiotik. Autoři předpokládali, že ačkoli je celkový efekt podávání antibiotik u pacientů s předčasným PROM krátkodobě prospěšný, existuje podskupina plodů, které budou vystaveny chronickému intrauterinnímu zánětlivému procesu.

8.6 Sériový intraamniální zánět

V naší studii jsme nepozorovali žádné pacientky s pozitivní mikrobiální kultivací z plodové vody, které podstoupili sériovou amniocentézu. Nicméně ve třech z těchto deseti případů byl IL-6 z AMC pozitivní. Intenzita intraamniální zánětlivé odpovědi se postupně zvyšuje s vrozenou obranou imunitou, která je aktivována přítomností bakterií buď v plodové vodě nebo ve fetální membráně. Nicméně se ukazuje, že intraamniální zánět je vyvolán nejen aktivací vzoru rozpoznávajícího receptory, které detekují specifické modely na povrchu bakterií nazývané molekulární vzor asociovaný s patogeny (PAMS), ale také endogenní molekuly, které signalizují poškození tkání a buněk tzv. „alarminy“ [122,123].

Aktivované imunokompetentní buňky produkují široké spektrum zánětlivých mediátorů a chemokinů zodpovědných za migraci neutrofilů, makrofágů a dalších imunitních buněk do placenty a fetální membrány [124]. To by mohlo vysvětlovat zvýšené hladiny IL-6 z AMC u našich pacientek s negativními mikrobiálními výsledky ve vzorcích z plodové vody ze sériové amniocentézy.

8.7 Chorioamnionitida a časná novorozenecká sepe

Histologická chorioamnionitida komplikuje téměř polovinu všech případů pPROM, ke kterým došlo před 34. týdnem těhotenství [125]. V naší studii byl u 26 (41,9 %) (tabulka 5) z 62 žen diagnostikován histopatologický znak chorioamnionitidy, který koreluje s publikovanými údaji. Chorioamnionitida po pPROM je spojena s vyšším rizikem časně novorozenecké sepse (EONS) (10,0 % vs. 2,8 %; aOR 3,102; 95 % CI 2,306–4,173; P <0,001) [126]. Placentární známky akutní chorioamnionitidy jsme našli u 4 (6,3 %) z 8 případů novorozenců diagnostikovaných s časnou novorozeneckou sepsí (tabulka 5). Walker a kol. zjistili, že pouze 33 % dětí nebylo porozených po jednom týdnu po pPROM [127]. V tomto ohledu bylo zjištěno, že novorozenci s delší dobou latence zemřou s vyšší pravděpodobností ve srovnání s kontrolami odpovídajícího věku. Nicméně, Test a kol. nenalezli žádnou korelaci mezi prodlouženým obdobím latence (více než 72 h) a zvýšenou novorozeneckou úmrtností [128]. V naší studii se doba latence pohybovala od 4 do 606 hodin a novorozenecká mortalita byla zjištěna v 1,6 % případů z důvodu nedonošenosti (obr. 4). K fetálním ztrátám docházelo spíše při ranném gestačním stáří po pPROM. V jedné skupině případů pPROM došlo ke všem úmrtím v době kratší než 30 týdnů. Intrauterinní fetální úmrtnost (FDIU) byla hlášena 0,9 %,

zatímco novorozenecká úmrtnost byla hlášena 5 % [129]. Baser et al. zjistili, že míra FDIU je 1,5 %. Všechny případy byly méně než 29 týdnů. Novorozenecká úmrtnost byla 1,9 % a byla spojena s nedonošeností [130]. Některé studie zjistily, že chorioamnionitida byla spojena s novorozeneckou sepsí, nicméně tato studie nenalezla žádnou asociaci [131,132].

8.8 Analytické metody pro hodnocení IL-6

IL-6 z plodové vody patří v současnosti mezi markery IAI používané v klinické praxi především díky dostupnosti testu v místě péče a jeho nadřazenosti nad klasickými IAI markery [102,133,134]. Na našem pracovišti jsme využívali point of care test a stanovili jsme pro koncentrace IL-6 v plodové vodě cut-off hodnotu 1000 pg/ml [135].

Pro zavedení nové analytické metody hodnocení IL-6, specifické pro IL-6 v plodové vodě, je velmi důležité stanovení vhodné cut-off hodnoty pro diagnostiku IAI. V této studii byly získány následující hlavní poznatky:

- i) byla zjištěna silná korelace mezi koncentracemi v plodové vodě naměřenými pomocí automatizované elektrochemiluminiscenční imunoanalytické metody a ELISOU;
- ii) pro koncentrace IL-6 v plodové vodě hodnocené pomocí automatizované elektrochemiluminiscenční imunoanalytické metody, pro diagnostiku IAI byla stanovena cut-off hodnota 3000 pg/ml u žen s pPROM.

V této studii jsme prokázali, že koncentrace IL-6 v plodové vodě měřené pomocí metody automatizovaného elektrochemiluminiscenčního imunotestu silně korelují s hodnotami naměřenými pomocí ELISA testu. Toto pozorování bylo konzistentní s nálezem z předchozí studie zahrnující séra od kriticky nemocných pacientů [99]. V posledních letech byly vyvinuty hraniční hodnoty pro koncentrace IL-6 v plodové vodě k identifikaci IAI u žen s pPROM. V roce 1993 Romero a spol. stanovil mezní hodnotu koncentrace IL-6 v plodové vodě 7,9 ng/ml u žen s pPROM se senzitivitou 81 %, specificitou 75 %, pozitivní prediktivní hodnotou 67 %, a negativní prediktivní hodnotou 86 % [66]. V roce 2001 byla stanovena nová mezní hodnota (2,6 ng/ml) navržena pro identifikaci IAI u žen s předčasným porodem a intaktní membránou (bez odtoku plodové vody), protože tato cut-off hodnota souvisela s vyšším rizikem nepříznivých neonatálních výsledků i u žen s negativním nálezem z kultivace z plodové vody

[103,134]. Následně cut-off hodnota 2,6 ng/ml byla široce používána k identifikaci IAI u žen, které měly spontánní onemocnění předčasný porod s intaktní membránou a pPROM [133, 136, 137]. Hodnocení koncentrace IL-6 v plodové vodě pomocí ELISA testu trvá 8 hodin; nicméně, lékaři potřebují výsledky IL-6 pro rozhodování co nejdříve. Proto byl zaveden point of care test s výsledkem do 20 minut k posouzení koncentrace IL-6 v plodové vodě. Romero a kol. navrhli hodnotu 745 pg/ml pro IAI jako cut-off pro koncentraci IL-6 v plodové vodě, pokud je koncentrace měřena pomocí testu point-of care [103,134]. V této studii jsme navrhli cut-off hodnotu 3000 pg/ml pro koncentrace IL-6 v plodové vodě stanovené pomocí metody automatizované elektrochemiluminiscenční imunoanalýzy u žen s pPROM. Prokázali jsme, že tato cut-off hodnota je dostatečně specifická a citlivá pro identifikaci IAI. Čtyři ženy vykazovaly falešně negativní výsledek založený na metodě automatizovaného elektrochemiluminiscenčního imunotestu. Dva případy z těchto žen měly MIAC (*Gardnerella vaginalis* [n = 1] a druh *Ureaplasma* [n = 1] s mikrobiální zátěží $10,7 \times 10^6$ kopií DNA/ml). Žádná z nich neměla pozitivní výsledky IL-6 z plodové vody (50 pg/ml, 50 pg/ml, 223 pg/ml a 372 pg/ml; data neuvedena), pokud byla koncentrace IL-6 měřena pomocí point-of-care testu založené na laterální průtokové imunoanalýze (Milenia Biotec, GmbH, Giessen, Německo). Jedna žena měla falešně pozitivní nález IL-6 v plodové vodě, koncentrace IL-6 byla měřena pomocí metody automatizované elektrochemiluminiscenční imunoanalýzy. Tato žena měla MIAC (druh *Ureaplasma* s mikrobiální zátěží $3,9 \times 10^4$ kopií DNA/ml), ale negativní nález IL-6 měřený pomocí imunoanalýzy na bázi laterální průtokové imunoanalýzy pomocí point-of-care testu (50 pg/ml, data neuvedena).

Silnou stránkou této studie je velmi homogenní kohorta žen s velmi důkladně definovaným fenotypem spontánního předčasného porodu (pPROM). Tato studie měla však určitá omezení:

1. Vzorky, které byly použity v této studii a prošly jedním cyklem zmrazování/rozmrazování.
2. Nebyla hodnocena schopnost automatizované elektrochemiluminiscenční imunoanalytické metody k posouzení čerstvého necentrifugovaného vzorku z plodové vody.
3. Byla stanovena přítomnost MIAC založená pouze na dvou nekultivačních přístupech (specifická PCR pro druhy *Ureaplasma*, *Mycoplasma hominis* a *Chlamydia trachomatis* a nescifické hodnocení genu 16S rRNA) bez aerobní/anaerobní kultivace.

To znamená, že skupina žen s MIAC může být podceňována a skupina žen bez MIAC může být přeceňována. Závěrem lze říci, že automatizovaná elektrochemiluminiscenční imunoanalytická metoda je a spolehlivá metoda hodnocení koncentrací IL-6 v plodové vodě u žen s pPROM v klinickém prostředí. Hraniční hodnota koncentrace IL-6 v plodové vodě stanovená pomocí automatizované elektrochemiluminiscenční imunoanalytické metody je 3000 pg/ml a tato je indikací k diagnostice IAI u žen s pPROM.

9 Závěr

Prospektivní studie některých autorů prokazují, že ženy, které mají v anamnéze předčasný porod mezi 23.–27. týdnem mají 27,1% riziko opakování předčasného porodu. Ženy s anamnézou pPROM měly v následující graviditě 13,5% riziko předčasného porodu pro pPROM a 13krát větší riziko pPROM před 28. týdnem gestace [138,139]. Mezi významné faktory zvyšující riziko předčasného odtoku plodové vody patří zkrácené děložní hrdlo nebo intraamniální infekce. Pro diagnostiku intraamniálního zánětu z plodové vody lze použít metody stanovení koncentrace standardních markerů, jako je např. glukóza, počet leukocytů a laktátu. Daleko průkaznější a přesnější je však stanovení koncentrace interleukinu (IL)-6 v plodové vodě.

Současné práce ukazují, že nejdůležitějším prediktorem neonatální morbidity je nízké gestační stáří, nikoliv riziko rozvoje časně neonatální sepse [140]. Tento fakt je zásadním argumentem pro aplikaci expektačního postupu u pacientek s pPROM. Tento management je celosvětově uznávaným standardem [141]. Je doporučena hospitalizace v perinatologickém centru a následná neonatologická intenzivní péče.

Závěrem lze říci, že hlavním klinickým zjištěním naší studie je, že sériová transabdominální amniocentéza s IL-6 point of care testem pomáhá identifikovat vysoký zánětlivý stav v plodové vodě u žen s pPROM. Zdá se, že je to rozhodující faktor pro výběr mezi aktivním a expektačním managementem u žen s pPROM. Prodloužení období latence s expektačním managementem nevedlo ke zvýšení novorozenecké úmrtnosti. Bylo by potřebné provést další studie, aby se zjistilo, zda se dlouhodobé neonatální výsledky liší podle specifické zánětlivé reakce.

10 Seznam použité literatury

1. Kacerovský M. Předčasný odtok plodové vody před termínem porodu. [online]. Labor aktuell 2018 1(1), Available from: <https://www.labor-aktuell.cz/predcasny-odtok-plodove-vody-pred-terminem-porodu>.
2. Meller C. H., Carducci M. E., Ceriani Cernadas J.M., et al. Preterm premature rupture of membranes. Arch Argent Pediatr 2018;116(4): e575-e581. doi: 10.5546/aap.2018.eng.e575.
3. Mercer, MB. Preterm premature rupture of the membranes. Obstet Gynec, 2003, 101, p. 179–193. doi: 10.1016/s0029-7844(02)02366-9.
4. Kacerovský M., Kokrdová Z., Koucký M., et al. Předčasný odtok plodové vody před termínem porodu. ČESKÁ GYNEKOLOGIE 2017, 82, č. 2 s. 166-167.
5. Kim YM, Chaiworapongsa T, Gomez R, et al. Failure of physiologic transformation of the spiral arteries in the placental bed in preterm premature rupture of membranes. Am J Obstet Gynecol.2002;187:1137–1142. doi: 10.1067/mob.2002.127720_.
6. Tchirikov M., Schlabritz-Loutsevitch N., Maher J., et al. Mid-trimester preterm premature rupture of membranes (PPROM): etiology, diagnosis, classification, international recommendations of treatment options and outcome. J. Perinat. Med. 2017; aop, s. 9-10. doi: 10.1515/jpm-2017-0027.
7. Kacerovsky, M., Musilova, I., Khatibi, A., et al. Intraamniotic inflammatory response to bacteria: analysis of multiple amniotic fluid proteins in women with preterm prelabor rupture of membranes. J Matern Fetal Neonatal Med, 2012, 25, p. 2014–2019. doi: 10.3109/14767058.2012.671873.
8. Kacerovsky, M., Pliskova, L., Bolehovska, R., et al. The microbial load with genital mycoplasmas correlates with the degree of histologic chorioamnionitis in preterm

- PROM. *Am J Obstet Gynecol*, 2011, 205, p. 213, e1–7. doi: 10.1016/j.ajog.2011.04.028.
9. Menon, R., Peltier, MR., Eckardt, J., et al. Diversity in cytokine response to bacteria associated with preterm birth by fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol*. 2009 Sep;201(3):306.e1-6. doi: 10.1016/j.ajog.2009.06.027.
 10. Arntzen, KJ., Kjollesdal, AM., Halgunset, J., et al. TNF, IL-1, IL-6, IL-8 and soluble TNF receptors in relation to chorioamnionitis and premature labor. *J Perinat Med*, 1998, 26, p. 17-26. doi: 10.1515/jpme.1998.26.1.17.
 11. Smith, G., Rafuse, Ch., Anand, N., et al. Prevalence, Management, and Outcomes of Preterm Prelabour Rupture of the Membranes of Women in Canada, *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*, Volume 27, Issue 6, June 2005, Pages 547-553. doi: 10.1016/s1701-2163(16)30711-3.
 12. Guzick, DS., Winn, K. The association of chorioamnionitis with preterm delivery. *Obstet Gynecol*, 1985, 65, p. 11-16.
 13. Sbarra, AJ., Selvaraj, RJ., Cetrulo, CL., et al. Infection and phagocytosis as possible mechanisms of rupture in premature rupture of the membranes. *Am J Obstet Gynecol*, 1985, 153, p. 38-43. doi: 10.1016/0002-9378(85)90586-1
 14. Seo, K., McGregor, JA., French, JI. Preterm birth is associated with increased risk of maternal and neonatal infection. *Obstet Gynecol*, 1992, 79, p. 75-80.
 15. Romero, R., Brody, DT., Oyarzun, E., et al. Infection and labor. III. Interleukin-1: asignal for the onset of parturition. *Am J Obstet Gynecol*, 1989,160, p. 1117-1123. doi: 10.1016/0002-9378(89)90172-5.
 16. Romero, R., Mazor, M., Sepulveda, W., et al. Tumor necrosis factor in preterm and term labor. *Am J Obstet Gynecol*, 1992, 166, p. 1576-1587. doi: 10.1016/0002-9378(92)91636-o.

17. Tchirikov M., Schlabritz-Loutsevitch N., Maher J., et al. Mid-trimester preterm premature rupture of membranes (PPROM): etiology, diagnosis, classification, international recommendations of treatment options and outcome. *J. Perinat. Med.* 2017; aop, s. 9-10. doi: 10.1515/jpm-2017-0027.
18. Heinrich, PC., Castell, JV., Andus, T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J*, 1990, 265, p. 621-636. doi: 10.1042/bj2650621
19. Kameda, T., Matsuzaki, N., Sawai, K., et al. Production of interleukin-6 by normal human trophoblast. *Placenta*, 1990, 11, p. 205-213. doi: 10.1016/s0143-4004(05)80266-8.
20. Weeks, JW., Reynolds, L., Taylor, D., et al. Umbilical cord blood interleukin-6 levels and neonatal morbidity. *Obstet Gynecol*, 1997, 90, p. 815-818. doi: 10.1016/S0029-7844(97)00421-3.
21. Chaiworapongsa T, Espinoza J, Yoshimatsu J, et al. Activation of coagulation system in preterm labor and preterm premature rupture of membranes. *J.Matern.Fetal Neonatal Med.* 2002;11:368–373. doi: 10.1080/jmf.11.6.368.373
22. Rosen T, Kuczynski E, O'Neill LM, et al. Plasma levels of thrombin-antithrombin complexes predict preterm premature rupture of the fetal membranes. *J.Matern.Fetal Med.* 2001;10:297–300. doi: 10.1080/714904361.
23. Lockwood CJ, Toti P, Arcuri F, et al. Mechanisms of abruption-induced premature rupture of the fetal membranes: thrombin-enhanced interleukin-8 expression in term decidua. *Am J Pathol.* 2005;167:1443–1449. doi: 10.1016/S0002-9440(10)61230-8
24. Gomez R, Romero R, Nien JK, et al. Idiopathic vaginal bleeding during pregnancy as the only clinical manifestation of intrauterine infection. *J Matern.Fetal Neonatal Med.* 2005;18:31–37. doi: 10.1080/14767050500217863.

25. Gervasi MT, Chaiworapongsa T, Naccasha N, et al. Maternal intravascular inflammation in preterm premature rupture of membranes. *J Matern.Fetal Neonatal Med.* 2002;11:171–175. doi: 10.1080/jmf.11.3.171.175.
26. Osterud B, Bjorklid E. Sources of tissue factor. *Semin.Thromb.Hemost.* 2006;32:11–23. doi: 10.1055/s-2006-933336.
27. Mackenzie AP, Schatz F, Krikun G, et al. Mechanisms of abruption-induced premature rupture of the fetal membranes: Thrombin enhanced decidual matrix metalloproteinase-3 (stromelysin-1) expression. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;191:1996–2001. doi: 10.1016/S0002-9440(10)61230-8
28. Rosen T, Schatz F, Kuczynski E, et al. Thrombin-enhanced matrix metalloproteinase-1 expression: a mechanism linking placental abruption with premature rupture of the membranes. *J.Matern.Fetal Neonatal Med.* 2002;11:11–17. doi: 10.1080/jmf.11.1.11.17.
29. Elovitz MA, Saunders T, Ascher-Landsberg J, et al. Effects of thrombin on myometrial contractions in vitro and in vivo. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 2000;183:799–804. doi: <https://doi.org/10.1067/mob.2000.108897> DOI: 10.1067/mob.2000.108897
30. Elovitz MA, Baron J, Phillippe M. The role of thrombin in preterm parturition. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 2001;185:1059–1063. DOI: 10.1067/mob.2001.117638
31. Lockwood CJ, Toti P, Arcuri F, et al. Mechanisms of abruption-induced premature rupture of the fetal membranes: thrombin-enhanced interleukin-8 expression in term decidua. *Am J Pathol.* 2005;167:1443–1449. doi: 10.1016/S0002-9440(10)61230-8
32. Gomez R, Romero R, Nien JK, et al. Idiopathic vaginal bleeding during pregnancy as the only clinical manifestation of intrauterine infection. *J Matern.Fetal Neonatal Med.* 2005;18:31–37. doi: 10.1080/14767050500217863.

33. Abdel Gader AM, Al-Mishari AA, Awadalla SA, et al. Total and free tissue factor pathway inhibitor in pregnancy hypertension. *Int.J.Gynaecol.Obstet.* 2006;95:248–253. doi: 10.1016/j.ijgo.2006.07.014. Epub 2006 Oct 27.
34. Di Paolo S, Volpe P, Grandaliano G, et al. Increased placental expression of tissue factor is associated with abnormal uterine and umbilical Doppler waveforms in severe preeclampsia with fetal growth restriction. *J Nephrol.* 2003;16:650–657.
35. Aharon A, Lanir N, Drugan A, et al. Placental TFPI is decreased in gestational vascular complications and can be restored by maternal enoxaparin treatment. *J Thromb.Haemost.* 2005;3:2355–2357. doi: 10.1111/j.1538-7836.2005.01564.x.
36. Erez O., Espinoza J., Chaiworapongsa T., et al. A link between a hemostatic disorder and preterm PROM: A role for tissue factor and tissue factor pathway inhibitor. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2008 Oct; 21(10): 732–744. doi: 10.1080/14767050802361807.
37. Treloar SA, Macones GA, Mitchell LE, et al. Genetic influences on premature parturition in an Australian twin sample. *Twin Res.* 2000; 3:80–2. doi: 10.1375/136905200320565526
38. Clausson B, Lichtenstein P, Cnattingius S. Genetic influence on birthweight and gestational length determined by studies in offspring of twins. *BJOG.* 2000; 107:375–81. doi: 10.1111/j.1471-0528.2000.tb13234.x
39. Esplin MS, Manuck TA, Varner MW, et al. Cluster analysis of spontaneous preterm birth phenotypes identifies potential associations among preterm birth mechanisms. *Am J Obstet Gynecol.* 2015; 213:429.e1–9. doi: 10.1016/j.ajog.2015.06.011
40. Capece A, Vasieva O, Meher S, et al. Pathway analysis of genetic factors associated with spontaneous preterm birth and pre-labor preterm rupture of membranes. *PLoS One.* 2014; 9:e108578. DOI: 10.1371/journal.pone.0108578

41. Romero R, Velez Edwards DR, Kusanovic JP, et al. Identification of fetal and maternal single nucleotide polymorphisms in candidate genes that predispose to spontaneous preterm labor with intact membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 2010; 202:431e1–34. DOI: 10.1016/j.ajog.2010.03.026
42. Frey HA, Stout MJ, Pearson LN, et al. Genetic variation associated with preterm birth in African American women. *Am J Obstet Gynecol.* 2016; 215:2. DOI: 10.1016/j.ajog.2016.03.008
43. Romero R, Dey SK, Fisher SJ. Preterm labor: one syndrome, many causes. *Science.* 2014; 345:760–5. [PubMed: 25124429] DOI: 10.1126/science.1251816
44. Romero R, Espinoza J, Goncalves LF, et al. The role of inflammation and infection in preterm birth. *Semin Reprod Med.* 2007; 25:21–39. DOI: 10.1055/s-2006-956773
45. Romero R, Brody DT, Oyarzun E, et al. Infection and labor. III. Interleukin-1: a signal for the onset of parturition. *Am J Obstet Gynecol.* 1989; 160:1117–23. DOI: 10.1016/0002-9378(89)90172-5
46. Romero R, Miranda J, Chaiworapongsa T, et al. A novel molecular microbiologic technique for the rapid diagnosis of microbial invasion of the amniotic cavity and intra-amniotic infection in preterm labor with intact membranes. *Am J Reprod Immunol.* 2014; 71:330–58. doi: 10.1111/aji.12189
47. Romero R, Ceska 00M, Avila C, Mazor M, Behnke E, Lindley I. Neutrophil tractant/activating peptide-1/interleukin-8 in term and preterm parturition. *Am J Obstet Gynecol.* 1991; 165:813–20. doi: 10.1016/0002-9378(91)90422-n
48. Keelan JA, Yang J, Romero RJ, et al. Epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide-78 is present in fetal membranes and amniotic fluid at increased concentrations with intra-amniotic infection and preterm delivery. *Biol Reprod.* 2004; 70:253–9. DOI: 10.1095/biolreprod.103.016204

49. Maymon E, Ghezzi F, Edwin SS, et al. The tumor necrosis factor alpha and its soluble receptor profile in term and preterm parturition. *Am J Obstet Gynecol.* 1999; 181:1142–8. DOI: 10.1016/s0002-9378(99)70097-9
50. Lonergan M, Aponso D, Marvin KW, et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), TRAIL receptors, and the soluble receptor osteoprotegerin in human gestational membranes and amniotic fluid during pregnancy and labor at term and preterm. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88:3835–44. DOI: 10.1210/jc.2002-021905
51. Hertelendy F, Rastogi P, Molnar M, et al. Interleukin-1beta-induced prostaglandin E2 production in human myometrial cells: role of a pertussis toxin-sensitive component. *Am J Reprod Immunol.* 2001; 45:142–7. DOI: 10.1111/j.8755-8920.2001.450304.x
52. Ibrahim SA, Ackerman WEt, Summerfield TL, et al. Inflammatory gene networks in term human decidual cells define a potential signature for cytokine-mediated parturition. *Am J Obstet Gynecol.* 2016; 214:284e1–84e47. DOI: 10.1016/j.ajog.2015.08.075
53. Gravett MG, Witkin SS, Haluska GJ, et al. An experimental model for intraamniotic infection and preterm labor in rhesus monkeys. *Am J Obstet Gynecol.* 1994; 171:1660–7. DOI: 10.1016/0002-9378(94)90418-9
54. Prince A, Ma J, Miller L, et al. Chorioamnionitis induced by intraamniotic injection of IL1, LPS or *Ureaplasma parvum* is associated with an altered microbiome in a primate model of inflammatory preterm birth. *Am J Obstet Gynecol.* 2014; 212:S153. doi: 10.3390/ijms23179792
55. Presicce P, SenthamaraiKannan P, Alvarez M, et al. Neutrophil recruitment and activation in decidua with intra-amniotic IL-1beta in the preterm rhesus macaque. *Biol Reprod.* 2015; 92:56. doi: 10.1095/biolreprod.114.124420

56. van de Veerdonk FL, Netea MG, Dinarello CA, et al. Inflammasome activation and IL-1beta and IL-18 processing during infection. *Trends Immunol.* 2011; 32:110–6. DOI: 10.1016/j.it.2011.01.003
57. Miao EA, Rajan JV, Aderem A. Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunol Rev.* 2011; 243:206–14. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2011.01044.x
58. Guo H, Callaway JB, Ting JP. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med.* 2015; 21:677–87. DOI: 10.1038/nm.3893
59. Masumoto J, Taniguchi S, Sagara J. Pypin N-terminal homology domain- and caspase recruitment domain-dependent oligomerization of ASC. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 280:652–5. DOI: 10.1006/bbrc.2000.4190
60. Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, et al. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ.* 2015; 22:526–39. DOI: 10.1038/cdd.2014.216
61. Romero R, Miranda J, Chaiworapongsa T, et al. Sterile intra-amniotic inflammation in asymptomatic patients with a sonographic short cervix: prevalence and clinical significance. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2014:1–17. DOI: 10.3109/14767058.2014.954243
62. Gomez-Lopez N, Romero R, Xu Y, et al. A Role for the Inflammasome in Spontaneous Preterm Labor With Acute Histologic Chorioamnionitis. *Reprod Sci.* 2017 Oct;24(10):1382-1401. Epub 2017 Jan 26 doi: 10.1177/1933719116687656.
63. Plazyo O, Romero R, Unkel R, et al. HMGB1 Induces an Inflammatory Response in the Chorioamniotic Membranes That Is Partially Mediated by the Inflammasome. *Biol Reprod.* 2016; 95:130. doi: 10.1095/biolreprod.116.144139
64. Romero R, Xu Y, Plazyo O, et al. A Role for the Inflammasome in Spontaneous Labor at Term. *Am J Reprod Immunol.* 2018 Jun; 79(6): e12440. doi: 10.1111/aji.12440

65. Conforti-Andreoni C, Beretta O, Licandro G, et al. Synergism of NOD2 and NLRP3 activators promotes a unique transcriptional profile in murine dendritic cells. *J Leukoc Biol.* 2010; 88:1207–16. DOI: 10.1189/jlb.1009652
66. Romero R, Yoon BH, Mazor M, et al. A comparative study of the diagnostic performance of amniotic fluid glucose, white blood cell count, interleukin-6, and gram stain in the detection of microbial invasion in patients with preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 1993; 169:839–51. DOI: 10.1016/0002-9378(93)90014-a
67. O'Toole A, Nwanne O, Tomlinson T. Inflammatory Bowel Disease Increases Risk of Adverse Pregnancy Outcomes: A Meta-Analysis. *Dig Dis Sci.* 2015; 60:2750–61. DOI: 10.1007/s10620-015-3677-x
68. Abdul Sultan A, West J, Ban L, et al. Adverse Pregnancy Outcomes Among Women with Inflammatory Bowel Disease: A Population-Based Study from England. *Inflamm Bowel Dis.* 2016; 22:1621–30. DOI: 10.1097/MIB.0000000000000802
69. Papageorgiou SN, Hagner M, Nogueira AV, Franke A, Jager A, Deschner J. Inflammatory bowel disease and oral health: systematic review and a meta-analysis. *J Clin Periodontol.* 2017; 44:382– 93. DOI: 10.1111/jcpe.12698
70. Lira-Junior R, Figueredo CM. Periodontal and inflammatory bowel diseases: Is there evidence of complex pathogenic interactions? *World J Gastroenterol.* 2016; 22:7963–72. doi: 10.3748/wjg.v22.i35.7963
71. Strauss J. F., Romero R., Gomez-Lopez N., Spontaneous preterm birth: advances toward the discovery of genetic predisposition. *Am J Obstet Gynecol.* 2018 March ; 218(3): 294–314.e2. doi:10.1016/j.ajog.2017.12.009. DOI: 10.1016/j.ajog.2017.12.009

72. Cunningham S.J., Feng L., Allen TK and Reddy TE et al. Functional Genomics of Healthy and Pathological Fetal Membranes. *Front. Physiol.* 11:687. doi: 10.3389/fphys.2020.00687
73. Romero, R., Chaiworapongsa, T., Kuivaniemi, H. Bacterial vaginosis, the inflammatory response and the risk of preterm birth: a role for genetic epidemiology in the prevention of preterm birth. *Am J Obstet Gynecol*, 2004, 190, p. 1509–1519. doi: 10.1016/j.ajog.2004.01.002.
74. Procházka M, Procházková J, Ľubušký M, Slavík L. Trombofilní stavy v porodnictví - I. část. *Prakt. Gyn.*, 2004, 4: 12-17.
75. Alfirevic Z, Martlew V, Briscoe L et al. Postnatal screening for thrombophilia in women with severe pregnancy complications. *Obstet Gynecol* 2001; 97: 753–9. doi: 10.1016/s0029-7844(01)01190-5
76. Kupfermanc MJ, Fait G, Many A et al. Severe preeclampsia and high frequency of thrombophilic mutations. *Obstet Gynecol* 2000; 96: 45–49. doi: 10.1016/s0029-7844(00)00861-9.
77. Kvasnička J, Živný J. Trombotické stavy v těhotenství a v šestinedělí. *Moderní gynekologie a porodnictví* 1999; 8(2): 144–151.
78. Friedrich PW, Sanson BJ, Simioni P, et al. Frequency of pregnancy – related venous thromboembolism in antikoagulant factor deficient women. Implications for profylaxis. *Ann Intern Med* 1996; 125: 955–960. doi: 10.7326/0003-4819-125-12-199612150-00003.
79. Lockwood CJ. Heritable coagulopathies in pregnancy. *Obstetrical and gynecological survey* 1999; 54(12): 754–765. doi: 10.1097/00006254-199912000-00004.

80. Yang J., Liang M. Risk factors for pregnancy morbidity in women with antiphospholipid syndrome. *Journal of Reproductive Immunology* 145 (2021) 103315. doi: 10.1016/j.jri.2021.103315. Epub 2021 Mar 29.
81. Bardett Fausett M, Branch DW. Autoimmunity and pregnancy loss. *Sem Reprod Med* 2000; 18: 379-392.
82. El-Messidi A, Cameron A. Diagnosis of premature rupture of membranes: inspiration from the past and insights for the future. *J Obstet Gynaecol Canada*. 2010;32(6):561–569. DOI: 10.1016/S1701-2163(16)34525-X
83. Eskicioglu F, Gur EB. Diagnostic modalities in premature rupture of membranes. *Int J Women’s Heal Reprod Sci*. 2015;3(2):89–92. <https://doi.org/10.15296/ijwhr.2015.17>
84. Abdelmane A-S. The evaluation of amniure for the detection of premature rupture of membranes. *Women’s Heal*. 2015;1(1):7–10. <https://doi.org/10.15406/mojwh.2015.01.00003>
85. Ghafoor S. Current and Emerging Strategies for Prediction and Diagnosis of Prelabour Rupture of the Membranes: A Narrative Review. *Malays J Med Sci* 2021 Jun;28(3):5-17. doi: 10.21315/mjms2021.28.3.2.
86. Kishida T, Yamada H, Negishi H, et al. Diagnosis of premature rupture of the membranes in preterm patients, using an improved AFP kit: comparison with ROM-check and/or nitrazine test. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1996;69(2):77–82. [https://doi.org/10.1016/0301-2115\(95\)02519-7](https://doi.org/10.1016/0301-2115(95)02519-7)
87. van der Ham DP, van Melick MJ, Smits L, et al. Methods for the diagnosis of rupture of the fetal membranes in equivocal cases: a systematic review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2011;157(2):123–127. DOI: 10.1016/j.ejogrb.2011.03.006

88. Singh CR, Bhat RG. Alpha-foetoprotein in the diagnosis of prelabour rupture of membranes. *J Clin Diagn Res.* 2014;8(11):OC01–OC02. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/8259.5093>
89. McQuivey RW, Block JE. ROM plus®: accurate point-of-care detection of ruptured fetal membranes. *Med Devices Evid Res.* 2016;9:69– 74. <https://doi.org/10.2147/MDER.S106106>
90. Oh KJ, Lee JH, Romero R, Park HS, et al. A new rapid bedside test to diagnose and monitor intra-amniotic inflammation in preterm PROM using transcervically collected fluid. *Am J Obstet Gynecol.* 2020;223(3):423. e1–423.e15. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2020.02.037>
91. William M. Risks associated with use of rupture of membranes tests — letter to health care providers. U.S. Food and Drug Administration, Center for Devices and Radiological Health; 2018.
92. R., Cioca A., Dima V., et al. Expectant Management of PPRM Improves Neonatal Outcome—A Retrospective Study of 562 Patients. *J Clin Med.* 2022 Jan; 11(1): 214. doi: 10.3390/jcm11010214.
93. Romero R, Miranda J, Kusanovic JP, et al. Clinical chorioamnionitis at term I: microbiology of the amniotic cavity using cultivation and molecular techniques. *J Perinat Med* 2015;43(1):19-36. doi: 10.1515/jpm-2014-0249
94. Aviram A, Quaglietta P, Warshafsky C, et al. The utility of ultrasound assessment in the management of preterm prelabor rupture of the membranes. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2020;55(6):806-14. doi: 10.1002/uog.20403
95. Marcellin L, Anselem O, Guibourdenche J, et al. [Comparison of two bedside tests performed on cervicovaginal fluid to diagnose premature rupture of membranes]. *J*

- Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris) 2011;40(7):651-6. doi: 10.1016/j.jgyn.2011.06.007
96. Musilova I, Pliskova L, Gerychova R, et al. Maternal white blood cell count cannot identify the presence of microbial invasion of the amniotic cavity or intra-amniotic inflammation in women with preterm prelabor rupture of membranes. *PLoS One* 2017;12(12):e0189394. doi: 10.1371/journal.pone.0189394
97. Kacerovsky M, Musilova I, Hornychova H, et al. Bedside assessment of amniotic fluid interleukin-6 in preterm prelabor rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2014;211(4):385.e1-9. doi:10.1016/j.ajog.2014.03.069
98. Vousden N, Chandiramani M, Seed P, et al. Interleukin-6 bedside testing in women at high risk of preterm birth. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2011;24(10):1301-4. doi: 10.3109/14767058.2011.558954
99. Fraunberger P, Pfeiffer M, Cremer P, et al. Validation of an automated enzyme immunoassay for interleukin-6 for routine clinical use. *Clin Chem Lab Med.* 1998;36:797–801. DOI: 10.1515/CCLM.1998.141
100. Fouhy F, Deane J, Rea MC, et al. The effects of freezing on faecal microbiota as determined using MiSeq sequencing and culture-based investigations. *PLoS One.* 2015;10:e0119355. DOI: 10.1371/journal.pone.0119355
101. Greisen K, Loeffelholz M, Purohit A, et al. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol.* 1994;32:335–351. DOI: 10.1128/jcm.32.2.335-351.1994
102. Chaemsaitong P, Romero R, Korzeniewski SJ, et al. A rapid interleukin-6 bedside test for the identification of intra-amniotic inflammation in preterm labor with intact membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2016;29:349–359. DOI: 10.3109/14767058.2015.1006620

103. Yoon BH, Romero R, Moon JB, et al. Clinical significance of intra-amniotic inflammation in patients with preterm labor and intact membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 2001;185:1130–1136. DOI: 10.1067/mob.2001.117680
104. Kacerovský M, Koucký M, Křepelka P, et al. Předčasný odtok plodové vody před termínem porodu. Doporučený postup. *Ceska Gynekol* 2017;82(2):166-7.
105. Kuba K, Bernstein PS. ACOG Practice Bulletin No. 188: Prelabor Rupture of Membranes. *Obstet Gynecol* 2018;131(6):1163-64. doi:10.1097/AOG.0000000000002663
106. Musilova I, Kutova R, Pliskova L, et al. Intraamniotic Inflammation in Women with Preterm Prelabor Rupture of Membranes. *PLoS One* 2015;10(7):e0133929. doi: 10.1371/journal.pone.0133929
107. Morley JJ, Kushner I. Serum C-reactive protein levels in disease. *Ann N Y Acad Sci* 1982;389:406-18. doi: 10.1111/j.1749-6632.1982.tb22153.x
108. Cobo T, Jacobsson B, Kacerovsky M, et al. Systemic and local inflammatory response in women with preterm prelabor rupture of membranes. *PLoS One* 2014;9(1):e85277. doi: 10.1371/journal.pone.0085277
109. Trochez-Martinez RD, Smith P, Lamont RF. Use of C-reactive protein as a predictor of chorioamnionitis in preterm prelabour rupture of membranes: a systematic review. *BJOG* 2007;114(7):796-801. doi: 10.1111/j.1471-0528.2007.01385.x
110. Kidokoro K, Furuhashi M, Kuno N, et al. Amniotic fluid neutrophil elastase and lactate dehydrogenase: association with histologic chorioamnionitis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2006;85(6):669-74. doi: 10.1080/01443610600604432
111. Popowski T, Goffinet F, Batteux F, et al. [Prediction of maternofetal infection in preterm premature rupture of membranes: serum maternal markers]. *Gynecol Obstet Fertil* 2011;39(5):302-8. doi: 10.1016/j.gyobfe.2010.11.006

112. Cassell GH, Waites KB, Watson HL, et al. *Ureaplasma urealyticum* intrauterine infection: role in prematurity and disease in newborns. *Clin Microbiol Rev* 1993;6(1):69-87. doi:10.1128/cmr.6.1.69
113. Gupta A, Gupta A, Gupta S, et al. Correlation of mycoplasma with unexplained infertility. *Arch Gynecol Obstet* 2009;280(6):981-5. doi:10.1007/s00404-009-1042-z
114. Prince AL, Ma J, Kannan PS, Alvarez M, et al. The placental membrane microbiome is altered among subjects with spontaneous preterm birth with and without chorioamnionitis. *Am J Obstet Gynecol* 2016;214(5):627.e1-627.e16. doi: 10.1016/j.ajog.2016.01.193
115. Sweeney EL, Kallapur SG, Gisslen T, et al. Placental Infection With *Ureaplasma* species Is Associated With Histologic Chorioamnionitis and Adverse Outcomes in Moderately Preterm and Late-Preterm Infants. *J Infect Dis* 2016;213(8):1340-7. doi: 10.1093/infdis/jiv587
116. Pavlidis I, Spiller OB, Sammut Demarco G, et al. Cervical epithelial damage promotes *Ureaplasma parvum* ascending infection, intrauterine inflammation and preterm birth induction in mice. *Nat Commun* 2020;11(1):199. doi: 10.1038/s41467-019-14089-y
117. Amon E, Lewis SV, Sibai BM, et al. Ampicillin prophylaxis in preterm premature rupture of the membranes: a prospective randomized study. *Am J Obstet Gynecol* 1988;159(3):539-43. doi: 10.1016/s0002-9378(88)80002-4
118. Kwak HM, Shin MY, Cha HH, et al. The efficacy of cefazolin plus macrolide (erythromycin or clarithromycin) versus cefazolin alone in neonatal morbidity and placental inflammation for women with preterm premature rupture of membranes. *Placenta* 2013;34(4):346-52. doi: 10.1016/j. placenta.2013.01.016

119. Lee J, Romero R, Kim SM, et al. A new antibiotic regimen treats and prevents intra-amniotic inflammation/ infection in patients with preterm PROM. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2016;29(17):2727-37. doi: 10.3109/14767058.2015.1103729
120. Lee J, Romero R, Kim SM, et al. A new anti-microbial combination prolongs the latency period, reduces acute histologic chorioamnionitis as well as funisitis, and improves neonatal outcomes in preterm PROM. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2016;29(5):707-20. doi: 10.3109/14767058.2015.1020293
121. Gomez R, Romero R, Nien JK, et al. Antibiotic administration to patients with preterm premature rupture of membranes does not eradicate intra-amniotic infection. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2007;20(2):167-73. doi: 10.1080/14767050601135485.
122. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 2007;81(1):1-5. doi: 10.1189/jlb.0306164
123. Romero R, Chaiworapongsa T, Alpay Savasan Z, et al. Damage-associated molecular patterns (DAMPs) in preterm labor with intact membranes and preterm PROM: a study of the alarmin HMGB1. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2011;24(12):1444-55. doi: 10.3109/14767058.2011.591460
124. Cobo T, Kacerovsky M, Palacio M, et al. Intra-amniotic inflammatory response in subgroups of women with preterm prelabor rupture of the membranes. *PLoS One* 2012;7(8):e43677. doi: 10.1371/journal.pone.0043677
125. Tchirikov M, Zhumadilov Z, Winarno AS, et al. Treatment of Preterm Premature Rupture of Membranes with Oligo-/Anhydramnion Colonized by Multiresistant Bacteria with Continuous Amnioinfusion and Antibiotic Administrations through a Subcutaneously Implanted Intrauterine Port System: A Case Report. *Fetal Diagn Ther* 2017;42(1):71-6. doi: 10.1159/000438483

126. Garcia-Munoz Rodrigo F, Galan Henriquez G, Figueras Aloy J, et al. Outcomes of very-low-birth-weight infants exposed to maternal clinical chorioamnionitis: a multicentre study. *Neonatology* 2014;106(3):229-34. doi: 10.1159/000363127
127. Walker MW, Picklesimer AH, Clark RH, et al. Impact of duration of rupture of membranes on outcomes of premature infants. *J Perinatol* 2014;34(9):669-72. doi: 10.1038/jp.2014.73
128. Test G, Levy A, Wiznitzer A, et al. Factors affecting the latency period in patients with preterm premature rupture of membranes. *Arch Gynecol Obstet* 2011;283(4):707- 10. doi: 10.1007/s00404-010-1448-7.
129. Goya M, Bernabeu A, Garcia N, et al. Premature rupture of membranes before 34 weeks managed expectantly: maternal and perinatal outcomes in singletons. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2013;26(3):290-3. doi: 10.3109/14767058.2012.733779
130. Baser E, Aydogan Kirmizi D, Ulubas Isik D, et al. The effects of latency period in PPROM cases managed expectantly. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2020;33(13):2274-83. doi: 10.1080/14767058.2020.1731465
131. Arora P, Bagga R, Kalra J, et al. Mean gestation at delivery and histological chorioamnionitis correlates with early-onset neonatal sepsis following expectant management in pPROM. *J Obstet Gynaecol* 2015;35(3):235-40. doi: 10.3109/01443615.2014.958143
132. Stepan M, Cobo T, Maly J, et al. Neonatal outcomes in subgroups of women with preterm prelabor rupture of membranes before 34 weeks. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2016;29(14):2373-7. doi: 10.3109/14767058.2015.1086329
133. Chaemsaihong P, Romero R, Korzeniewski SJ, et al. A point of care test for interleukin-6 in amniotic fluid in preterm prelabor rupture of membranes: a step toward

- the early treatment of acute intra-amniotic inflammation/infection. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2016;29:360–367. DOI: 10.3109/14767058.2015.1006621
134. Chaemsaihong P, Romero R, Korzeniewski SJ, et al. A point of care test for the determination of amniotic fluid interleukin-6 and the chemokine CXCL-10/IP-10. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2015;28:1510–1519. DOI: 10.3109/14767058.2014.961417
135. Fulova V, Hostinska E, Studnickova M, et al. Transabdominal amniocentesis in expectant management of preterm premature rupture of membranes: A single center prospective study. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2021 Sep; 165(3):305-315. DOI: 10.5507/bp.2020.041
136. Kim KW, Romero R, Park HS, et al. A rapid matrix metalloproteinase-8 bedside test for the detection of intraamniotic inflammation in women with preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 2007;197:292.e1–292.e5. DOI: 10.3109/14767058.2015.1006620
137. Tchirikov M, Schlabritz-Loutsevitch N, Maher J, et al. Mid-trimester preterm premature rupture of membranes (PPROM): etiology, diagnosis, classification, international recommendations of treatment options and outcome. *J Perinat Med.* 2018;46:465–488. DOI: 10.1515/jpm-2017-0027
138. Kacerovsky, M., Tosner, J., Andrys, C., et al. Amniotic fluid heat shock protein 70 concentration in preterm premature rupture of membranes. *Čes Gynek*, 2009, 74, p. 85-91. doi: 10.1080/14767050802054550.
139. Caughey, AB., Robinson, JN., Norwitz, ER, Contemporary diagnosis and management of preterm premature rupture of membranes. *Rev Obstet Gynecol*, 2008, 1, p. 11–22.
140. Tsiavlas, P., Kacerovsky, M., Musilová P., et al. The association between histological chorioamnionitis, funisitis and neonatal outcome in women with preterm prelabor

rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2013; 26(13): 1332–1336. doi: 10.3109/14767058.2013.784741.

141. Buchanan, S., Crowther, C., Morris J., Preterm prelabour rupture of the membranes: A survey of current practice, *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology* 2004; 44: 400–403. doi: 10.1111/j.1479-828X.2004.00256.x

11 Publikační činnost autorky

Původní vědecké publikace v souvislosti s tématem dizertační práce uveřejněné v časopise s IF

Veronika Fulova, Eliska Hostinska, Martina Studnickova, Karel Huml, Jana Zapletalova, Jan Halek, Radovan Pilka. Transabdominal amniocentesis in expectant management of preterm premature rupture of membranes: A single center prospective study. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2021 Sep; 165(3):305-315. DOI: 10.5507/bp.2020.041 (IF 1.245)

Ivana Musilova, Ctirad Andrys, Magdalena Holeckova, **Veronika Kolarova**, Lenka Pliskova, Marcela Drahosova, Radka Bolehovska, Radovan Pilka, Karel Huml, Teresa Cobo, Bo Jacobsson & Marian Kacerovsky. Interleukin-6 measured using the automated electrochemiluminescence immunoassay method for the identification of intra-amniotic inflammation in preterm prelabor rupture of membranes. The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine, 2020 Jun;33(11):1919-1926. DOI: 10.1080/14767058.2018.1533947. (IF 1.729)

Přehledné vědecké publikace v souvislosti s tématem dizertační práce

Veronika Fulová, Radovan Pilka. Předčasný odtok plodové vody před termínem porodu.

Ceska Gynekol 2022 (6.vydání)

Publikovaná abstrakta

Eliška Hostinská, Petra Slunská, **Veronika Kolářová**, Martina Studničková, Karel Huml, Management péče o pacientky s předčasným odtokem plodové vody před v nízkém týdnu těhotenství, XXXIV. Celostátní konference perinatologie a fetomaternální medicíny, 6-8.4.2017, Karlovy Vary, Posterová sekce

Veronika Kolářová, Karel Huml, Martina Studničková, Eliška Hostinská, Radovan Pilka, Předčasný odtok plodové vody před termínem porodu, 8. KONFERENCE NEMOCNIČNÍCH GYNEKOLOGŮ A PORODNÍKŮ, 22-24.11.2018, Mikulov

Původní vědecké publikace uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech

Radovan Pilka, Karel Huml, Marek Lubušský, Jan Vodička, Veronika Jančková, **Veronika Kolářová**. Roboticky asistovaná laparoskopická abdominální cerkláž: dvě kazuistiky. Ceska Gynekol 2018; 83(3): 195-200

Publikovaná abstrakta

Radovan Pilka, Veronika Jančková, **Veronika Kolářová**, Marek Lubušský, Jan Vodička, Roboticky a Laparoskopicky asistovaná abdominální cerkláž u pacientek s habituálním krvácením, 27. Sympozium asistované reprodukce a 16. Česko-slovenská konference reprodukční gynekologie, Brno, 14-15.11. 2017, Posterová sekce

Veronika Kolářová, Karel Huml, Lenka Hansmanová, Radovan Pilka, Neonatální aloimunní trombocytopenie, XXXV. CELOSTÁTNÍ KONFERENCE PERINATOLOGIE A FETOMATERNÁLNÍ MEDICÍNY s mezinárodní účastí, 12.04.2018 - 14.04.2018, Mikulov

Veronika Kolářová, Karel Huml, Radovan Pilka, Dehiscence po ruptuře děložní v předchozím těhotenství po myomektomii, XXXVI. CELOSTÁTNÍ KONFERENCE PERINATOLOGIE A FETOMATERNÁLNÍ MEDICÍNY ŠTEMBEROVY DNY s mezinárodní účastí, 11.-13.4. 2019, Valeč

Seznam přednášek/posterů přednesených na veřejných odborných fórech

Radovan Pilka, **Veronika Kolářová**, Karel Huml, Marek Ľubušký, Jan Vodička, Laparoskopicky asistovaná abdominální cerkláž, Perinatologie, Přednáškový večer Spolku lékařů v Olomouci dne 19.4.2017

Veronika Kolářová, Radovan Pilka, Karel Huml, Marek Ľubušký, Jan Vodička, Roboticky asistovaná laparoskopická abdominální cerkláž, Kontroverze v gynekologii a porodnictví, 7.—10. 6. 2018, Brno