

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Možnosti detekce časných forem sepse u novorozenců pomocí
průtokové cytometrie**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: Karolína Wojewodová

Studijní program: N1501 Biologie

Studijní obor: Experimentální biologie

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: RNDr. Martin Novák, Ph.D.

Termín odevzdání práce: 2018

Autor: Karolína Wojewodová
Název Práce: Možnosti detekce časných forem sepse u novorozenců pomocí průtokové cytometrie
Typ práce: Diplomová
Pracoviště: Hematoonkologická laboratoř FNOL
Vedoucí práce: RNDr. Martin Novák, Ph.D
Rok obhajoby: 2018

Abstrakt: Novorozenecká sepse je celosvětově nejčastější příčinou úmrtí u novorozenců, zvláště v rozvojových zemích. Včasná diagnostika a rychle započatá léčba je klíčovým faktorem ke snížení úmrtnosti. V klinické praxi se jako zlatý standard v diagnostice novorozenecké sepse využívá hemokultura. Nevýhodou této metody je, že po antibiotické profylaxi matek je bakteriální růst nízký, zvláště v hemokultuře. Standardní biomarkery sepse jako celkový počet leukocytů, celkový počet neutrofilů, c-reaktivní protein a prokalcitonin mají u novorozenecké sepse dobrou negativní prediktivní hodnotu, ale jejich pozitivní prediktivní hodnota je limitována.

C-reaktivní protein je běžně používaným markerem pro detekci bakteriální sepse u dětí a novorozenců, není však vhodný jako marker sepse v raném stádiu a postrádá specifitu. Lepším markerem sepse u dětí je prokalcitonin, bohužel jej nelze použít u novorozenců v prvních dnech života, kvůli jeho fyziologicky zvýšené hodnotě po porodu. Právě z těchto důvodů jsou hledány nové markery, které by disponovaly vysokou senzitivitou a specifitou a zároveň umožňovaly diagnostiku jak časně, tak pozdní novorozenecké sepse.

CD64, známý jako Fc-gama receptor je vysoce afinitní imunoglobulin, který se jeví jako slibný marker novorozenecké sepse, jelikož jeho exprese narůstá již hodinu od počátku infekce.

Předkládaná diplomová práce se zaměřuje na detekci časných forem sepse u novorozenců. V rámci praktické části bylo metodou průtokové cytometrie analyzováno 217 vzorků periferní krve novorozenců s cílem potvrdit asociaci přítomnosti infekce se zvýšenou expresí CD64.

Klíčová slova: novorozenecká sepse, časná sepse, pozdní sepse, průtoková cytometrie, CD64,

Počet stran: 49

Počet příloh: 2

Jazyk: Český

Author: Karolína Wojewodová

Title: Flow cytometry detection of early forms of neonatal sepsis

Type of thesis: Diplomová

Department: Hematoonkologická laboratoř FNOL

Supervisor: RNDr. Martin Novák, Ph.D

The year of presentation: 2018

Abstrakt: Neonatal sepsis is one of the most common causes of mortality of neonates all over the world, particularly in developing countries. Prompt diagnosis and treatment of neonatal sepsis are crucial to prevent severe mortality. Hemoculture is used as golden standard in clinical practice. The biggest disadvantage of this method is that bacterial growth is low after antibiomatic profylaxion of mothers. Standard biomarkers of inflammation, such as the total leukocyte count, neutrophil count, and acute phase reactant levels C-reactive protein, procalcitonin, have reasonable negative predictive value for infection, but their positive predictive value is limited.

C-raective protein is normally used marker of neonatal and child sepsis, nevertheless is not suitable marker of early onset sepsis because of its low and specificity during early stage of infection. Better marker of bacterial sepsi sis procalcitonin, unfortunately is useless during the first days of life, because of its fyziologicaly high levels after birth. Therefore new markers are seeked. Ideal marker should have high sensitivity and specificity and also enable diagnosis of both early and late onset sepsis.

As promising marker of neonatal sepsis seems nCD64, also known as FC-gama receptor, because its expression increasis already after one hour after onset of infection.

Presented thesis is focused on detection of early forms of neonatal sepsis. In experimental part of this thesis was analyzed 217 periferial blood samples from neonates to prove association of CD64 increasing expression during bacterial infection.

Klíčová slova: neonatal sepsis, early onset sepsis, late onset sepsis, flow cytometry, CD64

Počet stran: 49

Počet příloh: 2

Jazyk: czech

„Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne:

Podpis:

Souhrn

Novorozenecká sepe je celosvětově nejčastější příčinou úmrtí u novorozenců, zvláště v rozvojových zemích. Včasná diagnostika a rychle započatá léčba je klíčovým faktorem ke snížení úmrtnosti. V klinické praxi se jako zlatý standard v diagnostice novorozenecké sepse využívá hemokultura. Nevýhodou této metody je, že po antibiotické profylaxi matek je bakteriální růst nízký, zvláště v hemokultuře. Standardní biomarkery sepse jako celkový počet leukocytů, celkový počet neutrofilů, c-reaktivní protein a prokalcitonin mají u novorozenecké sepse dobrou negativní prediktivní hodnotu, ale jejich pozitivní prediktivní hodnota je limitována.

C-reaktivní protein je běžně používaným markerem pro detekci bakteriální sepse u dětí a novorozenců, není však vhodný jako marker sepse v raném stádiu a postrádá specifitu. Lepším markerem sepse u dětí je prokalcitonin, bohužel jej nelze použít u novorozenců v prvních dnech života, kvůli jeho fyziologicky zvýšené hodnotě po porodu. Právě z těchto důvodů jsou hledány nové markery, které by disponovaly vysokou senzitivitou a specifitou a zároveň umožňovaly diagnostiku jak časnou, tak pozdní novorozenecké sepse.

CD64, známý jako Fc-gama receptor je vysoce afinitní imunoglobulin, který se jeví jako slibný marker novorozenecké sepse, jelikož jeho exprese narůstá již hodinu od počátku infekce.

Předkládaná diplomová práce se zaměřuje na detekci časných forem sepse u novorozenců. V rámci praktické části bylo metodou průtokové cytometrie analyzováno 217 vzorků periferní krve novorozenců s cílem potvrdit asociaci přítomnosti infekce se zvýšenou expresí CD64.

Summary

Neonatal sepsis is one of the most common causes of mortality of neonates all over the world, particularly in developing countries. Prompt diagnosis and treatment of neonatal sepsis are crucial to prevent severe mortality. Hemoculture is used as golden standard in clinical practice. The biggest disadvantage of this method is that bacterial growth is low after antibiomatic profylaxion of mothers. Standard biomarkers of inflammation, such as the total leukocyte count, neutrophil count, and acute phase reactant levels C-reactive protein, procalcitonin, have reasonable negative predictive value for infection, but their positive predictive value is limited.

C-raective protein is normally used marker of neonatal and child sepsis, nevertheless is not suitable marker of early onset sepsis because of its low and specificity during early stage of infection. Better marker of bacterial sepsi sis procalcitonin, unfortunately is useless during the first days of life, because of its fyziologicaly high levels after birth. Therefore new markers are seeked. Ideal marker should have high sensitivity and specificity and also enable diagnosis of both early and late onset sepsis.

As promising marker of neonatal sepsis seems nCD64, also known as FC-gama receptor, because its expression increasis already after one hour after onset of infection.

Presented thesis is focused on detection of early forms of neonatal sepsis. In experimental part of this thesis was analyzed 217 periferial blood samples from neonates to prove association of CD64 increasing expression during bacterial infection.

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu mé diplomové práce RNDr. Martinu Novákovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a vstřícnost při konzultacích.

Obsah

1	Úvod	9
2	Cíle práce	10
3	Současný stav řešené problematiky	11
3.1	Sepse	11
3.1.1	Diagnostika sepse	13
3.1.2	Markery sepse	13
3.1.2.1	C-reaktivní protein	13
3.1.2.2	Prokalcitonin	14
3.1.2.3	Cytokiny	15
3.1.2.4	Sérový amyloid A	16
3.1.2.5	CD64	17
3.1.3	Mikrobiologická diagnostika sepse	18
3.1.4	Novorozenecká sepse	18
2.	Průtoková cytometrie	21
3.2.1	Princip průtokové cytometrie	22
3.2.2.1	Fluidní systém	22
3.2.2.2	Optický systém	23
3.2.2.3	Systém detekce a vyhodnocení dat	25
4	Materiál a metody	26
1.	Materiál	26
2.	Metody	26
5	Výsledky	28
5.1	Časná sepse	28
5.2	Pozdní sepse	29
6	Diskuze	33
7	Závěr	35

8	Seznam použitých zkratek	36
9	Seznam použité literatury	37
10	Seznam příloh	44

1 Úvod

I přes rozsáhlý výzkum a pokrok v oblasti moderní medicíny je sepse celosvětově nejčastější příčinou úmrtí u novorozenců, nejvíce ohroženou skupinou jsou děti předčasně narozené a ty s nízkou porodní váhou. Klíčem ke snížení mortality septických novorozenců je včasná diagnostika. Problémem však je, že sepse u novorozenců má v časně fázi pouze nespecifické klinické příznaky. Pokud jsou tyto symptomy přítomny, je v klinické praxi preventivně zahájena antibiotická terapie.

Zlatým standardem v diagnostice novorozenecké sepse je mikrobiologická kultivace vzorku periferní krve tzv. hemokultura, dále je využíváno stanovení CRP, prokalcitoninu, absolutního počtu leukocytů, neutrofilů a nezralých neutrofilů. Nicméně ani jedna z těchto metod není ideální pro včasnou diagnostiku, ať už kvůli délce trvání, nebo nízké specifitě.

Vzhledem k těmto nedostatkům jsou hledány nové markery, ty by měly ideálně umožňovat diagnostiku časně i pozdní fáze infekce a rychle reagovat na účinnost zavedené léčby. Senzitivita ideálního markeru by se měla blížit 100 %, stejně jako jeho negativní prediktivní hodnota. Vzhledem ke skupině pacientů by měl být marker vyšetřitelný z malého množství vzorku, vyšetření by mělo být rychlé, jednoduché a levné. Žádný z doposud používaných markerů novorozenecké sepse tato kritéria nesplňuje. Jako vhodná alternativa se jeví stanovení CD64 pomocí průtokové cytometrie. Výhodou použití této metody jsou rychle dostupné výsledky a potřeba pouze malého objemu krve.

2 Cíle práce

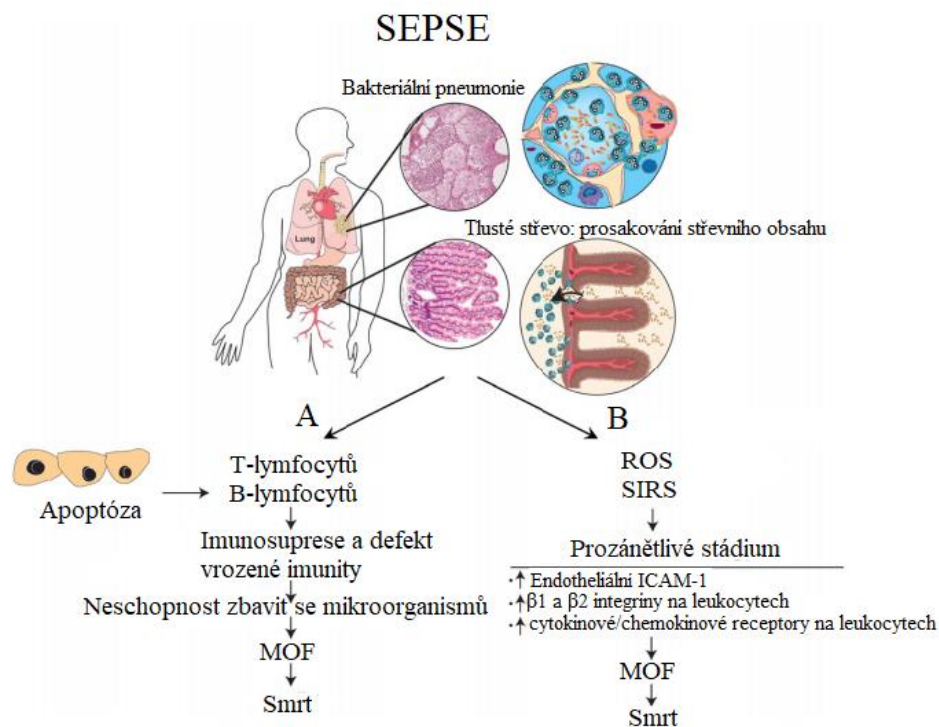
1. Vypracovat literární rešerši na téma diplomové práce
2. Zmapovat reakce imunokompetentních subpopulací u novorozenců v septickém stavu
3. Vyvinout prakticky použitelnou metodiku pro detekci časných forem novorozenecké sepse pomocí průtokové cytometrie

3 Současný stav řešené problematiky

3.1 Sepsa

První použití slova „sepsa“ je přisuzováno Hippokratovi, který jím označil rozklad organické hmoty. Dlouhá léta bylo studium sepsy a snahy o hledání nových léčebných postupů komplikováno vzájemným zaměňováním pojmů bakteremie, septikemie, sepsa a dalších, což vedlo k obtížné interpretaci výsledků klinických studií (Průcha *et al.*, 2015). V roce 1992 na konferenci Critical Care Society byla ustanovena definice, která je uznávána dodnes. Sepsa je tedy systémová zánětlivá reakce organismu na přítomnost infekčního agens a její průběh je rozdělen na tři stádia: sepsa, těžká sepsa a septický šok. Rovněž byl ve spojitosti se sepsí zaveden pojem systémová zánětlivá reakce (SIRS-systemic inflammatory response syndrom). Tento stav je charakterizován zvýšením tělesné teploty nad 38 °C nebo naopak jejím snížením pod 36 °C, dále pak zvýšenou tepovou a respirační frekvencí. V krvi se pak projevuje počtem leukocytů nad 12 000/mm³ nebo pod 4 000/mm³ (Bone *et al.*, 1992).

Sepsa může postihnout kteréhokoliv člověka, bez ohledu na věk (obr. č 1 vznik sepsy). Největší riziko však představuje pro seniory a novorozence, zvláště pak pro ty předčasně narozené. Obecně jsou ohroženi lidé se získanou formou imunitní nedostatečnosti, onkologičtí pacienti, osoby trpící jaterní cirhózou, pankreatitidou nebo lidé léčení imunosupresivní nebo biologickou léčbou.



Obr. č. 1: Vznik sepse

Legenda:

Sepse může začít jako bakteriální pneumonie nebo jako peritonitis spojenou s únikem střevního obsahu do břišní dutiny.

A: Následující události vedou k apoptóze T a B-lymfocytů a imunosupresi. To vede k neschopnosti organismu zbavit se bakterií, což vyústí v multiorgánové selhání (MOF), které následuje smrt.

B: Rozvoj sepse může vézt ke tvorbě reaktivních kyslíkových radikálů (ROS), a k systémové zánětlivé reakci (SIRS), rovněž dochází k imunoaktivaci endotheliálních buněk a leukocytů, v konečném stádiu dochází k MOF a smrti. Upraveno podle: Ward *et* Bosmann, 2012

3.1.1 Diagnostika sepse

I přes všechny pokroky moderní medicíny a antimikrobiální terapie, je v USA sepse nejčastější příčinou smrti těžce nemocných pacientů (Martin, 2014). Ročně zde má sepse na svědomí stejný počet úmrtí jako akutní infarkt myokardu (Angus *et al.*, 2001). Studie prokázaly, že každá hodina prodlení v diagnostice sepse znamená vyšší mortalitu pacientů (Kumar *et al.*, 2009). Včasná diagnostika je tedy v léčbě klíčová. Aby byla sepse diagnostikována z klinického hlediska, musí být u pacienta přítomny nejméně dva z těchto symptomů:

- Tělesná teplota $> 38\text{ °C}$ nebo $< 36,5\text{ °C}$
- Tepová frekvence > 90 tepů za minutu
- Dechová frekvence > 20 vdechů za minutu
- Zvýšený počet bílých krvinek ($>12\ 000/mm^3$)

Laboratorní diagnostika sepse spočívá v použití metod klinické biochemie, hematologie, imunologie, mikrobiologie a molekulární biologie. Klíčovou roli v diagnostice sepse hrají biomarkery, které indikují jak přítomnost sepse tak, zdali je původcem infekce bakterie nebo virus (Marshall *et Reinhart*, 2009). Pomocí biomarkerů je rovněž možné rozlišit, zda se jedná o infekci lokální nebo systémovou (Pierrakos *et Vincent.*, 2010). V rutinní klinické praxi se však využívá pouze zlomek biomarkerů, důvodem je to, že jsou to převážně markery orgánové dysfunkce, ke které u sepse dochází.

3.1.2 Markery sepse

3.1.2.1 C-reaktivní protein

C-reaktivní protein řadíme mezi proteiny akutní fáze, v klinické praxi je to nejpoužívanější marker zánětlivých reakcí organismu. Objeven byl v roce 1930 Tillettem a Francisem u pacientů s pneumokokovou pneumonií. Jedná se o cyklickou sloučeninu, sestávající z pěti identických nekovalentně vázaných podjednotek (Peisajovich *et al.*, 2008).

CRP je syntetizován játry s maximem produkce 24-48 hodin po zánětlivém podnětu. Jeho produkce v hepatocytech je stimulována především interleukinem 6. Hlavní funkcí CRP je vazba cizorodých struktur a aktivace komplementového systému, klasickou i alternativní cestou, stimulace opsonizace a fagocytózy (Peisajovich *et al.*, 2008).

Koncentrace CRP u zdravých osob je menší než 5 mg/l, výši jeho koncentrace je možno využít diferenciálně diagnosticky k rozlišení bakteriální infekce od virové (Haran *et al.*, 2013). Zatímco u bakteriálních infekcí dosahuje hodnot 100-300 mg/l a více, u virových, dochází jen k mírnému vzestupu CRP a to v rozmezí 20-50 mg/l. Zvýšenou koncentraci CRP můžeme rovněž pozorovat u autoimunitních onemocnění jako je revmatoidní artritida, nádorových onemocnění, traumatu nebo po chirurgických zákrocích (Ansar *et Ghosh*, 2013). Právě i z tohoto důvodu není CRP specifickým parametrem přítomnosti infekčního onemocnění, proto se v klinické praxi významně uplatňuje peptid, kterým je prokalcitonin (Průcha *et al.*, 2015).

3.1.2.2 Prokalcitonin

V posledních letech se stal PCT významným biomarkerem v diagnostice bakteriální infekce. Jedná se o peptid, který je prekurzorem hormonu kalcitoninu, který je zodpovědný za kontrolu hladin vápníku v krvi. Za fyziologických podmínek je produkován štítnou žlázou, ale v případě sepse jej může syntetizovat kterákoliv buňka (Morgenthaler *et al.*, 2003). Fyziologická koncentrace PCT u zdravých jedinců se pohybuje v rozmezí od 0-0,5 µg/l, hodnoty vyšší než 2 µg/l již ukazují na systémovou infekci (tabulka č. 1). Jednou z největších výhod PCT oproti ostatním markerům v diagnostice sepse je rychlé zvýšení jeho koncentrace, které je možno pozorovat již po 3-6 hodinách.

PCT je rovněž vhodným ukazatelem úspěšnosti léčby, jelikož jeho poločas rozpadu je 24 hodin. Při monitorování pacienta s podezřením na bakteriální sepsi se doporučuje stanovení PCT jedenkrát denně, kdy pokles o 50% ukazuje na úspěšně nasazenou léčbu.

Ve srovnání s C-reaktivním proteinem má prokalcitonin v diagnostice sepse vyšší specifitu a senzitivitu, nicméně nesplňuje úlohu ideálního biomarkeru sepse, jelikož jeho senzitivita není dostatečná u pacientů s abscesem, tuberkulózou nebo u invazivních mykotických infekcí (Porcel *et al.*, 2009).

Tabulka č. 1: Vztah koncentrace PCT ke klinickému stavu (Malina, 2012)

PCT (μg/l)	hodnocení	Vybrané klinické stavy	poznámka
0-0,5	Normální hodnoty	Zdravé osoby	Nevylučuje lokalizovanou nebo jinou než bakteriální infekci
0,5-2	Mírné zvýšení	Lokalizovaný infekční zánět, chronický zánět, virózy	Hodnoty běžné v časném pooperačním období a při těžké renální isuficienci
2-10	Vysoké hodnoty	Systémová bakteriální infekce, intenzivní SIRS nebakteriálního původu	
>10	Velmi vysoké hodnoty	Těžká sepse, multiorgánové selhání	Při těžkých bakteriálních infekcích až 1000 μg/l

3.1.2.3 Cytokiny

Cytokiny hrají klíčovou roli v imunitní odpovědi organismu na infekci. Rozlišujeme dva typy cytokinů: prozánětlivé a protizánětlivé. Prozánětlivé cytokiny stimulují systémový zánět, zatímco protizánětlivé zánětlivé reakce naopak inhibují a podporují hojení. Biomarkery vhodnými k diagnostice systémové zánětlivé odpovědi jsou cytokiny, zejména pak protizánětlivý interleukin-10 (IL-10) a prozánětlivé cytokiny interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), interleukin-18 (IL-18) a tumor nekrotizující faktor α (TNF- α).

IL-6 označovaný též jako interferon- β 2 je produkován různými typy buněk: monocyty, fibroblasty, endoteliálními buňkami, keratinocyty, T lymfocyty a nádorovými buňkami. Působí jako diferenciační faktor pro B-lymfocyty a aktivačním faktorem pro T-lymfocyty. Jeho zvýšené hodnoty v krevním oběhu můžeme pozorovat již po čtyřech až šesti hodinách. Zvýšené hodnoty IL-6 jsou markerem onkologických (Łukaszewicz *et al.*, 2007), kardiovaskulárních (Patterson *et al.*, 2010) a autoimunitních onemocnění (Ishihara *et Hirano*, 2002). Studie rovněž prokázaly spojitost zvyšující se hladiny IL-6 s rozvojem sepse (Gouel-Chéron *et al.*, 2012).

Interleukin-8 se řadí mezi chemokiny a je produkován makrofágy, epiteliálními a endoteliálními buňkami. IL-8 je jedním z hlavních mediátorů imunitní odpovědi, jeho primární funkcí je indukce chemotaxe v cílových buňkách, neutrofilních granulocytech (Chaudhry *et al.*, 2013). Proto je také označován jako neutrofilní chemotaktický faktor. U pacientů trpících sepsí byly naměřeny jeho zvýšené hladiny v séru a plasmě (Livaditi *et al.*, 2006).

Makrofágy produkováný IL-18 stimuluje NK buňky a některé T-lymfocyty k produkci interferonu γ , který hraje klíčovou roli v aktivaci makrofágů (Chaudhry *et al.*, 2013). IL-18 indukuje imunitní odpověď na mikrobiální infekci, v této souvislosti pozorujeme jeho zvýšené hladiny v séru u pacientů se sepsí (Rau *et al.*, 2010).

TNF- α se účastní akutní fáze zánětu a je produkován různými typy buněk, jako jsou T-lymfocyty, makrofágy a astrocyty (Scheringa *et Marquet*, 1990). Studie na dobrovolnících prokázaly, že po injekčním podání endotoxinu vzrostla jeho hladina v séru (Hesse *et al.*, 1988).

Interleukin-10 je spojen s pozdní fází zánětlivé imunitní odpovědi, a je jedním z rozhodujících cytokinů v patofyziologii sepse (Wu *et al.*, 2009). Je tvořen monocyty, makrofágy, T a B lymfocyty a neutrofilů. IL-10 se řadí mezi protizánětlivé cytokiny a tudíž hraje významnou roli v utlumení zánětlivé reakce navozené podáním LPS.

3.1.2.4 Sérový amyloid A

Sérový amyloid A patří mezi apo-lipoproteiny a je většinou tvořen v játrech (Patel *et al.*, 1998), mimo játra je syntetizován v endoteliálních buňkách, makrofázích a adipocytech (Malle *et al.*, 1993; Jensen *et al.*, 1998). Řadí se mezi proteiny akutní fáze a je markerem pro bakteriální a virová onemocnění (Cetinkaya *et al.*, 2009).

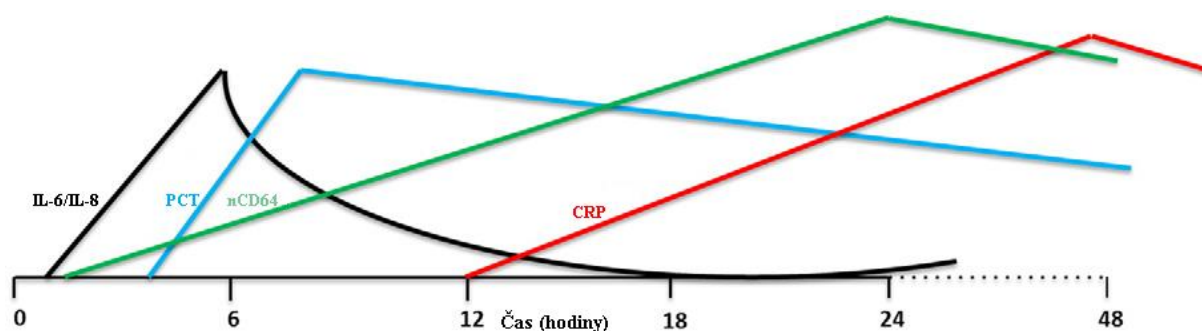
V krevním řečišti je vázán na HDL, tato vazba však způsobuje funkční změny HDL. V první řadě je snížena jeho afinita vůči enzymu lecitin cholesterol acyl transferase (LCAT), zodpovědného za esterifikaci cholesterolu (Steinmetz *et al.*, 1989; Kumon *et al.*, 1998). Ve druhé řadě dochází ke snížení afinity k hepatocytům, zatímco afinita k makrofágům a neutrofilům je zvýšena, tím je vytvořen tok cholesterolu z místa zánětu směrem k játrům (Malle *et al.*, 1993). Kvůli těmto změnám dochází ke snížení hodnoty esterifikovaného cholesterolu, což vysvětluje častý výskyt kardio-vaskulárních chorob u pacientů se zánětlivým onemocněním (Fyfe *et al.*, 1997).

3.1.2.5 CD64

CD64 je vysoce afinitní imunoglobulin, který je slibným markerem pro diagnostiku bakteriální sepsy. CD64 je rovněž markerem aktivovaných neutrofilů, které jej v malé míře exprimují (Davis, 2005). Je znám také jako Fc-gamma receptor 1 a je vysokoafinitním receptorem pro monomerní IgG protilátky a podílí se tak na procesu fagocytózy opsonizovaných bakterií. Ke zvýšení exprese receptoru na povrchu neutrofilů dochází přibližně za hodinu po invazi (Obr. č. 2), předpokládá se tedy, že se jedná o marker časných fází infekce (van der Meer *et al.*, 2007). Jeho exprese nezávisí na pohlaví, ale u novorozenců je vyšší než u dospělých (Maeda *et al.*, 1996). Zajímavostí je, že novorozenci krmení sunarem vykazují větší expresi CD64 než ti kojení mateřským mlékem (Grönlund *et al.*, 1999).

K jeho kvantifikaci je v klinické praxi využíváno metod průtokové cytometrie. Tento přístup se ukázal jako velmi slibný zvláště při diagnostice sepsy u novorozenců. U zdravých novorozenců je exprese CD64 stabilní během prvních týdnů života, ačkoliv z nějakého důvodu je vyšší než u dospělých (Layseca-Espinosa *et al.*, 2002).

CD64 má spoustu vlastností, které z něj dělají klinicky vhodný marker sepsy. Jednak má citlivost 90% a více, jeho specifita se pohybuje v rozmezí 90 % - 100 % (Hoffmann, 2009). Další výhodou je možnost jeho stanovení pomocí metod průtokové cytometrie, které umožňují identifikovat a kvantifikovat CD64 na neutrofilech do čtyř hodin, za použití minimálního objemu krve (Venet *et al.*, 2011).



Obr. č. 2: Dynamika markerů sepsy, upraveno podle GILFILLAN, Margaret; BHANDARI, Vineet. Biomarkers for the diagnosis of neonatal sepsis and necrotizing enterocolitis: Clinical practice guidelines. *Early Human Development*, 2017, 105: 25-33.

3.1.3 Mikrobiologická diagnostika sepse

V běžné klinické praxi se pacientům se suspektní sepsí odebírá krev na kultivační mikrobiologické vyšetření, takzvanou hemokulturu. Pacient s podezřením na bakteriální infekci má zvýšenou hladinu CRP (>60 mg/l), a zvýšenou tělesnou teplotu nad 38 °C. Pro vyloučení falešně negativních výsledků je nutné provést odběr na hemokulturu dříve než je zahájena léčba antibiotiky.

Odebírá se 10 ml žilní krve na jednu hemokultivační nádobku, zpravidla se odebírají dva vzorky v jedné sadě, na aerobní a anaerobní kultivaci. Hemokultivační lahvičky jsou vloženy do kultivátoru, který udržuje stálou kultivační teplotu 37 °C. Po pomnožení bakterií je obsah lahvičky vyočkován na tuhou kultivační půdu. Z roztěru je poté zhotoven mikroskopický preparát, který je nabarven podle Grama. Vykultivované bakteriální kmeny jsou identifikovány pomocí biochemických testů. Součástí mikrobiologické diagnostiky je též stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC). Pozitivní výsledek potvrzuje přítomnost bakterií v krvi pacienta (bakterémii). Pro vyloučení falešné positivity, tedy kontaminace vzorku, je paralelně prováděna kultivace stěru z kůže pacienta v místě odběru.

3.1.4 Novorozenecká sepse

Sepse představuje významný faktor mortality a morbidit u novorozenců, zejména pak v rozvojových zemích (Lawn *et al.*, 2006). Incidence novorozenecké sepse je 3-40 případů na 1000 porodů, rozsah mortality se pohybuje od 9 % do 20 % (Sundaram *et al.*, 2009). Novorozeneckou sepsi rozdělujeme podle stáří infikovaného novorozence na časnou sepsi (EOS) a na pozdní sepsi (LOS) (Umlauf *et al.*, 2013). U časně sepse dochází k jejímu rozvoji do 72 hodin od porodu a příčinou bývají antenatální a perinatální faktory, jako například maternální kolonizace B-streptokoky nebo maternální chorioamnionitis. K rozvoji LOS dochází po více jak 72 hodinách od porodu a je typická pro předčasně narozené děti, jedná se většinou o nozokomiální infekci, pocházející například z mechanické ventilace nebo vaskulárních katetrů (Ganatra *et al.*, 2010).

Důležitým faktorem pro léčbu novorozenecké sepse je včasná diagnostika, zde ovšem narážíme na problém, jelikož v brzké fázi má pouze nespecifické a variabilní klinické symptomy (Shi *et al.*, 2016). Ve všeobecnosti lze říci, že se sepse dá diagnostikovat třemi různými způsoby, a to mikrobiologickou kultivací vzorku krve, pomocí laboratorních

markerů a přítomností klinických příznaků (tab. 2). Zlatým standardem v diagnostice novorozenecké sepse je stanovení v hemokultuře. Tato metoda má však své nedostatky, jedním z nich je, že výsledky vyšetření jsou dostupné až po 48-72 hodinách, druhým nedostatkem je nízká senzitivita pro brzká stádia (Delanghe *et al.*, 2015), zvláště kvůli časté antibiotické terapii podávané matce v perinatálním období, u dětí s nízkou porodní váhou je také problém s odběrem dostatečného množství krve. Další možnosti diagnostiky novorozenecké sepse nabízí hematologická vyšetření jako je stanovení absolutního počtu leukocytů, neutrofilů a nezralých neutrofilů, biochemicky lze stanovit podle hladiny CRP. Nicméně ani jedna z těchto metod nedosahuje požadované senzitivity a specifity (Kurt *et al.*, 2007). Jako potenciálně slibný marker EOS se jeví hepcidin, tento peptid významně ovlivňuje metabolismus železa v těle, jeho působením je degradován ferroportin a tím je zablokován export železa z buňky. Tímto procesem je snížena biologická dostupnost železa pro orgány a dochází k hypoferrémii, která je klíčovým regulačním procesem v boji s infekcí (Tabbah *et al.*, 2018).

Aby mohla být novorozenecká sepe diagnostikována čistě na základě klinických příznaků, musí být splněny následující podmínky: ošetřující lékař zahájil vhodnou antimikrobiální léčbu sepse (trvání nejméně 5 dnů), v hemokultuře nebyly detekovány žádné patogeny nebo nebylo vyšetření neprovedeno, není patrná žádná infekce na jiném místě. Současně s těmito podmínkami musí rovněž platit nejméně dvě z těchto kritérií:

- febrilie ($> 38\text{ }^{\circ}\text{C}$) nebo nestabilní teplota (nutné časté změny nastavení inkubátoru) nebo hypotermie ($< 36,5\text{ }^{\circ}\text{C}$)
- tachykardie ($> 200/\text{min}$) nebo výskyt bradykardií či zvýšení četnosti jejich výskytu ($< 80/\text{min}$)
- doba kapilárního návratu (Capillary Refiling Time) $> 2\text{ s}$
- výskyt apnoe nebo zvýšení jejich četnosti ($> 20\text{ s}$)
- nevysvětlená metabolická acidóza
- nově zjištěná hyperglykémie
- jiné příznaky sepse - barva pokožky (pouze pokud se neměří CRT), zvýšená potřeba kyslíku (intubace), nestabilní celkový stav pacienta, apatie

Tabulka č. 2: Stratifikace sepse dle klinického průběhu a laboratorního vyšetření

	Hemokultura	Laboratorní markery	Klinické příznaky
Sepse jistá	+	+	+
Sepse pravděpodobná	-	+	+
Sepse klinická	-	-	+
Sepse nepřítomna	-	-	-

2. Průtoková cytometrie

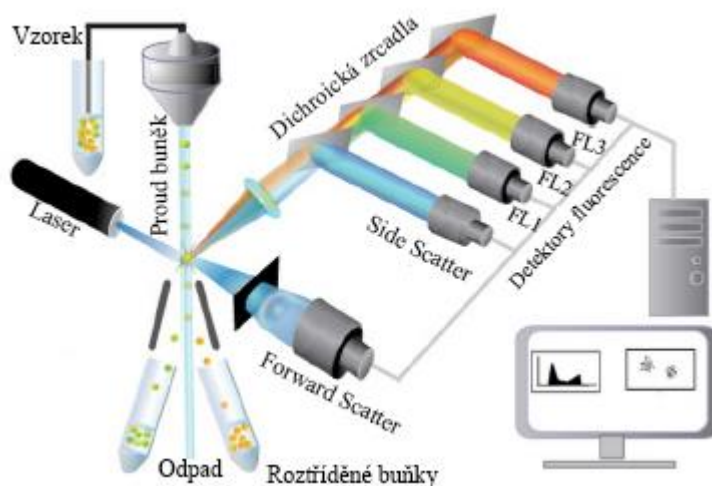
Průtoková cytometrie je bioanalytická metoda, spojující v sobě principy fluorescenční mikroskopie a hematologického analyzátoru. Tato metoda umožňuje kvantitativní a kvalitativní analýzu vlastností buněk, nebo jiných částic, během průchodu laserovým paprskem. Je založena na měření a následné analýze fyzikálních charakteristik vyšetřovaných buněk unášených nosnou kapalinou a interagujících se světelným zářením. Největší výhodou této metody je rychlost analýzy, která může být až 10 tisíc buněk za sekundu. Průtoková cytometrie má rovněž široké uplatnění, může být použita například k určení ploidie, stanovení obsahu jaderné DNA nebo k třídění chromozómů. Pravděpodobně nejširší uplatnění však nachází v oblasti medicínské diagnostiky, a to díky její vysoké senzitivitě, rychlosti laboratorní odezvy, široké paletě analytických možností a relativně nízké ceně za vyšetření.

Průtoková cytometrie jak ji známe dnes, vznikla v roce 1960 na půdě Stanford University v Kalifornii (Herzenberg *et al.*, 2002). Své první klinické využití dostala v osmdesátých letech, při diagnostice získané imonodeficiencie u lidí napadených virem HIV (Mandy, 2004).

Většina průtokových cytometrů je schopna analyzovat nejméně šest parametrů současně, velikost buněk, která je zobrazena pomocí FSC, granularitu buněk pomocí SSC a intenzita svitu fluorescenčně značených monoklonálních protilátek pro detekci komplementárních antigenů na povrchu i uvnitř analyzovaných buněk.

3.2.1 Princip průtokové cytometrie

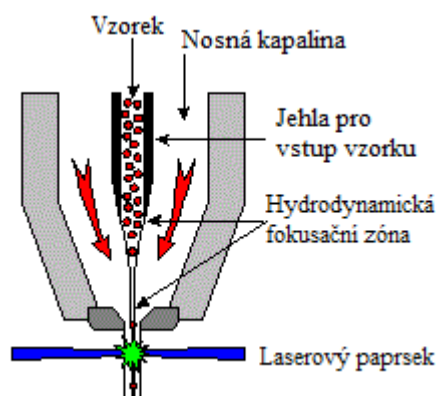
Průtokový cytometr je složen ze tří komponent (Obr. č. 3), z fluidního systému, který zajišťuje transport analyzovaných částic do měřicí komory, optického systému, ve kterém dochází působením laseru ke vzniku signálu a počítačového systému, kde se signál zpracovává.



Obr. 3: Schéma komponent průtokového cytometru, upraveno podle: <http://www.biotech.illinois.edu/flowcytometry>

3.2.2.1 Fluidní systém

Ve fluidním systému (Obr. č. 4) jsou analyzované částice transportovány do měřicí komory, pomocí nosné kapaliny, kterou bývá nejčastěji modifikovaný fyziologický roztok. Pro analýzu je nutné, aby částice procházely systémem jedna za druhou, a aby byly v ideální pozici k senzorům. Správná orientace částic je zajištěna hydrodynamickou izofokusací nosné kapaliny, do které je vzorek vstříkován tak, aby nedošlo k jeho smísení s tekutinou, ale k vytvoření tzv. koaxiálního proudu. Průchod právě jedné částice je umožněn kvůli zúžení kapiláry. Rychlost průtoku nosné kapaliny kapilárou lze uživatelsky upravovat, ovšem s rychlejší analýzou roste i počet nepřesností měření.

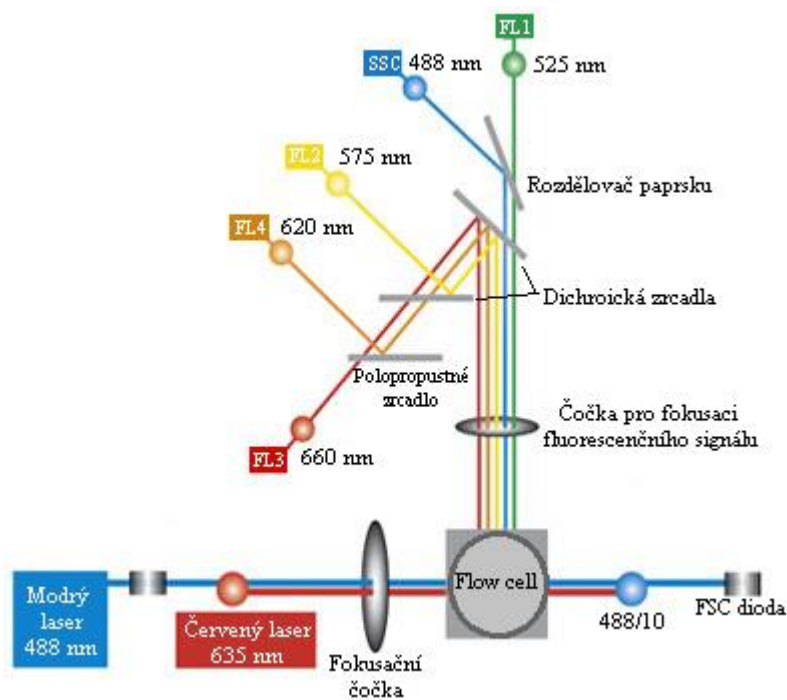


Obr. 4: Systém fluidiky v měřící komoře průtokového cytometru, upraveno podle: <https://research.medicine.umich.edu/office-research/biomedical-research-core-facilities/flow-cytometry/training/lesson-four-cytometer-subsystems/lesson-four-cytometer-subsystems-fluidics>

3.2.2.2 Optický systém

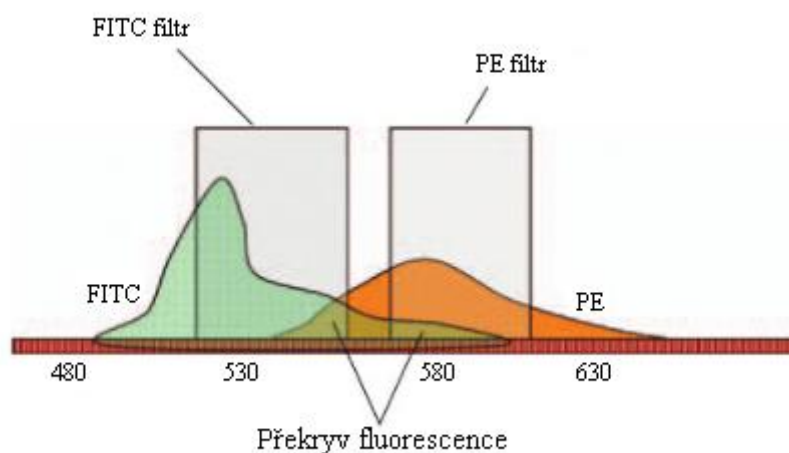
V optickém systému průtokového cytometru dochází k interakci analyzovaných částic značených fluorochromy a elektromagnetického vlnění emitovaného zdrojem monochromatického záření. Optický systém se skládá z excitační optiky a sběrných optických cest (Obr. č. 5). Excitační optika je tvořena zdrojem monochromatického koherentního záření, nejčastěji laserem, a optickými členy, které slouží k transportu a zaostření paprsku.

Fluorescenční barvivo se váže na různé buněčné komponenty, jako například na DNA nebo RNA. Po průchodu laserovým paprskem molekuly fluorescenčního barviva excitují na vyšší energetické hladiny, při jejich návratu na původní hladiny dochází k emisi světla o vyšší vlnové délce. Použitím více fluorochromů, které mají stejnou excitační vlnovou délku a rozdílnou vlnovou délkou emise, je možné měřit různé charakteristiky souběžně. Mezi často používané fluorochromy patří fluorescein isothiokyanát (FITC), phycoerythrin (PE), peridinin chlorophyll protein (PerCP) a allophycocyanin (APC). Tato barviva, s výjimkou APC, se využívají právě proto, že mají stejnou vlnovou délku excitace a to 488 nm. To znamená, že na analýzu takto značených buněk vystačíme pouze s jedním laserem, nejčastěji používaným je argonový 488 nm modrý laser. Jelikož APC není touto vlnovou délkou excitováno, je potřeba využít dalšího zdroje záření, kterým může být například 635 nm červená laserová dioda (Virgo *et* Gibbs, 2012).



Obr. 5: Schéma optického systému průtokového cytometru, upraveno podle <https://www2.unb.ca/emunit/FACSCalibur.html>, online: 20. 3. 2018

Při použití více fluorochromů však může dojít k interferenci fluorescence kvůli překrývání emisních spekter (Obr. č. 6). Příkladem je současné použití FITC a PE, jak již bylo řečeno oba tyto fluorochromy excitují při 488 nm, ale maximální emise dosahují při 520 a 576 nm. Ačkoliv je toto rozpětí vlnových délek emise relativně široké, dochází k překryvu emitovaného světla u FITC a PE, i když jsou použity filtry, které by tento překryv měly eliminovat (Naeim *et al.*, 2009). Tento problém řeší, v dnešní době již dostupné cytometrické programy, které jsou schopny opravit nebo eliminovat překryv fluorescence. Tato oprava se nazývá kompenzace, a je jedním z nejtěžších technických aspektů multibarevné průtokové cytometrie. Proces kompenzace využívá aplikaci lineární algebry s cílem opravit překryvy všech barev na všech detektorech, tak aby byla data normalizována a každý parametr obsahoval informaci z jedné barvy (Roederer, 2001).



Obr. 6: Příklad překryvu fluorescence u fluorochromů FITC a PE, upraveno podle (Roederer, 2001)

3.2.2.3 Systém detekce a vyhodnocení dat

Světelné signály z optického systému jsou detekovány dvěma způsoby. Fotony emitované fluorescenčními barvivy a signál bočního rozptylu (side scatter, SSC), je detekován fotonásobiči, zatímco signál dopředného rozptylu (forward scatter, FSC) je detekován fotodiodou. Každý fotonásobičový detektor je vybaven příslušným filtrem pro danou vlnovou délku.

Proud fotonů dopadající na detektor je převeden na tok elektronů, který zesílen zvýšením napětí mezi katodou a anodou na měřitelné hodnoty elektrického proudu. Kdy nejvyšší hodnota pulzu odpovídá nejvyšší hodnotě fluorescence dané částice.

Data z průtokového cytometru mohou být graficky znázorněna ve formě histogramů, nebo jako takzvaný dot plot či density plot. Každé z těchto zobrazení má své výhody i nevýhody, ale nejčastěji využívaným je dot plot (Virgo *et* Gibbs, 2012). Rovněž výsledky mohou být vyjádřeny různými způsoby, buď jako procentuální pozitivita, intenzita fluorescence nebo množství buněk na μL (Maher *et* Fletcher, 2005).

4 Materiál a metody

1. Materiál

V rámci diplomové práce bylo analyzováno 217 vzorků od předčasně narozených novorozenců hospitalizovaných na Novorozeneckém oddělení Fakultní nemocnice Olomouc a to v období od 3/2016 do 07/2017.

Pacienti byli rozděleni do dvou skupin podle doby oděru vzorku. U první skupiny předčasně narozených dětí byl v rámci standardního postupu pracoviště proveden odběr mezi 12. a 24. hodinou života, v rámci stanovení počtů krevních elementů a biochemického vyšetření a také diagnostiky časně novorozenecké sepsy. U druhé skupiny pacientů bylo vyšetření provedeno v rámci kontrolního laboratorního vyšetření, nebo při podezření na pozdní novorozeneckou sepsi, tedy kdykoliv, ale ne dříve než po 72. hodině života.

K analýze vzorku nebylo třeba zvláštního odběru, vyšetření byla provedena z materiálu získaného pro odběry prováděné standardním způsobem dle zvyklostí pracoviště. Doplnění vyšetření bylo v souladu s informovaným souhlasem stvrzeným zákonnými zástupci dítěte.

2. Metody

K analýze byly použity vzorky odebrané do zkumavek VACUETTE® EDTA (1 ml) k analýze – stanovení počtu krevních elementů a diferenciálního rozpočtu. U všech vzorků bylo provedeno stanovení a kvantifikace určených povrchových buněčných markerů metodou průtokové cytometrie. Analýza získaných vzorků byla realizována metodou vícebarevné průtokové cytometrie s panelem protilátek proti CD3, CD4, CD8, CD16+CD56+, CD14, CD15, CD163, CD19, CD138, CD45RO, CD64 a patřičných izotypových kontrol (EXBIO, eBioscience, BD Biosciences) na cytometru FACS Canto II (Becton Dickinson) s použitím analytického software FACS Diva ver. 8.0 1 (BD Biosciences).

Vzorky byly zpracovány metodou Lyse No Wash. Tedy 50 μ L periferní krve bylo inkubováno s 5 μ l protilátek po dobu 30 min. v temnu při 5 °C. Následně byly odstraněny erytrocyty přidavkem lyzačního roztoku BD FACS lyse (Becton Dickinson). Lyza probíhala 30 min v temnu při 25 °C.

Procentuální zastoupení cílové subpopulace CD64 na CD15 pozitivních granulocytech bylo stanovováno s použitím analytického software FACS Diva ver. 8.0 1 (BD Biosciences), přičemž k analýze dat bylo akvírováno minimálně 50 000 událostí v gate granulocytů. Ověření positivity CD64 bylo provedeno pomocí mediánu fluorescenční intenzity, jako vztažná populace byly použity T-lymfocyty.

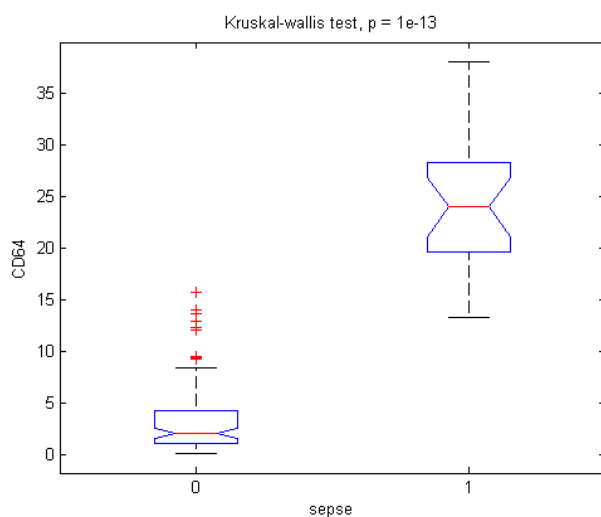
Ostatní diagnostika a terapie dětí byla prováděna dle zavedených diagnostických a terapeutických standardů pracoviště, včetně stanovení běžných biochemických markerů. Před zahájením terapie byl proveden odběr krve k mikrobiologickému hodnocení.

Následně byl vyhodnocen stav a průběh onemocnění u dětí, které byly zařazeny do kategorií dle klinického průběhu a výsledků laboratorního vyšetření: I. Jistá sepe (pozitivní klinické i laboratorní příznaky, pozitivní hemokultura), II. Pravděpodobná sepe (pozitivní klinické i laboratorní příznaky, negativní hemokultura). III. Sepe klinická (pozitivní klinické, negativní laboratorní příznaky a hemokultura), IV. Sepe nepřítomna (negativní klinické, laboratorní příznaky i hemokultura). Získaná data (uvedena v příloze 1 a 2) byla statisticky zpracována za použití Kruskal–Wallis testu. Bylo provedeno srovnání hodnot markeru CD64 v jednotlivých kategoriích a zhodnocení diagnostické schopnosti markeru pro diagnostiku sepse.

5 Výsledky

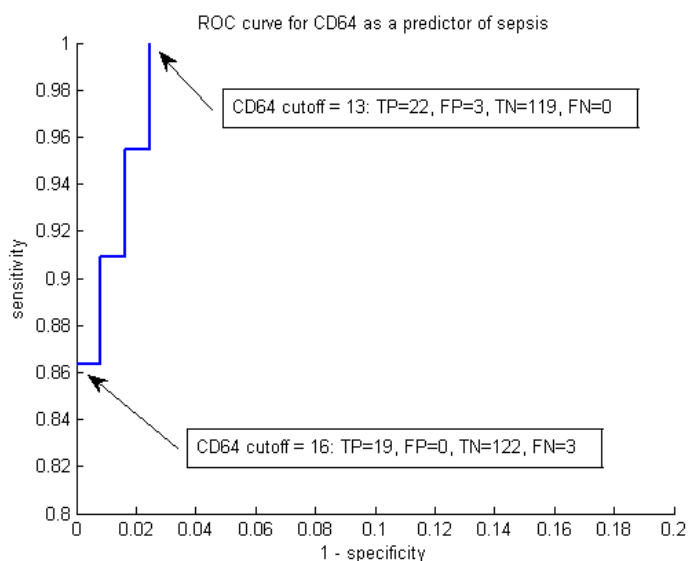
5.1 Časná sepsě

V první skupině pacientů bylo vyšetřeno 174 vzorků (174 pacientů), z toho mělo jistou (1) nebo pravděpodobnou sepsi (22) celkem 23 pacientů, u ostatních se o infekční komplikaci nejednalo. U všech 23 pacientů s jistou nebo pravděpodobnou sepsí byla zahájena ATB terapie dle standardů pracoviště. Ze statistického zpracování výsledků je zřejmá významná asociace hodnot nCD64 a výskytem sepsě (jisté nebo pravděpodobné). (Graf 1)



Graf 1. Hodnoty CD64 – srovnání skupiny pacientů s EOS a bez sepsě.

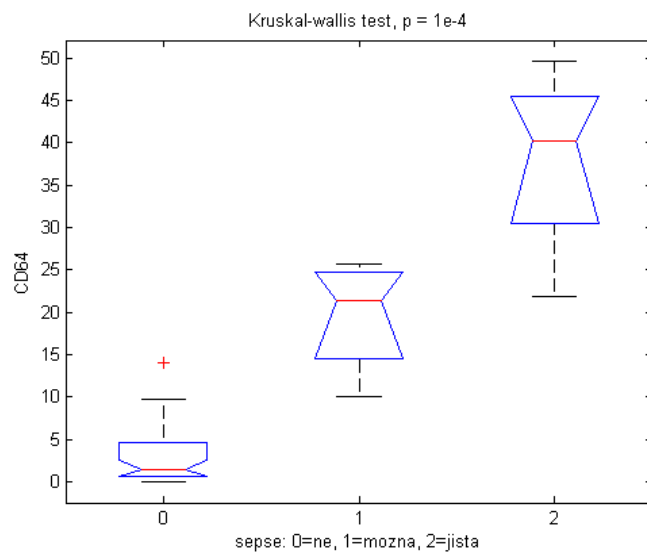
Výsek ROC křivky (graf 2) ukazuje výbornou prediktivní hodnotu nCD64 pro novorozeneckou sepsi (jistá, pravděpodobná), jako ideální cut-off hodnota se jeví 13% (senzitivita a specifická, negativní prediktivní hodnota, pozitivní prediktivní hodnota).



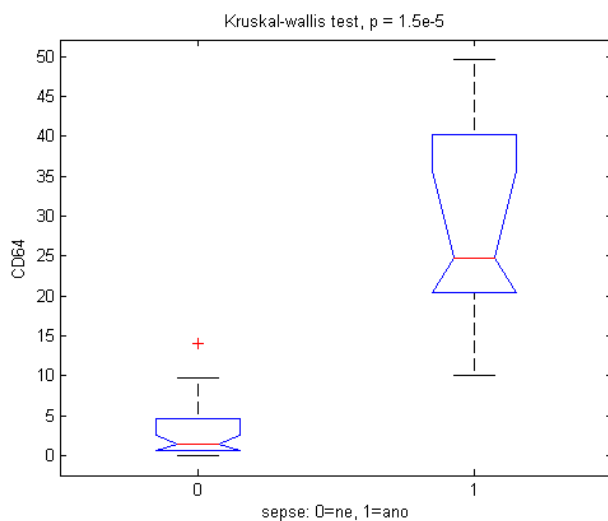
Graf 2. Výšek ROC křivky, srovnání statistických parametrů pro jednotlivé cut-off hodnoty (TP - true positive, FP – false positive, TN – true negative, FN – false negative)

5.2 Pozdní sepse

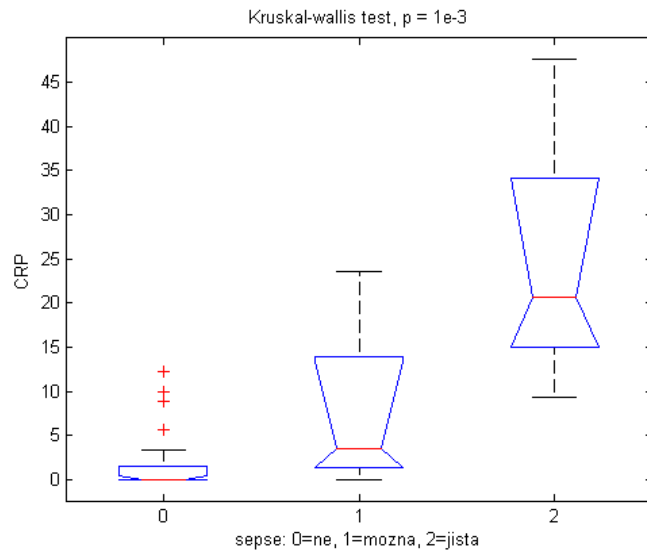
Ve druhé skupině (diagnostika pozdní sepse) – bylo vyšetřeno 43 vzorků, u 4 pacientů se jednalo dle kritérií o sepsi jistou, u 4 o sepsi pravděpodobnou, 35 pacientů sepsi nemělo. I v této skupině pacientů byla průkazná asociace hodnot nCD64 se sepsí (pravděpodobnou nebo jistou) (graf 3), signifikantní byl i rozdíl hodnot nCD64 mezi oběma skupinami pacientů se sepsí (vyšší hodnoty u pacientů s jistou sepsí) (graf 4). Pro nízký počet pacientů nebyla konstruována a hodnocena křivka ROC. V této kategorii byla provedena i analýza srovnávající asociaci nCD64 ve srovnání s CRP a počtem leukocytů, které byly odebrány ve stejné době, asociace je těsnější v případě nCD64 ve srovnání s hodnotou CRP i leukocytů. (graf 5, 6, 7, 8)



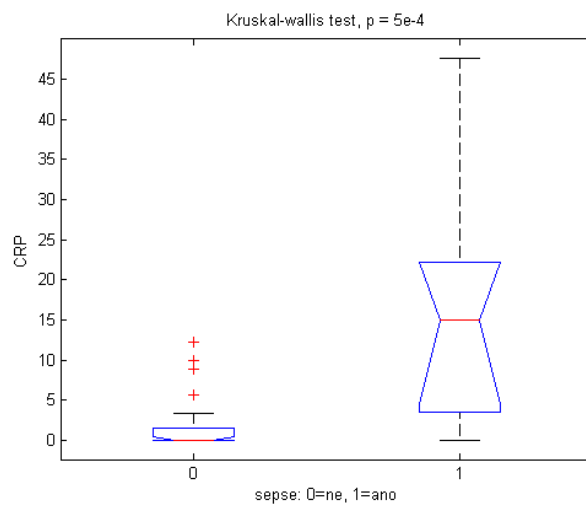
Graf 3. Srovnání hodnot CD64 v kategoriích pozdní novorozenecké sepse (LOS) – sepse nepřítomná, pravděpodobná, jistá



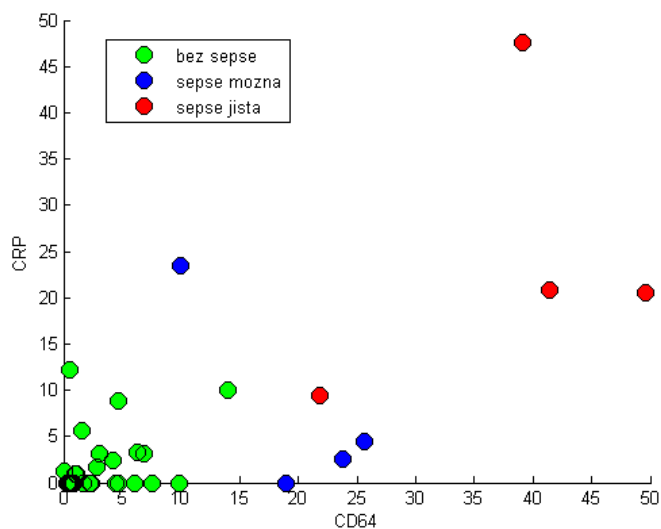
Graf 4. Srovnání hodnot CD64 v kategoriích pozdní novorozenecké sepse (LOS) – sepse nepřítomná, přítomná (pravděpodobná + jistá)



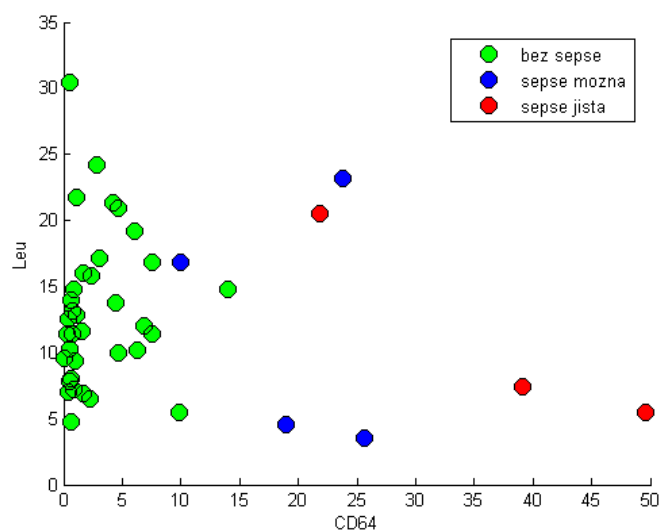
Graf 5. Srovnání hodnot CRP v kategoriích pozdní novorozenecké sepse (LOS) – sepse nepřítomná, pravděpodobná, jistá



Graf 6. Srovnání hodnot CRP v kategoriích pozdní novorozenecké sepse (LOS) – sepse nepřítomná, přítomná (pravděpodobná + jistá)



Graf 7. Srovnání markerů (CRP a CD64) a jejich výtěžnosti v diagnostice pozdní novorozenecké sepse (LOS)



Graf 7. Srovnání markerů (Počet leukocytů a CD64) a jejich výtěžnosti v diagnostice pozdní novorozenecké sepse (LOS)

6 Diskuze

Včasná diagnostika novorozenecké sepse je klíčem k její úspěšné léčbě. Bohužel, právě diagnostika časně sepse je stále velkým problémem, jelikož v běžné klinické praxi je sepsa diagnostikována na základě pozitivní hemokultury, nicméně i tato metoda má své nevýhody, tou největší je, že výsledky nejsou dostupné hned. Právě proto se v posledních letech mnoho výzkumných skupin zabývá hledáním nového markeru, který by měl vysokou senzitivitu a specifitu a to jak pro pozdní i časnou sepsi.

Dříve se mnoho studií zabývalo potenciální rolí cytokinů jakožto markerů pro diagnostiku sepse u novorozenců (Wang *et al.*, 2013). Většina studií potvrzovala interleukin-6 jako potenciálně vhodný marker časně novorozenecké sepse (Özdemir *et al.*, 1994; Mehr *et al.*, 1999; Romagnoli *et al.*, 2001). Nicméně hladina IL-6 sice stoupá již po několika hodinách od kontaktu s patogenem, ale velmi záhy znovu klesá až na normální hodnoty (Chirico *et al.*, 2011), což vede k falešně negativním výsledkům v případě, že byly vzorky odebrány v pozdější fázi.

V současné době přibývá v literatuře důkazů o možnosti využití nCD64 v diagnostice jak sepse obecně, tak sepse novorozenecké a to jak u novorozenců termínových, tak u předčasně narozených (Kipfmüller *et al.*, 2015; Juskewitch *et al.*, 2015; Du *et al.*, 2014; Elawady *et al.*, 2014; Soni *et al.*, 2013; Streimish *et al.*, 2012; Bhandari *et al.*, 2008). Dle doposud zjištěných dat se jedná o marker s poměrně časným vzestupem, jeho výhodou je stabilita jeho hodnot v časném poporodním období (Miyake *et al.*, 2016). Výsledky různých studií jsou však nejednoznačné, což může být dáno jednak rozdílností použitých metod stanovení nCD64 (Streimish *et al.*, 2012; Fang *et al.*, 2015; Camargo *et al.*, 2016, Pradhan *et al.*, 2016), tak zejména malou homogenitou zkoumaných souborů. Velká část publikovaných studií nedostatečně rozlišuje jednotlivé skupiny pacientů (předčasně narozené děti, děti narozené v termínu), odlišnou patofyziologii onemocnění (v rámci EOS – rozdílná dynamika onemocnění při prenatální vzniklé infekci při mikrobiální invazi postnatální, LOS), často není přesně stanovená doba odběru, což nereflektuje velmi důležitou dynamiku vzestupu infekčních markerů.

Doposud byly publikovány dvě metaanalýzy, zajímavostí je, že se neshodují ve svých závěrech. Práce Shi *et al.*, 2016 vyhodnotila marker nCD64 jako málo přínosný vzhledem k jeho nízké poolované senzitivě a specifitě. Tvrdí tedy, že nCD64 není vhodné používat jako samostatný marker novorozenecké sepse, ale zároveň nevyklučují jeho použití v kombinaci s jinými markery jako PCT. Metaanalýza Dai *et al.*, publikovaná v roce 2017

naopak zhodnotila nCD64 jako přínosný marker v diagnostice novorozenecké sepse a poukazuje na jeho vysokou negativní prediktivní hodnotu (Dhlamini *et al.*, 2013).

Pokud srovnáme markery nCD64 a CRP v diagnostice novorozenecké sepse, je nCD64 vhodnějším markerem pro záchyt pacientů se sepsí již v časném stádiu. To je dáno zejména tím, že se hladina CRP rapidně zvedá až po 24 hodinách od počátku infekce, zatímco exprese CD64 se zvýší během jedné hodiny. CRP je tedy spíše pozdní marker infekce (Choo *et al.*, 2012).

Výsledky této diplomové práce ukazují na velmi těsnou a významnou asociaci nCD64 s výskytem novorozenecké sepse. Tato zjištění však není možno generalizovat z mnoha důvodů. Prvním je, že námi použitá metodika je odlišná od převážně používaných způsobů stanovení nCD64 (Streimish *et al.*, 2012; Fang *et al.*, 2015; Camargo *et al.*, 2016) a výsledná hodnota uvádí podíl CD64 pozitivních neutrofilů, nejde o index vůči standardu. Dalším důvodem je, že studovaná populace je malá a zejména je poměrně nízký výskyt novorozeneckých sepsí. Na základě toho je v budoucnu nutno v dalších studiích zpřesnit indikační kritéria a soubor adekvátním způsobem rozšířit.

7 Závěr

Předkládaná diplomová práce je zaměřená na detekci časně sepsy u novorozenců pomocí průtokové cytometrie. Jako slibný marker EOS byl zvolen nCD64. Jedná se o vysoce afinitní imunoglobulin, jehož exprese vzrůstá již po jedné hodině od počátku infekce.

V rámci experimentální části bylo pomocí průtokové cytometrie analyzováno 217 vzorků od novorozenců narozených ve fakultní nemocnici Olomouc. Pacienti byli rozděleni do dvou skupin podle doby odběru vzorku. V první skupině byli pacienti s podezřením na časnou sepsi, ve druhé potom ti se suspektní LOS. Akvírovaná data následně byla statisticky zpracována.

Z výsledků vyplývá, že stanovení nCD64 může přinést další cenné informace pro časnou diagnostiku novorozenecké sepsy. Před zavedením do běžné klinické praxe je však nutné další ověření.

8 Seznam použitých zkratk

APC	allophycocyanin
CRP	Reaktivní protein
EOS	Časná sepse (Early-onset sepsis)
FITC	fluorescein isothiokyanát
IL-10	Interleukin 10
IL-18	Interleukin 18
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
LOS	Pozdní sepse (Late-onset sepsis)
LPS	Lipopolysacharid
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
MOF	Multiorgánové selhání
PCT	Prokalcitonin
PE	phycoerythrin
PerCP	peridinin chlorophyll protein
TNF- α	Tumor nekrotizující faktor α

9 Seznam použité literatury

Angus, D. C., Linde-Zwirble, W. T., Lidicker, J., Clermont, G., Carcillo, J., & Pinsky, M. R. (2001). Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Critical care medicine*, 29(7), 1303-1310.

Ansar, W., & Ghosh, S. (2013). C-reactive protein and the biology of disease. *Immunologic research*, 56(1), 131-142.

Bhandari, V., Wang, C., Rinder, C., & Rinder, H. (2008). Hematologic profile of sepsis in neonates: neutrophil CD64 as a diagnostic marker. *Pediatrics*, 121(1), 129-134.

Bone, R. C., Balk, R. A., Cerra, F. B., Dellinger, R. P., Fein, A. M., Knaus, W. A., Schein, R. M. H., Sibbald, W. J. (1992). Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest*, 101(6), 1644-1655.

Camargo, Z. S., T., Marra, A. R., Bacal, N. S., Casaroto, E., Pinto, L. M., Pasternak, J., Elivane da Silva, V., Dos Santos, F. P. & Edmond, M. B. (2016). Evaluation of Two Methods for Determination of CD64 as a Diagnostic Marker of Infection in Critically Ill Adults. *BioMed research international*, 2016.

Cetinkaya, M., Özkan, H., Köksal, N., Celebi, S., & Hacımustafaoğlu, M. (2009). Comparison of serum amyloid A concentrations with those of C-reactive protein and procalcitonin in diagnosis and follow-up of neonatal sepsis in premature infants. *Journal of Perinatology*, 29(3), 225.

Choo, Y. K., Cho, H. S., Seo, I. B., & Lee, H. S. (2012). Comparison of the accuracy of neutrophil CD64 and C-reactive protein as a single test for the early detection of neonatal sepsis. *Korean journal of pediatrics*, 55(1), 11-17.

Dai, J., Jiang, W., Min, Z., Yang, J., Tan, Y., Ma, T., & Ge, Z. (2017). Neutrophil CD64 as a diagnostic marker for neonatal sepsis: Meta-analysis.

Davis, B. H. (2005). Improved diagnostic approaches to infection/sepsis detection. *Expert review of molecular diagnostics*, 5(2), 193-207.

Delanghe, J. R., & Speeckaert, M. M. (2015). Translational research and biomarkers in neonatal sepsis. *Clinica Chimica Acta*, 451, 46-64.

- Dhlamini**, M. B., Suchard, M. S., Wiggill, T. M., Fadahun, O. O., & Ballot, D. E. (2013). Neutrophil CD64 has a high negative predictive value for exclusion of neonatal sepsis. *South African Journal of Child Health*, 7(1), 25-29.
- Du**, J., Li, L., Dou, Y., Li, P., Chen, R., & Liu, H. (2014). Diagnostic utility of neutrophil CD64 as a marker for early-onset sepsis in preterm neonates. *PloS one*, 9(7), e102647.
- Elawady**, S., Botros, S. K., Sorour, A. E., Ghany, E. A., Elbatran, G., & Ali, R. (2014). Neutrophil CD64 as a diagnostic marker of sepsis in neonates. *Journal of Investigative Medicine*, 62(3), 644-649.
- Fang**, D. H., Fan, C. H., Li, J., An, Q., Yao, H., Ji, Q., & Niu, G. (2015). Ratios of CD64 expressed on neutrophils, monocytes, and lymphocytes may be a novel method for diagnosis of neonatal sepsis. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 9(02), 175-181.
- Fyfe**, A. I., Rothenberg, L. S., DeBeer, F. C., Cantor, R. M., Rotter, J. I., & Lusis, A. J. (1997). Association between serum amyloid A proteins and coronary artery disease: evidence from two distinct arteriosclerotic processes. *Circulation*, 96(9), 2914-2919.
- Chaudhry**, H., Zhou, J., Zhong, Y. I. N., Ali, M. M., McGuire, F., Nagarkatti, P. S., & Nagarkatti, M. (2013). Role of cytokines as a double-edged sword in sepsis. *In Vivo*, 27(6), 669-684.
- Chirico**, G., & Loda, C. (2011). Laboratory aid to the diagnosis and therapy of infection in the neonate. *Pediatric reports*, 3(1).
- Ganatra**, H. A., Stoll, B. J., & Zaidi, A. K. (2010). International perspective on early-onset neonatal sepsis. *Clinics in perinatology*, 37(2), 501-523.
- Gouel-Chéron**, A., Allaouchiche, B., Guignat, C., Davin, F., Floccard, B., Monneret, G., & AzuRea Group. (2012). Early interleukin-6 and slope of monocyte human leukocyte antigen-DR: a powerful association to predict the development of sepsis after major trauma. *PloS one*, 7(3), e33095.
- Grönlund**, M. M., Nuutila, J., Pelto, L., Lilius, E. M., Isolauri, E., Salminen, S., Kero & Lehtonen, O. P. (1999). Mode of delivery directs the phagocyte functions of infants for the first 6 months of life. *Clinical and experimental immunology*, 116(3), 521.

Haran, J. P., Beaudoin, F. L., Suner, S., & Lu, S. (2013). C-reactive protein as predictor of bacterial infection among patients with an influenza-like illness. *The American journal of emergency medicine*, 31(1), 137-144.

(online 2. 3. 2018 [http://www.ajemjournal.com/article/S0735-6757\(12\)00351-8/fulltext](http://www.ajemjournal.com/article/S0735-6757(12)00351-8/fulltext))

Herzenberg, L. A., Parks, D., Sahaf, B., Perez, O., Roederer, M., & Herzenberg, L. A. (2002). The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. *Clinical chemistry*, 48(10), 1819-1827.

Hesse, D. G., Tracey, K. J., Fong, Y., Manogue, K. R., Palladino, J. M., Cerami, A., Shires, G. T. & Lowry, S. F. (1988). Cytokine appearance in human endotoxemia and primate bacteremia. *Surgery, gynecology & obstetrics*, 166(2), 147-153.

Hoffmann, J. J. (2009). Neutrophil CD64: a diagnostic marker for infection and sepsis. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 47(8), 903-916.

Ishihara, K., & Hirano, T. (2002). IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine & growth factor reviews*, 13(4-5), 357-368.

Jensen, L. E., & Whitehead, A. S. (1998). Regulation of serum amyloid A protein expression during the acute-phase response. *Biochemical Journal*, 334(Pt 3), 489.

Juskewitch, J. E., Abraham, R. S., League, S. C., Jenkins, S. M., Smith, C. Y., Enders, F. T., Grebe, S. K., Carey, W. A. & Huskins, W. C. (2015). Monocyte HLA-DR expression and neutrophil CD64 expression as biomarkers of infection in critically ill neonates and infants. *Pediatric research*, 78(6), 683.

Kipfmüller, F., Schneider, J., Prusseit, J., Dimitriou, I., Zur, B., Franz, A. R., Bartmann, P & Müller, A. (2015). Role of neutrophil CD64 index as a screening marker for late-onset sepsis in very low birth weight infants. *PloS one*, 10(4), e0124634.

Kumar, A., Ellis, P., Arabi, Y., Roberts, D., Light, B., Parrillo, J. E., Dodek, P., Wood, G., Kumar, A., Simon, D., Peters, C., Ahsan, M., Chateau, D. (2009). Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock. *Chest*, 136(5), 1237-1248.

Kumon, Y., Nakauchi, Y., Kidawara, K., Fukushima, M., Kobayashi, S., Ikeda, Y., Suehiro, T., Hashimoto, j., & Sipe, J. D. (1998). A longitudinal analysis of alteration in lecithin-cholesterol acyltransferase and paraoxonase activities following laparoscopic cholecystectomy relative to other parameters of HDL function and the acute phas

- Kurt, A., Aygun, A. D., Godekmerdan, A., Kurt, A., Dogan, Y., & Yilmaz, E. (2007).** Serum IL-1 β , IL-6, IL-8, and TNF- α levels in early diagnosis and management of neonatal sepsis. *Mediators of inflammation*, 2007.
- Lawn, J. E., Wilczynska-Ketende, K., & Cousens, S. N. (2006).** Estimating the causes of 4 million neonatal deaths in the year 2000. *International journal of epidemiology*, 35(3), 706-718.
- Layseca-Espinosa, E., Pérez-González, L. F., Torres-Montes, A., Baranda, L., De La Fuente, H., Rosenstein, Y., & González-Amaro, R. (2002).** Expression of CD64 as a potential marker of neonatal sepsis. *Pediatric allergy and immunology*, 13(5), 319-327.
- Livaditi, O., Kotanidou, A., Psarra, A., Dimopoulou, I., Sotiropoulou, C., Augustatou, K., Papasteriades, C., Armaganidis, A., Roussos, C., Orfanos, S. E., Douzinas, E. E. (2006).** Neutrophil CD64 expression and serum IL-8: sensitive early markers of severity and outcome in sepsis. *Cytokine*, 36(5-6), 283-290.
- Łukaszewicz, M., Mroczko, B., & Szmitkowski, M. (2007).** Clinical significance of interleukin-6 (IL-6) as a prognostic factor of cancer disease. *Pol Arch Med Wewn*, 117(5-6), 247-251.
- Maeda, M., Van Schie, R. C. A. A., Yüksel, B., Greenough, A., Fanger, M. W., Guyre, P. M., & Lydyard, P. M. (1996).** Differential expression of Fc receptors for IgG by monocytes and granulocytes from neonates and adults. *Clinical & Experimental Immunology*, 103(2), 343-347.
- Maher, K. J., & Fletcher, M. A. (2005).** Quantitative flow cytometry in the clinical laboratory. *Clinical and Applied Immunology Reviews*, 5(6), 353-372.
- Malina, P.,** FONS informační bulletin 2/2012, Staré a nové markery zánětu, str.21-24, časopis ČSKB, 2012, ISSN 1211-7137
- Malle, E., Steinmetz, A., & Raynes, J. G. (1993).** Serum amyloid A (SAA): an acute phase protein and apolipoprotein. *Atherosclerosis*, 102(2), 131-146.
- Mandy, F. F. (2004).** Twenty-five years of clinical flow cytometry: AIDS accelerated global instrument distribution. *Cytometry Part A*, 58(1), 55-56.
- Marshall, J. C., Reinhart, K. (2009).** Biomarkers of sepsis. *Critical care medicine*, 37(7), 2290-2298.

- Martin**, G. S. (2014) Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes, *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 10:6, 701-706, DOI: 10.1586/eri.12.50
- Mehr**, S., & Doyle, L. (1999). Interleukin-6 concentrations in neonatal sepsis. *The Lancet*, 353(9166), 1798.
- Miyake**, F., Ishii, M., Hoshina, T., Ichikawa, S., Araki, S., Kinjo, T., Shibata, E., Hachisuga, T. & Kusuhara, K. (2016). Analysis of the Physiological Variation in Neutrophil CD64 Expression during the Early Neonatal Period. *American journal of perinatology*, 33(14), 1377-1381.
- Morgenthaler**, N. G., Struck, J., Chancerelle, Y., Weglöhner, W., Agay, D., Bohuon, C., Suarez-Domenech, V., Bergmann, A., Müller, B. (2003). Production of procalcitonin (PCT) in non-thyroidal tissue after LPS injection. *Hormone and Metabolic Research*, 35(05), 290-295.
- Naeim**, F., Rao, P. N., & Grody, W. W. (2009). *Hematopathology: morphology, immunophenotype, cytogenetics, and molecular approaches*. Academic Press.
- Özdemir**, A., Oygür, N., Gültekin, M., Çoşkun, M., & Yegin, O. (1994). Neonatal tumor necrosis factor, interleukin-1 α , interleukin-1 β , and interleukin-6 response to infection. *American journal of perinatology*, 11(04), 282-285.
- Pradhan**, R., Jain, P., Paria, A., Saha, A., Sahoo, J., Sen, A., Mukherjee, S., Som, T., Hazra, A., Warner, N., Singh, A. K. & Singh, A. K. (2016). Ratio of neutrophilic CD64 and monocytic HLA-DR: A novel parameter in diagnosis and prognostication of neonatal sepsis. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 90(3), 295-302.
- Patel**, H., Fellowes, R., Coade, S., & Woo, P. (1998). Human serum amyloid A has cytokine-like properties. *Scandinavian journal of immunology*, 48, 410-418.
- Patterson**, C. C., Smith, A. E., Yarnell, J. W., Rumley, A., Ben-Shlomo, Y., & Lowe, G. D. (2010). The associations of interleukin-6 (IL-6) and downstream inflammatory markers with risk of cardiovascular disease: the Caerphilly Study. *Atherosclerosis*, 209(2), 551-557.
- Peisajovich**, A., Marnell, L., Mold, C., & Du Clos, T. W. (2008). C-reactive protein at the interface between innate immunity and inflammation. *Expert review of clinical immunology*, 4(3), 379-390.

- Pierrakos, C., Vincent, J. L.** (2010). Sepsis biomarkers: a review. *Critical care*, 14(1), R15.
- Porcel, J. M., Vives, M., Cao, G., Bielsa, S., Ruiz-Gonzalez, A., Martínez-Iribarren, A., & Esquerda, A.** (2009). Biomarkers of infection for the differential diagnosis of pleural effusions. *European Respiratory Journal*, 34(6), 1383-1389.
- Průcha, M., Fedora, M., Kieslichová, E., Šrámek, V.** (2015). *Sepse*. Praha: Maxdorf, [2015], 294 stran. Jessenius. ISBN 978-80-7345-448-7.
- Rau, M., Schiller, M., Krienke, S., Heyder, P., Lorenz, H., & Blank, N.** (2010). Clinical manifestations but not cytokine profiles differentiate adult-onset Still's disease and sepsis. *The Journal of rheumatology*, 37(11), 2369-2376.
- Roederer, M.** (2001). Spectral compensation for flow cytometry: visualization artifacts, limitations, and caveats. *Cytometry Part A*, 45(3), 194-205.
- Romagnoli, C., Frezza, S., Cingolani, A., De Luca, A., Puopolo, M., De Carolis, M. P., Vento, G., Antinori, A. & Tortorolo, G.** (2001). Plasma levels of interleukin-6 and interleukin-10 in preterm neonates evaluated for sepsis. *European journal of pediatrics*, 160(6), 345-350.
- Scheringa, M., & Marquet, R. L.** (1990). TNF: A brief review with emphasis on its antitumor activity. *Biotherapy*, 2(3), 275-281.
- Shi, J., Tang, J., & Chen, D.** (2016). Meta-analysis of diagnostic accuracy of neutrophil CD64 for neonatal sepsis. *Italian journal of pediatrics*, 42(1), 57.
- Soni, S., Wadhwa, N., Kumar, R., Faridi, M. M. A., Sharma, S., Chopra, A., & Singh, S.** (2013). Evaluation of CD64 expression on neutrophils as an early indicator of neonatal sepsis. *The Pediatric infectious disease journal*, 32(1), e33-e37.
- Steinmetz, A., Hocke, G., Säile, R., Puchois, P., & Fruchart, J. C.** (1989). Influence of serum amyloid A on cholesterol esterification in human plasma. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1006(2), 173-178.
- Streimish, I., Bizzarro, M., Northrup, V., Wang, C., Renna, S., Koval, N., Li, F., Ehrenkranz, R., Rinder, H. M. & Bhandari, V.** (2012). Neutrophil CD64 as a diagnostic marker in neonatal sepsis. *The Pediatric infectious disease journal*, 31(7), 777.

- Sundaram, V., Kumar, P., Dutta, S., Mukhopadhyay, K., Ray, P., Gautam, V., & Narang, A.** (2009). Blood culture confirmed bacterial sepsis in neonates in a North Indian tertiary care center: changes over the last decade. *Jpn J Infect Dis*, 62(1), 46-50.
- Tabbah, S. M., Buhimschi, C. S., Rodewald-Millen, K., Pierson, C. R., Bhandari, V., Samuels, P., & Buhimschi, I. A.** (2018). Hepcidin, an Iron Regulatory Hormone of Innate Immunity, is Differentially Expressed in Premature Fetuses with Early-Onset Neonatal Sepsis. *American journal of perinatology*.
- Umlauf, V. N., Dreschers, S., & Orlikowsky, T. W.** (2013). Flow cytometry in the detection of neonatal sepsis. *International journal of pediatrics*, 2013.
- van der Meer, W., Pickkers, P., Scott, C. S., van der Hoeven, J. G., & Gunnewiek, J. K.** (2007). Hematological indices, inflammatory markers and neutrophil CD64 expression: comparative trends during experimental human endotoxemia. *Journal of endotoxin research*, 13(2), 94-100.
- Venet, F., Lepape, A., & Monneret, G.** (2011). Clinical review: flow cytometry perspectives in the ICU-from diagnosis of infection to monitoring of injury-induced immune dysfunctions. *Critical care*, 15(5), 231.
- Virgo, P. F., & Gibbs, G. J.** (2012). Flow cytometry in clinical pathology. *Annals of clinical biochemistry*, 49(1), 17-28.
- Wang, K., Bhandari, V., Chepustanova, S., Huber, G., Stephen, O., Hern C. S. O., Shattuck M. D., & Kirby, M.** (2013). Which biomarkers reveal neonatal sepsis?. *PloS one*, 8(12), e82700.
- Ward, P. A., & Bosmann, M.** (2012). A historical perspective on sepsis. *The American journal of pathology*, 181(1), 2-7.
- Wu, H. P., Chen, C. K., Chung, K., Tseng, J. C., Hua, C. C., Liu, Y. C., Chuang, D. Y., & Yang, C. H.** (2009). Serial cytokine levels in patients with severe sepsis. *Inflammation Research*, 58(7), 385-393.

10 Seznam příloh

Příloha 1 Data pacientů s podezřením na EOS

Příloha 2 Data pacientů s podezřením na LOS

Příloha 1

Tabulka č. 3: Akvírovaná data pacientů s podezřením na EOS

Pacient	CD 64	IL6	CRP	PCT	Leu	Neu	I/T	CPT	HKT (ne/ neg/ poz)	seps (jistá, pravd., ne)	klinický obraz	ATB
1	0,3%											
2	0,3%											
3	6,7%											
4	1,5%											
5	0,5%											
6	2,1%		6.3	2.4	21	15	0		neg	ne		ano
7	0,7%											
8	25,3%		29	10	10	7	0.4		neg	pravd.	těžká nezralost	ano
9	6,3%											
10	2,5%											
11	1,0%											
12	1,5%		0.6	0.7	8.9	4.3	0					
13	28,6%		6.6	36	10	6.3	0		neg	pravd.		ano
14	1,3%											
15	0,8%											
16	35,1%		26	11	6.3	4.2	0		ne	pravd.	infiltrace - plicní, převoz ŠTBK	ano
17	1,5%											
18	0,1%											
19	0,3%											
20	12,9%											
21	29,3%		23	36	20	16	0	13	neg	pravd.	infiltrace - plicní	ano
22	5,8%											
23	13,9%		26	3.1	15	12	0.1		neg	pravd.	klinika + lab.	ano
24	3,0%											
25	2,2%											
26	3,8%											
27	1											
28	2,6%											
29	27,2%		8.2		4.8	3.6	0		ne	pravd.	klin.- UPV	ano
30	0,70%											
31	22	20	41	74	14	9.9	0		ne	pravd.	ANO	
32			8.3	43	15	7.9	0		neg	pravd.	hraniční lab.	
33	21		20	31	15	11	0		neg	pravd.	klin + lab.	ano
34	30		4.9	36	21	12	0	10	neg	pravd.	klin.hraniční, lab hraniční	ano
35	3,0%											
36	24,9%		12		7.7	4.2	0		neg	pravd.	klin+lab	ano
37	14,7%		40	16	6	3.2	0	1	ne	pravd.	klin + lab	ano
38	1,2%											
39	0,3%											

Pacient	CD 64	IL6	CRP	PCT	Leu	Neu	I/T	CPT	HKT (ne/ neg/ poz)	seps (jistá, pravd., ne)	klinický obraz	ATB
40	3.10		0	1.3	11				ne	ne		
41	28.20		25	2.3	6.4				neg	pravd.	klin+lab	ano
42	14.00								ne	ne		
43	19.30		5.3	39	26				neg	pravd.	klin+lab	ano
44	1.10								ne	ne		
45	2.70								ne	ne		
46	19.60		7.6	7.9	6.2				neg	pravd.	klin+lab	ano
47	6.90								ne	ne		
48	7.30								ne	ne		
49	1.40								ne	ne		
50	2.20								ne	ne		
51	2.10								neg	ne		ano
52	38.00		6.3	6.7	12				neg	pravd.	klin+lab	ano
53	4.60								ne	ne		
54	15.70								neg	ne		ano
55	3.70								neg	ne		ne
56	4.50								neg	ne		
57	3								ne	ne		
58	6								ne	ne		
59	1.80								ne	ne		
60	1.10								ne	ne		
61	20.00		5						poz	jistá	klin+lab+hkt	ano
62	2.30								neg	ne		
63	5.60								ne	ne		
64									neg	pravd.	klin+lab	ano
65	2.90								ne	ne		
66	2.80								ne	ne		
67	26.00		5.7	0.6	16				neg	pravd.	klin+lab	ano
68	12.30								ne	ne		
69	6.20											
70	23.00		27		14				neg	pravd.	klin+lab	ano
71	2.60								ne	ne		
72	2.30								ne	ne		
73	12.00								ne	ne		
74	9.20								ne	ne		
75	0.80								ne	ne		
76	2.50								ne	ne		
77	13.60								ne	ne		
78	6.70								ne	ne		
79	5.30								ne	ne		
80	0.90								ne	ne		
81	19.80		13	83	31				neg	pravd.	klin+lab	ano
82	1.70								ne	ne		
83	1.70								ne	ne		
84	4.30								ne	ne		

Pacient	CD 64	IL6	CRP	PCT	Leu	Neu	I/T	CPT	HKT (ne/ neg/ poz)	seps (jistá, pravd., ne)	klinický obraz	ATB
85	1.10								ne	ne		
86	1.00								ne	ne		
87	8.40								neg	ne		
88	6.90								ne	ne		
89	2.50								ne	ne		
90	1.30								neg	ne		
91	3.60								ne	ne		
92	0.30								neg	ne		
93	9.50								ne	ne		
94	3.80											
95	25.00		33	50	7.5				neg	pravd.	lab+klin	ano
96	5.40								ne	ne		
97	2.10								ne	ne		
98	1.20								ne	ne		
99	1.90								ne	ne		
100	0.20								ne	ne		
101	0.90								ne	ne		
102	0.80								ne	ne		
103	0.60								ne	ne		
104	0.90								ne	ne		
105	1.10								ne	ne		
106	3.70								ne	ne		
107	4.90								ne	ne		
108	7.20								ne	ne		
109	0.90								neg	ne		
110	1.40								ne	ne		
111	0.20								ne	ne		
112	0.60								ne	ne		
113	2.10								neg	ne		
114	0.80								ne	ne		
115	4.30								ne	ne		
116	1.90								ne	ne		
117	2.60								ne	ne		
118	0.40								ne	ne		
119	17.50		35	6.5	6.2				neg	pravd.	klin+lab	ano
120	1.60								ne	ne		
121	1.90								ne	ne		
122	1.70								ne	ne		
123	1.00								ne	ne		
124	1.10								ne	ne		
125	2.00								ne	ne		
126	9.30								ne	ne		
127	1.1								ne	ne		
128	2.10								ne	ne		
129	2.00								ne	ne		

Pacient	CD 64	IL6	CRP	PCT	Leu	Neu	I/T	CPT	HKT (ne/ neg/ poz)	seps (jistá, pravd., ne)	klinický obraz	ATB
130	7.80								ne	ne		
131	1.20								ne	ne		
132	1.20								ne	ne		
133	1.90								ne	ne		
134	1.40								ne	ne		
135	12.10								ne	ne		
136	0.70								ne	ne		
137	4.70								ne	ne		
138	1.20								ne	ne		
139	2.90								neg	ne		
140	13.30		17	52	4.7				neg	pravd.	pneumonie	ano
141	1.50								ne	ne		
142	2.8								ne	ne		
143	3.70								ne	ne		
144	1.30								ne	ne		
145	7.80								ne	ne		
146	1.10								ne	ne		
147	0.60								ne	ne		
148	2.80								ne	ne		

Příloha 2

Tabulka č. 4: Akvírovaná data pacientů s podezřením na LOS

Jméno	CD 64	IL6	CRP	PCT	Leu	hemokultura (ne/neg/poz)	sepsě (jistá, pravd., klin, ne)	ATB	etiol
1	0,3%	3.9	0	0.3	11.4	ne	ne	ne	
2	2,4%		0		15.8	ne	ne	ne	
3	0,4%	1.6	0	0.1	7	ne	ne	ne	
4	4,7%		0		10	ne	ne	ne	
5	7,5%	181	0	0.3	16.8	ne	ne	ne	
6	6,8%		3.2		12	ne	ne	ne	
7	6,0%		0		19.2	ne	ne	ne	
8	1		0.9		9.34	ne	ne	ne	
9	3.1		3.1	12	17.2	ne	ne	ne	
10	10	1145	23.50	5.2	16.8	neg	pravd.	ano	
11	0.9		0.00		7.25	ne	ne	ne	
12	4.2		2.40		21.4	ne	ne	ne	
13	2.8	30.5	1.70	0.3	24.2	ne	ne	ne	
14	1.1		0.90		12.9	ne	ne	ne	
15	41.4	6.68	20.80			poz	jistá	ano	staf epid
16	1.1		1.00		21.8	ne	ne	ne	
17	4.4		0.00		13.8	ne	ne	ne	
18	4.7	12.6	8.80		21	neg	ne	ne	
19	9.8		0.00		5.52	ne	ne	ne	
20	23.8		2.60		23.2	neg	pravd.	ano	
21	21.8		9.40		20.5	poz	jistá	ano	staf. Capitis
22	14		10.00		14.8	ne	ne	ne	
23	1.5	31.2	5.60	1.8	11.6	ne	ne	ne	
24	49.6	17529	20.50	2.9	5.45	poz	jistá	ano	staf epid
25	1.7		0.00		6.9	ne	ne	ne	
26	0.5		0.00		7.8	ne	ne	ne	
27	6.3	30.8	3.30		10.2	ne	ne	ne	
28	39.1		47.60		7.4	poz	jistá	ano	staf epid
29	25.6		4.40	2.9	3.57	neg	pravd.	ano	
30	19	1831	0.00	0.7	4.57	neg	pravd.	ano	
31	7.6	6.5	0.00	0.3	11.4	ne	ne	ne	
32	1.7	6.8	0.00	0.1	16	ne	ne	ne	
33	0.6		0.00		8	ne	ne	ne	
34	0.6		0.00		4.79	ne	ne	ne	
35	0.7		0.00		11.4	ne	ne	ne	
36	2.3		0.00		6.5	ne	ne	ne	
37	0.6		0		14	ne	ne	ne	
38	0.9	6.9	0.00	0.3	14.8	ne	ne	ne	
39	0.4	3.9	0.00	0.2	12.5	ne	ne	ne	
40	0.7		0.00		13.2	ne	ne	ne	
41	0.5	20.6	0.00	1.4	10.3	ne	ne	ne	
42	0		1.30		9.6	ne	ne	ne	
43	0.5	22.8	12.20	0.7	30.4	ne	ne	ne	

