

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KRISTINA JAKOPOVIĆ

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KRISTINA JAKOPOVIĆ

**VLOGA PRESEPSINA KOT NOVEGA MARKERJA SEPSE V DIAGNOSTIKI
BAKTERIJSKE IN VIRUSNE OKUŽBE**

**THE ROW OF PRESEPSIN AS A NEW SEPSIS MARKER IN THE DIAGNOSIS
OF BACTERIAL AND VIRAL INFECTIONS**

Ljubljana, 2012

Diplomsko nalogo sem izdelala v Univerzitetne kliničnem centru v Ljubljani v Urgentnem 24-urnem laboratoriju pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom dr. Ljube Krnjak, spec. med. biokem.

Zahvala

Iskrena hvala mentorju prof. dr. Jošku Osredkarju, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorici dr. Ljubi Krnjak, spec. med. biokem. za vsestransko pomoč, dosegljivost in koristne napotke pri izvedbi diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi vsem zaposlenim v Urgentnem 24-urnem laboratoriju Kliničnega centra v Ljubljani za prijaznost in pomoč pri zbiranju vzorcev in rokovanju z analizatorjem.

Posebna zahvala gre mojim staršem, ki so mi omogočili študij in verjeli vame. Hvala tudi sestri, partnerju in njegovi družini za vso podporo in vzpodbudo.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom dr. Ljube Krnjak spec. med. biokem.

Kristina Jakopović

Diplomska komisija:

Predsednica: izr. prof. dr. Lucija Peterlin Mašič, mag. farm.

Mentor: prof. dr. Joško Osredkar, mag. farm., spec. med. biokem.

Somentorica: dr. Ljuba Krnjak, spec. med. biokem.

Članica: doc. dr. Alenka Zvonar, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	IV
ABSTRACT	V
SEZNAM OKRAJŠAV	VI
1 UVOD.....	1
1.1 PATOGENEZA INFEKCIJSKIH BOLEZNI.....	2
1.1.1 NESPECIFIČNA IMUNSKA OBRAMBA.....	3
1.1.2 SPECIFIČNA IMUNSKA OBRAMBA.....	4
1.2 KLINIČNA SLIKA INFEKCIJSKIH BOLEZNI.....	5
1.3 LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA OKUŽB	9
1.3.1 C-REAKTIVNI PROTEIN.....	9
1.3.2 PROKALCITONIN.....	11
1.3.3 LEVKOCITI.....	14
1.3.4 HITROST SEDIMENTACIJE ERITROCITOV	19
1.4 PRESEPSIN	22
2 NAMEN DELA	26
3 MATERIALI IN METODE	27
3.1 KLINIČNO OKOLJE	27
3.2 IZBIRA BOLNIKOV.....	27
3.3 ZBIRANJE PODATKOV IN VZROCEV.....	27
3.7 DOLOČANJE KONCENTRACIJE PRESEPSINA	28
3.8 STATISTIČNA ANALIZA	31
4 REZULTATI.....	34
4.1 PODATKI O PREISKOVANCIH	34
4.2 TESTNA STATISTIKA	35
4.2.1 C-REAKTIVNI PROTEIN.....	36
4.2.2 PROKALCITONIN.....	37
4.2.3 LEVKOCITI.....	38
4.2.4 PRESEPSIN.....	40
4.3 KORELACIJA MED PRESEPSINOM IN OSTALIMI PARAMETRI.....	42
4.3.1 PRESEPSIN – C-REAKTIVNI PROTEIN	42
4.3.2 PRESEPSIN – PROKALCITONIN	43

4.3.3 PRESEPSIN – LEVKOCITI.....	44
4.4 OBČUTLJIVOST IN SPECIFIČNOST OZANČEVALCEV.....	45
5 RAZPRAVA.....	51
6 SKLEP.....	57
7 VIRI IN LITERATURA.....	58
8 PRILOGA.....	62

POVZETEK

Nespecifična narava znakov in simptomov pri pacientih naredi klinično diferenciacijo bakterijske in virusne okužbe težavno tudi za izkušenega zdravnika. Ker pa diagnoza možne bakterijske okužbe vpliva na rabo antibiotikov in bolnišnično bivanje, so se razvile strategije upravljanja, ki temeljijo na kombinaciji kliničnih znakov in laboratorijskih preiskav. V današnjem času tako v okviru laboratorijske diagnostike okužb uporabljamo določanje koncentracije C-reaktivnega proteina in števila levkocitov. Med novjšimi kazalci okužbe pa tudi določanje koncentracije prokalcitonina. Ti kazalci so občutljivi, vendar je njihov porast pogosto lahko tudi nespecifičen, zato za racionalno zdravljenje potrebujemo vpeljavo spremljanja novih metod za hitro in zanesljivo ugotavljanje okužb bakterijskega ali virusnega izvora.

V našo raziskavo smo vključili 57 pacientov, ki so bili hospitalizirani na različnih oddelkih Kliničnega centra v Ljubljani. Glede na izvid koncentracije C-reaktivnega proteina smo paciente razvrstili v tri skupine. Če je bila koncentracija večja od 100 mg/L smo bolnike uvrstili v skupino bakterijske okužbe, če je bila koncentracija nižja od 100 mg/L vendar višja od 5 mg/L pa v skupino virusne okužbe. V skupino zdravih preiskovancev smo uvrstili paciente, katerih koncentracija C-reaktivnega proteina je bila nižja od 5 mg/L. Vsem pacientom smo poleg C-reaktivnega proteina izmerili še koncentracijo prokalcitonina in številčno koncentracijo levkocitov ter določili novi marker presepsin. Ugotovili smo, da je mediana vrednost presepsina pri pacientih z bakterijsko okužbo (1523,089 ng/L) višja kot pri pacientih z virusno okužbo (1212,497 ng/L) ali pri pacientih brez znakov infekcije (1144,000 ng/L), vendar se vrednosti med seboj statistično signifikantno ne razlikujejo. S Spearmanovo korelacijsko analizo smo dokazali, da med presepsinom in ostalimi laboratorijskimi kazalci okužbe praktično ni ujemanja. Izračunali smo tudi specifičnost in občutljivost vseh parametrov ter površine pod ROC krivuljami za razlikovanje bakterijske od virusne okužbe, ki si sledijo 0,517 za presepsin, 0,631 za levkocite, 0,683 za prokalcitonin in 1,000 za C-reaktivni protein. Pri mejni vrednosti 1101 ng/L je bila specifičnost presepsina za diagnozo bakterijske infekcije 44,4 % in s tem najnižja med vsemi izmerjenimi parametri. Občutljivost je ob tem znašala 65,0 %.

Na podlagi naših rezultatov lahko zaključimo, da presepsin ni zanesljiv marker za ločevanje bakterijske od virusne okužbe.

ABSTRACT

Nonspecific nature of the signs and symptoms of the patients makes clinical differentiation of bacterial and viral infections difficult even for an experienced physician. Diagnosis of possible bacterial infection affects the use of antibiotics and impact on the hospital stay and therefore we developed management strategies used to distinguishing bacterial from viral infection, based on a combination of clinical signs and laboratory tests. In recent years C-reactive protein, white blood cell count and procalcitonin have been used as biomarkers that increase in infection patients. These indicators are sensitive, but their growth can often be non-specific, so for rational treatment of infection diseases we need the implementation of new monitoring methods for rapid and reliable detection of infections caused by bacteria or viruses.

In our survey, we have included 57 patients who were hospitalized on the various sections of the University Medical Centre in Ljubljana. According on the results of concentration of C-reactive protein the patients were classified into the three groups. If the concentration was greater than 100 mg/L we put them into the group of bacterial infections, if the concentration was less than 100 mg/L but higher than 5 mg/L we put patients in the group of viral infections. Into the group of healthy subjects we considered patients whose concentration of C-reactive protein was lower than 5 mg/L. In addition to the concentration of C-reactive protein we also measured the concentration of procalcitonin and leukocytes to all patients and determined the new marker presepsin. We found that the median value of presepsin was higher in patients with bacterial infection (1523,089 ng/L) than in patients with viral infection (1212,497 ng/L) or in patients without signs of infection (1144,000 ng/L) but the values do not differ statistically significant. With the Spearman's correlation analysis we have demonstrated that there is no correlation between presepsin and other laboratory indicators. The AUCs obtained from the ROC curve for distinguishing bacterial from viral infections were presepsin 0,517, leukocytes 0,631, procalcitonin 0,683 and C-reactive protein 1,000. The results for presepsin were the worst. When the cutoff value for presepsin was set at 1101 ng/L, clinical sensitivity was 65,0 % and clinical specificity was 44,4 %.

Based on our results, we can conclude that presepsin is not a reliable marker for separating bacterial from viral infections.

SEZNAM OKRAJŠAV

AIDS	Akvirirani imunski deficitni sindrom
AUC	Area under the curve (površina pod krivuljo)
CALC – I	Kalcitonin I gen
CDP – Star [®]	Kemiluminescenčni substrat (spojina 1,2–dioksetana)
CIIM	Center internistične intenzivne terapije
CIT	Centralna intenzivna terapija
CLEIA	Kemiluminescenčna encimsko imunološka metoda
CRP	C-reaktivni protein
DIK	Diseminirana intravaskularna koagulacija
DKS	Diferencialna krvna slika
DNK	Deoksiribonukleinska kislina
EDTA	Etilendiaminotetraoetna kislina
HIV	Virus humane imunske pomanjkljivosti
IFN	Interferon
IL	Interlevkin
IPP	Internistična prva pomoč
LBP	Protein, ki veže lipopolisaharid
LPS	Lipopolisaharid
mCD14	Membranska oblika glikoproteina CD14
MES	2-morfolinoetansulfonska kislina

MOPS	3-morfolinopropansulfonska kislina
pCO ₂	Parcialni tlak ogljikovega dioksida
PCT	Prokalcitonin
PEG	Polietilen glikol
RNK	Ribonukleinska kislina
ROC krivulja	Krivulja občutljivosti in specifičnosti
sCD14	Topna oblika glikoproteina CD14
sCD14-ST	Presepsin
SIRS	Sindrom sistemskega vnetnega odziva
T _C	Citotoksična celica T
T _H	Celica T pomagalka
TLR4	Toll-u podoben receptor 4
TNF – α	Tumorje nekrotizirajoči faktor α
TRIS	Spojina hidroksimetilaminometana

1 UVOD

Pri nastanku infekcijske bolezni sodelujeta mikroorganizem, ki je na ali v gostitelju, kot tudi sam gostitelj. Nastane takrat, kadar mikroorganizem prizadene gostitelja v tolikšni meri, da se pri njem pojavijo okvare tkiv in organov in pride do razvoja bolezenskih znakov. V tem primeru mikrob najde dostop do gostitelja, je zmožen vstopiti v tkiva in se v njih razmnoževati, izloča različne virulencne dejavnike in obvlada imunski sistem gostitelja. Na izid okužbe vplivata patogenost mikroorganizma in gostiteljeva odzivnost. Patogeni organizmi, ki najpogosteje povzročajo infekcijske bolezni, so številne vrste virusov in bakterij. Manj pogosto pa tudi glive ali paraziti (1).

Virusi so najmanjši mikroorganizmi, katerih genom predstavlja nukleinska kislina (DNK ali RNK). Genom je zaščiten z beljakovinskim plaščem, pri nekaterih virusih pa tudi z zunanjo lipoproteinsko ovojnico. V velikosti virusov obstaja velika raznolikost, saj lahko merijo od 20 do 400 nm, dokaj različni pa so si tudi po obliki. Lahko so paličasti, poliedrični, spiralno zaviti ali kompleksno zgrajeni. Virusi nimajo lastne presnove, zato se razmnožujejo samo v živih celicah gostitelja (2). Zdravljenje virusnih infekcij poteka predvsem simptomatsko. Protivirusna zdravila se uporabljajo le pri okužbah z virusi Herpes simplex, Varicella zoster, Citomegalovirus in virusom HIV (3).

Bakterije so prokarionti paličaste, okrogle ali druge oblike, katerih premer je večinoma okoli 1 μm . Bakterije vsebujejo eno molekulo DNK, ki se nahaja v citoplazmi, saj prokarionske celice nimajo jedra. Bakterijska DNK je praviloma krožna in vsebuje informacije za celično rast in razmnoževanje. Slednje navadno poteka z deljenjem. V citoplazmi bakterijske celice so tudi ribosomi, plazmidi in različni citoplazemski vključki. Citoplazmo sicer navzven omejuje selektivno prepustna citoplazemska membrana, tj. dvosloj fosfolipidov, v katerega so umeščeni proteini. Citoplazemsko membrano obdaja trdna bakterijska stena, ki daje bakterijam obliko in katere sestava se med Grampozitivnimi in Gramnegativnimi bakterijami razlikuje. Rast in razmnoževanje bakterij preprečujemo z antibiotiki. Ti za uničevanje virusov niso primerni (4).

Če želimo začeti ustrezno zdravljenje infekcijske bolezni je ločevanje med bakterijsko in virusno okužbo zelo pomembno. Namreč, prepozno prepoznana in zdravljena bakterijska okužba je lahko za bolnika usodna, nepotrebno antibiotično zdravljenje virusne infekcije pa lahko povzroči številne zaplete in povečuje tveganje za pojav okužb z odpornimi bakterijami (5). Pri ločevanju bakterijske od virusne infekcije si danes pomagamo predvsem z laboratorijskimi preiskavami določanja akutnih pokazateljev vnetja, saj napoved povzročitelja okužbe le na podlagi kliničnih znakov ni zanesljiva. Klinični znaki so sicer lahko izredno pestri, vendar pogosto spominjajo tudi na marsikatero drugo bolezen. Vnetni označevalci, ki jih v današnjem času uporabljamo v okviru laboratorijske diagnostike okužb, so občutljivi, žal pa niso specifični, zato potrebujemo označevalec, ki bi zgodaj in hitro potrdil bakterijsko okužbo ter jo ločil od virusne infekcije (6).

1.1 PATOGENEZA INFEKCIJSKIH BOLEZNI

Interakcija med povzročiteljem okužbe in gostiteljem vedno poteka v več fazah. V prvi fazi, fazi adhezije, se morajo mikroorganizmi najprej pritrditi na celice kože ali sluznic, da jih telesne tekočine ne odplavijo, nato pa se tam razmnožujejo, kar imenujemo faza kolonizacije. Pri teh procesih uporabljajo različne mehanizme - bakterije posebne površinske strukture imenovane adhezini, virusi pa svojo zmožnost vezanja virusnih ligandov na ustrezne celične receptorje. Na ujemanju ligandov in receptorjev temelji tudi lastnost virusov, da se razmnožujejo le v določenih celicah organov, kar imenujemo virusni tropizem. Občutljivost celic je genetsko določena, ker je zapis za receptor v celičnem genomu. Prav tako je genetsko določena sposobnost razmnoževanja virusov s podvajanjem njihovih nukleinskih kislin in sintezo ostalih sestavin. Nekateri virusi imajo namreč genetske delce (pospeševalce), ki stimulirajo prepisovanje virusnih genov. Pospeševalci so bodisi aktivni v celicah vseh organov bodisi so strogo tkivno specifični. Virusni tropizem lahko določa tudi mesto vstopa virusa v telo in pot invazije v gostiteljeve celice in tkiva. Fazi kolonizacije sledi intracelularna faza, to je vstopanje mikroba v celice organizma. Pri virusih je vstopanje obvezno, bakterije pa lahko poleg vstopanja v celice ostajajo tudi na mestu vstopa v telo, kjer med razmnoževanjem izločajo hidrolitične encime ter eksotoksine in endotoksine. Eksotoksini so proteini, ki jih izločajo žive bakterije, pri endotoksinih pa gre za lipopolisaharidne sestavine bakterijske stene, ki se sprostijo ob odmrtnosti bakterij. Te

sproščene substance povzročajo lokalno vnetje in preko patofizioloških reakcij okvarijo organizem. Vstop bakterij v endotelne celice organizma sicer poteka s procesom endocitoze. Pri endocitozi se celična membrana gostiteljske celice skupaj z bakterijo povleče v notranjost in nastane fagosomska vakuola, ki se v primeru širjenja okužbe uspešno izogniti celičnim lizosomom. Fagocitoza je namreč pomemben obrambni mehanizem v boju proti patogenim mikroorganizmom, saj fagociti s svojimi proteolitičnimi encimi lahko uničijo mnoge bakterije in viruse. Endocitoza patogenih bakterij lahko poteka tudi na epiteljskih celicah kože ter na endotelnih celicah kapilar in sluznic. Intracelularna faza je potrebna za prodiranje okužbe v globlje strukture tkiva ter za prehajanje mikroba na oddaljena mesta organizma, kar označujemo s fazo invazije. Mikroorganizmi tako pridejo iz tkiva v najbližjo bezgavko in če so dovolj virulentni, se uprejo v bezgavki prisotnim makrofagom in nevtrofilcem ter preko mezoangionije prehajajo v krvni obtok. V krvi ostajajo prosti ali pa se nahajajo znotraj celic. Nastopi primarna bakteriemija ali primarna viremija. Mikroorganizmi torej lahko izrabljajo celice krvotvornega organa za razširjanje po telesu. Tako se prenesejo v organe, ki imajo mnogo kapilar in sinusoidov, kjer se cirkulacija upočasni (npr. pljuča, vranica, jetra). Sledi nenadzorovano razmnoževanje v organih in ponovno izplavljanje v kri, pri čemer nastopi sekundarna bakteriemija oz. sekundarna viremija, ki je obilnejša od primarne. Virusi na ta način prehajajo v svoje ciljne organe, bakterije pa sprožijo bujen sistemski odziv, ki se kaže s sepsa in se v najhujših primerih razvije v septični šok. Aktivirata se tudi nespecifična in specifična imunska obramba organizma ter nastopi klinična slika infekcijske bolezni (1, 2, 4).

1.1.1 NESPECIFIČNA IMUNSKA OBRAMBA

Po vdoru mikroorganizmov v telo se aktivirajo mehanizmi naravne imunosti, katerih del je tudi citokinski odziv oziroma odziv akutne faze. Osrednja celica, ki sproži citokinski odziv je makrofag. Makrofagi imajo na svoji površini posebne receptorje za prepoznavanje značilnih makromolekularnih vzorcev patogenih mikroorganizmov. Ob vdoru bakterij v telo se po alternativni poti sproži aktivacija komplementa, ki je pomemben del naravne odpornosti zlasti v zgodnji fazi bakterijske okužbe, saj C3b sestavina komplementa omogoča vezavo bakterije na celično membrano, fagocitozo in uničenje celic. Vse to pa v

makrofagih aktivira sintezo in izločanje citokinov, predvsem interleukina-1 (IL-1), interleukina-6 (IL-6) in tumorje nekrotizirajočega dejavnika α (TNF- α), ki imajo številne lokalne in sistemske učinke. Povzročijo levkocitozo, sprožijo intenzivno proteolizo v mišicah, zvišajo telesno temperaturo ter v hepatocitih povečajo sintezo beljakovin akutne faze (7). Poveča se sinteza fibrinogena, C-reaktivnega proteina, serumskega amiloida A, α_1 antitripsina, haptoglobina, ceruloplazmina in drugih. Beljakovine akutne faze okrepijo delovanje sistema komplementa, zavirajo bakterijske proteaze in usmerjajo specifičen imunski odgovor (1).

Pri virusnih infekcijah so pri omejevanju širjenja okužbe pomembni predvsem interferoni (IFN), katerih povečano količino vseh vrst zasledimo že nekaj ur po vdoru virusa v telo. Interferoni zavirajo replikacijo virusov v vseh celicah ter preko pospeševanja zorenja mirujočih limfocitov v plazmatke povečajo izdelovanje protiteles. S tem okrepijo fagocitozo ter delovanje citotoksičnih limfocitov T in naravnih celic ubijalk. Najpomembnejša funkcija celic ubijalk je uničenje z virusom okuženih celic, še predno se razvije specifični imunski odziv (1).

1.1.2 SPECIFIČNA IMUNSKA OBRAMBA

Patogene mikroorganizme dokončno uničijo dejavniki specifične humoralne in celularne imunske obrambe.

Humoralno imunost, ki predstavlja pglavitni obrambni mehanizem pred zunajceličnimi mikrobi, posredujejo protitelesa ali imunoglobulini, ki jih izdelujejo limfociti B. V času odziva akutne faze se aktivirajo mononuklearni fagociti, ki izločajo regulatorne citokine interleukin-10 (IL-10), interleukin-12 (IL-12) in interleukin-18 (IL-18), ki usmerjajo specifičen imunski odgovor. In sicer IL-10 stimulira rast in razmnoževanje limfocitov B v mirujoče spominske celice B in v protitelesa izločujoče celice, plazmatke. Protitelesa so različnih razredov in imajo različne lastnosti in funkcije. Virusom preprečijo pritrjevanje na celične receptorje in tako onemogočijo vdiranje v celico in razmnoževanje v njej ali pa viruse zlepijo, kar močno pospešuje fagocitozo. Skupaj s komplementom povzročajo tudi virolizo ali pa se vežejo na bakterije zunaj celic, kar omogoča fagocitom, da jih spoznajo in

fagocitirajo. Protitelesa tudi nevtralizirajo bakterijske toksine in tako preprečijo njihovo vezanje na tarčne celice (1).

Pri obvladanju okužb, ki jih povzročajo znotrajcelične bakterije, je najpomembnejša celično posredovana imunost, ki jo posredujejo limfociti T. Slednji se po srečanju z antigenom razmnožujejo in diferencirajo v spominske celice T in različne efektorske celice, to so celice T pomagalke (T_H) ali citotoksične celice T (T_C). Ti dve podvrsti se med seboj razlikujeta po membranskih glikoproteinih: CD_4 in CD_8 . Celice T pomagalke izražajo glikoprotein CD_4 in ob aktivaciji z antigenom izločajo številne citokine, ki aktivirajo celice B, celice T_C in makrofage, kar ima za posledico uničenje mikrobov. Citotoksične celice T pa izražajo na membrani glikoprotein CD_8 in povzročajo lizo inficiranih celic (8).

Ko gostitelj s svojo specifično imunsko obrambo uniči mikroorganizem, postane začasno ali dosmrtno nedovzeten za ponovno okužbo z istim sevom mikroorganizma (1).

1.2 KLINIČNA SLIKA INFEKCIJSKIH BOLEZNI

Med potekom okužbe se pojavijo tudi splošni znaki in simptomi okužb, ki se kažejo z motnjami fizioloških in metaboličnih poti v organizmu. Ti procesi niso specifični samo za bolnike z okužbami, ampak se pojavljajo pri vseh stanjih, ki aktivirajo vnetni odgovor. Torej tudi pri večjih poškodbah, opeklinah in kirurških posegih (1).

Zgodnji znaki infekcijskih bolezni so zelo nespecifični. Pojavijo se splošno slabo počutje, glavobol, nemir, slaba koncentracija, utrujenost in pomanjkanje energije. Prisotna je tudi neješčnost. V kolikor bakterijska ali virusna infekcija napreduje, se klinična slika okužb lahko kaže kot lokalno omejeno vnetje z rdečino, toploto, oteklino in bolečino (1). Vnetišče je toplo, ker se skozi kapilare v vnetem področju kože poveča pretok tople krvi iz notranjosti telesa. Zaradi napolnjenja kapilarne mreže in venul s krvjo ter oksigeniranega hemoglobina v koži, se pojavi rdečina. Iztekanje tekočine in plazemskih beljakovin z veliko molekulsko maso v intersticij pa skupaj z infiltracijo tkiva z levkociti povzroči nastanek vnetne oteklina. Pogosto se pojavi tudi bolečina, predvsem zaradi endogenih mediatorjev vnetja, ki lahko senzitivirajo ali neposredno vzdražijo proste živčne končiče,

ki so receptorji za bolečinske dražljaje (9). Vzporedno z lokalnimi znaki vnetja nastopijo tudi sistemski znaki in simptomi infekcijske bolezni, kot so:

VROČINA

Gre za zvišano telesno temperaturo nad 37,2 °C (merjeno v pazduhi), ki velja za enega glavnih simptomov infekcijske bolezni. Okužba z bakterijami ali virusi sproži nastanek vročine tako, da mikroorganizmi sprožijo nastanek endogenih pirogenov v organizmu, ti pa nato preko delovanja na termoregulacijski center v hipotalamusu dvignejo telesno temperaturo. V kolikor se ne dokaže drugega vzroka zanjo, vročino vedno obravnavamo kot posledico okužbe. Glede na diferencialno diagnozo razlikujemo štiri tipe zvišane telesne temperature:

- Intermitentno temperaturo. To je telesna temperatura, ki je zjutraj normalna, čez dan pa ob spremljajočih mrzlicah poraste na 39 °C in več ter ponoči ponovno pade s spremljajočim znojenjem. Značilna je za septična stanja.
- Remitentno temperaturo, ki kaže nihanja med jutranjo in večerno telesno temperaturo za 2 °C ali več, vendar ne doseže normalne vrednosti. Pojavlja se pri številnih lokalnih okužbah.
- Kontinuirano temperaturo, ki je telesna temperatura večinoma višja od 39 °C in ki v poteku dneva niha največ za 1 °C. Pojavlja se pri nekaterih virusnih okužbah.
- Rekurentno oziroma ponavljajočo se temperaturo pri kateri vročinskemu obdobju, ki traja od 5 – 10 dni, sledi interval brez vročine (dva dni ali več). Temu ponovno sledi krajše obdobje visoke vročine in daljši interval brez vročine in temu zopet še blažji in krajši tretji napad vročine (1).

METABOLIZEM

Telesna temperatura močno vpliva na presnovno intenzivnost, in sicer se pri vročini, ki spremlja infekcijsko bolezen, ta zviša kar za 35 – 40 %. Bolnik pri tem začne uporabljati svoje lastne energetske zaloge. Prvo zalogo predstavlja glikogen v jetrih, ki pa zadošča le za 24h, saj so zaloge jetrnega glikogena sorazmerno majhne. Maščobe se zaradi citokinov, ki se sproščajo ob okužbi in zavirajo njihovo porabo, kot vir energije med infekcijsko

boleznijo ne morejo uporabiti, zato glavni vir predstavljajo predvsem mišične beljakovine. Aminokislina, ki se sprosti ob njihovi razgradnji, se porabi za neoglukogenezno v jetrih in za sintezo imunoglobulinov. Pogosto se zaradi izgube skeletnega mišičja pojavijo tudi bolečine v mišicah (1, 10).

IZGUBA APETITA

Neješčnost naj bi povzročal leptin, polipeptidni hormon, ki se pod vplivom vnetnega citokina IL-6 sprošča iz maščevja. Njegova fiziološka funkcija je zaviranje privzema hrane ter zvečanje energijske porabe. Zaradi izgube apetita nastopi katabolizem, pri čemer se zaloge organizma porabljajo za sintezo novih beljakovin (1).

KRVNA SLIKA

Levkociti

Levkociti (Lkci) ali bela krvna telesa so pomembni pri obrambi pred različnimi povzročitelji bolezni. Odstopanja v njihovem številu so pogosta pri bakterijskih in virusnih okužbah, pa tudi pri kroničnih boleznih. Na splošno pri bakterijskih okužbah običajno opazimo povišano število nevtrofilcev ter znižano število eozinofilcev in limfocitov, medtem ko je za nekatere virusne bolezni bolj značilna nevtropenija (1).

Eritrociti

Življenjska doba eritrocitov je 120 dni, zato sprememb v rdeči krvni sliki pri akutni infekcijski bolezni ne pričakujemo. Se pa lahko po več tednov trajajoči okužbi razvije anemija. Namreč, v serumu je takrat znižana koncentracija transferina, kar prispeva k padcu koncentracije železa v plazmi. Iz makrofagov se sprošča interlevkin-1 (IL-1), pod vplivom katerega makrofagi pospešeno izdelujejo apoferritin, ki veže železo. Iz nevtrofilcev se pod vplivom IL-1 zveča tudi sproščanje lakoferrina, ki deluje kot kelator železovih ionov in je tudi transportni protein za železo; prenaša ga v makrofagno tkivo, zato ni na voljo za sintezo v drugih celicah. IL-1 in TNF- α pospešita sproščanje IFN- γ , ki zavira delovanje eritropoetina na eritropoezo. Vse naštetu vodi v nastanek anemije (1).

SEDIMENTACIJA ERITROCITOV

Pri infekcijskih boleznih je sedimentacija eritrocitov pospešena, ker se nekateri reaktanti akutne faze vežejo na eritrocite in povzročijo njihovo zlepljanje med seboj. Tako nastali skupki eritrocitov sedimentirajo hitreje kot posamezni eritrociti, zato se hitrost sedimentacije poveča (1, 9).

KOAGULACIJA

Med potekom infekcijske bolezni poraste število trombocitov in fibrinogena.

Kot resen zaplet okužbe se lahko zaradi poškodbe endotelija ali sproščanja tkivnega faktorja iz poškodovanega tkiva pojavi diseminirana intravaskularna koagulacija (DIK). V okviru DIK nastajajo tromboze v žilju, kar poslabša prekrvitev tkiv. Zaradi porabe koagulacijskih beljakovin in trombocitov pride sočasno do krvavitev (1).

KRVNI TLAK

Pri hudih bakterijskih okužbah je pogosto znižan. Huda bakterijska okužba namreč sproži obsežno sproščanje vnetnih citokinov, kar ima za posledico sistemski vnetni odziv. Pojavijo se motnje v delovanju endotelija, vazodilatacija, venodilatacija, ki skupaj s povečano prepustnostjo mikrocirkulacije za beljakovine zmanjšuje venski priliv v srce, in tudi arteriolodilatacija, ki povzroči padec perifernega upora. Vse naštetu vodi v hipotenzijo (1, 7).

ŠOK

Šokovno stanje je eden najresnejših zapletov infekcijske bolezni. Srčnožilni sistem v šoku namreč ne zmore zagotoviti ustrezne prekrvitve organov, zaradi česar pride do njihove okvare, kar se klinično kaže z odpovedovanjem njihovega delovanja (1).

LEDVICE

Pri bolniku z zvišano telesno temperaturo je prepustnost ledvičnih glomerulov večja. Tako lahko v času infekcijske bolezni najdemo v seču povečano količino beljakovin in

minimalne količine sladkorja. Zaradi povečane razgradnje mišičnih beljakovin so lahko povišane tudi vrednosti dušikovih spojin (1).

JETRA

Prizadetost jeter se izraža preko povečane vrednosti jetrnih encimov in/ali bilirubina. Prizadeta so lahko neposredno zaradi razmnoževanja patogenih mikrobov v jetrih ali posredno v okviru šokovnega stanja (1).

OSREDNJE ŽIVČEVJE

Pri hujšem poteku bakterijske ali virusne okužbe se lahko kot posledica zmanjšane prekrvitve možganov pojavijo zaskrbljenost, zmedenost in delirij. Pri starejših bolnikih lahko nastopi tudi koma, medtem ko so pri otrocih pogostejši krči (1).

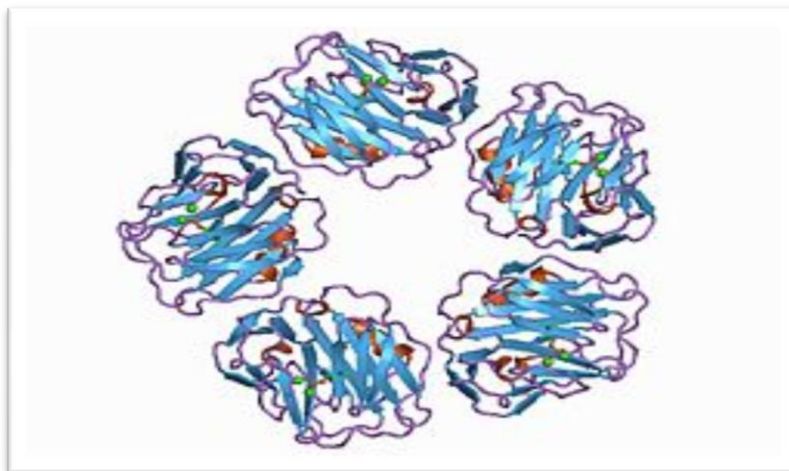
1.3 LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA OKUŽB

Pri ločevanju bakterijske od virusne okužbe se poslužujemo merjenja akutnih pokazateljev vnetja. Uporabljamo jih kot presejalni test, saj niso dragi, njihova izvedba pa je relativno lahka. Danes si v rutinski praksi pomagamo predvsem z določanjem C-reaktivnega proteina, z določanjem celotnega števila levkocitov v periferni krvi ter deleža limfocitov, monocitov in granulocitov ter z določanjem hitrosti sedimentacije eritrocitov. Med novejših pokazateljev vnetja uvrščamo tudi določanje prokalcitonina. Ti testi so občutljivi, žal pa niso specifični, zato potrebujemo vnetni označevalec, ki bi lahko bakterijsko okužbo čim hitreje in s čim večjo zanesljivostjo potrdil ali ovrgel.

1.3.1 C-REAKTIVNI PROTEIN

C-reaktivni protein (CRP) spada med mediatorje akutne faze vnetja. Gre za glikoprotein, sestavljen iz petih istovetnih nekovalentno povezanih polipeptidov (slika 1), katerega sinteza poteka v jetrih; v fizioloških razmerah 1 – 10 mg/dan, med odzivom akutne faze > 1 g/dan. Molekulska masa znaša 118 kDa. Pri zdravih ljudeh je CRP v sledovih prisoten v krvi, kjer normalna koncentracija znaša do 5 mg/L. Med njegove glavne funkcije v

organizmu spadajo aktivacija sistema komplementa po klasični poti, spodbujanje fagocitoze in okrepitev imunskega odgovora (11, 12).



Slika 1: Zgradba C-reaktivnega proteina (povzeto po 13).

Zvišane vrednosti CRP so vedno povezane s patogenimi spremembami, zato je določanje CRP široko uporabno v diagnostiki in spremljanju različnih vnetnih procesov. Njegova koncentracija začne naraščati od 6 do 12 ur po začetku vnetnega procesa, doseže največjo vrednost po 48 urah in ostane povišana še nekaj dni po nastopu okužbe. Pri bakterijskih okužbah je koncentracija CRP običajno zvišana, nizka pa ostane pri virusnih okužbah, zato danes predvsem na osnovi CRP vrednosti razlikujemo med bakterijskimi in virusnimi infekcijami. Pri blagem vnetju in večini virusnih okužb so vrednosti CRP med 10 in 40 mg/L, pri aktivnem vnetju, bakterijskih okužbah in redko pri virusnih okužbah so vrednosti višje in se gibljejo med 40 in 200 mg/L, pri invazivnih bakterijskih okužbah dosežejo koncentracije CRP v serumu celo med 150 in 200 mg/L. Velika prednost CRP je, da ga lahko določamo v zelo majhnih količinah krvi sočasno z drugimi preiskavami ter da je metoda hitra in visoko občutljiva. Poleg tega upadanje koncentracije omogoča uspešno spremljanje poteka bolezni in odziva pacienta na terapijo, zato se zdravljenje pogosto lahko konča, ko vrednost CRP doseže normalno stanje. Vendar pa CRP ni zelo specifičen kazalec okužbe, saj povišane koncentracije zasledimo tudi po kirurških posegih ter pri vnetjih in poškodbah tkiva zaradi drugega vzroka (revmatoidni artritis, maligne bolezni, kardiovaskularne bolezni, kronična okvara ledvic, opekline), zato se zvišane vrednosti lahko interpretirajo le ob drugih ustreznih preiskavah in klinični sliki (6, 11).

Metoda določanja CRP:

Koncentracijo CRP najpogosteje določamo z imunoturbidimetrično metodo s polietilen glikolom (PEG). Po tem principu deluje tudi analizator Advia 1800, ki ga za določanje koncentracije CRP uporabljajo v Urgentnem 24-urnem laboratoriju Kliničnega centra v Ljubljani.

Turbidimetrija je imunokemijska metoda, ki temelji na merjenju prepuščene svetlobe oz. tiste svetlobe, ki se na delcih v raztopini ne sipa. Prepuščena svetloba se zbira na fotodetektorju, ki je postavljen pod kotom 0° od žarka svetlobe. Sipanje svetlobe je sicer fizikalni pojav, ki nastane kot posledica interakcije svetlobe in delcev v raztopini, pri čemer se fotoni sevanja odbijajo od delcev in z njimi trkajo brez izmenjave energije. Na sipanje svetlobe vplivajo različni faktorji, pri turbidimetriji predvsem velikost delcev. Večja kot je velikost delcev oziroma število nastalih kompleksov v raztopini, večja je jakost sipane svetlobe in s tem manjša jakost prepuščene svetlobe, zato je signal na fotodetektorju manjši ter obratno. Izmerjeni električni signal prepuščene svetlobe je sorazmeren koncentraciji analita v vzorcu, ki se nato izračuna iz umeritvene krivulje (12).

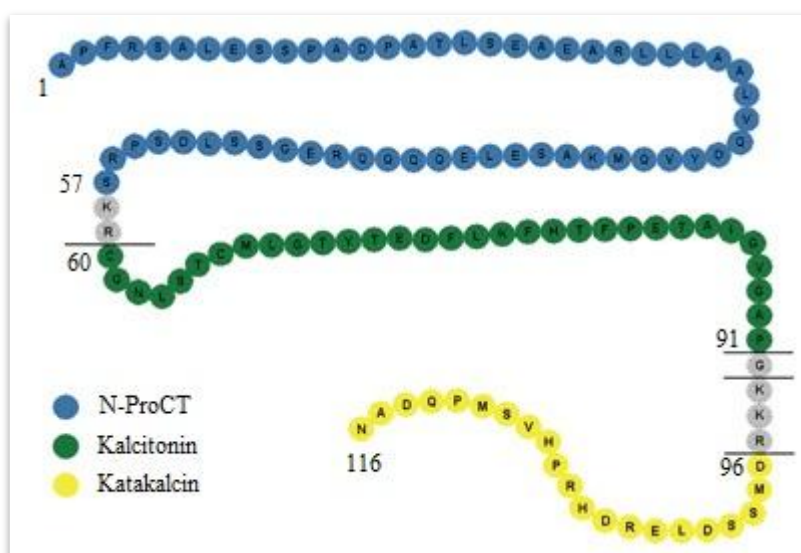
Princip metode:

Vzorec seruma, ki vsebuje CRP, se pomeša z raztopino s stalno koncentracijo anti-CRP protiteles v prisotnosti polietilen glikola (PEG). CRP v raztopini reagira kot antigen z anti-CRP protitelesi, pri čemer nastanejo imunski kompleksi, katerih količina je sorazmerna s koncentracijo CRP v serumu. Količino teh kompleksov nato izmerimo turbidimetrično pri 340 nm. Prisotnost PEG v raztopini olajša nastanek kompleksov med antigenom in protitelesi ter vzdržuje njihovo homogenost v raztopini (12, 13).

1.3.2 PROKALCITONIN

Prokalcitonin (PCT) je polipeptid sestavljen iz 116 aminokislin in z molekulsko maso približno 13 kDa. V aminokislinskem zaporedju prokalcitonina ločimo tri dele (slika 2): N-terminalno regijo (N-ProCT), C-terminalno regijo imenovano katakalcin in sekvenco, ki je v 32 aminokislinah istovetna prohormonu kalcitonina in katerega aktivna oblika nastaja v nevroendokrinih C celicah ščitnice po specifični intracelularni proteolizi prohormona.

Hitrost in obseg sinteze prokalcitonina ureja gen kalcitonin I (CALC-I), ki leži na 11 kromosomu. Najmočnejši dražljaj za izločanje PCT je sistemska bakterijska okužba. V krvi zdravih posameznikov najdemo PCT le v nizki koncentraciji pod 0,1 µg/L. Normalna koncentracija v krvi sicer znaša do 0,5 µg/L. V odsotnosti okužbe je prepis gena CALC-I omejen le na selektivno izražanje v nevroendokrinih celicah ščitnice in pljuč, medtem ko mesto sinteze z bakterijskim vnetjem inducirane PCT ni povsem pojasnjeno. Prav tako niso razjasnjeni molekularni mehanizmi, ki vodijo do povečane ekspresije CALC-I gena in posledično k povišanim vrednostim PCT v serumu bolnikov z bakterijsko okužbo. Zagotovo je le, da ga ne izločajo celice C ščitnice, saj PCT nastaja tudi pri bolnikih s popolno tiroidektomijo. Po mnenju nekaterih strokovnjakov PCT ob prisotnosti bakterijskih toksinov ali mediatorjev vnetja nastaja v celicah nekaterih organov, kot so jetra, ledvica, trebušna slinavka in maščobno tkivo (5, 15, 16, 17).



Slika 2: Aminokislinsko zaporedje prokalcitonina (povzeto po 16).

V primerjavi s CRP je PCT razmeroma zgodnji kazalec okužbe. Po okužbi z bakterijo se njegova serumska koncentracija značilno poveča že v 3 do 6 urah, v serumu pa je zaznaven že 2 uri po nastopu okužbe. Najvišje vrednosti koncentracije se dosežejo v 8 urah, na začetno vrednost pa se spet znižajo v 48 do 72 urah. Poleg bakterijskih okužb je koncentracija PCT povečana tudi pri sistemskih okužbah z glivami in paraziti. Zmerno povečanje koncentracije opazamo pri politravmatiziranih bolnikih in pri bolnikih ob večjih kirurških posegih, kot so operacije na srcu, v prsni votlini ali v trebuhu ter tudi pri bolnikih

v prvih nekaj dneh po presaditvi organov. Pri bolnikih s hudo potekajočo sepsa in pri tistih, ki so v septičnem šoku, lahko serumska koncentracija PCT tudi za več stokrat preseže mejno vrednost 0,5 µg/L. Nekateri avtorji ocenjujejo, da je prav koncentracija PCT pri odraslih osebah najbolj specifičen kazalec sepse, ki je tudi mnogo zanesljivejši od podatka o koncentraciji CRP. Pri lokaliziranih okužbah posameznih organov ter pri virusnih okužbah je koncentracija PCT praviloma nižja od mejne vrednosti 0,5 µg/L (5, 6, 18).

Določevanje PCT je danes torej pomembno predvsem pri ugotavljanju vzrokov za povišano telesno temperaturo, pri razlikovanju virusnih ter avtoimunih bolezni od akutnih bakterijskih okužb ter pri razlikovanju bakterijskega od drugih vzrokov za akutni respiratorni distress sindrom. Pri bolnikih z okužbo zgornjih dihal ima PCT poleg klinične slike pomembno vlogo tudi pri odločitvi antibiotičnega zdravljenja (18).

Metoda določanja PCT:

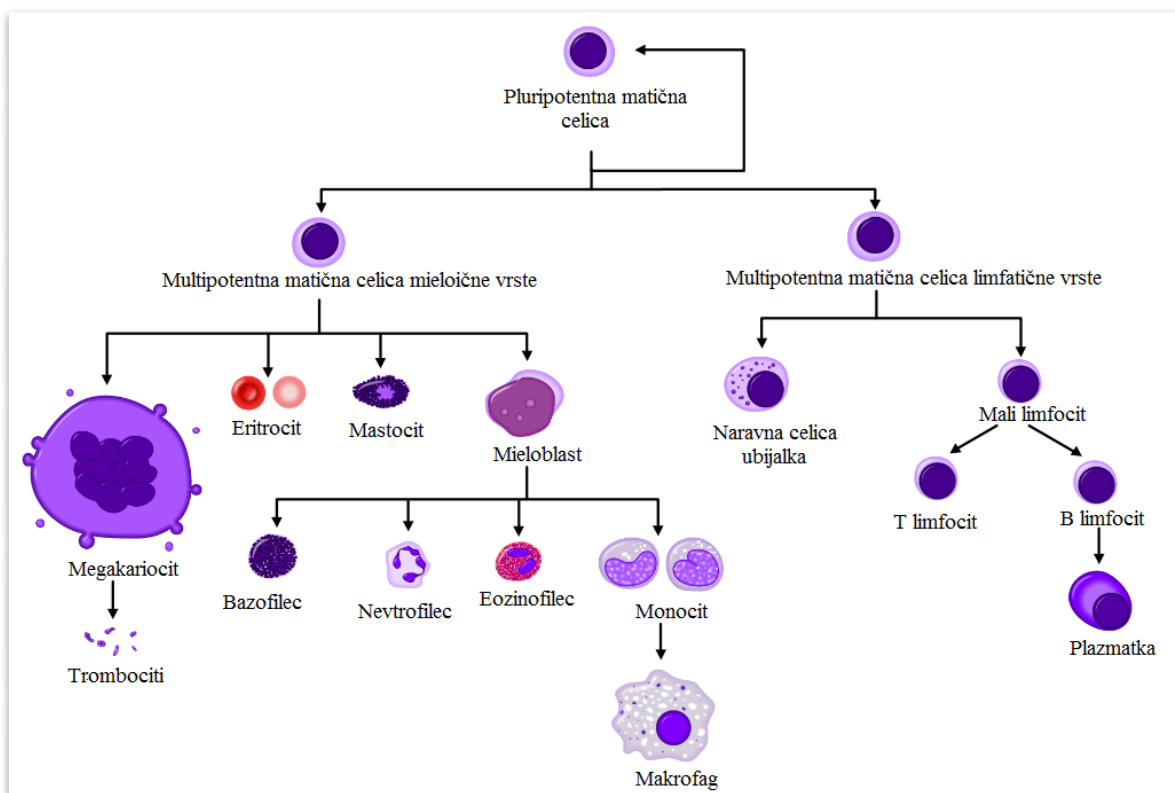
V Urgentnem 24-urnem laboratoriju Kliničnega centra v Ljubljani koncentracijo PCT določajo na analizatorju Roche Cobas e 411, ki deluje na principu dvojnega sendviča s kemiluminiscenco, pri čemer uporablja dve vrsti monoklonskih protiteles; protitelesa označena z biotinom in protitelesa označena z rutenijevim kompleksom. Del reagentov so tudi mikrodenci prevlečeni s streptavidinom (19).

Princip metode:

Vzorec plazme, ki vsebuje antigen PCT, se doda reagentu, v katerem so monoklonska specifična anti-PCT protitelesa označena z biotinom in druga vrsta monoklonskih protiteles označenih z rutenijem. Sledi inkubacija pri 37 °C, v kateri pride do tvorjenja sendvič kompleksa. Sledi druga inkubacija, kjer po dodatku s streptavidinom prevlečenih mikrodenc, nastane trden kompleks med sendvič kompleksom in mikrodenci, in sicer preko povezave z biotinom. Reakcijska mešanica se nato vsesa v merilno celico, kjer se mikrodenci zaradi magnetne privlačnosti vežejo na površino elektrode. Nevezane snovi se sperejo. Zaradi vzpostavitve napetosti na elektrodi se sproži kemiluminiscentna reakcija, pri kateri nastaja svetloba, ki jo merimo s fotodetektorjem in ki se pretvarja v električni signal. Izmerjeni električni signal je premosorazmeren koncentraciji PCT v vzorcu, ki se nato izračuna iz umeritvene krivulje (19).

1.3.3 LEVKOCITI

Vse krvne celice nastajajo pri človeku iz pluripotentne matične celice v krvotvornem organu. Pri odraslem človeku sta to rdeči kostni mozeg in limfatično tkivo. Pluripotentna matična celica se že zgodaj v hematopoezi diferencira v dve smeri, pri čemer nastaneta ali limfoidna matična celica ali mieloidna matična celica. Iz matične celice limfoidne vrste se med procesom transformacije, ki poteka v limfatičnem tkivu, nadalje razvijejo limfociti B in T ter plazmatke. Matične celice mieloidne vrste dozorevajo v usmerjene matične celice rdeče vrste, nevtrofilno-monocitne, eozinofilne in bazofilne vrste ter megakariocitno-trombocitne vrste. Iz le-teh nato po več zaporednih delitvah in dozorevanju nastajajo zrele krvne celice, ki prehajajo v kri (slika 3). Nastajanje krvnih celic je natančno uravnavano z različnimi hemopoetičnimi ravninskimi faktorji (20).



Slika 3: Hematopoeza (povzeto po 21).

Krvne celice bele vrste skupno imenujemo levkociti. Levkocite lahko preštujemo v merilni komorici oz. to opravi hematološki analizator. Rezultat je število levkocitov oz. številčna koncentracija v litru krvi. Orientacijska referenčna vrednost levkocitov v periferni krvi znaša $4,0 - 10,0 \times 10^9/L$. Po morfoloških lastnostih in funkciji v telesu razlikujemo tri vrste levkocitov, in sicer granulocite, monocite in limfocite. Deleže posameznih vrst levkocitov imenujemo diferencialna bela krvna slika (DKS). DKS izvajamo z namenom diagnostike v primeru znižane oziroma zvišane številčne koncentracije levkocitov, infekcije, zastrupitve itd. S štetjem posameznih vrst levkocitov prikažemo relativne in absolutne vrednosti za vrsto levkocitov ter opisujemo morfološke značilnosti levkocitov (oblika in velikost, razčlenjenost jeder, granulacije v citoplazmi levkocitov). Ocenimo tudi velikost, obarvanost in obliko eritrocitov ter njihove nenormalnosti. DKS opravimo s hematološkim analizatorjem, po potrebi pa tudi z razmazom periferne krvi in oceno pod mikroskopom. Absolutno število posameznih vrst levkocitov in njihovi deleži so predstavljeni v preglednici 1 (22).

Preglednica 1: Deleži posameznih vrst levkocitov (povzeto po 22).

	Delež	Absolutno število $10^9/L$
Nevtrofilci	0,4 – 0,75	1,6 – 7,5
Limfociti	0,2 – 0,50	0,8 – 5,0
Monociti	0,02 – 0,10	0,08 – 1,0
Eozinofilci	0,01 – 0,06	0,04 – 0,6
Bazofilci	0,0 – 0,01	do 0,1

Granulociti

Granulociti so levkociti, ki so dobili naziv po značilnih zrnih v citoplazmi. Poznamo tri vrste granulocitov, ki jih razvrstimo po značilnem obarvanju njihovih citoplazemskih zrn. To so nevtrofilci, eozinofilci in bazofilci (20).

Nevtrofilci merijo od 12 do 15 μm . Jedro ima dva do pet segmentov, v povprečju pa tri, ki so med seboj povezani s tanko nitko. Citoplazma je rožnate barve in vsebuje številna za celico značilna zrnca, ki so v pravilno pripravljenih razmazih sivovijoličasto obarvana. Nevtrofilci so pretežno uskladiščeni v kostnem mozgu in le manjši del jih prehaja v kri. V krvnem obroku se zadržujejo ob steni žil ali pa krožijo v krvi, kjer sicer ostanejo le krajši

čas, saj prestopajo v tkiva, kjer preživijo 2 do 4 dni. V tkivih, predvsem v sluznicah, nevtrofilci fagocitirajo bakterije in druge mikrobo, delno pa tudi anorganske snovi in nekatere celice. V tkivu se tudi aktivno gibljejo, kar jim omogoča, da pridejo do vnetnih tkiv. Zvečano število nevtrofilcev v krvi (več kot $7,5 \times 10^9/L$) imenujemo nevtrofilija. O nevtropeniji oz. znižani koncentraciji nevtrofilcev v krvi govorimo, kadar je število v krvi manjše od $1,8 \times 10^9/L$ (20).

Eozinofilci so nekoliko večji od nevtrofilcev in merijo od 12 do 17 μm . Jedro ima običajno le dva segmenta, v citoplazmi pa je veliko oranžno obarvanih eozinofilnih granulacij, tako da je običajno sploh ne vidimo. Eozinofilci so podobno kot nevtrofilci uskladiščeni v kostnem mozgu in se po potrebi sprostijo v kri, od koder nato prehajajo v tkiva; nahajajo se predvsem v podkožju in sluznicah. Glavna funkcija eozinofilcev je obramba pred paraziti, sodelujejo pa tudi pri preobčutljivostni reakciji zgodnjega tipa. Kadar je število eozinofilcev v periferni krvi več kot $4,0 \times 10^9/L$, govorimo o eozinofiliji. Zmanjšano število ali odsotnost eozinofilcev v krvi imenujemo eozinopenija (20).

Bazofilci so najmanjši od vseh granulocitov. Jedro ima običajno le dva segmenta, ki ju prekrivajo debela, groba temnovijoličasto obarvana zrnca. Bazofilci se nahajajo predvsem v tkivih in sodelujejo pri preobčutljivostnih reakcijah (20).

Limfociti

Limfociti so gibljive celice okrogle ali jajčaste oblike, velikosti od 5 do 12 μm . Jedro je nekoliko ovalno, temno modro, z grudasto kromatinsko strukturo, ki vsebuje eno ali dve jedrci. Citoplazma je svetlo sivomodra, obilna in lahko vsebuje azurofilna zrnca ali celo vakuole. Limfocite razdelimo v dve skupini. V limfocite B, ki dozori v kostnem mozgu, in v limfocite T, ki dozori v priželjcu. Večina limfocitov T kroži po limfnem in krvnem obtoku. Po limfnih žilah zapuščajo limfatično tkivo in se skozi velik limfatični vod vračajo v kri in nazaj v limfatično tkivo. Večina limfocitov B se ne vrača v krvni obtok in ostane v limfatičnem tkivu. Za razliko od drugih vrst levkocitov je življenjska doba limfocitov dolga. Limfociti in njihove razvojne oblike so osrednje celice imunskega odziva. Ko je limfocitov v krvi več kot $4,0 \times 10^9/L$, govorimo o limfocitozi, o limfopeniji pa takrat, ko je limfocitov v krvi manj kot $1,5 \times 10^9/L$ (20).

Monociti

Monociti so različnih velikosti. Mali merijo od 20 do 30 μm , večji merijo do 40 μm in so največje celice v periferni krvi. Jedro je veliko, njegova oblika pa je lahko različna. Kromatinska struktura je zelo rahla in je zato videti mrežasto ali čipkasto. Jedro ne vsebuje grud kromatina, citoplazme pa je veliko in je svetlo sivomodre barve. Lahko vsebuje tudi redka azurofilna zrnca. Monociti se v krvi zadržijo le krajši čas, od 20 do 40 ur, nato pa prehajajo v tkiva, kjer iz njih nastanejo makrofagi. Življenjska doba slednjih znaša več mesecev ali celo več let. Makrofagi fagocitirajo mikrobe in odmrle ali razpadle celice. Sodelujejo pri posredovanju antigena limfocitom T in imajo ključno vlogo pri imunski odzivnosti. V monocitih in makrofagih nastajajo tudi različni citokini. Kadar v krvi zasledimo več kot $0,8 \times 10^9/\text{L}$ monocitov, govorimo o monocitozi (20, 22).

Glavna naloga levkocitov je torej varovanje organizma pred okužbami. Do levkocitoze, stanja povišane koncentracije levkocitov v krvi, lahko pride zaradi povečanja števila nevtrofilcev, eozinofilcev, bazofilcev in limfocitov. Najpogostejši vzrok dviga levkocitov, od katerih jih je več kot 80 % nevtrofilcev, je akutna vnetna mikrobna okužba. Predvsem bakterijska. Pri hudih okužbah se v krvi lahko pojavijo tudi nesegmentirane in druge mlajše oblike nevtrofilnih granul, kar označujemo z izrazom pomik v levo. Številne študije navajajo večjo verjetnost resne bakterijske okužbe, če je število absolutnih nevtrofilcev $\geq 10,0 \times 10^9/\text{L}$ in/ali če je število nesegmentiranih nevtrofilcev $\geq 1,0 \times 10^9/\text{L}$. Nekrozo tkiva in sterilno vnetje spremljajo le malo zvišani levkociti, pri kroničnem vnetju pa običajno opazimo normalno ali le rahlo povišano število levkocitov z monocitozo. Pri virusnih infekcijah pa so levkociti lahko v referenčnih mejah, rahlo zvišani ali pogosto tudi znižani. Stanje znižane koncentracije levkocitov v krvi imenujemo levkopenija in je posledica znižanja števila nevtrofilcev ali limfocitov ali obojih. Število levkocitov je torej enostavno merljiv in sorazmerno občutljiv kazalec bakterijske okužbe, vendar je njegova slaba stran nespecifičnost, saj povišane vrednosti lahko zasledimo pri različnih bolezenskih stanjih. Poleg tega pa številne okužbe spremlja tudi normalno število levkocitov, ki ne odražajo intenzivnosti in obsega okužbe (6, 20).

Metoda določanja številčne koncentracije levkocitov z diferencialno krvno sliko:

Številčno koncentracijo levkocitov z DKS določamo s hematološkimi analizatorji. V Urgentnem 24-urnem laboratoriju uporabljajo analizatorja Advia 120 in Advia 2120. Hematološki analizatorji so različica večkratnih analizatorjev. Pri njih dozirna glava razdeli točno določen volumen aspiriranega vzorca krvi na več kanalov in istočasno izvede analize večjega števila parametrov. Poleg osnovnih hematoloških preiskav (merjenje številčne koncentracije krvnih celic, merjenje masne koncentracije hemoglobina in merjenje eritrocitnih konstant) izvajajo tudi preiskave, kot so DKS, koeficient variacije volumna eritrocitov in koeficient variacije volumna trombocitov. Pri novejših hematoloških analizatorjih analitik ne pride v stik s krvjo, ker ima analizator tako imenovani zaprti sistem dela (pipetiranje iz zaprte epruvete – igla prebode gumijasti zamašek epruvete z vzorcem) (22, 23).

Hematološki analizatorji so si med seboj zelo različni, zato jih v smislu določanja števila krvnih celic v grobem lahko razdelimo v dve skupini:

- analizatorji, ki delujejo na principu spremembe električne prevodnosti raztopine med dvema elektrodama zaradi prisotnosti krvnih celic,
- analizatorji, ki delujejo na principu elektro-optične tehnike (22).

Analizatorja Advia 120 in Advia 2120 delujeta na principu optične meritve z uporabo reakcije na mieloperoksidazo. Mieloperoksidaza je lizosomalni encim, ki ga najdemo v azurofilnih zrnih nevtrofilcev, primarnih lizosomih monocitov in v specifičnih zrnih eozinofilcev. Encim katalizira prenos dveh elektronov iz substrata na vodikov peroksid, pri čemer nastane oksidirani produkt in voda. Oksidirani produkt se na mestu aktivnosti peroksidaze obarja. Reakcija je močno pozitivna v azurofilnih zrnih granulocitov, manj v monocitih in vedno negativna v limfocitih. Merimo absorpcijo laserske svetlobe, pri čemer je delež absorbirane svetlobe sorazmeren količini temnega precipitata zaradi vsebnosti mieloperoksidaze. Pri optičnih meritvah sicer vzorec krvi potuje v enakomernem toku skozi polje zaznave, v katerega je usmerjen laserski žarek. Ko celica prečka polje zaznave, jo žarek zadene. Pri tem se na površini celice žarek sipa, prehaja skozi celico ali se razprši znotraj nje. Sipano svetlobo lovijo fotodetektorji in jo pretvarjajo v električne signale. Jakost sipane svetlobe pod velikimi koti poda značilnost notranje zgradbe celice, pod

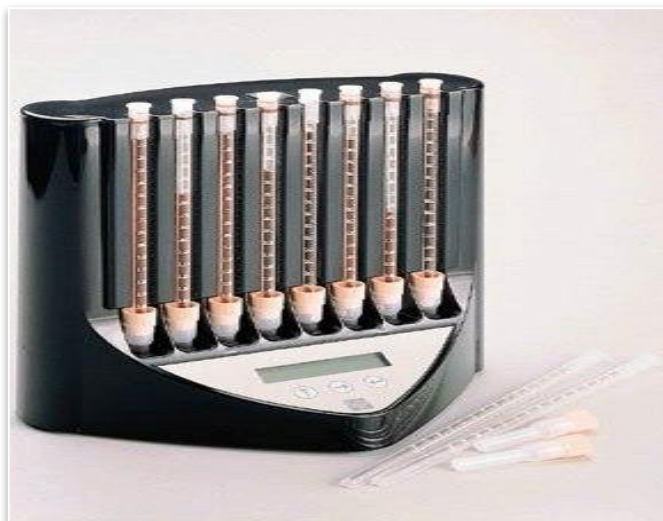
malimi koti pa velikost celice. Pri obdelavi podatkov z ustrežno programsko opremo dobljene lastnosti omogočajo določanje števila, velikosti in ločevanje podvrst levkocitov (22, 23, 24).

1.3.4 HITROST SEDIMENTACIJE ERITROCITOV

Če v navpično postavljene steklene cevke doziram kri in ji dodamo sredstvo proti strjevanju, tako da ostane tekoča, se bodo čez čas eritrociti, ki so najštevilčnejše krvne celice, zaradi lastne teže začeli posedati na dno. Ta pojav imenujemo sedimentacija eritrocitov. Bolezenska stanja pri katerih zasledimo pospešeno hitrost sedimentacije eritrocitov so akutne in kronične bakterijske infekcije, avtoimune sistemske vnetne bolezni veziva, sklepov in žil, malignomi v napredovali fazi, ko jih spremljata nekroza in vnetje ter ishemične in travmatske nekroze. Fiziološko pa je hitrost sedimentacije lahko pospešena med nosečnostjo, pri menstruacijah in v starosti (22).

Ugotavljanje hitrosti sedimentacije eritrocitov je ena najstarejših laboratorijskih preiskav. Najbolj razširjen način določanja je merjenje po Westergrenu, kjer pacientu odvzamemo vensko kri v epruvete z antikoagulantom natrijevim citratom v razmerju 1 : 4 (en del antikoagulanta in štirje deli krvi). Postopek poteka tako, da v dvomililitrsko sterilno, suho brizgo vsrkamo 0,4 mL 3,8 % sterilne raztopine natrijevega citrata in zraven odvzamemo še 1,6 mL venske krvi. Eritrociti sedimentirajo v navpični stekleni cevki dolžine 300 mm in s premerom svetline 2,5 mm, ki je do višine 200 mm graduirana od zgoraj navzdol v presledkih po 1 mm. Po eni uri odčitamo razdaljo od stebrička eritrocitov do gladine plazme in rezultat podamo v milimetrih na uro. Postopek je v celoti avtomatiziran (slika 4).

Referenčne vrednosti so odvisne od starosti. Za moške pod 50 letom starosti so referenčne vrednosti 0 - 15 mm/h, za ženske 0 – 20 mm/h. Za moške nad 50 letom starosti pa 0 – 20 mm/h in za ženske 0 – 28 mm/h (22).



Slika 4: Aparatura za odčitek meje med eritrociti in plazmo pri preiskavi hitrost sedimentacije eritrocitov (povzeto po 25).

Hitrost sedimentacije eritrocitov je odvisna od:

- Sestave krvi
- Zunanje temperature
- Časa
- Kota pod katerim kri sedimentira
- Razmerja med krvjo in antikoagulantom

Eritrociti imajo na svoji površini negativni naboj in zaradi tega se med seboj odbijajo. In vitro sedimentirajo, ker je njihova gostota večja od gostote plazme. Slednja je viskozna tekočina, zato padanju eritrocitov nasprotuje sila upora, ki je odvisna od oblike delcev in je sorazmerna s hitrostjo padanja. Pri določeni hitrosti se sila upora izenači s silo težnosti in hitrost sedimentacije postane konstantna. Ko se eritrociti zlepijo v stebričke, se razmerje med težo teh delcev in njihovo površino poveča, upor se zato zmanjša in hitrost sedimentacije se poveča. Spremembe v sestavi krvi, ki vplivajo na hitrost sedimentacije eritrocitov so število eritrocitov ter spremembe v sestavi krvne plazme, predvsem spremembe v sestavi beljakovin. Povečano število eritrocitov (policitemija) povzroči upočasnitev hitrosti sedimentacije eritrocitov, zmanjšano število eritrocitov (anemije) pa jo na splošno pospeši. Na to vpliva tudi povprečni volumen eritrocitov in njihova oblika. V primeru povečanega volumna eritrocitov, se hitrost sedimentacije pospeši, v primeru zmanjšanega volumna pa upočasni. Na hitrost sedimentacije rdečih krvničk pomembno

vpliva tudi njihova oblika. Pri poikilocitozi agregati ne nastajajo v tolikšni meri, kot bi sicer in hitrost sedimentacije se upočasnijo. Prav tako se hitrost sedimentacije lahko upočasnijo zaradi velikega števila levkocitov. Na sedimentacijo vpliva tudi hematokrit, manjši kot je večji so agregati eritrocitov. Nastanek večjih agregatov pa poveča hitrost sedimentacije eritrocitov. Plazemske beljakovine, npr. imunoglobulini, fibrinogen ali druge beljakovine akutne faze s tem, ko se vežejo na eritrocite, povzročijo nevtralizacijo negativnih nabojev na rdečih krvničkah, zato se njihova agregacija poveča in hitrost sedimentacije se pospeši. Hitrost sedimentacije se močno pospeši tudi pri visoki temperaturi, zaradi zmanjšanja viskoznosti plazme, zato preiskavo vedno izvajamo pri sobni temperaturi. Zelo pomemben dejavnik je tudi lega steklene cevke, ki mora biti vedno postavljena navpično, saj že rahel odklon od navpične lege poveča hitrost sedimentacije eritrocitov. Že pri nagibu 10 stopinj se lahko celo podvoji. Pri odvzemu moramo upoštevati tudi točno količino citratne raztopine, saj se v primeru, da je uporabimo premalo, sedimentacija zaradi povečane koagulacije krvi pospeši, če pa antikoagulant dodamo preveč, dobimo zaradi manjše koagulacije znižan rezultat (20, 22, 26).

Na določitev hitrosti sedimentacije eritrocitov pa vplivajo tudi možne laboratorijske napake pri preiskavi, kot so:

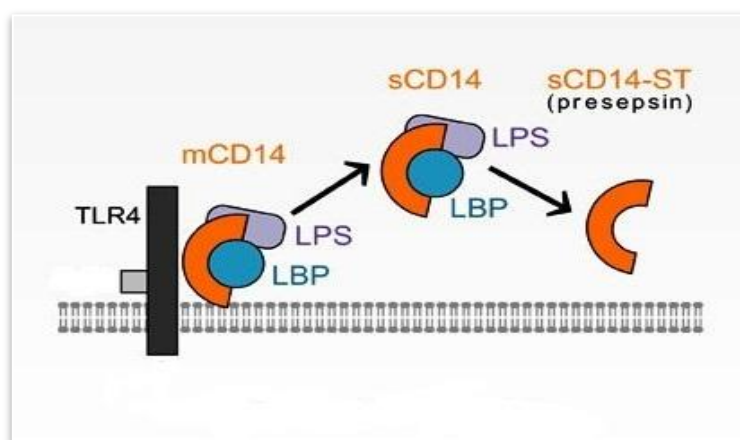
- hemoliza vzorca,
- čistoča, položaj in polnjenje cevk,
- čas od odvzema krvi do pričetka preiskave (največ ena ura),
- dolžina in notranji premer cevk,
- točen čas.

Hitrost sedimentacije eritrocitov je torej preprost in poceni, vendar nespecifičen in od številnih dejavnikov odvisen test, zato je njegov diagnostični pomen omejen. Kadar je hitrost sedimentacije pospešena gre namreč za neko bolezensko stanje in ne za določeno bolezen. Včasih je lahko tudi bolezen navkljub normalna in tako ne izključuje bolezenskega stanja, zato se določanje hitrosti sedimentacije eritrocitov običajno uporablja le v povezavi z drugimi diagnostičnimi testi (20, 22).

1.4 PRESEPSIN

CD14 je glikoprotein z molekulsko maso 55 kDa, ki ga v človeškem organizmu najdemo v dveh oblikah. V topni obliki (angl. soluble CD14, sCD14) ter v obliki membranske beljakovine glikozilfosfatidilinozitola (angl. membrane CD14, mCD14), ki se konstantno izraža na površini monocitov, makrofagov in nevtrofilcev. Zasledimo ga tudi na površini hondrocitov, dendritičnih celic, limfocitov B, keratinocitov in na epiteljskih celicah prebavnega trakta. CD14 je sicer specifičen receptor z veliko afiniteto vezave kompleksa med lipopolisaharidom (LPS) in proteinom, ki veže lipopolisaharid (angl. lipopolysaccharides binding protein, LBP). V človeškem organizmu modulira preko lipopolisaharidov sproženo apoptozo celic ter sodeluje pri prepoznavanju različnih bakterijskih produktov, kot sta npr. teihoična kislina in peptidoglikan predvsem Grampozitivnih bakterij. Ob vezavi LPS – LBP kompleksa CD14 aktivira Toll-u podoben receptor 4 (angl. Toll-like receptor 4, TLR4) in s tem specifično kaskado vnetnega odziva gostitelja proti mikroorganizmu, ki je povzročil okužbo. Del receptorja mCD14 se po vezavi kompleksa loči od celične membrane in sprosti v cirkulacijo. Tako nastane oblika sCD14, ki se med vnetnim odzivom izloča tudi neposredno iz hepatocitov, kar vodi do zaključka, da bi morali tudi sCD14 obravnavati kot protein akutne faze.

V krvnem obtoku prisotne plazemske proteaze cepijo sCD14, pri čemer nastane podtip sCD14 (angl. Soluble CD14 subtype, sCD14-ST) oz. presepsin (slika 5). S poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata so dokazali, da je presepsin sestavljen iz 64 aminokislin, ki sicer predstavljajo zaporedje N-terminalnega fragmenta glikoproteina CD14 in da molekulska masa znaša 13 kDa (27, 28).



Slika 5.: Pot nastanka presepsina (povzeto po 29).

Presepsin se od glikoproteina CD14 razlikuje po tem, da nima sposobnosti vezave kompleksa LPS – LBP in da ga ni moč detektirati z anti-CD14 protitelesi. Primerjava različnih lastnosti presepsina z glikoproteinom CD14 je predstavljena v preglednici 2 (30).

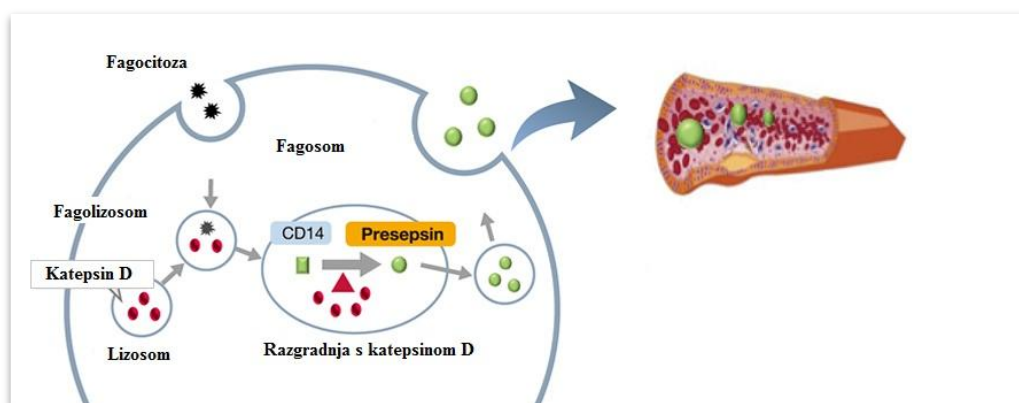
Preglednica 2: Primerjava presepsina z glikoproteinom CD14 (povzeto po 30).

Lastnost	Presepsin	CD14
Molekulska masa	13 kDa	55 kDa
Oblika	Topna oblika	Topna in membranska oblika
Struktura	Fragment CD14 - 64 aminokislin	356 aminokislin
Vezava LPS	Ne	Da
Biološka funkcija	Neznana	Receptor za endotoksine
Koncentracija v krvi zdravih oseb	48 – 171 ng/L ^{*1}	(1200 – 3100) x 10 ³ ng/L ^{*2}
Bolezni	Infekcije in sepsa	Sepsa in druge bolezni (AIDS, sistemski lupus eritematozus)
Mehanizem indukcije	Razgradnja CD14 z lizosomskimi encimi	Proteinska sinteza

*1 Podatki pridobljeni znotraj Mitsubishi Chemical Medience Corporation.

*2 Normalni EDTA vzorci (34) so bili določeni z imunokemijsko metodo za detekcijo CD14 (podatki iz R&D Systems Catalog).

Biološka vloga presepsina torej še ni povsem pojasnjena. Vendar domnevajo, da preko neposredne interakcije z levkociti T in B modulira celični in humoralni imunski odziv. Tudi mehanizem indukcije presepsina do danes še ni povsem pojasnjen, vendar nekateri avtorji menijo, da so v mehanizem vključeni fagocitoza kot odziv na bakterijsko okužbo ter katepsin D in drugi lizosomski encimi (slika 6) (27, 30).



Slika 6: Možni mehanizem izločanja presepsina (povzeto po 30).

Do povišanja plazemskih koncentracij presepsina pride med bakterijsko infekcijo ter med sepsom in septičnim šokom. Prav tako so povišane koncentracije zasledili pri lokaliziranih bakterijskih infekcijah, medtem ko so vrednosti ostale nizke pri pacientih s sindromom sistemskega vnetnega odziva (angl. Systemic Inflammatory Response Syndrom, SIRS), ki ni povezan z bakterijsko okužbo ter pri pacientih, ki so utrpeli zelo invazivne travme, ki prav tako niso povezane z infekcijo (28, 30). Prve klinične študije znotraj Mitsubishi Chemical Medience Corporation predlagajo naslednje mejne vrednosti presepsina za diferenciacijo med različnimi patološkimi stanji (29):

- < 200 ng/L: izključitev bakterijske infekcije.
- < 300 ng/L: izključitev SIRS povezanega z okužbo (sepsa).
- < 500 ng/L: sepsa je možna.
- < 1000 ng/L: zmerno tveganje za napredovanje sistemske okužbe (huda sepsa) in večje tveganje neugodnih rezultatov.
- \geq 1000 ng/L: visoko tveganje za napredovanje sistemske okužbe (huda sepsa/septični šok).

Na konferenci ameriškega Združenja za intenzivno medicino so leta 1992 sprejeli enotne definicije sindroma sistemskega vnetnega odziva, sepse, hude sepse in septičnega šoka (31).

Sindrom sistemskega vnetnega odziva (SIRS) je nespecifični in uniformni odgovor telesa na različne škodljive vplive (npr. okužba, obsežna poškodba, srčni infarkt, velik kirurški poseg, hud pankreatitis). Za formalno klinično potrditev SIRS mora imeti bolnik dva ali več naštetih sistemskih vnetnih znakov:

- Hipertermijo (> 38 °C) ali hipotermijo (< 36 °C).
- Tahikardijo (> 90 utripov/minuto ali 10 udarcev nad predvideno frekvenco).
- Tahipnejo (> 20 vdihov na minuto ali pCO_2 v arterijski krvi < 32 mmHg).
- Spremembe v krvni sliki (levkocitoza $> 12 \times 10^9/L$ ali levkopenija $< 4 \times 10^9/L$ ali > 10 % paličastih nevtrofilcev v periferni krvni sliki) (31).

O **sepsi** govorimo, če je SIRS povzročila okužba z mikroorganizmi oz. njihovimi toksini (31).

Huda sepsa je sepsa s prizadetostjo organov zaradi padca krvnega tlaka in zmanjšane prekrvitve, ki se pozitivno odziva na zdravljenje z infuzijo tekočine. Pri hudi sepsi se pojavijo naslednji simptomi:

- Hipotenzija (sistolični krvni tlak < 90 mmHg ali znižan za > 40 mmHg od sicer izmerjenih vrednosti ob odsotnih drugih razlogov za hipotenzijo).
- Laktatna acidoza.
- Hipoksija.
- Oligurija.
- Spremembe v stopnji zavesti.
- Prizadetost jeter.
- Motnje strjevanja krvi (1, 31).

Sepsa se lahko stopnjuje do nevarnega **septičnega šoka**, ki pomeni hudo sepsa, pri kateri je prišlo do cirkulatornega šoka in posledično do odpovedi več organov (angl. Multiple Organ Failure, MOF ali Multiple Organ Dysfunction Syndrome, MODS). To stanje je neodzivno na intravensko infuzijo tekočin. Večorganska odpoved nastane zaradi okvare delovanja dveh ali več organov ali organskih sistemov (1). Sepsa moramo zato hitro spoznati in jo čim prej pravilno zdraviti, saj si omenjeni stadiji hitro sledijo in se v nasprotnem primeru končajo s smrtnim izidom. Vendar pa število bolnikov s hudo sepsa in septičnim šokom v zadnjih letih narašča in tako predstavlja deseti najpogostejši vzrok smrti nasploh in vodilni vzrok smrti v enotah intenzivne terapije. Umrljivost bolnikov s hudo sepsa je tako 30 % - 50 %, s septičnim šokom pa še okoli dvakrat višja, medtem ko zaradi npr. možganske kapi umre 12 % do 19 % in zaradi miokardnega infarkta do 8 % bolnikov, zdravljenih v bolnišnici (31).

Prve klinične študije torej predlagajo, da bi bil presepsin lahko obetaven biološki marker lokaliziranih in sistemskih bakterijskih infekcij ali sepse, zato smo predpostavili, da bi bil kot tak lahko primeren tudi za razlikovanje bakterijske od virusne okužbe, kar je bil tudi cilj dokazati s tem diplomskim delom.

2 NAMEN DELA

Na intenzivnih oddelkih moramo pri bolnikih z zvišano telesno temperaturo čim prej ugotoviti vzrok zanjo, predvsem pa opredeliti morebitno bakterijsko okužbo in začeti z ustreznim zdravljenjem. Posebno težavno, celo za izkušenega zdravnika, je ugotavljanje bakterijskih okužb pri bolnikih, ki so že dlje časa hospitalizirani na intenzivnih oddelkih, saj ti bolniki običajno že prejemajo antibiotike, upoštevati pa moramo tudi druge vzroke za zvišanje telesne temperature, kot so virusne in parazitarne okužbe, sistemske alergične reakcije ali sistemske vnetne bolezni (5). Ker je narava znakov in simptomov infekcijske bolezni nespecifična, je razlikovanje virusnih ter avtoimunih bolezni od akutnih bakterijskih okužb le na podlagi kliničnih znakov nezanesljivo. Danes si zato pomagamo z laboratorijsko diagnostiko okužb, kjer uporabljamo predvsem določanje koncentracije CRP, PCT in števila levkocitov v periferni krvi. Levkocitoza, visoke vrednosti CRP in klinični izvid nas dostikrat usmerijo v diagnozo bakterijske okužbe, ki je z mikrobiološkimi preiskavami ne moremo vedno potrditi. Zato potrebujemo vnetni označevalec, ki bo sposoben razlikovati vnetni odziv na bakterijsko okužbo od drugih vrst vnetja, pa tudi ki bo sposoben kazati na resnost in prognozo bolezni. V okviru diplomske naloge bomo tako na osnovi rezultatov določitve CRP vrednosti paciente razvrstili v tri skupine. V skupino zdravih preiskovancev, skupino bolnikov z bakterijsko okužbo in skupino z virusno okužbo. Tem bolnikom bomo nato določili novi marker presepsin in preko primerjave z vnaprej izmerjenimi koncentracijami klasičnih parametrov (CRP, PCT, številčna koncentracija levkocitov) preverili ali je merjenje presepsina lahko edini in bolj zanesljiv test za razlikovanje med bakterijskimi in virusnimi okužbami od danes rutinsko uporabnih parametrov.

Če bomo domnevo o primernosti presepsina, kot zanesljivega označevalca za razlikovanje bakterijske od virusne okužbe potrdili, bi pacientom s tem omogočili hitrejšo in lažjo diagnostiko okužb in posledično hitrejše zdravljenje. S tem bi tudi zmanjšali nepotrebno antibiotično zdravljenje virusnih infekcij in ne nazadnje povečali možnost preživetja.

Hipoteza

Presepsin je primeren označevalec za razlikovanje bakterijskih okužb od okužb virusne etiologije.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 KLINIČNO OKOLJE

Raziskavo smo izvedli v Univerzitetnem kliničnem centru v Ljubljani v Urgentnem laboratoriju (urgentna in 24-urna laboratorijska služba za potrebe Kliničnega centra in ljubljanske zdravstvene regije).

3.2 IZBIRA BOLNIKOV

Bolnike smo izbrali naključno iz računalniške baze Urgentnega 24-urnega laboratorija, in sicer na osnovi že izmerjene koncentracije CRP in jih nato glede na izvid razporedili v tri skupine. Če je bila izmerjena koncentracija CRP višja od 100 mg/L, smo okužbo opredelili kot bakterijsko in bolnike uvrstili v skupino, ki smo jo poimenovali *Bakterijska okužba*. V kolikor je bila izmerjena CRP vrednost manjša od 100 mg/L, vendar višja od 5 mg/L, smo okužbo opredelili kot virusno in jo uvrstili v skupino *Virusna okužba*. V tretjo skupino poimenovano *Zdravi preiskovanci* pa smo uvrstili osebe pri katerih je bila izmerjena CRP vrednost manjša od 5 mg/L. V vsako od skupin smo vključili po 20 preiskovancev. Edini kriterij za izbor bolnikov je bila starost nad 18 let. Izbrani bolniki so bili hospitalizirani na različnih oddelkih Kliničnega centra.

Pri izvedbi raziskovalnega dela je bila zaupnost osebnih podatkov varovana v skladu z Zakonom o varnosti osebnih podatkov.

3.3 ZBIRANJE PODATKOV IN VZROCEV

Podatke o preiskovancih in o koncentraciji CRP, PCT ter številu levkocitov v periferni krvi smo pridobili iz računalniške baze Urgentnega laboratorija. Vzorce odvzete krvi izbranih preiskovancev smo nato poiskali v skladišču Urgentnega laboratorija, kjer vse vzorce po izvedeni analizi hranijo še sedem dni. Vrednosti presepsina smo določili v plazmi, ki smo

jo pridobili tako, da smo izbrane vzorce krvi centrifugirali 10 minut na 3000 obratih in nato plazmo s pipeto ločili od krvnih celic. Zbrane vzorce plazme smo zamrznili na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in jih analizirali serijsko pri več bolnikih skupaj.

3.7 DOLOČANJE KONCENTRACIJE PRESEPSINA

Koncentracijo presepsina smo določili z analizatorjem PATHFAST[®] (slika 7) proizvajalca Mitsubishi Chemical Medience Corporation, ki uporablja princip kemiluminescenčne encimsko imunološke metode (CLEIA) in patentirane Magtration[®] tehnologije. Analizator je popolnoma avtomatiziran, majhen in enostaven za uporabo. Hkrati lahko analizira 6 različnih ali enakih parametrov, pri tem pa omogoča hitro kvantitativno določitev, saj rezultat dobimo v le 17 minutah. Analiziramo lahko vzorec polne krvi ali plazme. V primeru polne krvi aparat pri izračunu koncentracije upošteva predhodno določen hematokrit, katerega privzeta vrednost je 40 % (32). Del naprave so tudi vgrajeni računalnik, tiskalnik in čitalec kod, kar močno poenostavi vnos podatkov pacienta in izpis rezultatov. Možen je tudi prenos podatkov v LIS (Laboratorijski informacijski sistem). Pri delu se uporablja tovarniško pripravljen reagentni komplet istega proizvajalca, ki vsebuje reagentne vložke, kalibratorje in kontrole. Vsebnost reagentov zadostuje za do 60 določitev.

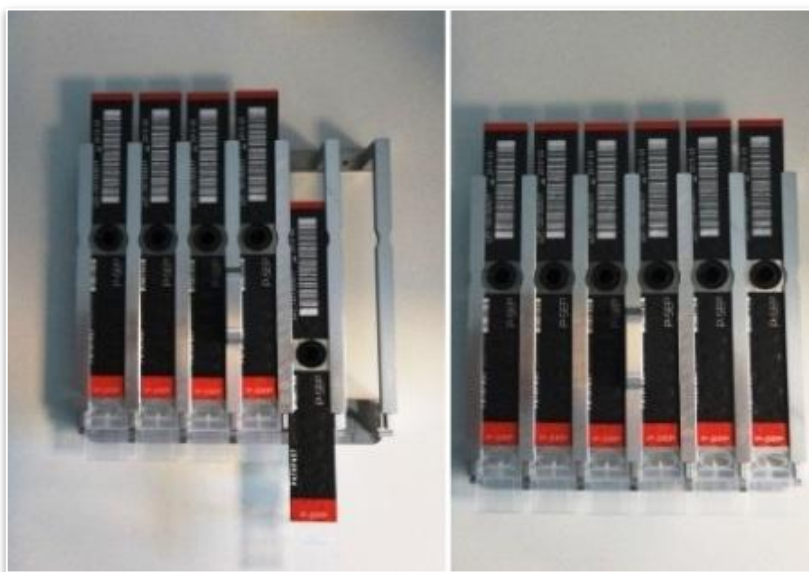


Slika 7: Analizator PATHFAST.

Posamezen reagentni vložek vsebuje 16 vdolbin, od katerih je 9 praznih (# 1, 6, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 16), 7 pa napolnjenih z ustreznim reagentom:

- # 2: anti – presepsin zajčja poliklonska protitelesa označena z alkalno fosfatazo v MES pufru in konzervansu (natrijev azid).
- # 7: anti – presepsin mišja monoklonska protitelesa označena z magnetnimi delci v MES pufru.
- # 13: kemiluminescentni substrat CDP-Star[®].
- # 11: pufer za redčenje vzorcev - Tris pufer in konzervans (natrijev azid).
- # 3, 4, 5: pufer za izpiranje - MOPS pufer in konzervans (natrijev azid) (32).

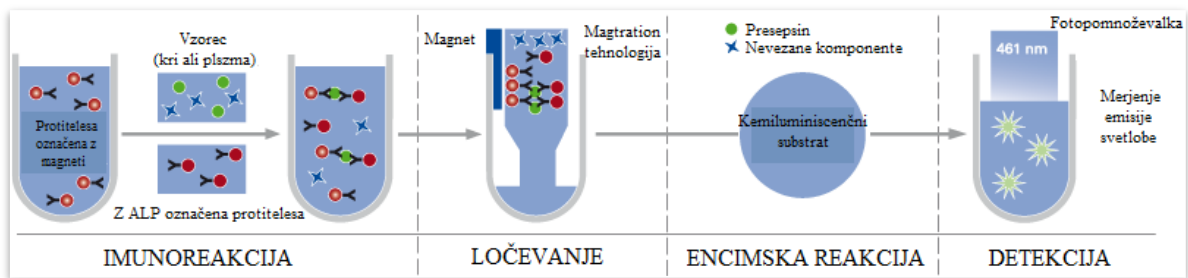
Vse vdolbinice, z izjemo prve (za vzorec) in desete (za štetje), so prekrite z aluminijasto zaporko, ki je označena s črtno kodo in imenom analizirane snovi (slika 8). Med samo analizo se aluminijasta zaporka preluknja z enoto za luknjanje, kar omogoča varen prehod nastavkov za pipete v reagentne vdolbinice (32).



Slika 8: Stojalo z reagentnimi vložki.

Princip metode:

Analizni postopek temelji na CLEIA metodi in patentirani Magtration[®] tehnologiji, pri čemer vključuje naslednje stopnje: imunoreakcijo, ločevanje, encimsko reakcijo in detekcijo (slika 9) (32, 33).



Slika 9: Princip metode za določanje koncentracije presepsina (povzeto po 33).

V prvi stopnji, stopnji imunoreakcije poteče 5 minutna inkubacija pri 37,5 °C, v kateri pride do tvorbe sendvič kompleksa med antigenom presepsinom, ki ga vsebuje vzorec seruma, anti-presepsin poliklonskimi protitelesi označenimi z alkalno fosfatazo in anti-presepsin monoklonskimi protitelesi označenimi z magnetnimi delci. Sledi stopnja ločevanja s patentirano Magstration[®] tehnologijo. Gre za registrirano ime proizvajalca Precision System Science in pomeni magnetno filtracijo, ki ločuje med snovmi vezanimi na magnetne delce in prostimi snovmi v raztopini. Namreč, ob vsesavanju raztopine v pipeto se nastali kompleksi zaradi magnetnih delcev ujamejo na steno nastavka za pipete, nevezane komponente raztopine pa se sperejo nazaj v vdolbinico za vzorec. Temu sledi spiranje kompleksov iz pipetnih nastavkov z novimi reagenti ter nato še ločevanje magnetnih delcev iz sendvič kompleksa, tako da v raztopini ostanejo samo prečiščeni kompleksi med monoklonskimi protitelesi brez magnetnih delcev, antigenom presepsinom ter poliklonskimi protitelesi označenimi z alkalno fosfatazo. Po odstranitvi nevezanih protiteles in magnetnih delcev se v reakcijsko zmes avtomatsko doda kemiluminescenčni substrat CDP-Star[®] (spojina 1,2-diooksetana), ki je registrirano ime proizvajalca Applied Biosystems. Omenjeni substrat reagira z alkalno fosfatazo, pri čemer pride do odcepa fosfata na substratu in do nastanka metastabilnega intermediata, ki nadalje razpade v adamantilni keton in arilni ester. Ester pri prehodu v osnovo stanje odda odvečno energijo v obliki fotona, ki se zbira na fotopomnoževalki in se nato pretvori v električni signal, ki ga merimo pri 461 nm. Izmerjeni signal je sorazmeren koncentraciji analita v vzorcu, ki se nato izračuna s pomočjo standardne umeritvene krivulje (32, 33).

Območje občutljivosti: 20 – 20,000 ng/L (32).

Postopek analize:

1. Iz analizatorja smo vzeli stojalo za reagentne vložke ter vanj vstavili ustrezne reagente.
2. V vdolbinico za vzorec smo odpipetirali 100 μ L plazme in stojalo vstavili nazaj v analizator.
3. Dodali smo tudi Pathfast nastavke za pipete, zaprli pokrov analizatorja in s pritiskom na start gumb zagnali analizo.
4. Analizator je avtomatsko odčital vrsto reagenta in določil vrsto analize ter hkrati preveril tip preiskovanega vzorca, saj v primeru polne krvi pri izračunu koncentracije upošteva hematokrit.
5. Sledil je potek analize po prej opisanem postopku.
6. Po izteku analize je sledila odstranitev reagentnih vložkov in izpis rezultatov.

V kolikor smo za analizo uporabili nov reagenčni paket, smo pred pričetkom reakcije izvedli tudi kalibracijo in kontrolo kakovosti, ki sta se izvajali s predpisanim materialom in po predpisanem postopku proizvajalca. Kalibracijski material in material za kontrolo kakovosti imata točno določene vrednosti analitov, ki jih meri analizator. Njihov rok uporabe pa je omejen. S kalibracijo in kontrolo kakovosti smo dosegli sledljivost naših meritev in zagotovili, da aparatura dosega predpisane rezultate.

3.8 STATISTIČNA ANALIZA

Za analizo pridobljenih podatkov smo uporabili programski paket MedCalc za Windows, verzija 12.3.0. Normalnost porazdelitve posameznih parametrov (CRP, PCT, levkocitov in presepsina) smo preverili z D'Agostino–Pearsonovim testom. V primeru, da so bile vrednosti p večje od 0,05, smo potrdili normalno porazdeljevanje spremenljivk, v nasprotnem primeru pa porazdeljevanje spremenljivk ni bilo statistično značilno normalno. Preverili smo tudi morebitne osamelce oz. izstopajoče vrednosti (angl. outliers) z metodo Tukey, 1977.

Za vsak posamezen parameter znotraj vsake skupine smo določili tudi minimalno in maksimalno vrednost ter kvartile (prvi – Q_1 , drugi – mediana, tretji – Q_3). Te podatke smo nato predstavili v grafu kvantilov (angl. Box-and-Whisker plot), kjer pravokotnik predstavlja razpon od prvega do tretjega kvartila, do minimuma in maksimuma pa segata daljci. Znotraj pravokotnika je s črto predstavljena mediana. Na grafu so lahko prikazane tudi morebitne oddaljene vrednosti (34).

V nadaljevanju smo v primeru normalno porazdeljenih spremenljivk za primerjavo vrednosti med skupino bakterijskih in virusnih okužb ter skupino zdravih in bakterijskih ali virusnih okužb uporabili *Studentov t-test* z upoštevanjem enakih ali neenakih varianc. Kadar gre za majhne vzorce, *t-test* dveh neodvisnih vzorcev temelji na predpostavki o enakosti varianc. Pred *t-testom* smo zato opravili *F-test* (test za primerjavo varianc) in se s tem prepričali, če so standardni odkloni varianc znotraj skupin enaki. Če je bila *p* vrednost *F-testa* manj kot 0,05, je to pomenilo, da so standardni odkloni varianc znotraj skupine zdravih in znotraj skupine bolnih različni, zato smo za primerjavo vrednosti spremenljivk uporabili *t-test* z upoštevanjem neenakih varianc oz. *t-test* z logaritmiranimi vrednostmi parametra, sicer pa *t-test* z upoštevanjem enakih varianc. V primeru nenormalno porazdeljenih vrednosti smo uporabili *Mann-Whitneyev test*. V vseh primerih smo za statistično značilno vzeli vrednost pod 0,05 ($p < 0,05$) (35).

Določili smo tudi stopnjo povezanosti presepsina z vsemi ostalimi parametri znotraj vsake skupine, in sicer z uporabo Spearmanovega koeficienta korelacije rangov, ki prikazuje stopnjo povezanosti dveh spremenljivk, ki se ne porazdeljujeta normalno. Koeficient korelacije je število med -1 in 1. Ujemanje je pozitivno (premosorazmerno), če so vrednosti Spearmanovega koeficienta pozitivne, in negativno (obratnosorazmerno), če so vrednosti negativne. Če parameter zavzema vrednost 0, povezanosti med parametroma ni. Korelacijo med posameznima parametroma smo predstavili tudi grafično s Scatterjevim diagramom (35).

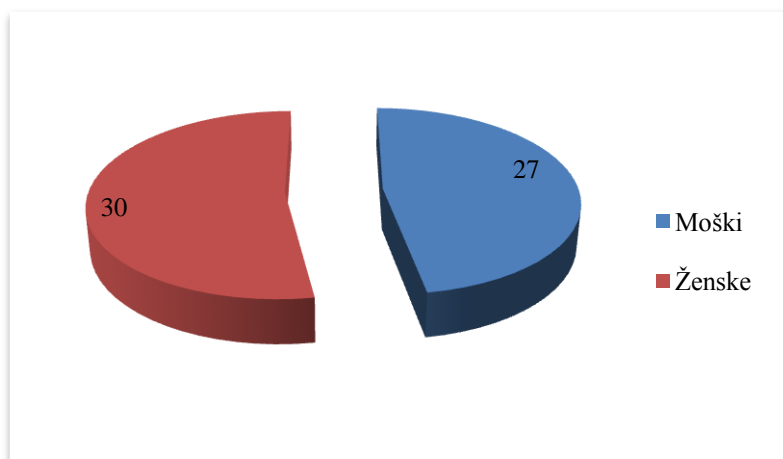
Občutljivost in specifičnost posameznega parametra smo predstavili grafično s krivuljo, ki jo imenujemo krivulja občutljivosti in specifičnosti oz. krivulja ROC (angl. Receiver Operating Characteristic Curve). Na *y* osi se nahaja občutljivost (resnično pozitivni rezultat), na *x* osi pa 100-specifičnost (lažno pozitivni rezultat). Diagnostična občutljivost je verjetnost pozitivnega izida testa pri osebah, pri katerih je bolezen prisotna. Specifičnost testa podaja verjetnost, da dobimo negativen rezultat testa, ko bolezen ni prisotna. Določili

smo tudi površino pod ROC krivuljo (angl. Area Under the ROC Curve, AUC), ki podaja verjetnost, da bo določen parameter pravilno ločil med bolnimi in zdravimi oz. v našem primeru tudi med bolniki z virusno in bolniki z bakterijsko okužbo. AUC torej povezujemo z natančnostjo uporabljenega označevalca za detekcijo (35).

4 REZULTATI

4.1 PODATKI O PREISKOVANCIH

V raziskavo smo vključili 60 preiskovancev, ki smo jih nato razdelili v skupino virusne okužbe, skupino bakterijske okužbe in v skupino zdravih. Pri vseh parametrih znotraj vsake skupine smo preverili osamelce oz. izstopajoče vrednosti. Eno takšnih vrednosti smo zaznali v primeru presepsina v skupini zdravih preiskovancev (> 20000 ng/L) in dve v skupini virusne okužbe (16698 ng/L in > 20000 ng/L). Izstopajoče vrednosti se lahko pojavijo zaradi različnih razlogov. V našem primeru bi lahko šlo za napako pri zbiranju podatkov ali pa izbrana oseba ni pripadala ciljni populaciji v katero smo jo določili. Ker analize omenjenih vzorcev nismo imeli moč ponoviti, smo se odločili, da te tri preiskovance izključimo iz obravnave in tako dobimo bolj pravilno oceno o koncentraciji presepsina znotraj posamezne skupine. V statistično obdelavo smo tako vključili 57 preiskovancev. Od tega 30 žensk in 27 moških. Zastopanost po spolih je predstavljena tudi na sliki 10.



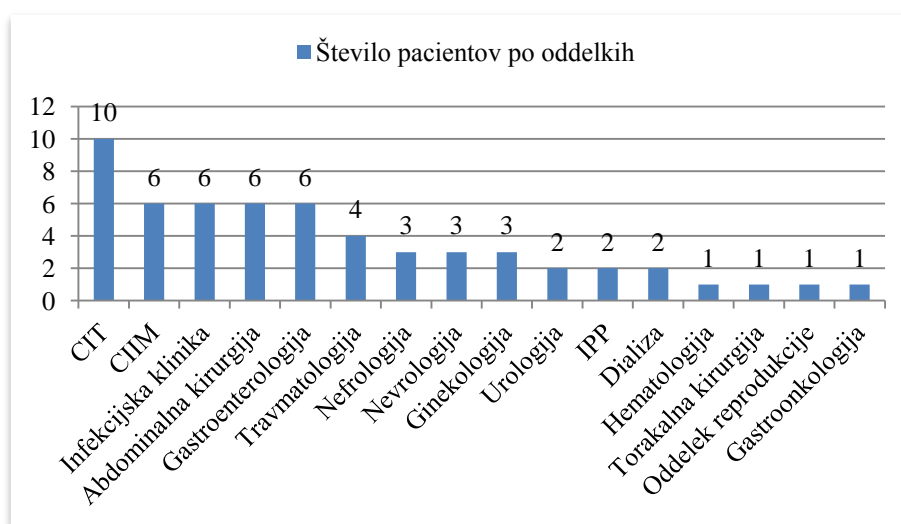
Slika 10: Zastopanost preiskovancev glede na spol.

V skupini zdravih je bilo tako skupno 19 preiskovancev, v skupini virusne okužbe 18 in v skupini bakterijske okužbe 20 preiskovancev. Povprečna starost znotraj posamezne skupine je predstavljena v preglednici 3.

Preglednica 3: Povprečna starost bolnikov v posameznih skupinah.

	Zdravi	Virusna okužba	Bakterijska okužba	Vsi preiskovanci
Št. oseb	19	18	20	57
Starost (v letih)	58,95 ± 14,98	57,78 ± 16,61	65,00 ± 16,85	60,70 ± 16,20

V raziskavo vključeni pacienti so bili hospitalizirani na različnih oddelkih Kliničnega centra v Ljubljani. Največ izmed njih na oddelku Centra internistične intenzivne terapije (CIIM) ali Centralne intenzivne terapije (CIT) ter na oddelkih Abdominalne kirurgije in na oddelkih Infekcijske klinike. Prikaz števila pacientov po oddelkih je prikazan na sliki 11.



Slika 11: Prikaz števila pacientov po oddelkih.

4.2 TESTNA STATISTIKA

V nadaljevanju so za vsak izmerjeni parameter posebej v preglednicah predstavljeni rezultati D'Agostino–Pearsonovega testa normalnosti porazdelitve. Rezultati primerjave minimalnih in maksimalnih vrednosti ter vrednosti mediane za vsak parameter med različnimi skupinami, so predstavljeni v sliki kvantilov. Na isti sliki so predstavljeni tudi rezultati statističnih testov, s katerimi smo ovrednotili ali posamezen parameter statistično značilno razlikuje infekcijo bakterijskega ali virusnega izvora od zdravih preiskovancev oz. če razlikuje med bakterijsko in virusno okužbo.

4.2.1 C-REAKTIVNI PROTEIN

V preglednici 4 so predstavljeni rezultati testa normalnosti porazdelitve za parameter CRP.

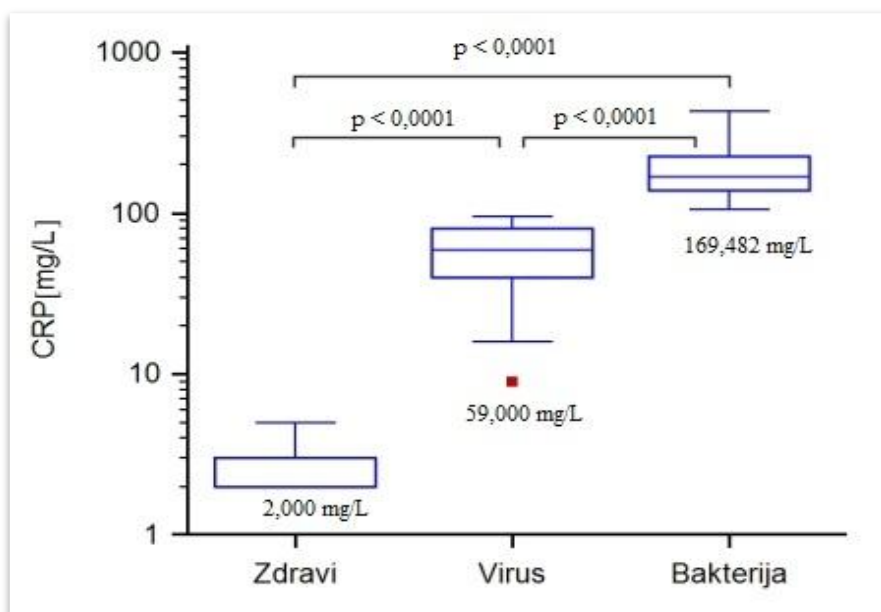
Preglednica 4: Rezultati normalnosti porazdelitve CRP.

	CRP Zdravi	CRP Virus	CRP Bakterija
N	19	18	20
D'Agostino Pearsonov test distribucije	$p = 0,0396^*$	$p = 0,6859$	$p = 0,5015^*$

* Po logaritmski transformaciji.

Spremenljivka se porazdeljuje normalno, če je $p > 0,05$. Iz rezultatov predstavljenih v preglednici 4 vidimo, da so vrednosti CRP v primeru virusne in bakterijske okužbe porazdeljene normalno, v skupini zdravih preiskovancev pa se vrednosti tudi po logaritmski transformaciji ne porazdeljujejo statistično značilno normalno.

Zaradi nenormalnosti porazdelitve spremenljivke pri zdravih, smo v nadaljevanju za primerjavo vrednosti CRP med skupinami, uporabili neparametrični *Mann-Whitneyev test*. Za statistično značilno smo vzeli vrednost $p < 0,05$. V vseh treh primerih smo dobili $p < 0,0001$ in s tem dokazali, da CRP med skupinami statistično pomembno razlikuje. Dobljeni rezultati so predstavljeni na sliki 12.



Slika 12: Prikaz razlik v porazdelitvi podatkov CRP znotraj vsake skupine z rezultati Mann-Whitneyevega testa.

Pri primerjavi minimalnih in maksimalnih vrednosti ter vrednosti mediane ugotovimo, da so po pričakovanju vrednosti najvišje v skupini bakterijske okužbe, kjer mediana znaša 169,482 mg/L, minimalna vrednost 105,0 mg/L in maksimalna 431,0 mg/L. Pri virusni okužbi so vrednosti nižje. Mediana znaša 59,000 mg/L, minimalna in maksimalna vrednost pa 9,0 mg/L in 96,0 mg/L. Pri zdravih preiskovancih so te vrednosti še nižje; mediana in najnižja izmerjena vrednost znašata 2,0 mg/L, najvišja izmerjena vrednost pa 5,0 mg/L (slika 12).

4.2.2 PROKALCITONIN

V preglednici 5 so predstavljeni rezultati testa normalnosti porazdelitve za parameter PCT.

Preglednica 5: Rezultati normalnosti porazdelitve PCT.

	PCT Zdravi	PCT Virus	PCT Bakterija
N	19	18	20
D'Agostino Pearsonov test distribucije	p = 0,3648*	p = 0,3058*	p = 0,3137*

* Po logaritemski transformaciji.

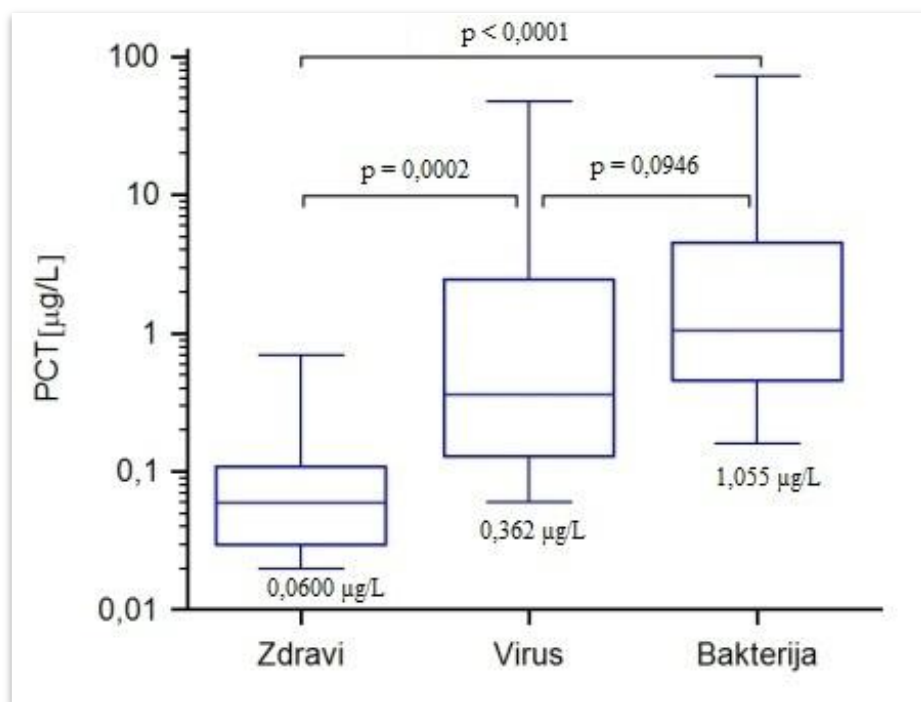
Ker je v vseh treh primerih $p > 0,05$, so vrednosti prokalcitonina v vseh skupinah normalno porazdeljene.

Za primerjavo PCT vrednosti med skupinami smo uporabili *Studentov t test*, in sicer za primerjavo skupine zdravih z obema skupinama bolnih *Studentov t-test* z upoštevanjem neenakih varianc, za primerjavo med skupinama z bakterijsko in virusno okužbo pa *Studentov-t test* z upoštevanjem enakih varianc. Za ustrezen test smo se odločili na osnovi rezultatov *F-testa*, ki so predstavljeni v preglednici 6.

Preglednica 6: Rezultati F-testa homogenosti varianc za PCT.

	Zdravi - Virus	Zdravi – Bakterija	Virus - Bakterija
F-test	p = 0,008	p = 0,015	p = 0,779
Predpostavljamo:	Neenake variance	Neenake variance	Enake variance

Z rezultati *t*-testa smo dokazali, da PCT statistično značilno razlikuje zdrave preiskovance od preiskovancev z virusno okužbo ($p = 0,0002$) ter preiskovancev z bakterijsko okužbo ($p < 0,0001$), medtem ko med bakterijskimi in virusnimi bolniki statistično pomembno ne razlikuje ($p = 0,0946$) (slika 13). Iz slike 13 je tudi razvidno, da so v primeru PCT najvišje mediana vrednosti v skupini bakterijske okužbe, kjer le-ta znaša $1,055 \mu\text{g/L}$, najnižje pa pri zdravih preiskovancih z rezultatom $0,0600 \mu\text{g/L}$. Med mediano zdravih in mediano bakterijskih bolnikov se nahaja mediana virusnih bolnikov z vrednostjo $0,362 \mu\text{g/L}$. Tudi najvišje in najnižje izmerjene vrednosti parametra padajo v enakem zaporedju od bakterijske okužbe do skupine zdravih preiskovancev. Maksimalna vrednost bakterijske skupine tako znaša $72,210 \mu\text{g/L}$, virusne $47,230 \mu\text{g/L}$ in skupine zdravih $0,700 \mu\text{g/L}$. Minimalna izmerjena vrednost bakterijske skupine pa $0,160 \mu\text{g/L}$, virusne $0,06 \mu\text{g/L}$ in skupine zdravih preiskovancev $0,02 \mu\text{g/L}$.



Slika 13: Prikaz razlik v porazdelitvi podatkov PCT znotraj vsake skupine z rezultati *t*-testa.

4.2.3 LEVKOCITI

V preglednici 7 so predstavljeni rezultati testa normalnosti porazdelitve za številčno koncentracijo levkocitov.

Preglednica 7: Rezultati normalnosti porazdelitve števila levkocitov.

	Lkci Zdravi	Lkci Virus	Lkci Bakterija
N	19	18	20
D'Agostino Pearsonov test distribucije	p = 0,7848	p = 0,7371	p = 0,4902

Število levkocitov je znotraj vseh treh skupin porazdeljeno statistično značilno normalno.

Tudi v tem primeru smo zato za ugotavljanje statistično pomembnih razlik med skupinami uporabili *Studentov t-test* na osnovi rezultatov *F-testa*, ki so predstavljeni v preglednici 8. Za primerjavo vrednosti levkocitov pri zdravih in pri virusnih bolnikih smo tako uporabili *t-test* z upoštevanjem enakih varianc. Prav tako smo isti test uporabili za primerjavo vrednosti med skupinama z virusno in bakterijsko okužbo. Za primerjavo zdravih in bolnikov z bakterijsko okužbo pa smo uporabili *t-test* z upoštevanjem neenakih varianc.

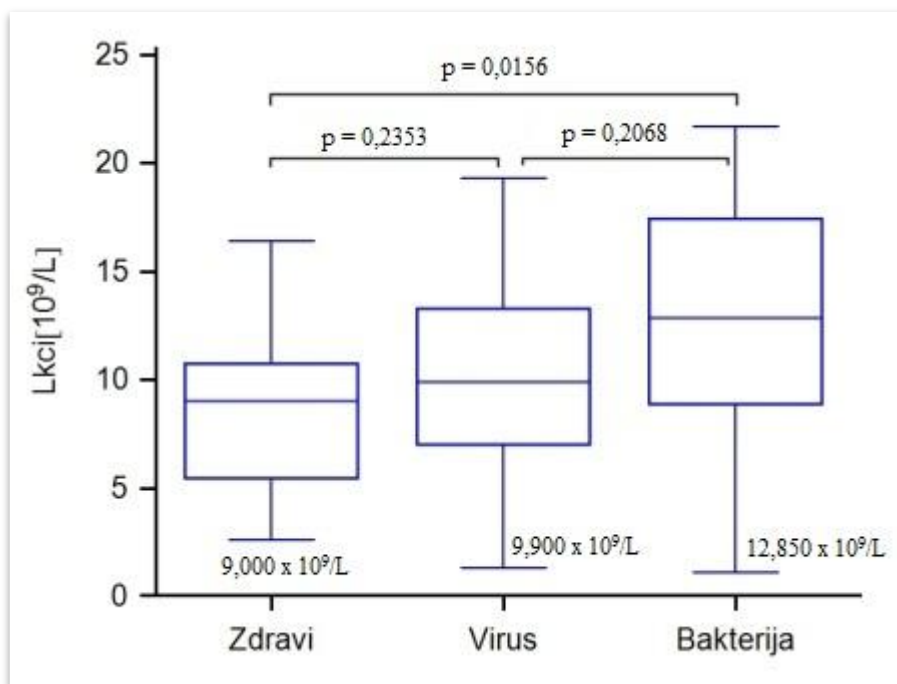
Preglednica 8: Rezultati F-testa homogenosti varianc za levkocite.

	Zdravi - Virus	Zdravi – Bakterija	Virus – Bakterija
F-test	p = 0208	p = 0,042	p = 0,445
Predpostavljamo:	Enake variance	Neenake variance	Enake variance

Rezultati *t-testa* predstavljeni na sliki 14 so pokazali, da ni statistično pomembnih razlik v številčni koncentraciji levkocitov med skupino zdravih preiskovancev in skupino z virusno okužbo (p = 0,2353). Prav tako ni statistično pomembne razlike v številu levkocitov med virusno in bakterijsko okužbo (p = 0,2068). Se pa vrednosti statistično značilno razlikujejo med skupino zdravih in skupino z bakterijsko infekcijo (p = 0,0156).

V skupini zdravih preiskovancev je vrednost mediane $9,000 \times 10^9/L$ in s tem najnižja med skupinami. Sledi mediana virusne okužbe z vrednostjo $9,900 \times 10^9/L$ in nato mediana $12,850 \times 10^9/L$ skupine z bakterijsko infekcijo. Za razliko od drugih parametrov je bila najnižja vrednost številčne koncentracije levkocitov izmerjena v skupini preiskovancev z bakterijsko okužbo, in sicer $1,1 \times 10^9/L$, nato v skupini virusne infekcije z vrednostjo $1,3 \times 10^9/L$. V skupini zdravih je bila najnižja izmerjena vrednost $2,6 \times 10^9/L$. Maksimalna

vrednost pa je pri zdravih $16,4 \times 10^9/L$, v skupini virusne infekcije $19,3 \times 10^9/L$ in v skupini bakterijske okužbe $21,7 \times 10^9/L$ (slika 14).



Slika 14: Prikaz razlik v porazdelitvi podatkov števila levkocitov znotraj vsake skupine z rezultati t-testa.

4.2.4 PRESEPSIN

V preglednici 9 so predstavljeni rezultati testa normalnosti porazdelitve za parameter presepsin.

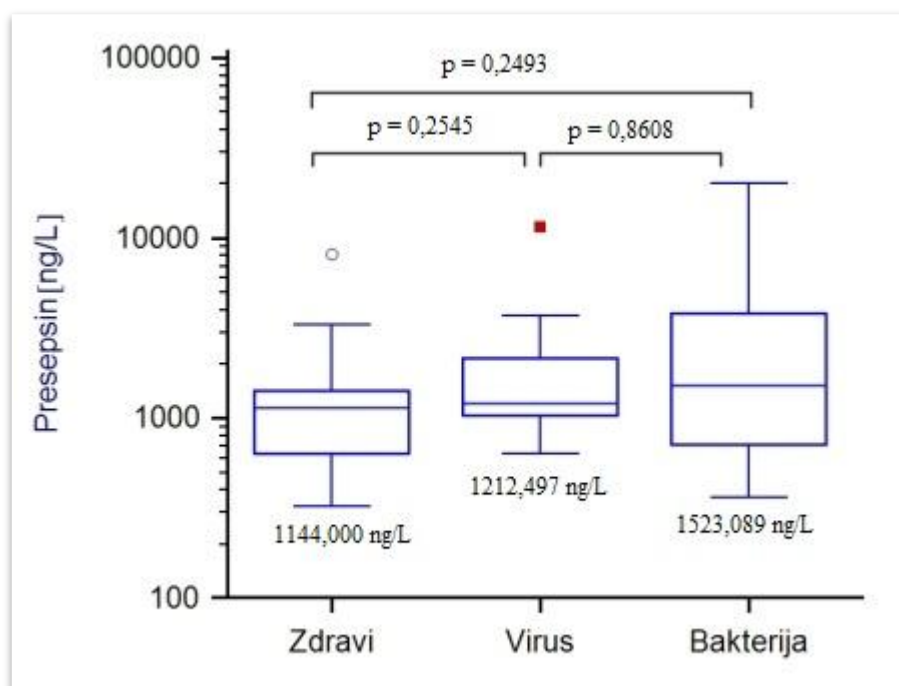
Preglednica 9: Rezultati normalnosti porazdelitve presepsina.

	Presepsin Zdravi	Presepsin Virus	Presepsin Bakterija
N	19	18	20
D'Agostino Pearsonov test distribucije	$p = 0,1309^*$	$p = 0,0045^*$	$p = 0,3843^*$

* Po logaritamski transformaciji.

Podatki za presepsin so v skupini zdravih in v skupini bakterijske okužbe porazdeljeni statistično značilno normalno, v skupini virusne okužbe pa porazdelitev podatkov ni statistično značilno normalna.

Zaradi nenormalnosti porazdelitve podatkov v skupini virusne okužbe, smo za ugotavljanje morebitnih statistično pomembnih razlik med skupinami uporabili neparametrični *Mann-Whitneyev test*. Ugotovili smo, da se vrednosti presepsina med skupino zdravih in skupino z bakterijsko ali virusno okužbo statistično značilno ne razlikujejo. Med skupino zdravih in skupino virusne okužbe znaša $p = 0,2545$, med zdravimi preiskovanci in preiskovanci z bakterijsko okužbo pa je $p = 0,2493$. Presepsin prav tako statistično značilno ne razlikuje med vrednostmi skupin z virusno in bakterijsko infekcijo ($p = 0,8608$) (slika 15).



Slika 15: Prikaz razlik v porazdelitvi podatkov presepsina z rezultati Mann-Whitneyevega testa.

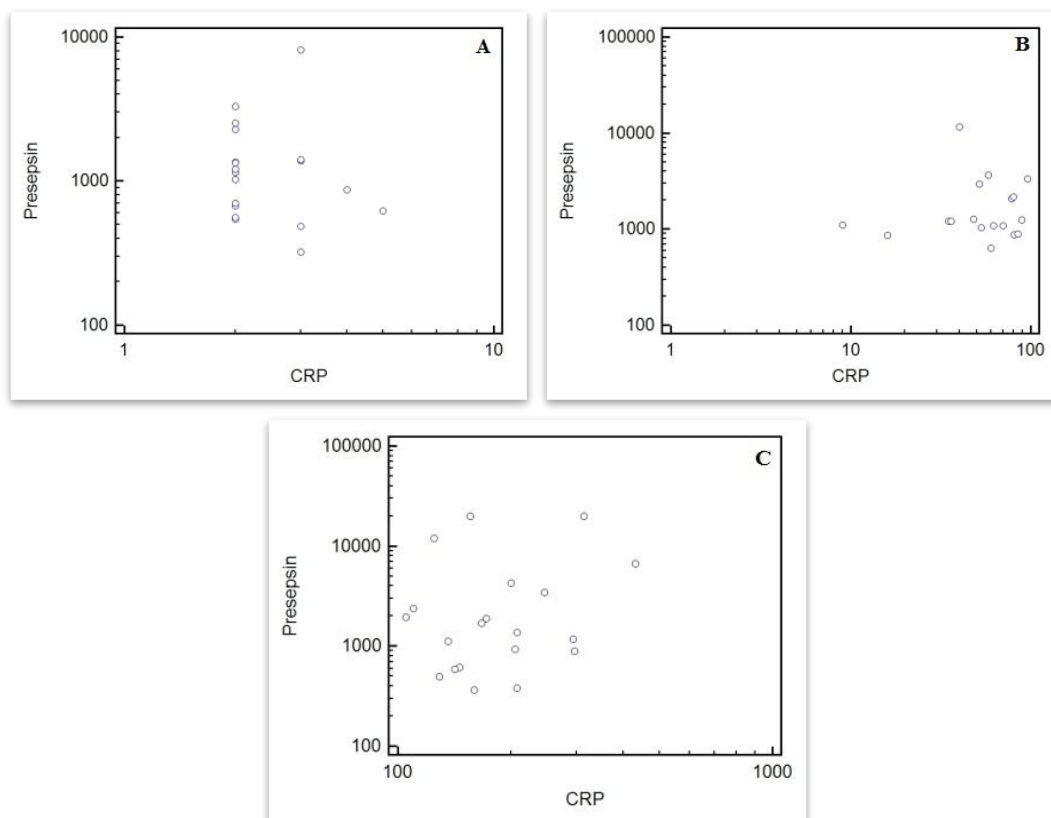
Razlike v mediani so majhne. Pri zdravih znaša 1144,000 ng/L, pri preiskovancih z virusno infekcijo 1212,497 ng/L, pri skupini z bakterijsko infekcijo pa 1523,089 ng/L. V skupini zdravih znaša najnižja izmerjena vrednost 323,0 ng/L, najvišja izmerjena vrednost pa 8145 ng/L. Pri virusni infekciji pa je najnižja izmerjena vrednost 633,0 ng/L in je višja kot najnižja izmerjena vrednost skupine z bakterijsko infekcijo, ki znaša 363,0 ng/L. Maksimalna vrednost pa znaša 11525,0 ng/L pri virusnih preiskovancih in kar 20000 ng/L pri bakterijskih preiskovancih.

4.3 KORELACIJA MED PRESEPSINOM IN OSTALIMI PARAMETRI

V okviru diplomske naloge smo analizirali korelacijo med presepsinom in ostalimi parametri za posamezni skupini bolnikov in skupino zdravih preiskovancev. Rezultati so predstavljeni na slikah 16 - 18.

4.3.1 PRESEPSIN – C-REAKTIVNI PROTEIN

Na sliki 16 so s Scatterjevim diagramom predstavljene korelacije med presepsinom in CRP znotraj vsake skupine.



Slika 16: Korelacija med presepsinom in CRP v skupini zdravih preiskovancev (A) skupini virusne okužbe (B) in skupini bakterijske okužbe (C).

Iz slike 16 in preglednice 10 je razvidno, da v skupini zdravih preiskovancev z naraščanjem koncentracije CRP, presepsin rahlo pada, vendar o korelaciji ne moremo

govoriti, medtem ko pri virusni in bakterijski okužbi rahlo narašča, vendar tudi tu ne obstaja korelacija. Vse p vrednosti so namreč večje od 0,05, kar pomeni, da korelacija med presepsinom in CRP v vseh treh skupinah ni statistično značilna.

Preglednica 10: Prikaz vrednosti Spearmanovega koeficienta korelacije med presepsinom in CRP znotraj vsake skupine.

	Spearmanov koeficient	p
Zdravi	- 0,158	0,5184
Virusna okužba	0,0444	0,8612
Bakterijska okužba	0,123	0,6065

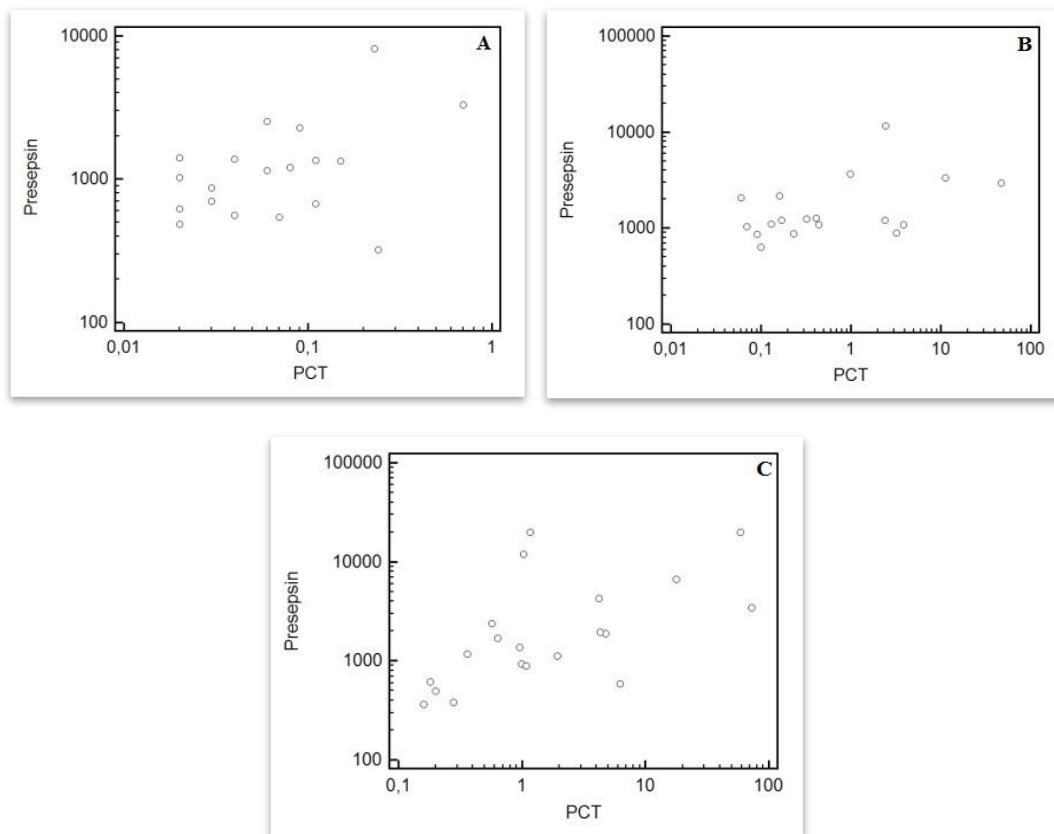
4.3.2 PRESEPSIN – PROKALCITONIN

Iz preglednice 11 lahko razberemo, da v skupini zdravih ($p = 0,1981$) in v skupini bolnikov z virusno infekcijo ($p = 0,0810$) korelacija ni statistično značilna, saj je p vrednost v obeh primerih manjša od 0,05. Statistično značilna je v skupini bakterijske okužbe, kjer p znaša 0,0034. Gre za pozitivno ujemanje med presepsinom in PCT, kar pomeni, da z naraščanjem koncentracije PCT tudi koncentracija presepsina narašča.

Preglednica 11: Prikaz vrednosti Spearmanovega koeficienta korelacije med presepsinom in PCT znotraj vsake skupine.

	Spearmanov koeficient	p
Zdravi	0,309	0,1981
Virusna okužba	0,422	0,0810
Bakterijska okužba	0,622	0,0034

Korelacija med presepsinom in PCT znotraj vsake skupine je predstavljena tudi s Scatterjevim diagramom na sliki 17.



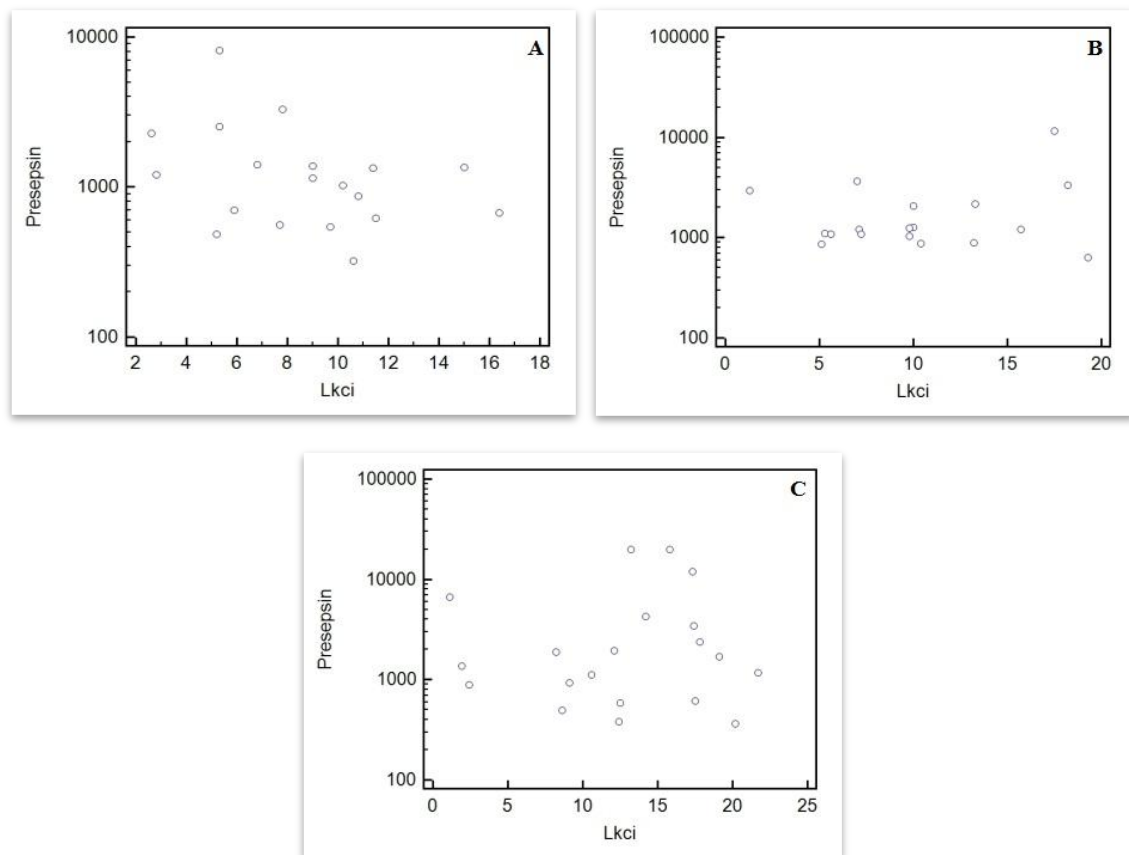
Slika 17: Korelacija med presepsinom in PCT v skupini zdravih preiskovancev (A), skupini virusne okužbe (B) in skupini bakterijske okužbe (C).

4.3.3 PRESEPSIN – LEVKOCITI

Iz preglednice 12, kjer so predstavljene vrednosti Spearmanovega koeficienta korelacije in iz Scatterjevih diagramov, predstavljenih na sliki 18, vidimo, da tudi med presepsinom in levkociti praktično ni korelacije, kadar upoštevamo rezultate različnih obolenj. Vse p vrednosti so večje od 0,05. Torej, ujemanje med koncentracijo presepsina in številčno koncentracijo levkocitov ni statistično značilno.

Preglednica 12: Prikaz vrednosti Spearmanovega koeficienta korelacije med presepsinom in levkociti znotraj vsake skupine.

	Spearmanov koeficient	P
Zdravi	- 0,332	0,1651
Virusna okužba	0,0661	0,7944
Bakterijska okužba	0,0331	0,8898



Slika 18: Korelacija med presepsinom in Lkci v skupini zdravih preiskovancev (A), v skupini virusne okužbe (B) in skupini bakterijske okužbe (C).

4.4 OBČUTLJIVOST IN SPECIFIČNOST OZANČEVALCEV

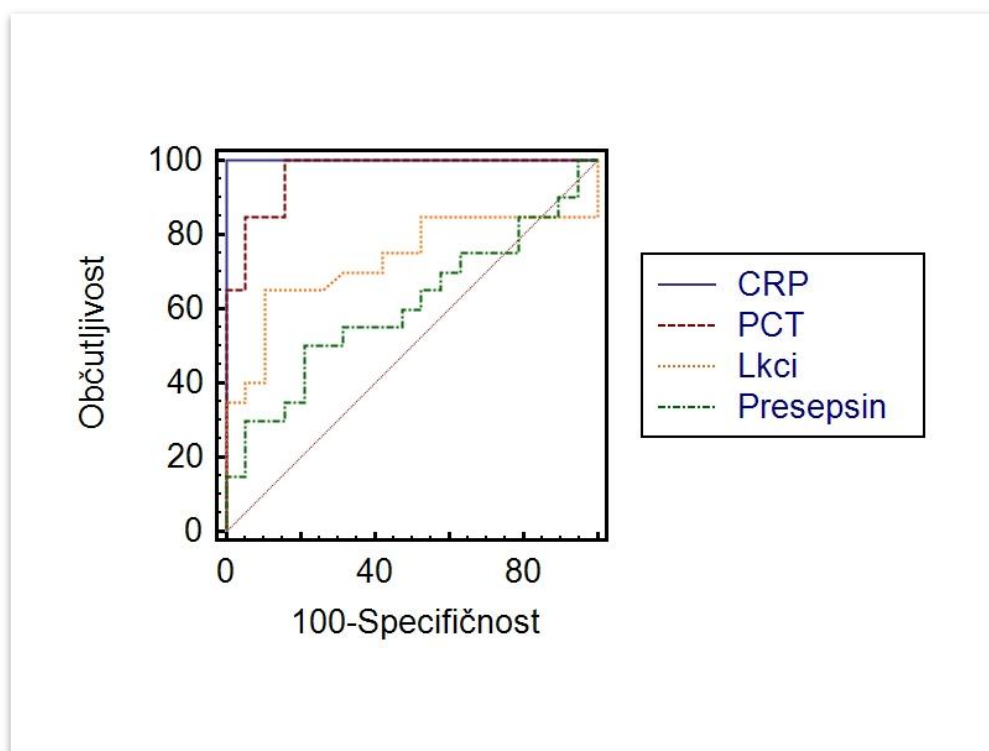
Občutljivost in specifičnost parametrov za razlikovanje bakterijske infekcije od zdravih preiskovancev, smo izračunali s pomočjo ROC krivulj. Dobljene vrednosti so predstavljene v preglednici 13 skupaj z mejnimi (angl. cutoff) vrednostmi.

Preglednica 13: Specifičnost in občutljivost parametrov za razlikovanje bakterijske okužbe od zdravih preiskovancev.

	CRP	PCT	Lkci	Presepsin
Mejna vrednost	> 5 mg/L	> 0,15 µg/L	> 11,5 x 10 ⁹ /L	> 1417 ng/L
Občutljivost (%)	100,0	100,0	65,0	50,0
Specifičnost (%)	100,0	84,2	89,5	78,9

Pri mejni vrednosti 5 mg/L sta tako občutljivost kot specifičnost CRP 100,0 %. Občutljivost PCT je pri mejni vrednosti 0,15 µg/L prav tako 100,0 %, medtem ko je specifičnost 84,2 %. Občutljivost levkocitov znaša 65,0 %, specifičnost pa 89,5 % pri mejni vrednosti $11,5 \times 10^9/L$. Najmanjšo občutljivost za postavitev diagnoze bakterijske okužbe ima presepsin, in sicer ta pri mejni vrednosti 1417 ng/L znaša le 50,0 %. Specifičnost je ob tem 78,9 % in je najnižja med vsemi parametri..

Primerjava ROC krivulj vseh parametrov je predstavljena na sliki 19.



Slika 19: ROC krivulje vseh parametrov za razlikovanje bakterijske okužbe od zdravih preiskovancev.

V preglednici 14 so prikazane AUC vrednosti, ki so izračunane iz predstavljenih ROC krivulj. Površina pod krivuljo za razlikovanje bakterijske infekcije od zdravih preiskovancev znaša za presepsin 0,564 in je najnižja med vsemi AUC vrednostmi. Najvišjo, 1, ima zaradi 100% specifičnosti in občutljivosti CRP, sledjo PCT z 0,828 in nato še levkociti z AUC 0,683 .

Preglednica 14: Prikaz AUC vrednosti vseh parametrov za razlikovanje bakterijske okužbe od zdravih preiskovancev.

	AUC	Standardna napaka ^a	95% CI ^b
CRP	1,000	0,000	0,910 – 1,000
PCT	0,966	0,0243	0,852 – 0,998
Lkci	0,733	0,0873	0,567 – 0,862
Presepsin	0,608	0,0932	0,436 – 0,760

a – DeLong in sod., 1988

b – Binomski interval zaupanja.

Izračunali smo tudi razlike v AUC vrednostih med presepsinom in ostalimi parametri in preverili ali se krivulji dveh parametrov statistično značilno razlikujeta. Dobljeni rezultati so predstavljeni v preglednici 15. Za statistično značilno smo vzeli vrednost $p < 0,05$.

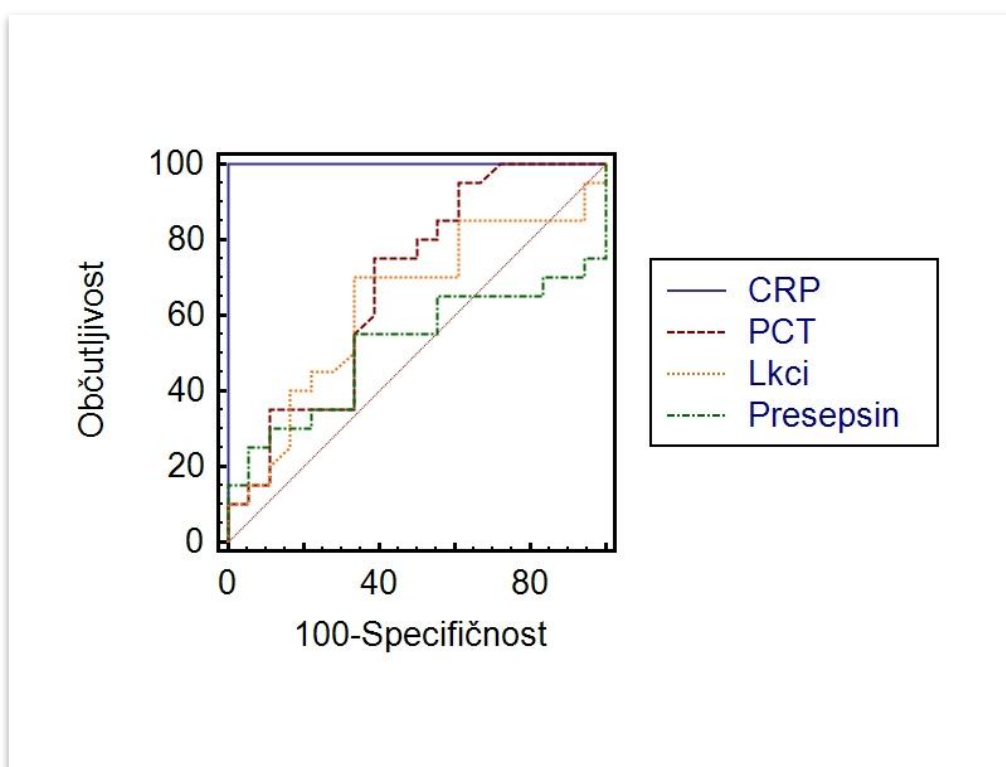
Preglednica 15: Razlika med AUC presepsina in ostalih parametrov pri razlikovanju bakterijske okužbe od zdravih preiskovancev.

Presepsin – CRP	
Razlika med površinama	0,392
Standardna napaka ^c	0,0932
95% CI	0,210 – 0,575
Stopnja značilnosti	$p < 0,0001$
Presepsin – PCT	
Razlika med površinama	0,358
Standardna napaka ^c	0,0855
95% CL	0,190 – 0,525
Stopnja značilnosti	$p < 0,0001$
Presepsin – Lkci	
Razlika med površinama	0,125
Standardna napaka ^c	0,130
95% CI	- 0,131 – 0,381
Stopnja značilnosti	$p = 0,3381$

c – DeLong in sod., 1988

Razlika med AUC presepsina in CRP znaša 0,392 in je statistično značilna ($p < 0,0001$). Prav tako je statistično značilna razlika ($p < 0,0001$) med krivuljo presepsina in prokalcitonina, kjer razlika med površinama znaša 0,358. Krivulji levkocitov in presepsina pa se statistično značilno ne razlikujeta ($p = 0,3381$). Razlika med AUC je 0,125.

Občutljivost in specifičnost parametrov smo izračunali tudi za primer razlikovanja med bakterijsko in virusno okužbo. Prikaz primerjave ROC krivulj med parametri je predstavljen na sliki 20, rezultati specifičnosti in občutljivosti pa v preglednici 16.



Slika 20: ROC krivulje vseh parametrov za razlikovanje bakterijske od virusne okužbe.

Preglednica 16: Specifičnost in občutljivost parametrov za razlikovanje bakterijske okužbe od okužbe virusne etiologije.

	CRP	PCT	Lkci	Presepsin
Mejna vrednost	> 96 mg/L	> 0,44 $\mu\text{g/L}$	> 10,4 x 10 ⁹ /L	> 1101 ng/L
Občutljivost (%)	100,0	75,0	70,0	65,0
Specifičnost (%)	100,0	61,1	66,7	44,4

Tudi v tem primeru sta pri mejni vrednosti 96,0 mg/L specifičnost in občutljivost CRP 100,0 %. Specifičnost presepsina v tem primeru pri mejni vrednosti 1101 ng/L znaša 44,4 %, s 65 % občutljivostjo in je tako nižja od specifičnosti prokalcitonina, ki pri mejni vrednosti 0,44 µg/L znaša 61,1 % s 75 % občutljivostjo. Tudi specifičnost levkocitov je višja od specifičnosti presepsina; pri mejni vrednosti $10,4 \times 10^9/L$ znaša 66,7 %, občutljivost pa 70 %.

AUC presepsina je tudi v tem primeru najnižja, in sicer znaša 0,517. Nekoliko večji sta površini pod krivuljo za levkocite in prokalcitonin. Za slednjega znaša 0,683, za levkocite pa 0,631. Najvišja je po pričakovanju AUC za CRP, ki je 1 (preglednica 17).

Preglednica 17: Prikaz AUC vrednosti vseh parametrov za razlikovanje med bakterijsko in virusno okužbo.

	AUC	Standardna napaka ^a	95% CI ^b
CRP	1,000	0,000	0,907 – 1,000
PCT	0,683	0,0901	0,513 – 0,824
Lkci	0,631	0,0942	0,459 – 0,781
Presepsin	0,517	0,0994	0,349 – 0,681

a – DeLong in sod., 1988

b – Binomski interval zaupanja.

Izračunali smo tudi razlike med površinami presepsina in ostalih označevalcev za primer razlikovanja med bakterijsko in virusno okužbo. Vse dobljene vrednosti so prikazane v preglednici 18.

Preglednica 18: Razlika med AUC presepsina in ostalih parametrov za razlikovanje med bakterijsko in virusno okužbo.

Presepsin – CRP	
Razlika med površinama	0,483
Standardna napaka [*]	0,0994
95% CI	0,289 – 0,678
Stopnja značilnosti	p < 0,0001

Presepsin – PCT	
Razlika med površinama	0,167
Standardna napaka*	0,0976
95% CL	- 0,0247 – 0,358
Stopnja značilnosti	p = 0,0878
Presepsin – Lkci	
Razlika med površinama	0,114
Standardna napaka*	0,130
95% CI	- 0,141 – 0,369
Stopnja značilnosti	p = 0,3815

* – DeLong in sod., 1988

Iz rezultatov lahko razberemo, da se krivulja presepsina statistično signifikantno razlikuje od krivulje CRP ($p < 0,0001$) in tudi od krivulje levkocitov ($p = 0,3815$). Medtem ko med krivuljo presepsina in krivuljo prokalcitonina ni statistično značilne razlike ($p = 0,0878$).

5 RAZPRAVA

Zgodnje odkrivanje in prepoznavanje povzročitelja infekcijske bolezni je pri kritično bolnih zelo pomembno za izboljšanje rezultatov zdravljenja. Natančna diagnoza neposredno opredeljuje tudi pravilno in bolj preudarno rabo antibiotikov, ki so primerni le za zdravljenje bakterijskih infekcij, medtem ko njihova razširjena uporaba pri virusnih infekcijah povečuje tveganje za pojav okužb z odpornimi bakterijami. Detekcija mikroorganizmov z mikrobiološko analizo krvnih kultur je sicer bistvenega pomena za dokončno diagnozo bakterijske okužbe, vendar zaradi nizke občutljivosti detekcije in možnosti kontaminacije odvzete kužnine, postopek ne predstavlja zanesljive preizkusne metode. Prav tako do sedaj uporabni biološki označevalci okužbe niso preveč učinkoviti, saj je njihov porast pogosto lahko tudi nespecifičen. Zato potrebujemo novi označevalec, ki bi lahko zgodaj potrdil bakterijsko okužbo ter jo zanesljivo ločil od virusne infekcije.

V okviru naše diplomske naloge smo tako 57 pacientom, ki smo jih glede na izvid CRP vrednosti razvrstili v skupino bakterijske ali virusne okužbe ter v skupino zdravih preiskovancev, poleg trenutno uporabnih bioloških označevalcev določili še novi marker presepsin in ocenili njegovo uporabnost v diagnostiki razlikovanja bakterijske od virusne okužbe. Povprečna starost vključenih preiskovancev je bila $60,70 \pm 16,20$ let. Prvotno smo imeli namen oceniti tudi učinkovitost določanja presepsina v diagnostiki in zdravljenju sepse, vendar je proces zbiranja bolnikov s sepsa dolgotrajen, saj smo od februarja 2012 pa do septembra 2012 uspeli zbrati le 8 bolnikov, zato smo se na koncu omejili le na določanje presepsina pri virusnih in bakterijskih okužbah.

Rezultati naše raziskave so pokazali, da je za laboratorijsko diagnostiko okužb, najučinkovitejši marker CRP. Manj učinkovita sta PCT in število levkocitov, novi marker presepsin pa za diagnostiko okužb ni učinkovit. Izmerjene vrednosti za CRP namreč statistično značilno razlikujejo med skupino zdravih in skupino z virusno ali bakterijsko infekcijo (slika 12). Statistično značilna je tudi razlika med skupinama bolnikov, medtem ko ta razlika (med virusno in bakterijsko skupino) pri drugih označevalcih ni statistično značilna. Mediana CRP vrednost je pričakovano najvišja v skupini bakterijske infekcije, nižja v skupini virusne infekcije in najnižja v skupini zdravih preiskovancev.

Tudi v primeru prokalcitonina in levkocitov so vrednosti mediane v skupini zdravih nižje kot v skupini bakterijske in virusne okužbe, vendar kot že rečeno, med vsemi vrednostmi ni statistično značilne razlike. PCT statistično značilno razlikuje zdrave preiskovance od bolnikov z virusno in od bolnikov z bakterijsko okužbo, vendar ne razlikuje med skupinama bolnikov (slika 13). Levkociti statistično značilno razlikujejo le med zdravimi preiskovanci in bolniki z bakterijsko okužbo, medtem ko med zdravimi in virusno skupino statistično značilno ne razlikujejo. Prav tako ne razlikujejo vrednosti virusnih bolnikov od izmerjenih vrednosti bakterijskih bolnikov (slika 14).

Pri določanju koncentracije CRP in PCT smo najnižjo izmerjeno vrednost določili v skupini zdravih preiskovancev, najvišjo pa v skupini bakterijskih bolnikov. V primeru levkocitov je bila najnižja številčna koncentracija določena v skupini bakterijskih bolnikov in ne v skupini zdravih. Dobljeni rezultat nas ni presenetil, saj se število levkocitov pri okužbah močno poveča, lahko pa se tudi zniža. Smo pa v skupini zdravih preiskovancev v dveh primerih izmerili številčno koncentracijo levkocitov nižjo od spodnje referenčne meje ($4,0 \times 10^9/L$) in kar v sedmih primerih rahlo višjo od zgornje referenčne meje ($10,0 \times 10^9/L$). Pričakovali bi, da bodo vse vrednosti znotraj referenčnih, vendar pa lahko na število levkocitov vplivajo tudi zdravila, npr. kortikosteroidi in kemoterapevtiki ali pa so levkociti neposredno vpleteni v patogenezo bolezni (krvna obolenja). Ali je kaj naštetega možen vzrok za dobljene vrednosti, ne moremo zagotovo trditi, saj podatkov o morebitni terapiji in komorbidnosti pacientov nismo pridobili.

Tudi mediana vrednost novega označevalca presepsina je bila najnižja v skupini zdravih preiskovancev, nekoliko višja v skupini pacientov z virusno okužbo in najvišja v skupini bakterijske infekcije, vendar se vrednosti med skupinami v nobenem primeru statistično značilno ne razlikujejo (slika 15). V skupini zdravih preiskovancev smo izmerili najnižjo vrednost pri 323 ng/L in najvišjo pri 8145 ng/L. V skupini virusnih bolnikov je bila najnižja izmerjena vrednost 633 ng/L in s tem višja kot najnižja izmerjena vrednost skupine z bakterijsko okužbo, ki znaša 363 ng/L. Najvišja izmerjena vrednost pri virusni skupini pa znaša 11525 ng/L in pri bakterijski skupini kar > 20000 ng/L. Opazimo, da so razlike med izmerjenimi vrednostmi znotraj skupine zelo velike, prisotni pa so tudi primeri v katerih vrednost presega 20000 ng/L, torej vrednost, ki sicer predstavlja mejo detekcije analizatorja.

Velike razlike med izmerjenimi vrednostmi znotraj skupine se kažejo tudi v korelaciji med presepsinom in ostalimi parametri. Z raziskavo smo namreč dokazali, da med presepsinom in CRP, PCT in levkociti ni ujemanja. V mnogih primerih so bile vrednosti presepsina zelo visoke tudi pri zdravih preiskovancih, ko je vrednost CRP kazala, da okužbe ni. Prav tako so bile vrednosti presepsina močno povišane in tudi znižane v primerih, ko je CRP vrednost opredelila virusno okužbo. Povsem podobne rezultate močno povišanih in znižanih koncentracij presepsina smo dobili tudi pri bakterijski infekciji. Statistično značilno korelacijo smo sicer dokazali le v primeru presepsina in PCT v skupini bakterijske okužbe, kjer Spearmanov koeficient korelacije znaša 0,622. Korelacija je pozitivna, kar pomeni, da z naraščanjem koncentracije PCT, narašča tudi koncentracija presepsina.

Dobljeni rezultati so odvisni tudi od občutljivosti in specifičnosti merjenega parametra. Za nek parameter pravimo, da je dobro občutljiv, kadar pokaže pozitiven rezultat za vzorec, ki resnično vsebuje preiskovani analit, specifičen pa kadar ne pokaže pozitivnih rezultatov pri vzorcih, ki analita ne vsebujejo (35). Za vse parametre smo občutljivost in specifičnost določili s pomočjo ROC krivulj. Specifičnost za razlikovanje bakterijske okužbe od zdravih preiskovancev je tako za presepsin pri mejni vrednosti 1417 ng/L 78,9 % in je nižja tako od specifičnosti prokalcitonina (84,2 %), kot tudi od specifičnosti levkocitov (89,5 %) in CRP (100,0 %). Občutljivost presepsina ob tem znaša 50 %. Pomemben podatek pri ovrednotenju novega označevalca je tudi površina pod ROC krivuljo (AUC), ki pove s kakšno verjetnostjo bo metoda ločila med zdravimi in bolnimi oz. v našem primeru med bakterijsko okužbo in zdravimi preiskovanci. AUC vrednosti si sledijo 1,000 za CRP, 0,966 za PCT, 0,733 za levkocite in 0,608 za presepsin. Nizka vrednost AUC za presepsin pove, da parameter slabo razlikuje zdrave preiskovance od bolnikov z bakterijsko okužbo in da ne pokaže značilno povišanih vrednosti pri bakterijskih bolnikih. Najboljša za razlikovanje sta po teh podatkih CRP in PCT, nekoliko slabši pa so levkociti. Podobne rezultate smo dobili tudi, ko smo ugotavljali specifičnost in občutljivost parametrov za razlikovanje med bakterijsko in virusno okužbo. Specifičnost CRP je ostala enaka (100,0 %), medtem ko se je specifičnost ostalih parametrov znižala. Za prokalcitonin znaša 61,1 %, za levkocite 66,7 % in za presepsin pri mejni vrednosti 1101 ng/L le 44,4 %, s 65 % občutljivostjo. Tudi AUC vrednost presepsina je v tem primeru še vedno precej nizka (0,517) in najnižja med vsemi testiranimi parametri (preglednica 17), zato lahko na tem

mestu zavržemo našo postavljeno hipotezo in zaključimo, da presepsin ni boljši parameter za razlikovanje med bakterijskimi in virusnimi okužbami od trenutno uporabnih parametrov (CRP, PCT, Lkci).

Dobljeni rezultati niso izpolnili naših pričakovanj, saj se bistveno razlikujejo od rezultatov drugih študij, ki v večini navajajo, da je CRP za določanje in spremljanje bakterijske okužbe sicer dober vendar manj specifičen označevalec kot PCT. Manj zanesljivo in specifično je tudi merjenje številske koncentracije levkocitov. Delèvaux in sodelavci so v podobni študiji, ki so jo med letoma 1999 in 2001 izvedli na oddelku interne medicine bolnišnice v Franciji, med seboj primerjali CRP, PCT in številčno koncentracijo levkocitov ter ugotavljali njihov pomen pri razlikovanju bakterijske okužbe od drugih vnetnih stanj (virusne infekcije, amiloidoze, ulcerativnega kolitisa, neoplazme). V skupino s potrjeno bakterijsko okužbo so vključili 60 pacientov, v drugo skupino pa 113 pacientov. Rezultati so pokazali, da so mediane vrednosti vseh treh parametrov v skupini bakterijske okužbe (Lkci: mediana = $10,0 \times 10^9/L$, CRP: mediana = 137 mg/L, PCT: mediana = 0,9 $\mu g/L$) značilno višje kot v skupini pacientov z virusno okužbo in drugimi vnetnimi stanji (Lkci: mediana = $8,1 \times 10^9/L$, CRP: mediana = 71,5 mg/L, PCT: mediana = 0,1 $\mu g/L$), medtem ko je v našem primeru med skupino virusnih in skupino bakterijskih preiskovancev statistično značilno razlikoval le CRP. Pri mejni vrednosti 0,5 $\mu g/L$ je bila v študiji, ki so jo izvedli Delèvaux in sodelavci, specifičnost PCT za diagnozo bakterijske infekcije najboljša med vsemi, in sicer kar 96,0 %, s 65,0 % občutljivostjo. Površina pod krivuljo je bila ob tem 0,840 za PCT, 0,730 za CRP in 0,620 za levkocite, s čimer so dokazali, da PCT bolje razlikuje bakterijsko okužbo od drugih vnetnih stanj kot CRP in levkociti (36).

V neki drugi študiji, ki so jo med avgustom 2009 in junijem 2010 izvedli v bolnišnici na Japonskem, so Shozushima in sodelavci, novi označevalec presepsin primerjali s PCT, CRP in IL-6 v učinkovitosti razlikovanja sistemske okužbe od neinfektivnih stanj. Koncentracijo presepsina so tako kot mi v naši raziskavi določili z analizatorjem PATHFAST[®] proizvajalca Mitsubishi Chemical Medience Corporation. V raziskavo so vključili 128 zdravih preiskovancev in 192 pacientov, ki so ob prihodu v bolnišnico kazali klinične znake okužbe. Slednje so nato glede na postavljeno diagnozo s strani specialistov infektologov razdelili v 5 patoloških skupin (lokalizirana infekcija, SIRS, sepsa, huda sepsa in skupina pacientov, ki ni izpolnjevala pogojev za SIRS ali lokalizirano infekcijo in so jo zato poimenovali skupina »normalnih« pacientov). Rezultati meritev so pokazali, da

znaša aritmetična sredina presepsina pri zdravih 190,0 ng/L. V skupini normalnih pacientov $294,2 \pm 121,4$ ng/L, v skupini lokalizirane infekcije $721,0 \pm 611,3$ ng/L, v skupini s SIRS $333,5 \pm 130,6$ ng/L, v skupini s sepsa $817,9 \pm 572,7$ ng/L in v skupini pacientov s hudo sepsa kar $1992,9 \pm 1509,2$ ng/L. Med vsemi vrednostmi so bile razlike statistično značilne. Kot vidimo, se dobljeni rezultati močno razlikujejo od rezultatov naše raziskave, kjer smo že v skupini zdravih preiskovancev izmerili mediano vrednost presepsina zelo visoko (1144 ng/L) in le nekoliko nižjo od aritmetične sredine skupine s hudo sepsa iz te študije. AUC za razlikovanje pacientov z infekcijo (lokalizirana infekcija + sepsa + huda sepsa) od skupine pacientov brez infekcije (normalni pacienti + SIRS) za presepsin je bila v okviru raziskave na Japonskem 0,845 in tako višja kot AUC za PCT (0,652), CRP (0,815) in IL-6 (0,672). Ob tem je bila pri mejni vrednosti 399 ng/L občutljivost presepsina 80,3 % in specifičnost 78,5 %. Podobno najboljše AUC vrednosti za presepsin so dobili tudi v primeru diferenciacije SIRS od sepse, in sicer si vrednosti sledijo 0,879 za presepsin, 0,856 za CRP, 0,666 za PCT in 0,658 za IL-6. Specifičnost je bila v tem primeru pri mejni vrednosti 415 ng/L 81,0 % in občutljivost 80,1 %, kar kaže na ugodno uporabo presepsina v diagnostiki sepse in za razlikovanje neinfektivnih stanj od sistemskih bakterijskih okužb (37).

Rezultati naše študije so torej v nasprotju z rezultati drugih podobnih študij, vendar so za nas v primeru CRP pričakovani, saj smo paciente ravno na osnovi izmerjene vrednosti CRP razvrstili v omenjene tri skupine in tako zagotovili, da v skupini bakterijske okužbe zagotovo ni bilo pacienta, katerega koncentracija CRP bi bila nižja od 100 mg/L kot tudi v skupini virusne okužbe ni bilo pacienta katerega koncentracija bi bila višja od 100 mg/L ali nižja od 5 mg/L. V skupini zdravih pa so bili tako le preiskovanci z vrednostjo CRP nižjo od 5 mg/L. Med razlogi zakaj rezultati PCT in presepsina v tej študiji niso bili boljši, bi veljalo izpostaviti dejstvo, da pacienti niso imeli potrjene okužbe in smo jih zato na osnovi CRP vrednosti, ki sicer v literaturi velja za nespecifičen marker, verjetno napačno razvrstili v skupine. Namreč skoraj 23 % pacientov (13/57), ki smo jih uvrstili v skupino virusne ali bakterijske okužbe, je bilo hospitaliziranih na oddelkih travmatologije, hematologije, torakalne kirurgije, abdominalne kirurgije ali gastroonkologije, kjer lahko skoraj zagotovo trdimo, da ne gre za okužbe pač pa za zelo invazivne poškodbe ali za SIRS, ki ni posledica infekcije. To pa so stanja, kjer koncentracije PCT in presepsina ostanejo relativno nizke.

Podobne razloge za slabše rezultate PCT v svoji študiji navajajo tudi Shozushima in sodelavci (37).

Na slabšo občutljivost metode za merjenje koncentracije presepsina bi lahko v našem primeru vplivalo tudi večkratno odmrzovanje in ponovno zamrzovanje vzorcev, zaradi težav z analizatorjem in reagenti v času merjenja. V enem primeru je šlo za težave s fotopomnoževalko, v drugem primeru pa nam je med analizo zmanjkalo reagenta, pri čemer nismo uspeli analizirati vseh vzorcev, zato smo jih ponovno zamrznili do naslednjega merjenja.

Temeljni cilj naše diplomske naloge je bilo oceniti ali je merjenje presepsina lahko edini in bolj zanesljiv test za razlikovanje med bakterijskimi in virusnimi okužbami od danes rutinsko uporabnih parametrov. Ob tem smo si tudi postavili hipotezo: Presepsin je primeren označevalec za razlikovanje bakterijskih okužb od okužb virusne etiologije, ki jo lahko zavržemo, saj se v našem primeru presepsin ni izkazal za zanesljivi označevalec v razlikovanju bakterijskih od virusnih okužb, saj med temi pacienti statistično značilno ne razlikuje. Ker pa številne tuje študije navajajo obetavne rezultate presepsina v diagnostiki sepse, bi bilo smiselno našo študijo razširiti na oceno učinkovitosti presepsina v diagnostiki in zdravljenju sepse, kjer je za dobro prognozo septičnih bolnikov pomembna predvsem pravočasna in hitra diagnostika, kar pa metoda merjenja koncentracije presepsina tudi omogoča. Namreč z analizatorjem PATHFAST[®] lahko opravimo meritve v polni krvi in brez predpriprave oz. obdelave vzorca, zato lahko rezultate dobimo v le 17 minutah.

6 SKLEP

Presepsin kot novi označevalec sepse, se v naši raziskavi ni izkazal kot zanesljivi kazalec bakterijske okužbe. Z raziskavo smo sicer dokazali, da so koncentracije pri bakterijski okužbi v povprečju višje kot pri virusni infekciji ter zdravih preiskovancih, vendar razlike med vrednostmi niso statistično značilne. V primerjavi s CRP in drugimi laboratorijskimi označevalci kaže tudi slabšo specifičnost in občutljivost. Dobljeni rezultati so lahko posledica eksperimentalnih težav pri analizi, zaradi česar smo morali vzorce večkrat odmrzniti in ponovno zamrzniti.

Za razlikovanje bakterijske od virusne okužbe tako še vedno ostaja najbolj uporabno istočasno določanje vrednosti CRP in celokupnega števila levkocitov s sočasnim spremljanjem klinične slike.

7 VIRI IN LITERATURA

1. Marolt – Gomišček M, Radšel – Medvešček A: **Infekcijske bolezni**, 2. izdaja, Založba Tangram, Ljubljana, 2002: 14-23 in 257-266.
2. Koren S, Avšič Županc T, Drinovec B, Marin J, Poljak M: **Splošna medicinska virologija**, 3. ponatis, Medicinska fakulteta v Ljubljani, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Littera picta, Ljubljana, 2007: 1-11 in 49-64.
3. Šuler B: **Zdravila za sistemsko zdravljenje virusnih infekcij**, oktobra 2012 dostopno na www.sf.ffa.uni-lj.si/PU-seminarji/okt_2006/Seminar-J05.doc
4. Gubina M, Ihan A: **Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo**, 1. izdaja, Medicinska fakulteta v Ljubljani, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Littera picta, Ljubljana, 2002: 3-15 in 65-86.
5. Gabršček L, Voga G, Krivec B, Skale R, Parežnik R, Podbregar M: **Pomen prokalcitonina pri prepoznavanju bakterijske okužbe**, Zdravniški vestnik 2001; 70: Supl. I: 11-5.
6. Vidmar M, Tonin I, Čižman M: **Pomen C-reaktivnega proteina (CRP) v diagnostiki akutno nastale vročine brez žariščnih znakov bolezni pri otrocih**, Medicinski razgledi 2007; 46: 111-118.
7. Sketelj J: **Temelji patološke fiziologije: Nespecifični obrambni odziv organizma na stres**, 2. izdaja, Medicinska fakulteta v Ljubljani, Inštitut za patološko fiziologijo, Littera picta, Ljubljana, 2009: 57-62.
8. Vozelj M: **Temelji imunologije**, 1. izdaja, DZS, Ljubljana, 2000: 1-9 in 379-396.
9. Kovačič U: **Temelji patološke fiziologije: Vnetje**, 2. Izdaja, Medicinska fakulteta v Ljubljani, Inštitut za patološko fiziologijo, Littera picta, Ljubljana, 2009: 47-55.

10. Grubič Z: **Temelji patološke fiziologije: Stradanje**, 2. Izdaja, Medicinska fakulteta v Ljubljani, Inštitut za patološko fiziologijo, Littera picta, Ljubljana, 2009; 69-79.
11. Osredkar J, Poredoš P: **51. Tavčarjevi dnevi, Zbornik prispevkov: C-reaktivni protein: Od odkritja do napovedovalca žilnih bolezni**, Littera picta, Ljubljana, 2009: 157-158.
12. Čvorišček D, Čepelak I: **ŠTRAUSOVA Medicinska biokemija**, 3. izdaja, Zrinski d.d., Čakovec, 2009: 23 in 420-421.
13. Navodilo za uporabo analizatorja Advia 1800.
14. http://en.wikipedia.org/wiki/C-reactive_protein (dostop oktober 2012)
15. Hatzistilianou M, **Diagnostic and prognostic role of procalcitonin in infections**, The Scientific World Journal 2010; 10: 1941-1946
16. Petres B, Sokolić B: **Procalcitonin (PCT) – Novi dijagnostički parametar za pračenje bakterijskih upala i sepsi**, BIOCHEMIA MEDICA 1998; god. 8, br. 3-4, 55-66.
17. McGee K, Baumann N: **Procalcitonin**, oktobra 2012 dostopno na <http://www.aacc.org/publications/cln/2009/july/Pages/series0709.aspx>
18. Jereb M, Derganc M, Kremžar B, Kitanovski L: **Procalcitonin v klinični praksi**, ONKOLOGIJA/za prakso 2009; leto XIII, št. 2: 110-113.
19. Navodilo za uporabo analizatorja Roche Cobas e 411.
20. Kocijančič A, Mrevlje F, Štajer D: **Interna medicina**, 3. izdaja, Littera picta, Ljubljana, 2005: 1172-1190 in 1225-1231.

21. http://cs.wikipedia.org/wiki/Myeloidn%C3%AD_progenitor (dostop oktober 2012)
22. Pajič T: **Študijsko gradivo za vaje iz Klinične kemije I, Osnovne preiskave v hematologiji**, Fakulteta za farmacijo, Katedra za klinično biokemijo, Ljubljana, 2009: 4-17.
23. <http://www.slideserve.com/aspn/advia-120-technology> (dostop oktober 2012)
24. Navodilo za uporabo hematološkega analizatorja Advia 120 in Advia 2120.
25. http://www.fishersci.com/ecom/servlet/fsproductdetail_10652_1329063_-1_0 (dostop oktober 2012)
26. Sevnik T: **Diplomsko delo: Določanje sedimentacije eritrocitov v primerjavi z določitvijo serumskega C-reaktivnega proteina in števila levkocitov za ugotavljanje prisotnosti vnetja in okužbe**, Ljubljana, 2010: 17-21.
27. Mussap M, Noto A, Fravega M, Fanos V: **Soluble CD14 subtype presepsin (sCD14-ST) and lipopolysaccharide binding protein (LBP) in neonatal sepsis: new clinical and analytical perspectives for two old biomarkers**, The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine, 2011; 24(S(2)): 12-14.
28. Endo S, Takahashi G, Shozushima T, Matsumoto N, Kojika M, Suzuki Y, Inoue Y: **Usefulness of presepsin (soluble CD14 subtype) as a diagnostic marker for sepsis**, JJAAM 2012; 23: 27-38.
29. http://www.pathfast.de/images/stories/download/PF_Folder_2012_SEPSIS_WEB.pdf (dostop oktober 2012)
30. <http://presepsin.com/mechanism.html> (dostop oktober 2012)
31. Jereb M, Trampuž A: **Novosti v patogenezi in zdravljenju sepse**, Zdravniški vestnik 2003; 72: 675-80.

32. Navodilo za uporabo PATHFAST[®] Presepsin.
33. http://www.pathfast.de/index.php?option=com_content&view=article&id=73&Itemid=70 (dostop oktober 2012)
34. <http://flowingdata.com/2008/02/15/how-to-read-and-use-a-box-and-whisker-plot/> (dostop avgust 2012)
35. MedCalc[®] for Windows navodila za uporabo, oktobra 2012 dostopno na <http://www.medcalc.org/download.php>
36. Delèveaux I, André M, Colombier M, Albuisson E, Meylheuc F, Bègue R, Piette J-C, Aumaître O: **Can procalcitonin measurement help in differentiating between bacterial infection and other kinds of inflammatory processes?**, Ann Rheum Dis 2003; 62: 337-340.
37. Shozushima T, Takahashi G, Matsumoto N, Kojika M, Okamura Y, Endo S: **Usefulness of presepsin (sCD14-ST) measurement as a marker for the diagnosis and severity of sepsis that satisfied diagnostic criteria os systemic inflammatory response syndrome**, Journal of Infection and Chemotherapy 2011;17; 6: 764-769.

8 PRILOGA

ZDRAVI PREISKOVANCI

Zaporedna št.	Spol	Starost [leta]	CRP [mg/L]	PCT [$\mu\text{g/L}$]	Lkci [$10^9/\text{L}$]	Presepsin [ng/L]
1	Ž	60	< 3	0,11	15,0	1357
2	M	27	< 3	0,11	16,4	672
3	M	38	< 3	0,03	5,9	699
4	M	61	< 3	0,07	9,7	542
5	Ž	32	4	0,03	10,8	873
6	M	57	< 3	0,15	11,4	1344
7	Ž	63	3	0,04	9,0	1381
8	Ž	69	3	< 0,02	5,2	486
9	Ž	58	< 3	0,06	5,3	2529
10	M	73	5	< 0,02	11,5	620
11	M	59	3	0,24	10,6	323
12	Ž	61	< 3	0,04	7,7	558
13	M	51	< 3	0,06	9,0	1144
14	Ž	72	3	0,02	6,8	1417
15	Ž	76	< 3	0,08	2,8	1215
16	Ž	52	< 3	0,09	2,6	2288
17	Ž	51	< 3	< 0,02	10,2	1024
18	M	79	< 3	0,70	7,8	3289
19	Ž	81	3	0,23	5,3	8145
20	M	79	< 3	0,05	7,4	> 20000

S podatki v obliki < 3 mg/L, < 0,02 $\mu\text{g/L}$ in > 20000 ng/L (meja detekcije analizatorjev) ne moremo izračunati osnovnih statističnih parametrov, zato smo za vse podatke v obliki < 3 mg/L pri statistični obdelavi upoštevali vrednost 2 mg/L, za podatke v obliki < 0,02 $\mu\text{g/L}$ vrednost 0,02 $\mu\text{g/L}$ in za podatke v obliki > 20000 ng/L vrednost 20000 ng/L.

VIRUSNA OKUŽBA

Zaporedna št.	Spol	Starost [leta]	CRP [mg/L]	PCT [µg/L]	Lkci [10 ⁹ /L]	Presepsin [ng/L]
1	Ž	46	81	0,23	10,4	880
2	Ž	65	9	0,13	5,3	1101
3	M	60	58	0,99	7,0	3688
4	M	78	96	11,19	18,2	3348
5	M	66	60	0,10	19,3	633
6	M	53	48	0,41	10,0	1272
7	Ž	70	53	0,07	9,8	1029
8	Ž	55	35	2,41	7,1	1215
9	M	33	85	3,19	13,2	893
10	M	73	40	2,45	17,5	11525
11	Ž	71	70	4,03	6,6	16698
12	M	69	89	0,32	9,8	1239
13	Ž	68	16	0,09	5,1	867
14	M	49	52	47,23	1,3	2930
15	Ž	29	78	0,06	10,0	2065
16	M	39	80	0,16	13,3	2158
17	M	72	70	0,44	5,6	1082
18	Ž	83	62	3,86	7,2	1090
19	Ž	32	36	0,17	15,7	1210
20	Ž	42	65	3,44	17,3	> 20000

BAKTERIJSKA OKUŽBA

Zaporedna št.	Spol	Starost [leta]	CRP [mg/L]	PCT [µg/L]	Lkci [10 ⁹ /L]	Presepsin [ng/L]
1	M	55	129	0,20	8,6	495
2	Ž	50	146	0,18	17,5	615
3	Ž	81	205	0,99	9,1	831
4	M	45	246	72,21	17,4	3425

5	Ž	82	136	1,94	10,6	1125
6	M	72	110	0,57	17,8	2364
7	Ž	70	294	0,36	21,7	1177
8	Ž	56	160	0,16	20,2	363
9	M	18	172	4,78	8,2	1902
10	Ž	84	142	6,26	12,5	587
11	Ž	83	167	0,64	19,1	1697
12	Ž	40	296	1,08	2,4	884
13	Ž	71	200	4,20	14,2	4297
14	M	69	125	1,03	17,3	12015
15	M	73	105	4,31	12,1	1952
16	M	76	431	17,74	1,1	6676
17	Ž	72	208	0,96	1,9	1367
18	M	58	208	0,28	12,4	379
19	M	72	314	59,06	15,8	> 20000
20	Ž	73	156	1,16	13,2	> 20000