

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LIDIJA PEJIĆ

DIPLOMSKA NALOGA

VISOKOŠOLSKI STROKOVNI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE
BIOMEDICINE

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

Lidija Pejić

DOLOČANJE VNETNIH DEJAVNIKOV PROKALCITONINA
IN C-REAKTIVNEGA PROTEINA PRI BAKTERIJSKIH IN
VIRUSNIH INFEKCIJAH

DETERMINATION OF INFLAMMATORY AGENTS PROCALCITONIN
AND
C-REACTIVE PROTEIN IN BACTERIAL AND VIRAL INFECTIONS

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2013

Diplomsko nalogo sem opravljala na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo v Univerzitetnem kliničnem centru v Ljubljani, pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem.

Zahvaljujem se prof. dr. Jošku Osredkarju, mag. farm., spec. med. biokem, za strokovne nasvete pri izdelavi diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi svoji družini in prijateljem, ki so mi stali ob strani in me spodbujali v času študija.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarju, mag. farm., spec. med. biokem.

Lidija Pejić

Komisija za zagovor:

Predsednica: prof. dr. Marija Sollner Dolenc

Mentor: prof. dr. Joško Osredkar

Član: asist. Nejc Horvat mag. farm.

Ljubljana, 2013

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	III
POVZETEK	IV
ABSTRACT	V
KAZALO SLIK	VI
KAZALO TABEL	VII
SEZNAM OKRAJŠAV IN KRATIC	VIII
1. UVOD	1
1.1 VNETJE.....	1
1.1.1 NAMEN VNETJA.....	1
1.1.2 VZROK VNETJA.....	1
1.1.3 KEMIČNI POSREDNIKI (MEDIATORJI) VNETJA.....	2
1.1.4 KLINIČNA IN HISTOLOŠKA DELITEV OBLIK VNETJA.....	3
1.1.5 AKUTNO VNETJE.....	2
1.1.6 KRONIČNO VNETJE.....	3
1.1.7 VRSTE EKSDUDACIJSKIH VNETIJ.....	4
1.1.8 ZNAKI VNETJA.....	5
1.1.9 VNETNE CELICE.....	6
1.2 DIAGNOSTIČNE LABORATORIJSKE METODE.....	7
1.2.1 BELA KRVNA SLIKA.....	7
1.2.2 SEDIMENTACIJA ERITROCITOV.....	8
1.2.3 PROTEINI AKUTNE FAZE.....	10
1.2.4 SEPSA.....	17
2. NAMEN DELA	18
3. MATERIALI IN METODE	19
3.1 OPIS PREISKOVANCEV.....	19
3.2 DOLOČANJE KONCENTRACIJE C-REAKTIVNEGA PROTEINA.....	20
3.2.1 NAMEN IN PODROČJE UPORABE.....	20
3.2.2 REAGENTI, KALIBRATORJI, KONTROLE.....	20
3.2.3 PRINCIP METODE.....	20
3.2.5 PODAJANJE REZULTATOV.....	22
3.3 DOLOČANJE KONCENTRACIJE PROKALCITONINA (PCT).....	23
3.3.1. NAMEN IN PODROČJE UPORABE.....	23
3.3.2 REAGENTI, KALIBRATORJI, KONTROLE.....	23
3.3.3. PRINCIP METODE.....	24
3.3.4 PODAJANJE REZULTATOV.....	25
3.4 STATISTIČNA ANALIZA.....	25
4. REZULTATI	26
4.1 REZULTATI LABORATORIJSKIH PREISKAV.....	28
4.2 OBČUTLJIVOST IN SPECIFIČNOST.....	29
4.3 KORELACIJA MED PCT in CRP.....	32
4.4 ROC-KRIVULJA.....	35
5. RAZPRAVA	41
6. SKLEP	44
7. LITERATURA	45

POVZETEK

Vnetje je lokalna reakcija na poškodbo v tkivu, pri kateri pride do otekline, rdečine in bolečine. Je poskus telesa za samozaščito, katerega cilj je, da se odstranijo škodljivi dejavniki in se začne proces zdravljenja. Vnetje delimo na akutno in kronično. Za akutno vnetje je značilen kratek potek, za kronično vnetje pa je značilno dolgotrajen potek. Pri ugotavljanje vnetja spremljamo parametre, kot so; bela krvna slika, sedimentacija eritrocitov in proteine akutne faze (CRP in PCT).

Namen našega diplomskega dela je bil ugotoviti ali se vnetna kazalca C-reaktivni protein in prokalcitonin razlikujeta, glede na to, ali gre za virusno ali bakterijsko vnetje. V raziskavo smo vključili 232 preiskovancev iz Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani. 212 preiskovancev je iz Klinike za infekcijske bolezni in vročinska stanja, 20 preiskovancev pa iz ostalih oddelkov UKC, ki niso kazali znakov vnetja in smo jih vzeli kot kontrolno skupino. 212 preiskovancev smo grobo razdelili glede na vrednosti proteina CRP v serumu na preiskovance z virusnim in preiskovance z bakterijskim vnetjem.

Za statistično obdelavo zbranih podatkov smo uporabili statistični program MedCalc[®] za Windows. Izračunali smo srednjo vrednost, mediano in standardni odklon, korelacijo ter narisali krivuljo občutljivosti in specifičnosti (ROC).

Ugotovili smo, da je prokalcitonin boljši pokazatelj bakterijskega vnetja. Med prokalcitoninom in C-reaktivnim proteinom ne obstaja korelacija v koncentraciji, kar pomeni, da na podlagi le ene spremenljivke ne moremo opredeliti za katero vrsto vnetja gre. Popolnoma jasne meje med virusnim in bakterijskim vnetjem žal ni mogoče določiti z določanjem le obeh omenjenih vnetnih dejavnikov.

Najučinkovitejši način za razlikovanje med virusnim in bakterijskim vnetjem je sočasno določanje C-reaktivnega proteina in prokalcitonina ter spremljanje klinične slike bolezni.

ABSTRACT

Inflammation is a local reaction to injury in tissue accompanied by swelling, redness and pain. It is an attempt of the body for self-protection; the aim is to remove harmful elements and start the healing process. Inflammation can be classified as either acute or chronic. Acute inflammation is defined by a short course; the chronic inflammation is defined by long-term inflammatory process. In determining inflammation we monitor parameters, such as, white blood count, erythrocyte sedimentation rate and acute phase proteins (CRP and PCT).

The purpose of our work was to determine whether the inflammatory indicator C-reactive protein and procalcitonin are acting differently, depending on whether it is a viral or bacterial infection. The study included 232 subjects from the University Medical Centre Ljubljana. 212 subjects were from the Clinic for Infectious Diseases and Febrile Illnesses, 20 subjects were from other departments of the University Medical Centre, who showed no signs of inflammation and we have taken them as a control group. 212 subjects were roughly divided according to the value of CRP protein levels on subjects with viral and bacterial inflammation.

For statistical analysis of collected data we used the statistical program MedCalc[®] for Windows. We calculated the mean, median, standard deviation, correlation, and draw Receiver Operating Characteristic curve (ROC).

We found out that procalcitonin is a better indicator of bacterial infection. There is no correlation between procalcitonin and C-reactive protein. This means that on the basis of only one variable we can not define what type of infection it is. Unfortunately, completely clear boundaries between viral and bacterial inflammation can not be determined only by setting both of these inflammatory factors. The most effective way to distinguish between viral and bacterial inflammation is to measure both the C-reactive protein and procalcitonin and monitor clinical picture of the disease.

KAZALO SLIK

Slika 1: Eritrociti v rouleaux formaciji (8).....	9
Slika 2: Sinteza proteinov akutne faze (10)	10
Slika 3: Kristalna struktura C-reaktivnega proteina (12)	11
Slika 4: Aminokislinsko zaporedje prokalcitonina (19).....	15
Slika 5: Analizator ADVIA [®] 1800 (25).....	22
Slika 6: Analizator Cobas e 411 (27)	25
Slika 7: Izid diagnostičnih testov (30).....	29
Slika 8: Prikaz korelacije med PCT in CRP brez vnetja	32
Slika 9: Prikaz korelacije med PCT in CRP pri virusnem vnetju	33
Slika 10: Prikaz korelacije med PCT in CRP pri bakterijskem vnetju.....	34
Slika 11: ROC krivulja za parameter PCT pri preiskovancih z bakterijskim vnetjem	36
Slika 12: ROC krivulja za parameter CRP pri preiskovancih z bakterijskim vnetjem.	37
Slika 13: ROC krivulja za parameter PCT pri preiskovancih z virusnim vnetjem.	38
Slika 14: ROC krivulja za parameter CRP pri preiskovancih z virusnim vnetjem.....	39

KAZALO TABEL

Tabela 1: Klinične in ustrezne histološke oblike vnetja.....	3
Tabela 2: Vrednosti CRP (15).....	12
Tabela 3: Koncentracija CRP pri različnih patoloških stanjih (15)	13
Tabela 4: Vrednosti PCT (20)	16
Tabela 5: Število preiskovancev	19
Tabela 6: Reagenti.....	20
Tabela 7: Prikaz povprečnih koncentracij za posamezno skupino.....	26
Tabela 8: Prikaz median vrednosti za posamezno skupino.....	26
Tabela 9: Prikaz standardnega odklona za posamezno skupino	27
Tabela 10: Število preiskovancev z normalnimi in zvišanimi vrednostmi PCT pri virusnem in bakterijskem vnetju	28
Tabela 11: Število preiskovancev z zvišanimi in normalnimi vrednostmi CRP in PCT v kontrolni skupini	28
Tabela 12: Diagnostična občutljivost in specifičnost glede na posamezno mejno vrednost pri bakterijski PTC.....	36
Tabela 13: : Diagnostična občutljivost in specifičnost glede na posamezno mejno vrednost pri bakterijski CRP	37
Tabela 14: : Diagnostična občutljivost in specifičnost glede na posamezno mejno vrednost pri virusnem PTC.....	38
Tabela 15: : Diagnostična občutljivost in specifičnost glede na posamezno mejno vrednost pri virusnem CRP	39
Tabela 16: Površina pod krivuljo	40

SEZNAM OKRAJŠAV IN KRATIC

Oznaka:	Opis:
Ab	protitelo
Ag	antigen
AUC	površina pod ROC krivuljo
CRP	C-reaktivni protein
Celice TH1	celice pomagalke
Celice NK	naravne celice ubijalke
Celice TC	citotoksične celice T
IL-1	interleukin 1
IL-6	interleukin 6
IL-8	interleukin 8
INF- γ	interferon gama
Ig-M	imunoglobulin razreda M
LN	lažno negativno
LP	lažno pozitivno
MIP-1a	makrofagni inflamatorni protein
MIP-1b	makrofagni inflamatorni protein
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina
PCT	prokalcitonin
PEG	polietilenglikol
PN	pravilno negativno
ROC	Receiver Operating Characteristic
PP	pravilno pozitivno
TNF- α	dejavnik tumorske nekroze alfa

1. UVOD

1.1 VNETJE

Vnetje je zapleten odziv ožiljenega tkiva na poškodbo ali draženje zaradi delovanja škodljivih dejavnikov (1). Dostikrat se razvije neodvisno od imunskega sistema, na primer po fizični poškodbi (2). Ob posredovanju raznovrstnih kemičnih posrednikov (mediatorjev) vnetja, ki se sprožijo iz plazme, poškodovanega tkiva in sodelujočih vnetnih celic, nastane cela vrsta postopnih sprememb na žilju, plazmi, v intersticiju in na vnetnih celicah (1). Vnetje je zelo pomemben obrambni in koristen odgovor organizma, ki uniči ali onemogoči povzročitelja in odstrani odmrlo tkivo ter pripravi pogoje za celjenje. Vnetno odgovori samo živo in zdravo tkivo, zato opazimo pri obsežnih nekrozah vnetje le na robovih, ki ima še zdrav krvni obtok (3).

1.1.1 NAMEN VNETJA

Namen vnetja je odstraniti ali uničiti škodljivi dejavnik ali vsaj preprečiti njegovo širjenje. Vnetna reakcija ni bolezen, ampak del naravne telesne obrambe z zdravilnim učinkom, ki pa je lahko dvorezen: ob odstranitvi oziroma uničevanju povzročitelja se velikokrat poškoduje in uničuje zdravo tkivo. Razvijejo se oteklina, bolečina, delovanje prizadetega dela je moteno, v votlih organih se lahko pojavljajo razpoke (rupture) in širjenje vnetja (na primer: vnetje slepiča, žolčnika ter krvavitve). Vnetje omogoča, da se odstranijo uničeni deli tkiva, ki se nato obnovijo ali zabrazgotinijo oziroma nadomestijo z vezivom. Okužbe brez vnetja bi se nenadzorovano širile, rane pa se nebi celile.

1.1.2 VZROK VNETJA

Vnetni odgovor je lahko posledica različnih dražljajev:

- okužbe z različnimi mikroorganizmi (bakterije z njihovimi toksini, virusi, glive, paraziti)
- kemikalije (strupene snovi v hrani – etilni alkohol, strupene snovi v gobah, strupeni plini, kisline, lugi, zdravila, droge, svinec ...)
- fizikalni dejavniki oziroma pojavi (vročina, mraz, elektrika, ultravijolična svetloba)
- endogeni vzroki (nekroza tkiva, nakopičeni produkti metabolizma, kot so holesterol, urati, kristali, motnje prekrvavitve, hormonske motnje, imunske okvare ...)

1.1.3 KEMIČNI POSREDNIKI (MEDIATORJI) VNETJA

Kemični posredniki z medsebojnim zapletenim delovanjem omogočajo postopno razvijanje vnetnega odziva. Vnetje lahko neposredno povzročijo poškodba tkiva, imunski kompleksi, bakterijski endotoksini in podobno, večinoma pri njegovem nastanku kemično posredujejo mediatorji, ki izvirajo iz:

1. poškodovanega oziroma odmrlega tkiva (kinini, encimi iz trebušne slinavke)
2. vnetnih celic (na primer histamini in heparin iz mastocitov in bazofilcev, serotoninini in trombocitni dejavniki)
3. plazme (na primer kininski in komplementarni sistem, C-reaktivi protein)

Nekateri mediatorji so shranjeni v določenih celicah, nekateri pa se na novo sintetizirajo. Na posamezno stopnjo vnetja vplivajo različni mediatorji, z različno močjo in vnetni odziv pospešujejo ali umirjajo (1).

Mediatorje vnetja razdelimo v več skupin:

- **vazoaktivni amini** (na primer: histamin, ki razširi žile in poveča prepustnost žilne stene).
- **nekateri encimi v plazmi** (najbolj pomemben je Hagemanov dejavnik - pri strjevanju krvi znan kot dejavnik XII. Hagemanov dejavnik aktivira sistem komplementa, ki deluje kot mediator vnetja in privlači levkocite na mesto vnetja).
- **presnovki arahidonske kisline** (arahidonska kislina nastane pri poškodbi celice iz fosfolipidov celične membrane. Presnova arahidonske kisline poteka v dveh smereh. Pri prvi nastanejo prostaglandini in tromboksani, pri drugi pa levkotrieni. Vse te snovi širijo žile, povečajo prepustnost žilnih sten in privlači levkocite).
- **reaktivni kisikovi radikali, limfokini, vsebine lizosomov** (3).

1.1.4 KLINIČNA IN HISTOLOŠKA DELITEV OBLIK VNETJA

Osnovne histopatološke oblike vnetja so:

- kataralno
- eksudacijsko (serozno, fibrinsko, hemoragično, gnojno ...)
- alteracijsko oziroma nekrozantno
- proliferacijsko
- fibroproduksijsko vnetje (vključno z granulomskim)

Klinično glede na trajanje vnetja ločimo akutno, subakutno in kronično vnetje.

V Tabeli 1 smo prikazali klinične in ustrezne histološke oblike vnetja (1).

Tabela 1: Klinične in ustrezne histološke oblike vnetja

KLINIČNA SLIKA	HISTOLOŠKA OBLIKA VNETJA	VNETNE CELICE, EKSUDAT
AKUTNO VNETJE	Kataralno (<i>nahod</i>)	sluz
	Eksudacijsko (<i>serozno, fibrinsko, hemoragično, gnojno</i>)	Nevtrofilni granulociti, gnoj, fibrin, eritrociti, makrofagi
	Alteracijsko-nekrozantno-ulcerozno (<i>absces, ulkus</i>)	mrtvina
	(fibro)proliferacijsko	vezivo
SUBAKUTNO VNETJE	Eksudacijsko	Nevtrofilni, eozinofilni in bazofilni granulociti, mastociti, enojedrne vnetnice
	Alteracijsko	
	Proliferacijsko	
KRONIČNO VNETJE	(Fibro)-proliferacijsko	Enojedrne vnetnice – limfociti, plazmatke, histociti-makrofagi, vezivne celice, kolagen, sluz
	Granulomsko	
	Kataralno (kronični bronhitis)	

1.1.5 AKUTNO VNETHJE

Za akutno vnetje je značilen kratek potek (od nekaj dni do 2 ali 3 tedne), histološko pa nekrozantno in eksudacijsko vnetje in v vnetišču predvsem vnetna infiltracija z nevtrofilnimi granulociti (1). V nekaj minutah po poškodbi se razširijo žile, kar povzroči povečan dotok krvi v tkivo. Povečan volumen krvi povzroči vročino in oteklino. Poveča se tudi prepustnost žilja, posebno postkapilarnih venul, kar povzroči oteklino in v nekaterih primerih izstopanje levkocitov, kar prispeva k nabrekanju in k pordečitvi tkiva. Ko tekočina izstopi iz krvnega obtoka, se aktivirajo kininski strjevalni in fibrinolitični sistem. Številne spremembe žilja, ki se pojavijo zgodaj pri akutnem vnetju, nastanejo zaradi neposrednega učinka plazemskih encimskih mediatorjev, kot so bradikinini in fibrinopeptidi. Nekatere spremembe žilja nastanejo zaradi posrednega delovanja komplimentnih anafilatoksinov, ki spodbujajo degranulacijo lokalnih mastocitov s sproščanjem histamina.

Nekaj ur po nastanku teh vaskularnih sprememb se nevtrofilci prilepijo na endotelijske celice in potujejo iz krvi v tkivne prostore. Nevtrofilci fagocitirajo patogene mikrobo in sproščajo mediatorje, ki prispevajo k vnetju. Med mediatorje vnetja sodita makrofagna inflamatorna proteina (MIP-1a in MIP-1b), to sta kemokina, ki pritegneta makrofage v vnetišče. Makrofagi so aktivirane celice, ki učinkovito fagocitirajo mikrobo, in izločajo mediatorje in citokine, ki prispevajo k vnetju.

Aktivirani makrofagi izločajo tri citokine (IL-1, IL-6 in TNF- α), ki povzročajo številne lokalne in sistemske spremembe, ki jih opazujemo pri akutnem vnetju. Ti trije citokini delujejo lokalno, povečajo prepustnost žil in povzročajo strjevanje. IL-1 in TNF- α delujeta na makrofage in endotelijske celice ter spodbujata izdelovanje kemokina IL-8, ki prispeva k vdoru nevtrofilcev. Tudi IFN- γ in TNF- α aktivirata makrofage in nevtrofilce, okrepiata njihovo fagocitno aktivnost in pospešujeta sproščanje litičnih encimov v medceličnino.

Trajanje in jakost akutnega vnetja mora biti skrbno nadzorovana, da se omeji okvara tkiva in omogoči obnova tkiva, ki je potrebna, da se rana zaceli.

Lokalno akutno vnetje spremlja sistemski odziv, imenovan reakcija akutne faze. Zanj je značilna vročina, povečana sinteza hormonov, povečano nastajanje levkocitov in izdelovanje

številnih proteinov akutne faze v jetrih. Povečana telesna temperatura preprečuje razmnoževanje številnih patogenih mikrobov in okrepi imunski odgovor nanje. Prototip proteina akutne faze je C-reaktivni protein, katerega serumska raven se med akutnim vnetjem poveča do 1000-krat (2).

1.1.6 KRONIČNO VNETJE

Za kronično vnetje pa je značilen dolgotrajen potek - več mesecev ali celo let, histološko ga spremlja proliferacijsko, fibro produkcijsko vnetje z mononuklearnimi celičnim vnetnim infiltratom z limfociti, plazmatkami, histociti ali granulomsko vnetje (1).

Kronično vnetje se razvije zaradi dolgotrajne navzočnosti antigena. Nekateri mikroorganizmi imajo na primer komponente celične stene, ki jim omogočajo, da se uprejo fagocitozi in povzročijo nastanek kroničnega vnetja ter obsežno okvaro tkiva. Kronično vnetje nastaja tudi pri številnih avtoimunih boleznih, kjer lastni antigeni neprestano aktivirajo celice T.

Značilno za kronično vnetje je nakopičenje in aktivacija makrofagov. Najpomembnejša citokina sta IFN- γ , ki aktivira makrofag in TNF- α , ki prispeva k propadanju tkiva. Aktivirani makrofagi so zelo učinkoviti pri predstavljanju antigena in pri uničenju znotrajceličnih patogenih mikrobov. Pri kroničnem vnetju nakopičenje aktiviranih makrofagov veliko prispeva k okvari tkiva.

Na kraju kroničnega vnetja se razvije tudi fibroza, ki celi rane, lahko pa ovira normalno funkcijo tkiva. Ta, tumorju podobna gmota, imenovana granulom, je sestavljena iz središča, kjer so aktivirani makrofagi obdani z aktiviranimi limfociti. V središču granuloma so dostikrat večjedrne celice velikanke, ki so nastale z zlitjem aktiviranih makrofagov. Celice velikanke so obdane z velikimi spremenjenimi makrofagi, ki so podobni epiteljskim celicam in jih imenujemo epiteloidne celice.

Citokina IFN- γ in TNF- α sta najpomembnejša za razvoj kroničnega vnetja. IFN- γ sproščajo celice TH1, celice NK in celice TC, medtem ko TNF- α sproščajo aktivirani makrofagi. Najpomembnejša lastnost IFN- γ je njegova zmožnost, da aktivira makrofage, ki prispevajo k okvari tkiva. Aktivirani makrofagi sproščajo hidrolitične encime in reaktivne kisikove in dušikove presnovke, ki povzročijo okvaro okolnega tkiva. Več proučevanj je pokazalo, da tudi TNF- α prispeva k propadanju tkiva, značilnem za kronično vnetje (2).

1.1.7 VRSTE EKSUDACIJSKIH VNETIJ

Vnetna tekočina (eksudat) je sestavljena iz tekočine in beljakovin plazme, levkocitov, odmrlih celic in povzročiteljev vnetja. Najpogosteje je eksudat motna tekočina bolj ali manj gnojnega videza, ki se lahko tudi strdi. Vnetna tekočina je najbolj kužen material in izvrstno gojišče za bakterije (3).

Ločimo več podvrsti eksudacijskega vnetja, glede na vrsto snovi ali celic, ki prehajajo preko preveč prepustnih kapilar:

Serozno vnetje – pri blago povečani prepustnosti prehajajo v intersticij ali telesne votline albumini, ki zaradi zvišanega onkotskega tlaka potegnejo za seboj tudi tekočino, ki tvori vnetni edem. V teh primerih je to zgolj transudat.

Fibrinozno vnetje – nastane pri srednje povečani prepustnosti žilnih sten, pri kateri prehajajo tudi globulini in fibrinogen, ki se spremeni v fibrin.

Seromukozno ali kataralno vnetje – transudat je pomešan z sluzjo iz draženih mukoznih žlez.

Hemoragično vnetje – pri izjemno povečani prepustnosti pasivno izstopajo eritrociti in nevtrofilni granulociti.

Gnojno ali purulentno vnetje – vnetnice pri propadu iz lizosomov sproščajo številne proteolitične encime, ki razgrajujejo poškodovano tkivo. Gnoj sestoji iz številnih živih in propadlih nevtrofilnih granulocitov, utekočinjene nekroze, neceličnega vnetnega eksudata ter povzročiteljev vnetja. Kadar je gnojno vnetišče dobro razmejeno od okolnega tkiva, govorimo o ognjku (abscesu), kadar pa je difuzno razširjeno pa o flegmoni.

Gangrenozno vnetje – nastane po odmrtnju tkiva zaradi dodatne okužbe z bakterijami.

Proliferacijsko vnetje – nastane zaradi sproščanja rastnih dejavnikov, med njimi tudi z brstenjem oziroma proliferacijo žilja in veziva.

Vse navedene oblike vnetja se lahko med seboj kombinirajo (1).

1.1.8 ZNAKI VNETJA

Klasični znaki vnetja so:

Oteklina in nabrekanje tkiva (tumor) nastane zaradi kopičenja tekočine in celic. Vnetno tekočino ali eksudat sestavljajo voda, beljakovine plazme in levkociti, pogosto pa tudi povzročitelji vnetja (mikroorganizmi).

Toplota (calor) je značilna za vneto kožo. Koža je običajno hladnejša kot telesno jedro. Kri, ki napolni razširjene žile, pa je topla (okoli 37 °C).

Rdečina (rubor) nastane na mestu vnetja zaradi povečane prekrvavitve.

Bolečina (dolor) nastane zaradi draženja bolečinskih živčnih končičev s snovmi iz vnetega tkiva in spremenjenega pH v vnetem tkivu.

Moteno delovanje oziroma funkcija prizadetega dela telesa (functio laesa) je posledica bolečine, otekline in drugih znakov vnetja (3).

Sistemske znake vnetja

Mediatorji vnetja ne delujejo le lokalno, temveč imajo tudi sistemske učinke, kot so povišana telesna temperatura, levkocitoza (nevtrofilija pri bakterijskih infekcijah, limfocitoza pri virusnih infekcijah, eozinofilija pri alergičnih reakcijah), hitrejši srčni utrip, povišan krvni tlak, tresenje, splošno slabo počutje. Kronično vnetje lahko privede do izrazite izgube telesne teže (kaheksija), vdor bakterij v kri pa do septičnega šoka.

1.1.9 VNETNE CELICE

Vnetne celice so celice, ki sodelujejo pri nastanku vnetja. Vnetje lahko posredujejo celice: nevtrofilci, eozinofilci, bazofilci, mastociti, trombociti, epiteljske celice in krožeči proteini: komponente komplemента, koagulacije in fibrinolize. Skupne lastnosti vnetnih celic so predvsem receptorji za imunoglobuline in komplement, citoplazemska zrna, ki vsebujejo hidrolitične encime, nastajanje presnovkov arahidonske kisline in zmožnost fagocitoze. Primarna funkcija nevtrofilcev in makrofagov je fagocitoza, za bazofilce in mastocite pa je pomembno izločanje vnetnih mediatorjev. Fagocitne celice, delujejo kot zaščitna pregrada med okoljem in gostiteljem; sekrecijske celice pa prispevajo k obrambi gostitelja z okrepitevijo fagocitoze ali z neposrednim delovanjem na celice tarče. Vnetje, ki ga posredujejo celice je nujno potrebno za obrambo gostitelja, ima pa resne stranske učinke, če se aktivira čezmerno ali na neustrezen način (4).

1.2 DIAGNOSTIČNE LABORATORIJSKE METODE

Parametri, ki jih spremljamo pri vnetju, so:

Bela krvna slika

Sedimentacija eritrocitov

Proteini akutne faze

1.2.1 BELA KRVNA SLIKA

Izsledke količinskih in kakovostnih preiskav celic v periferni krvi imenujemo krvna slika. Razdelimo jo na eritrocitno (rdečo), levkocitno (belo) in trombocitno krvno sliko.

Krvne celice bele vrste imenujemo levkociti. Poznamo tri vrste levkocitov, ki se ločijo po morfoloških lastnostih in funkciji v telesu. To so granulociti, monociti in limfociti (5).

Bele krvničke ali levkociti imajo pomembno vlogo pri obrambi pred povzročitelji bolezni in jih poleg krvi najdemo v tkivu številnih organov. Nastajajo v kostnem mozgu in bezgavkah, na svojo nalogo pa se pripravljajo v vranici in priželjcu (timus). Odkloni v številu levkocitov so pogosto znak vnetja v telesu (6).

V belo krvno sliko sodijo število levkocitov in delež oziroma absolutno število posameznih vrst levkocitov.

Levkocite preštajemo v komori z mikroskopom ali pa to opravi elektronski števec-analizator. Rezultate izrazimo tradicionalno s številom levkocitov oziroma s številčno koncentracijo v litru krvi ($10^9/l$).

Diferencialna bela krvna slika je podatek v odstotkih o deležu posameznih vrst levkocitov. Za oceno moramo pregledat najmanj 200 celic v krvnem razmazu. Absolutno število vseh levkocitov pomnožimo z deležem za posamezno vrsto. Rezultat izrazimo s številom v litru krvi ($10^9/l$) (5).

Zmanjšano število levkocitov (levkopenija) kaže predvsem na virusno okužbo, malarijo, tifus, poškodbe kostnega mozga zaradi obsevanja ali jemanja nekaterih zdravil.

Povečano število levkocitov (levkocitoza) kaže na okužbe z bakterijami, glivicami, paraziti ali drugimi povzročitelji. Drugi možni vzroki za ta pojav so lahko tudi akutne zastrupitve, krvavitve, alergije, stanja šoka in levkemije (6).

1.2.2 SEDIMENTACIJA ERITROCITOV

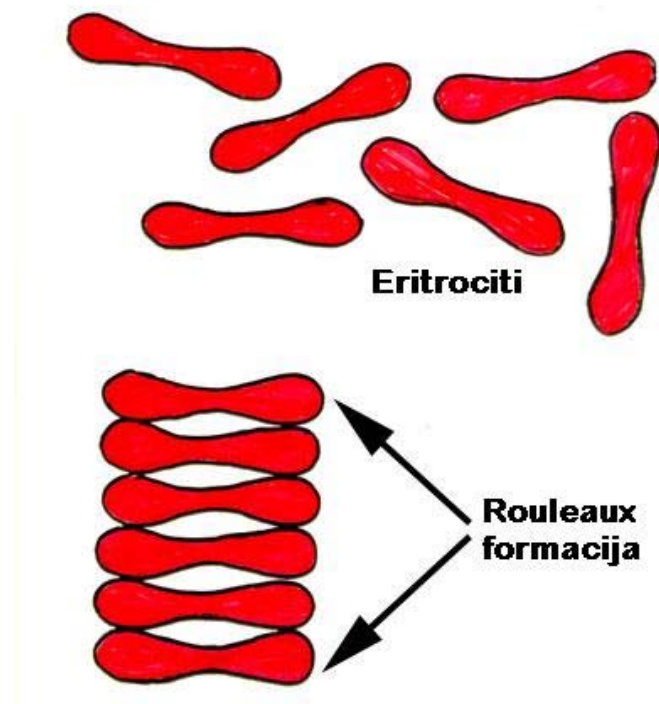
Sedimentacija eritrocitov je nespecifična preiskava, ker nam ne pove, za katero bolezensko stanje gre. Sedimentacija je lahko fiziološko povišana v nekaterih primerih, kot so: nosečnost, menstruacija, pri starejših ljudeh, oziroma je lahko normalna kljub prisotni bolezni (na primer: okvara jeter, nekatera maligna obolenja ...).

Sedimentacija eritrocitov je posledica nestabilnosti krvi, ki je odvisna od recipročnega učinka med površino eritrocitne membrane in določenimi proteini v plazmi, ki jih imenujemo aglomerini. Lastnost aglomerinov imajo fibrinogen, IgM in alfa-2-makroglobulin.

Aglomerini so faktorji akutne faze, ki zaradi svojega specifičnega delovanja na membrano eritrocitov, lahko povzročijo pospešeno sesedanje eritrocitov v in vitro pogojih. Aglomerini imajo visoko afiniteto do glikoproteinov v eritrocitni membrani in zaradi velikosti molekul lahko tvorijo mostove med posameznimi eritrocitnimi celicami. V krvnem obtoku se eritrociti zaradi enakega naboja odbijajo in se ne sesedajo. Faktorji akutne faze (CRP, ceruloplazmin, alfa 1-kisli glikoprotein ...) zmanjšajo naboj na eritrocitih, povzročijo agregacijo in pospešeno sesedanje eritrocitov.

Hitrost sedimentacije je prvi uvedel Westergreen. Eritrociti sedimentirajo v graduirani cevki (pipeti), ki jo imenujemo Westergreenova pipeta. Westergreenova metoda temelji na hitrosti sesedanja eritrocitov v pipeti določenih dimenzij (7).

Vzorec venozne krvi pomešamo s snovjo, ki preprečuje strjevanje krvi, nato pa jo v navpični cevki posesamo do višine 200 milimetrov. Po eni uri odčitamo, za koliko milimetrov na uro se usedejo krvna telesca v cevki (6). Sedimentacija poteka v treh fazah. V prvi fazi, ki traja približno 10 minut pride do agregacije eritrocitov in nastajanje "rouleaux formacij", kot je prikazano na Sliki 1, v drugi fazi, ki traja približno 40 minut, pride do pospešenega sesedanja nastalih agregatov, v zadnji fazi pa pride do umiritev sesedanja, zaradi tesno stisnjenih eritrocitnih agregatov (7).



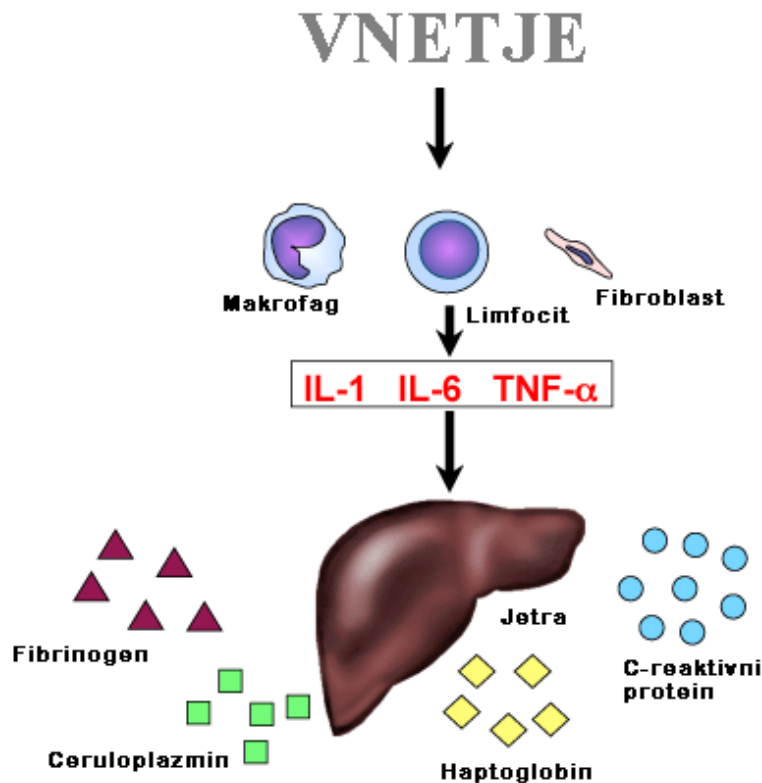
Slika 1: Eritrociti v rouleaux formaciji (8)

Povečana hitrost usedanja (povečana sedimentacija) kaže na to, da je nekje v telesu kronično ali akutno vnetno žarišče. Za povečano sedimentacijo je lahko veliko nenevarnih, pa tudi nevarnih sprememb v telesu: virusne ali bakterijske okužbe, kronična vnetja, kot so revmatska obolenja, poškodbe jeter, slabokrvnost ali pa tumorska obolenja.

Zmanjšana hitrost usedanja (zmanjšana sedimentacija) se pojavi le redko, pri nekaterih boleznih krvi, na primer pri poliglobuliji (6).

1.2.3 PROTEINI AKUTNE FAZE

Proteini akutne faze (ang. acute phase proteins - APP) so komponenta nespecifične (prirojene) imunosti. Sintetizirajo se v jetrih, po stimulaciji s citokini, ki jih sproščajo makrofagi na mesto vnetja (9). Sintezo proteinov akutne faze prikazuje Slika 2.



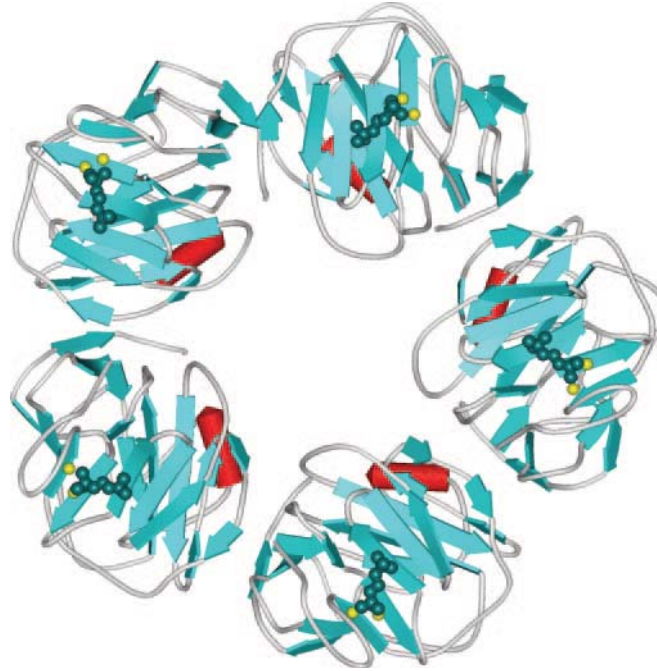
Slika 2: Sinteza proteinov akutne faze (10)

Koncentracija v krvi je proporcionalna jakosti in stopnji poškodbe tkiva. Proteini akutne faze pomagajo pri: odkrivanju infekcij, diagnostiki vnetnih in malignih bolezni, odkrivanju tkivne nekroze.

So skupina proteinov plazme, katerih koncentracija se menja v času akutne faze vnetja, infekcije, travme, stresa. Kot odgovor na stimulans se poveča koncentracija fibrinogena, C-reaktivnega proteina, serumskega amiloid A, haptoglobina, ceruloplazmina, α 1-kislega glikoproteina medtem ko se koncentracija albumina in transferina zmanjšata (9).

1.2.3.1 C-REAKTIVNI PROTEIN (CRP)

C-reaktivni protein je beljakovina akutne faze vnetja (11). Po sestavi je glikoprotein, sestavljeni iz petih enakih nekovalentno povezanih enot, simetrično razporejenih okoli centralne pore, kot prikazuje Slika 3. Molekulska masa posameznega monomora znaša ~ 23 kD. Gen za CRP se nahaja na kratki ročici prvega kromosoma (12). Njegovo sintezo spodbujajo jetra pod vplivom IL-1 in IL-6 (13).



Slika 3: Kristalna struktura C-reaktivnega proteina (12)

Med njegove glavne funkcije spadajo aktivacija sistema komplimenta, spodbujanje fagocitoze in okrepitev imunskega odgovora. Koncentracija CRP-ja je neposredni pokazatelj vnetja. Normalna koncentracija CRP-ja v serumu je do 5 mg/l, ki pa po vnetnem dražljaju hitro naraste (tudi do 1000-krat), vendar tudi izredno hitro pade (v enem tednu) (13). Je razmeroma pozen kazalec okužbe, saj začne koncentracija v plazmi naraščati 6 do 12 ur po začetku procesa, doseže največjo vrednost po 48 urah in ostane povišana več dni po prenehanju okužbe (11,14). CRP je na eni strani zelo občutljiv, na drugi strani pa zelo nespecifičen označevalec vnetja, ne glede na to, kaj je vnetje povzročilo. Določanje CRP je našlo široko uporabnost v diagnostiki in spremljanju različnih vnetnih procesov, kot na primer razločevanje med bakterijskimi in virusnimi okužbami, sledenje pooperativnim zapletom, diagnosticiranju ostalih vnetnih bolezni in spremljanje učinkovitosti zdravljenja (11). Velika prednost CRP je, da ga lahko določamo v zelo majhnih količinah krvi sočasno z drugimi

preiskavami, da je metoda hitra in da je meritev dostopna 24 ur na dan. Med najbolj pomembnimi kvalitetami CRP sta visoka občutljivost in visoka negativna napovedna vrednost. Vendar CRP ni zelo specifičen kazalec okužbe, saj je koncentracija povečana tudi po kirurških posegih ter vnetjih in poškodbah tkiva drugega vzroka (sistemske bolezni, maligne bolezni, poškodbe, opekline). Pri bakterijskih okužbah je koncentracija CRP ponavadi zvišana, nizka pa ostane pri virusnih okužbah (14).

Pri blagem vnetju in večini virusnih okužb so koncentracije CRP med 10 in 40 mg/l, pri bakterijskih okužbah pa so vrednosti večinoma višje in se gibljejo med 40 in 200 mg/l, pri najbolj izraženih bakterijskih okužbah pa celo med 150 in 200 mg/l (11). Vendar pa so lahko vrednost CRP normalna ali celo znižana pri bakterijskih okužbah in močno povišana pri virusnih okužbah. Ugotovili so, da se izmerjena vrednost CRP med 10 in 50 mg/l ne more uporabljati za ločevanje bakterijske in virusne infekcije, saj bi to lahko vodilo k pogosti antibiotični terapiji pri virusnih okužbah in s tem do ustvarjanja rezistence. Upadanje koncentracije kaže na uspešnost terapije in zdravljenje se pogosto lahko konča, ko vrednost CRP doseže normalno stanje (14). V Tabeli 2 smo prikazali vrednosti CRP na podlagi katerih lahko ob pomoči klinične slike ugotovimo ali gre za bakterijsko okužbo. Nizke vrednosti pod 20 mg/l z veliko gotovostjo izključujejo bakterijsko okužbo, izjema so le novorojenčki (15). CRP je od klasičnih dejavnikov tveganja neodvisni napovednik srčno-žilnih dogodkov in omogoča prepoznavanje najbolj ogroženih posameznikov (11).

Tabela 2: Vrednosti CRP (15)

VREDNOST CRP		REZULTATI	IZJEME
Normalne vrednosti	< 20 mg/l	Z veliko gotovostjo izključuje invazivno bakterijsko okužbo.	Novorojenčki prvih 6-12 ur po začetku okužbe.
Povišane vrednosti	20-99 mg/l	Sum na lokaliziran bakterijski proces ali bakteremijo.	
Zelo povišane vrednosti	> 100 mg/l	Sum na invazivno bakterijsko okužbo ali septikemijo.	

Visok CRP je značilen za :

- bakterijski pielonefritis
- bakterijsko pljučnico
- gnojni meningitis

Nizek CRP je značilen za:

- cistitis
- virusno pljučnico
- virusni meningoencefalitis (15).

V Tabeli 3 smo prikazali koncentracijo CRP pri različnih patoloških stanjih.

Tabela 3: Koncentracija CRP pri različnih patoloških stanjih (15)

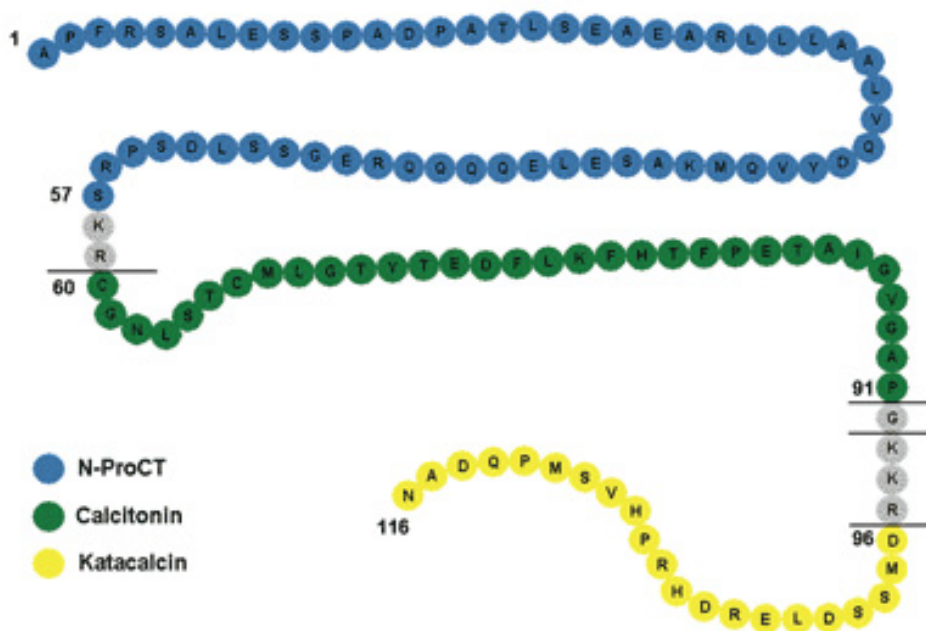
PATOLOŠKO STANJE		mg/l
BAKTERIJSKE INFEKCIJE	Septični artritis	80 do > 200
	Meningitis	80 do > 200
	Pljučnica	80 do > 200
	Pielonefritis	60 do > 200
	Tonzilitis	30 – 60
	Vnetje srednjega ušesa	10 – 40
	Infekcije zgornjega dela dihalnih poti	10 – 40
VIRUSNE INFEKCIJE	Pljučnica	10 – 20
	Meningitis	10 – 20
	Infekcije zgornjega dela dihalnih poti	10
	Influenca	10 – 20
	Prehlad	10
NEINFEKCIJSKE VNETNE BOLEZNI	Revmatoidni artritis	30 do > 200
	SLE	10 – 20
	Polimialgia reumatica	10 – 30
	Akutni pankreatitis	10 – 30
NEKROZE	Miokardialni infarkt	10 – 30
	Rakava obolenja	10 – 40

1.2.3.2 PROKALCITONIN (PCT)

Prokalcitonin (PCT) je vnetni protein akutne faze vnetja. Je polipeptid sestavljen iz 116 aminokislin, njegova molekulska masa pa znaša 13 kD. Njegovo aminokislinsko zaporedje je istovetno prohormonu kalcitonina, ki nastaja v celicah C ščitnice (16). Vključuje zaporedje kalcitonina na pozicijah od 60 do 91 (32 amino kislin) (Slika 4). PTC je zelo stabilen protein, tako in vivo kot ex vivo in ni podrejen hormonski aktivnosti kalcitonina v plazmi (17). Najmočnejši dražljaj za izločanje je sistemski učinek bakterijskih endotoksinov. Koncentracija PCT je v plazmi zdravih ljudi tako majhna, da je s sedanjimi laboratorijskimi metodami nezaznavna (manjša kot 0,1 µg/l) (18). Razpolovni čas prokalctonina je od 25 do 30 ur (16). Vrednosti PCT od 0,5 do 3 µg/l štejemo kot nizke, vrednosti od 3 do 30 µg/l spadajo med visoke, nad 30 µg/l pa štejemo kot zelo visoke vrednosti PCT. Vrednosti, večje kot 0,5 µg/l, govorijo v prid akutni bakterijski okužbi. Pri hudih bakterijskih okužbah in v hiperinflamatornem obdobju večorganske odpovedi so vrednosti PCT večje kot 100 ali celo kot 1000 µg/l. Vrednosti PCT so pri bolnikih z bakterijskimi okužbami in sistemskim vnetnim odgovorom organizma praviloma zelo visoke in nam omogočajo razlikovanje takšnih bolnikov od bolnikov z lokalno omejenimi okužbami (18). V Tabeli 4 smo prikazali vrednotenje koncentracije PCT.

Mesto sinteze PCT, katerega porast spodbudi bakterijsko vnetje, ni povsem pojasnjeno. Predvsem pa niso dokončno razjasnjeni molekularni mehanizmi, ki vodijo v povečanje koncentracije PCT pri bolnikih z bakterijsko okužbo. Zanesljivo ga ne izločajo celice C ščitnice. Nekateri avtorji dokazujejo, da PCT nastaja v nevroendokrinih celicah nekaterih organov, kot so pljuča in prebavila. Z raziskavo na živalskem modelu sepse so v tkivih različnih organov našli mRNA, ki kodira nastanek kalcitonina. Imunoreaktivni kalcitonin so dokazali v pljučih, jetrih, ledvicah, možganih, trebušni slinavki, tankem črevesju in v srcu. Pri ljudeh so nedvoumno dokazali, da ob prisotnosti posrednikov vnetja PCT nastaja in se izplavlja iz maščobnih celic. Poti izločanja PCT prav tako niso povsem pojasnjene, verjetno ga razgradijo proteolitični encimi. PCT se načelno ne vpleta v presnovo kalcija in fosfata. V primerjavi z nekaterimi starejšimi označevalci vnetja, kot je CRP, povečanje PCT hitreje spremlja začetek sistemske okužbe. Po intravenskem vbrizganju endotoksina po Gramu negativne bakterije se je pri zdravih prostovoljcih v 3 do 6 urah koncentracija serumskega PCT značilno povečala. V serumu je bil zaznaven že 2 uri po začetku raziskave, vrh je koncentracija dosegla v 8 urah. V 2 do 3 dneh se je koncentracija PCT v serumu spet zmanjšala pod mejno vrednost 0,5 µg/l. Koncentracija PCT lahko pri neobvladani okužbi več

dni in pa tudi tednov ostaja visoka. Metaanaliza 12 objavljenih raziskav je pokazala, da je PCT v primerjavi s CRP občutljivejši (92 % oz. 86 %) in bolj specifičen (73 % oz. 70%) za diagnozo bakterijske okužbe. Zmerno povečanje koncentracije PCT opazamo tudi pri politravmatiziranih in kirurških bolnikih. Povečano koncentracijo PCT pričakujemo predvsem po obsežnejših kirurških posegih, kot so operacije na srcu, v prsni votlini ali v trebuhu. Če pa PCT preseže 1,5 µg/l, to z večjo verjetnostjo napoveduje dodaten zaplet oz. okužbo. Povečanje koncentracije PCT opazamo tudi pri bolnikih v prvih dneh po presaditvi organov, predvsem jeter in ledvic. Pri šoku, ki ni posledica okužbe, se koncentracija PCT sicer poveča, vendar je manjša kot pri septičnem šoku. Pri rakavih boleznih, alergijah, sistemskih vezivno tkivnih boleznih in različnih virusnih okužbah, ne glede na sistemske znake vnetja, se PCT praviloma ne poveča čez mejno vrednost 0,5 µg/l. Serumski PCT je zaradi hitrega povečanja koncentracije lahko zgodnji diagnostični laboratorijski kazalec sistemske bakterijske okužbe. Pri jemanju zdravil, ki vplivajo na sproščanje citokinov, pa se koncentracija lahko neznačilno poveča (16).



Slika 4: Aminokislinsko zaporedje prokalcitonina (19)

Smernice določanja PCT

PCT določamo pri :

- sumu na sepso v kolikor je koncentracija CRP nizka
- klinični sliki hude sepse ali septičnega šoka
- febrilni nevtropeniji
- prizadetih novorojenčkah s sumom na sepso (upoštevaj diagram fiziološkega dviga)
- okužbah posameznega organskega sistema (pljučnica, infekcijski endokarditis, gnojni meningitis, okužbe sečil) in sočasnih kliničnih znakov skladnih s sliko hude sepse ali septičnega šoka
- meningitisu, v kolikor s preiskavo krvi in likvorja ne moremo zanesljivo izključiti bakterijske okužbe
- neinfekcijskih boleznih (po presaditvi organov, operacija, pankreatitis, opekline, pljučna embolija, akutni koronarni sindrom, tumor, bolezni veziva, obsežne poškodbe) v kolikor je koncentracija CRP povišana (po presaditvi jeter tudi ob normalnem CRP) in so prisotni znaki sistemskega vnetnega odziva.

Tabela 4: Vrednosti PCT (20)

NORMALNA VREDNOST : < 0,05 µg/l	BREZ SISTEMSKIH ZNAKOV VNETJA.
PCT < 0,5 µg/l klinično neznačilen porast	Lokalno vnetje ali lokalizirana okužba ni izključena.
PCT 0,5 do <2,0 µg/l blag sistemski vnetni odziv	Lokalizirana okužba ali druge bolezni s sistemskimi znaki vnetja, sepsa manj verjetna.
PCT > 2 in < 10 µg/l zmeren sistemski vnetni odziv	Sepsa je možna, lahko odpoved posameznih organov.
PCT > 10 µg/l hud sistemski vnetni odziv	Sepsa je verjetna, običajno prisotni znaki odpovedi posameznih organov.

1.2.4 SEPSA

Sepsa je sistemski odgovor organizma na okužbo. Povzročajo jo različne Gram negativne bakterije, Gram pozitivne bakterije, mikobakterije, virusi, glive in zajedalci (21).

Okužbe se klinično prikazujejo kot območno omejeno vnetje ali kot sistemski vnetni sindrom (sepsa), ki se lahko stopnjuje do nevarnega septičnega šoka (22). Za sepso je značilna zvišana ali znižana telesna temperatura, povišana frekvenca dihanja in srčni utrip, povišano ali znižano število levkocitov (21). Če se hudi sepsi pridruži arterijska hipotenzija, neodzivna na nadomeščanje tekočine, govorimo o septičnem šoku (22).

Klinična slika je odvisna od virulence povzročitelja, bolnikovih pridruženih boleznih in narave njegove vnetne reakcije, izvora sepse (21).

Sistemska bakterijska okužba je najmočnejši dražljaj za nastajanje PCT, medtem ko je pri lokaliziranih okužbah posameznih organov ali abscesih serumska koncentracija PCT večinoma nižja (pod 0,5 µg/l). Stopnja povečanja PCT je v neposredni povezavi z resnostjo sepse oziroma s prizadetostjo posameznih organskih sistemov. Povišana koncentracija PCT v serumu ima v primerjavi z drugimi laboratorijskimi označevalci sepse, kot so CRP ali levkociti v periferni venski krvi, večjo občutljivost, specifičnost in pozitivno napovedno vrednost, pa tudi negativno napovedno vrednost za diagnozo sepse. PCT se v začetku sistemske bakterijske okužbe hitro poveča in se ob umirjanju vnetja, skladno s kliničnim izboljšanjem, tudi hitro normalizira. S spremljanjem PCT lahko ocenimo aktivnost vnetja in napovemo razplet sistemske okužbe. Če visoka koncentracija PCT v serumu vztraja, je to neugoden znak, ki ga spremlja velika smrtnost (20).

2. NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti ali se koncentracija parametra prokalcitonina in C-reaktivnega proteina razlikujeta glede na to ali gre za virusno ali bakterijsko okužbo. V raziskavo smo vključili 232 preiskovancev iz Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani.

Z uporabo računalniškega statističnega programa MedCalc[®] za Windows smo izračunali srednjo vrednost, mediano in standardni odklon prokalcitonina in C-reaktivnega proteina. Ugotovili smo, koliko rezultatov PCT je normalnih pri skupinah z virusno oziroma bakterijsko okužbo, koliko je zvišanih PCT in CRP v kontrolni skupini, izračunali smo specifičnost in občutljivost parametrov PCT in CRP ter korelacijo in izdelali krivuljo občutljivosti in specifičnosti (ROC-krivulja).

3. MATERIALI IN METODE

3.1 OPIS PREISKOVANCEV

V raziskavo, ki smo jo opravili, smo vključili 232 preiskovancev. 212 preiskovancev je iz Klinike za infektivne bolezni in vročinska stanja, Univerzitetnega Kliničnega centra v Ljubljani. 20 preiskovancev pa iz ostalih oddelkov UKC, ki niso kazali znakov vnetja in smo jih vzeli kot kontrolno skupino. 212 preiskovancev smo razdelili v dve skupini, glede na vrednost proteina CRP v serumu. Če je bila vrednost CRP-ja pod 80 mg/l, smo jih uvrstili v virusno skupino. Če pa je bila vrednost CRP-ja nad 80 mg/l, smo jih uvrstili v bakterijsko skupino. Tabela 5 prikazuje število preiskovancev v posamezni skupini.

Tabela 5: Število preiskovancev

SKUPINA	ŠTEVILO PREISKOVANCEV
Virusna	56
Bakterijska	156
Kontrolna	20
SKUPAJ	232

Zdravi preiskovanci v kontrolni skupini so bili v starostni skupini od 27 do 81 let, povprečna starost je bila 60 let. Preiskovanci z virusno okužbo so bili v starostni skupini od 15 do 94 let, povprečna starost je bila 53 let. Preiskovanci z bakterijsko okužbo so bili v starostni skupini od 16 do 92 let, njihova povprečna starost pa je bila 58 let.

Vzorci so bili odvzeti za diagnostične postopke in ne za potrebe diplomske naloge.

3.2 DOLOČANJE KONCENTRACIJE C-REAKTIVNEGA PROTEINA

V okvirju diplomske naloge smo določili koncentracijo CRP v serumu bolnikov z imunoturbidimetrično metodo na analizatorju ADVIA® 1800 proizvajalca Siemens (Slika 5).

3.2.1 NAMEN IN PODROČJE UPORABE

Koncentracija CRP je pomembna za diagnozo, terapijo, spremljanje bolezni in uspešnost operativnih posegov. Zvišane vrednosti niso specifične, zato se lahko interpretirajo le ob drugih ustreznih preiskavah in klinični sliki. Pomaga nam ločiti virusno okužbo od bakterijske.

3.2.2 REAGENTI, KALIBRATORJI, KONTROLE

Uporabili smo reagente in kalibratorje proizvajalca Siemens. Kontrole pa od proizvajalca Biorad.

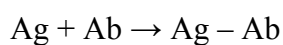
Reagenti na analizatorju so v dveh hlajenih krožnikih v plastičnih reagenčnih posodicah (Tabela 6).

Tabela 6: Reagenti

REAGENTI, PRIBOR	PROIZVAJALEC
CRP 2	Siemens
CRP-2 Calibrator	Siemens
Lypho.Immunol. plus L1,L2	Bio Rad

3.2.3 PRINCIP METODE

- ADVIA® 1800 proizvajalca Siemens
- Imunoturbidimetrična metoda s polietilen glikolom (PEG)



Specifična anti-serum protitelesa reagirajo z antigenom iz vzorca in tvorijo antigen-protitelo kompleks. Nastali kompleks merimo turbodimetrično pri 340/694 nm.

Interference:

- Ikterični vzorci ($> 274 \mu\text{mol/l}$),
- hemoliza ($> 2,50 \text{ g/l}$),
- lipemija ($> 0,74 \text{ mmol/l}$).

Stabilnost vzorca:

- 11 dni pri $15 - 25^\circ \text{C}$,
- 2 meseca pri $4 - 8^\circ \text{C}$,
- 3 leta pri -15 do -25°C

Vzorec: serum (23).

3.2.3.1 INŠTRUMENTI IN OPREMA

Za določanje koncentracije CRP v serumu smo uporabili biokemični analizator ADVIA[®] 1800.

Analizator ADVIA[®] 1800 je v laboratoriju namenjen določanju elektrolitov, encimov in metabolitov v serumu, plazmi, urinu ali likvorju, z namenom pridobiti podatke za postavitev diagnoze, zdravljenje in preprečevanje bolezni pri bolnikih ali zdravih posameznikih.

Analizator ADVIA[®] 1800 je popolnoma selektiven avtomatiziran sistem namenjen za običajno in prednostno analizo bioloških vzorcev. Analizator opravlja analize iz vzorcev, ki jih pipetira iz avtomatiziranega laboratorijskega sistema ali pa iz svojega krožnika za vzorce. Analizator je priključen na informacijski vmesnik Centralink, s katerim izmenjuje podatke v zvezi z naročilom analiz in nato s pošiljanjem rezultatov. Analizator opravlja meritve elektrolitov (natrij, kalij, klorid) z metodo indirektna potenciometrije in meri po spektrofotometričnem principu vse ostale teste.

V spektrofotometričnem delu lahko določamo več vrst kolorimetričnih testov: z detekcijo končne točke absorbance, kinetičnih kolorimetričnih testov ali dvotočkovne kinetične reakcije. Igla, ki pipetira vzorec iz ALS ali iz krožnika za vzorce v dilucijski krožnik, ima senzorje, ki zaznajo premajhen volumen vzorca, strdek v vzorcu ali trdo površino (npr. zamašek na epruveti). V dilucijskem krožniku se vzorec razredči s fiziološko raztopino. Reakcijski krožnik z 221 merilnimi kivetami je osrednji del analizatorja in je termostatiran v posebni oljni kopeli na 37°C , kjer potekajo fotometrične meritve. V eno merilno kiveto se napipetira najprej reagent 1 iz reagentnega krožnika 1. Krožnik se obrne za pol obrata in v

merilno kiveto igla doda razredčen vzorec. Merilna kiveta se premakne pod mešalec, ki reakcijsko zmes premeša. Spektrofotometer pa nato glede na vrsto testa odčitava absorbanco vsakih 6 sekund v odvisnosti od vrste testa pri eni od 14 različnih valovnih dolžin od 340 nm do 884 nm. Izvor svetlobe je 12V halogenska žarnica. V primeru, da je v merilno kiveto potrebno po določenem času inkubacije dodati še reagent iz reagent krožnika 2, se reakcijski krožnik premakne na mesto za dodajanje reagenta 2. Nova reakcijska zmes pa se znova premeša.

Po vseh končanih odčitkih absorbance se kiveta spere z vodo in kondicionerjem kivet, kontrolira se njena slepa vrednost in kiveta je pripravljena za nov test. Analizator ima možnost avtomatične ponovitve analize v primeru izmerjenih koncentracij izven linearnega območja analizatorja, prav tako pa ima tudi možnost meritve serumskih indeksov (hemoliza, lipemičnost, ikteričnost) (24).



Slika 5: Analizator ADVIA[®] 1800 (25)

3.2.5 PODAJANJE REZULTATOV

Linearno območje: 5 – 205 mg/l,

Orientacijske referenčna vrednosti za odrasle:

•serum: do 5 mg/l (23).

3.3 DOLOČANJE KONCENTRACIJE PROKALCITONINA (PCT)

Določili smo koncentracijo PCT v serumu bolnikov na analizatorju Cobas e 411 (Slika 6) proizvajalca Roche, ki uporablja princip dvojnega sendviča s kemiluminiscenco.

3.3.1. NAMEN IN PODROČJE UPORABE

Prokalcitonin (PCT) je namenjen ugotavljanju sistemskih bakterijskih okužb in spremljanju terapije na intenzivnih enotah pri bolnikih s sepsa.

3.3.2 REAGENTI, KALIBRATORJI, KONTROLE

Primarni reagent sestoji iz treh ločenih faz:

M: Mikrodelci prevlečeni s streptavidinom v konzervansu (6,5 ml; 0,72 mg/ml).

R1: Proti PCT protitelo označeno z biotinom; 9 ml (Z biotinom označena monoklonalna proti PCT označena mišja protitelesa (2,0 µg/ml)) v fosfatnem pufru (95 mmol/l, pH 7,5) in v konzervansu.

R2: Proti PCT protitelo označeno z rutenijem (9 ml).

Monoklonalna proti PCT usmerjena mišja protitelesa, ki so označena z rutenijevim kompleksom v koncentraciji 5,6 µg/ml; fosfatni pufer 95 mmol/L, pH 7,5 v konzervansu.

Cal 1: PCT kalibrator 1 (beli pokrov), 1 flaška (liofiliziran) za 4 ml:

Rekombinantni PCT, približno 0,10 ng/ml v humanem serumu in konzervansu.

Cal 2: PCT kalibrator 2 (črn pokrov), 1 flaška (liofiliziran) za 4 ml:

Rekombinantni PCT približno 54 ng/ml v humanem serumu in konzervansu.

PC PCT 1: Preci kontrola PCT1 (siv pokrov) (liofiliziran) za 4 ml:

Rekombinantni PCT približno 0,50 ng/ml v humanem serumu in konzervansu.

PC PCT 2: Preci kontrola PCT2 (rjav pokrov) (liofiliziran) za 4 ml:

Rekombinantni PCT približno 10 ng/ml v humanem serumu in konzervansu.

3.3.3. PRINCIP METODE

Cobas e 411 (Slika 6) uporablja princip dvojnega sendviča s kemiluminiscenco, pri čemer uporablja dve vrsti poliklonalnih protiteles, ki prepoznavata epitope na N terminalnem delu (1-76) pro BNP molekule (1-108).

Čas analiza je 18 minut do izdaje rezultata.

Analizator avtomatsko izvede naslednje korake :

- aspiracija 30 µl seruma (vzorca) in dodajanje reagenta, v katerem so monoklonalna proti PCT specifično usmerjena protitelesa označena z biotinom, druga vrsta monoklonalnih protiteles so označena z rutenijem. Sledi inkubacija pri 37°C, v kateri pride do tvorjenja sendvič kompleksa.
- druga inkubacija: po dodatku mikrodelcev, ki so prevlečenih streptavidinom, pride do povezave v trdne komplekse preko povezave biotin-streptavidin.
- reakcijsko mešanico analizator aspirira v merilno calico, kjer se mikrodelci fiksirajo na površino elektrode zaradi magnetne privlačnosti.
- ne vezani delci v trdne komplekse se sperejo s ProCell-om.

Aplikacija napetosti v elektrodi sproži kemiluminiscentno reakcijo, katere oddano svetlobo detektira fotomultipiler.

Kalibracijo izvedemo pri vsaki novi serijski številki reagenta.

RLU signal je premosorazmeren koncentraciji analita in je izračunan iz kalibracijske krivulje, ki jo dobimo iz dvotočkovne kalibracije in master krivulje, ki je podana pri vsaki novi serijski številki reagenta (26).



Slika 6: Analizator Cobas e 411 (27)

3.3.4 PODAJANJE REZULTATOV

Positiven rezultat je pri vrednosti PCT nad $0,50 \mu\text{g/l}$ (26).

3.4 STATISTIČNA ANALIZA

Za analizo pridobljenih podatkov smo uporabili računalniški statistični program MedCalc[®] za Windows. Izračunali smo povprečno vrednost, mediano, standardni odklon, korelacijo ter narisali krivuljo občutljivosti in specifičnosti (ROC).

Izračunali smo tudi občutljivost in specifičnost za preiskovance z virusnim in za preiskovance z bakterijskim vnetjem.

4. REZULTATI

Vsem preiskovancem smo izmerili CRP in PCT ter izračunali povprečne koncentracije, mediano in standardni odklon.

Zbrani rezultati so prikazani v Tabelah 7-9.

Povprečna vrednost je definirana kot kvocient med vsoto vseh meritev in številom meritev.

Tabela 7: Prikaz povprečnih koncentracij za posamezno skupino

	SKUPINA Z VIRUSNIM VNETJEM	SKUPINA Z BAKTERIJSKIM VNETJEM	KONTROLNA SKUPINA
CRP (mg/l)	47,98214	191,4038	3,15
PCT (µg/l)	3,600357	8,604103	0,1085

Mediana (srednja vrednost) je sredinsko število iz skupine

Tabela 8: Prikaz median vrednosti za posamezno skupino

	SKUPINA Z VIRUSNIM VNETJEM	SKUPINA Z BAKTERIJSKIM VNETJEM	KONTROLNA SKUPINA
CRP (mg/l)	51,500	168,000	3
PCT (µg/l)	0,185	2,210	0,0600

Standardni odklon je definiran je kot kvadratni koren variance, s čimer je v vsakem primeru dosežena pozitivna vrednost kazalca.

Tabela 9: Prikaz standardnega odklona za posamezno skupino

	STANDARDNI ODKLON	
	PCT	CRP
KONTROLNA SKUPINA	0,153461	0,48936
VIRUSNA SKUPINA	9,565012	20,42591
BAKTERIJSKA SKUPINA	17,65904	92,16281

V skupini zdravih preiskovancev so vrednosti CRP znašale od 3 do 5 mg/l s povprečno vrednostjo 3,15 mg/l, standardnim odklonom 0,48 in mediano 3 mg/l.

PCT pri zdravih preiskovancih pa je bil od 0,02 do 0,7 µg/l s povprečno vrednostjo 0,1085µg/l, standardnim odklonom 0,15 in mediano 0,06 µg/l.

V skupini preiskovancev z virusnim vnetjem so bile vrednosti CRP med 10,0 in 78,0 mg/l s povprečno vrednostjo 47,98 mg/l, standardnim odklonom 20,43 in mediano 51,5 mg/l.

Vrednosti PCT preiskovancev z virusnim vnetjem so znašale od 0,02 do 42,68 µg/l, povprečna vrednost je bila 3,6 µg/l, standardni odklon 9,57 in mediana 0,185 µg/l.

V skupini preiskovancev z bakterijskim vnetjem so bile vrednosti CRP med 81,0 in 543,0 mg/l s povprečno vrednostjo 191,4 mg/l, standardnim odklonom 92,16 in mediano 168,0 mg/l. PCT pri preiskovancih z bakterijskem vnetju je znašal od 0,04 do 121,45 µg/l s povprečno vrednostjo 8,60 µg/l, standardnim odklonom 17,66 in mediano 2,21 µg/l.

Višje vrednosti smo dobili pri preiskovancih z bakterijskim vnetjem, nižje v skupini z virusnim vnetjem in najnižje v kontrolni skupini.

4.1 REZULTATI LABORATORIJSKIH PREISKAV

Rezultati so zbrani v Tabeli 10 in 11.

Tabela 10: Število preiskovancev z normalnimi in zvišanimi vrednostmi PCT pri virusnem in bakterijskem vnetju

	ŠTEVILO PREISKOVANCEV Z VIRUSNIM VNETJEM	ŠTEVILO PREISKOVANCEV Z BAKTERIJSKIM VNETJEM
V okvirju referenčnih vrednosti	39	38
Zvišane vrednosti	17	118
SKUPAJ	56	156

Povišane vrednosti PCT so bile pri 118 preiskovancih z bakterijskim vnetjem, 38 pa jih je bilo v okvirju referenčnih vrednosti (pod 0,5 µg/l), medtem ko smo pri preiskovancih z virusnim vnetjem zasledili 17povišanih vrednosti in 39 v okvirju referenčnih vrednosti.

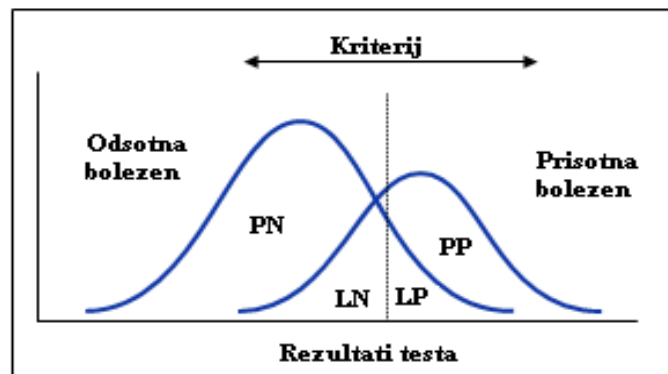
Tabela 11: Število preiskovancev z zvišanimi in normalnimi vrednostmi CRP in PCT v kontrolni skupini

	PCT	CRP
V okvirju referenčnih vrednosti	19	18
Zvišane vrednosti	1	2
SKUPAJ	20	20

Kontrolno skupino sestavljajo preiskovanci, za katere je bilo ugotovljeno da nimajo vnetja, morebiten vzrok povišanega PCT ali CRP pa je drugje (na primer: ateroskleroza, maligna obolenja). Ugotovili smo, da ima 1 preiskovanec zvišan PTC in 2 preiskovanca zvišan CRP.

4.2 OBČUTLJIVOST IN SPECIFIČNOST

Diagnostična specifičnost in občutljivost sta merilo točnosti (28). Obstaja več izrazov, ki se pogosto uporabljajo skupaj z opisom specifičnosti in občutljivosti. To so: pravilno pozitivno (PP), pravilno negativno (PN), lažno negativno (LN) in lažno pozitivno (LP). Če se dokaže prisotnost bolezni pri bolniku in dani diagnostični test tudi potrdi sum na prisotno bolezen, rezultat testa štejemo kot pravilno pozitivnega (PP). Podobno, če dokažemo odsotnost bolezni, diagnostični test pa prav tako potrdi odsotnost bolezni, rezultat štejemo kot pravilno negativnega (PN). Vendar pa žal diagnostični testi niso popolni. Če diagnostični test pokaže prisotnost bolezni pri bolniku, ki v resnici nima prisotne bolezni, je rezultat testa napačen, torej lažno pozitiven (LP). Podobno velja, če diagnostični test pokaže odsotnost bolezni pri bolniku, ki ima v resnici prisotno bolezen je rezultat testa lažno negativni (LN). Lažno negativni in lažno pozitivni rezultati kažejo, da so rezultati testa v nasprotju z dejanskim stanjem (29). Slika 7 prikazuje izide diagnostičnih testov.



Slika 7: Izid diagnostičnih testov (30)

Diagnostična občutljivost (ang. sensitivity) je sposobnost testa za ugotavljanje prisotnosti bolezni. Predstavlja del oseb, ki jih je prizadela bolezen in imajo resnično pozitivne rezultate.

Diagnostična specifičnost (ang. specificity) je sposobnost testa za prepoznavanje odsotnosti bolezni. Predstavlja delež oseb, ki imajo resnično negativne izvide (28).

Občutljivost in specifičnost prikazujeta spodnji enačbi:

$$\text{OBČUTLJIVOST (\%)} = \frac{\text{PRAVILNO POZITIVNO}}{\text{PRAVILNO POZITIVNO} + \text{LAŽNO NEGATIVNO}} \times 100$$

$$\text{SPECIFIČNOST (\%)} = \frac{\text{PRAVILNO NEGATIVNO}}{\text{PRAVILNO NEGATIVNO} + \text{LAŽNO POZITIVNO}} \times 100$$

Izračun specifičnosti in občutljivosti za preiskovance z virusno okužbo:

$$\text{Specifičnost (PCT)} = \text{PN}/\text{PN}+\text{LP} * 100 = 19 / 19 + 1 * 100 = \mathbf{95 \%}$$

$$\text{Občutljivost (PCT)} = \text{PP}/\text{PP}+\text{LN} * 100 = 17 / 17 + 39 * 100 = \mathbf{30,35 \%}$$

$$\text{Specifičnost (CRP)} = \text{PN}/\text{PN}+\text{LP} * 100 = 18 / 18 + 2 * 100 = \mathbf{90 \%}$$

$$\text{Občutljivost (CRP)} = \text{PP}/\text{PP}+\text{LN} * 100 = 56 / 56 + 0 * 100 = \mathbf{100 \%}$$

Izračun je pokazal, da je občutljivost PCT pri 17 pravilno pozitivnih in 39 lažno negativnih rezultatih 30,35%. Specifičnost pa je bila 95 %.

Občutljivost CRP pa je pri 56 pravilno pozitivnih rezultatih in nobenem lažno negativnem 100 %, specifičnost pa 90 %.

Izračun občutljivosti in specifičnosti za preiskovance z bakterijsko okužbo :

$$\text{Specifičnost (PCT)} = \text{PN} / (\text{PN} + \text{LP}) * 100 = 19 / (19 + 1) * 100 = \mathbf{95 \%}$$

$$\text{Občutljivost (PCT)} = \text{PP} / (\text{PP} + \text{LN}) * 100 = 118 / (118 + 38) * 100 = \mathbf{75,64 \%}$$

$$\text{Specifičnost (CRP)} = \text{PN} / (\text{PN} + \text{LP}) * 100 = 18 / (18 + 2) * 100 = \mathbf{90 \%}$$

$$\text{Občutljivost (CRP)} = \text{PP} / (\text{PP} + \text{LN}) * 100 = 156 / (156 + 0) * 100 = \mathbf{100 \%}$$

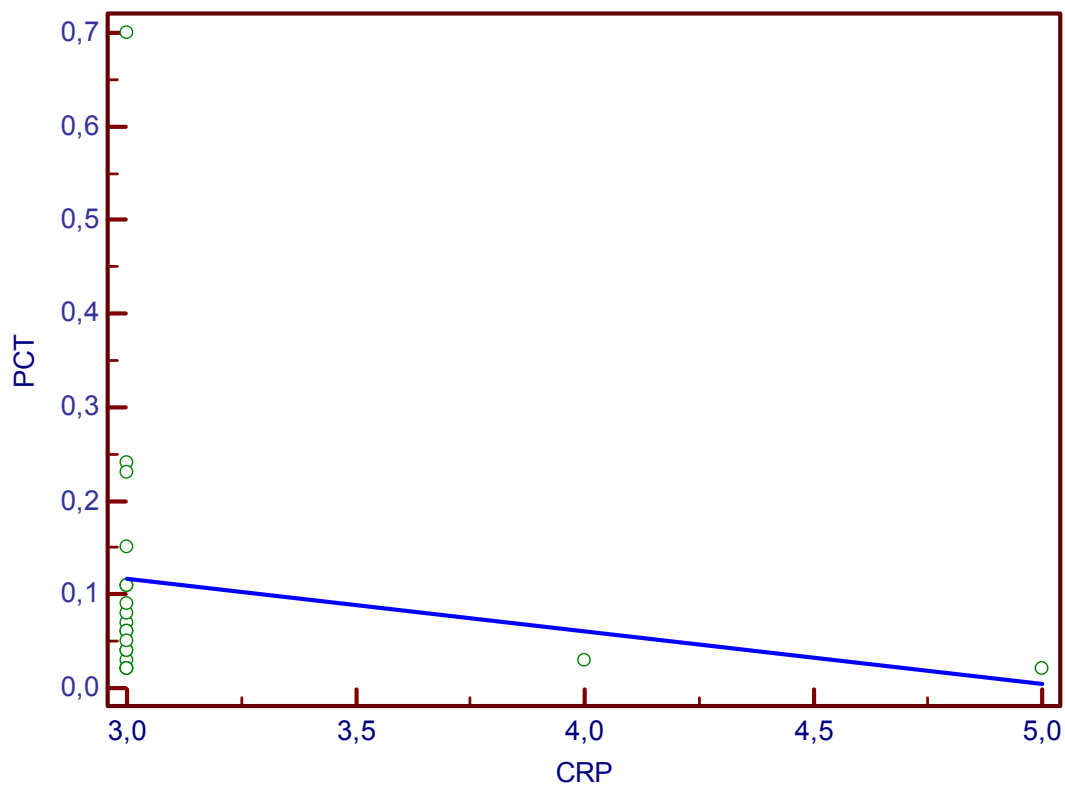
Občutljivost PCT pri bakterijskem vnetju je pri 118 pravilno pozitivnih rezultatih in 38 lažno negativnih rezultatih 75,64 %, specifičnost pa 95 %.

Občutljivost CRP pri bakterijskem vnetju je pri 156 pravilno pozitivnih rezultatih in brez lažno negativnih rezultatih 100 %, specifičnost pa 90%.

4.3 KORELACIJA MED PCT in CRP

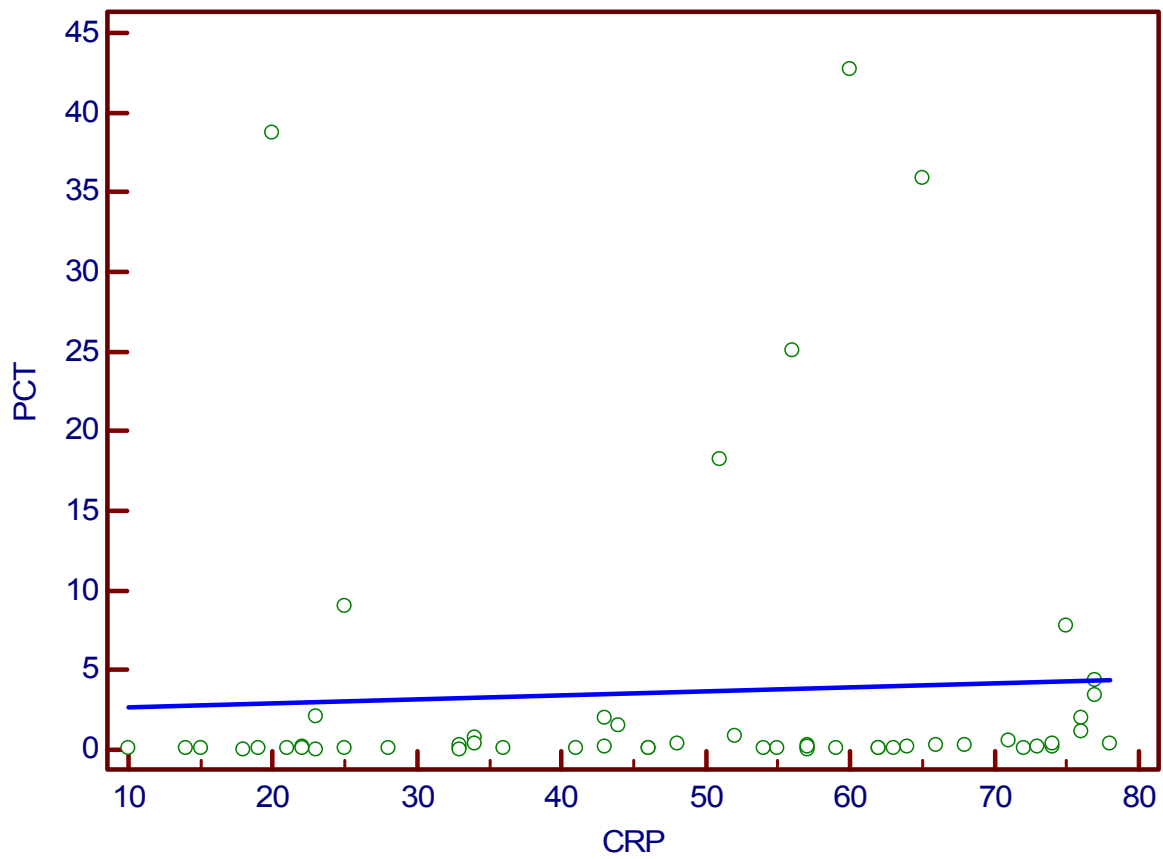
Ovrednotili smo korelacijo med CRP in PCT. Rezultati so prikazani na Slikah 8-10.

Prikaz korelacije med PCT in CRP pri zdravih, korelacija $r = -0,179$.



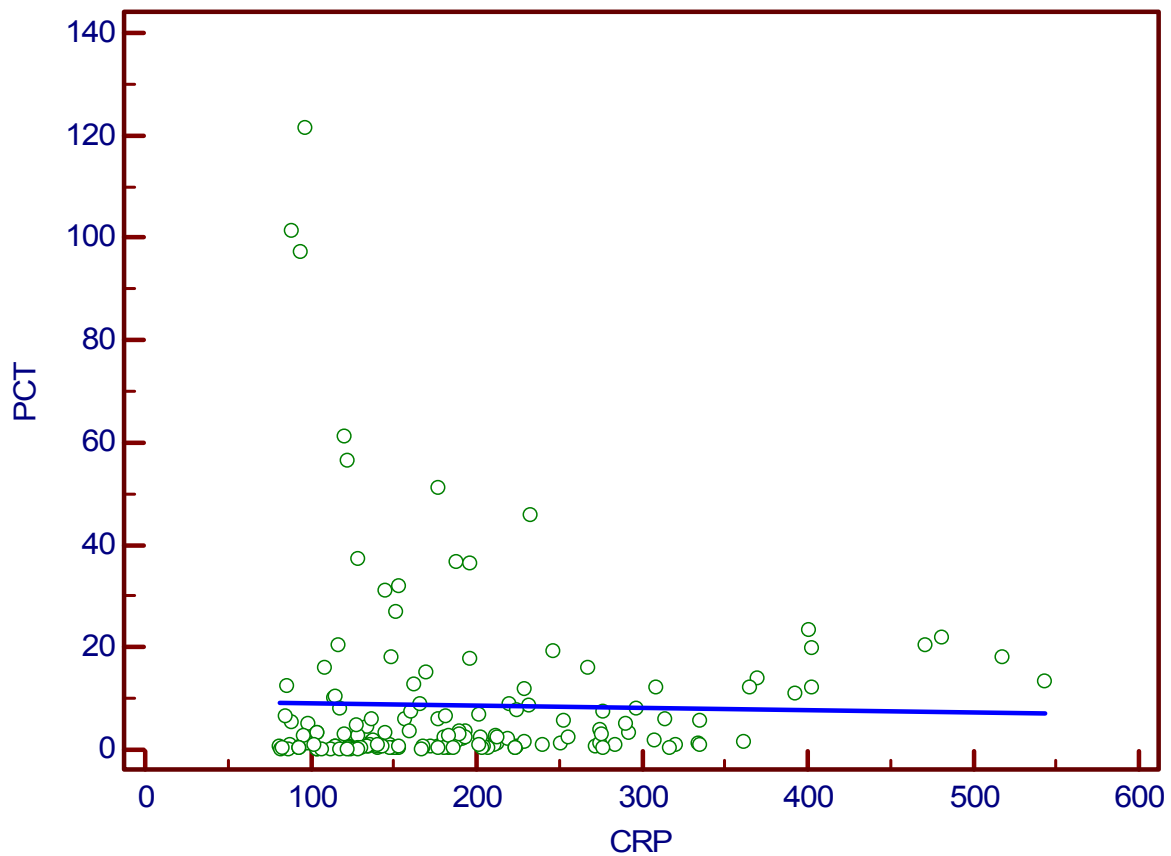
Slika 8: Prikaz korelacije med PCT in CRP brez vnetja

Prikaz korelacije med PCT in CRP pri pacientih z virusnim vnetjem, korelacija $r = 0,053$.



Slika 9: Prikaz korelacije med PCT in CRP pri virusnem vnetju

Prikaz korelacije med PCT in CRP pri pacientih z bakterijskim vnetjem, korelacija $r = -0,022$.



Slika 10: Prikaz korelacije med PCT in CRP pri bakterijskem vnetju

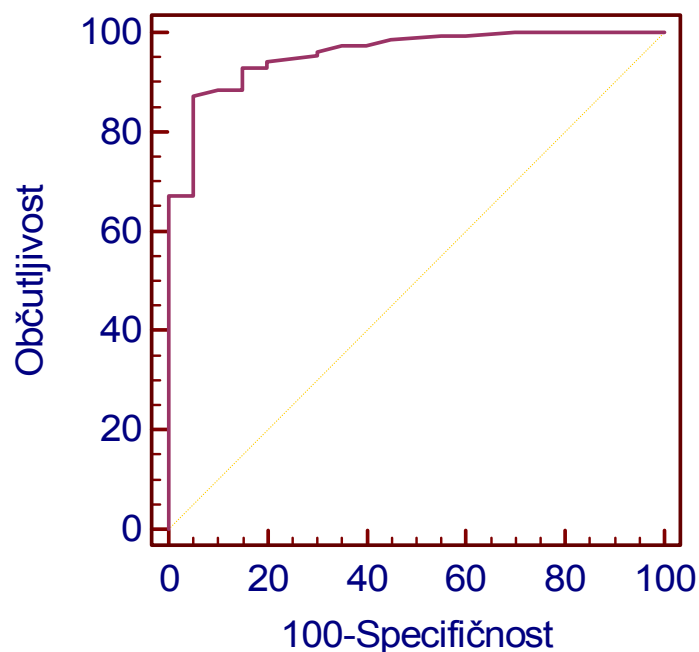
Iz diagrama in nizkih korelacijskih koeficientov vidimo, da med PCT in CRP ni korelacije. To pomeni, da za ugotavljanje vnetja potrebujemo oba parametra. Če bi bila korelacija dobra, bi bilo potrebno določiti le enega.

4.4 ROC-KRIVULJA

Sposobnost testa za razlikovanje bolnih preiskovancev od zdravih ocenimo s pomočjo Receiver Operating Characteristic (ROC) krivulje. ROC krivulja se lahko uporablja tudi za primerjavo diagnostične učinkovitosti dveh ali več laboratorijskih ali diagnostičnih testov (30).

Na vertikalni (Y) osi se nahaja občutljivost, oziroma resnično pozitivni rezultati, na horizontalni (X) osi, pa lažno pozitivni rezultati oziroma 100-specifičnost. Lažno pozitivni rezultati predstavljajo del resnično neokuženih oseb, ki pa imajo pozitivne rezultate preizkusa, in so merilo specifičnosti. Test z dobro klinično zmogljivostjo dosega veliko resnično pozitivnih rezultatov (občutljivost) in majhno število lažno pozitivnih rezultatov (visoka specifičnost). Pri testih z visoko diagnostično točnostjo se krivulja približa levemu zgornjemu kotu, kjer imamo veliko število resnično pozitivnih rezultatov in majhno število lažno pozitivnih rezultatov. Bližje kot je krivulja zgornjemu levemu kotu, večja je točnost testa. Tako lahko vizualno ocenimo diagnostično točnost testa in primerjamo različne teste med seboj (28).

S pomočjo ROC krivulje lahko izberemo najbolj ustrezno mejno vrednost, s katero bi dobili najboljšo diagnostično občutljivost ob čim višji diagnostični specifičnosti. Rezultati so prikazani na Slikah 11–14 in Tabelah 12–5.



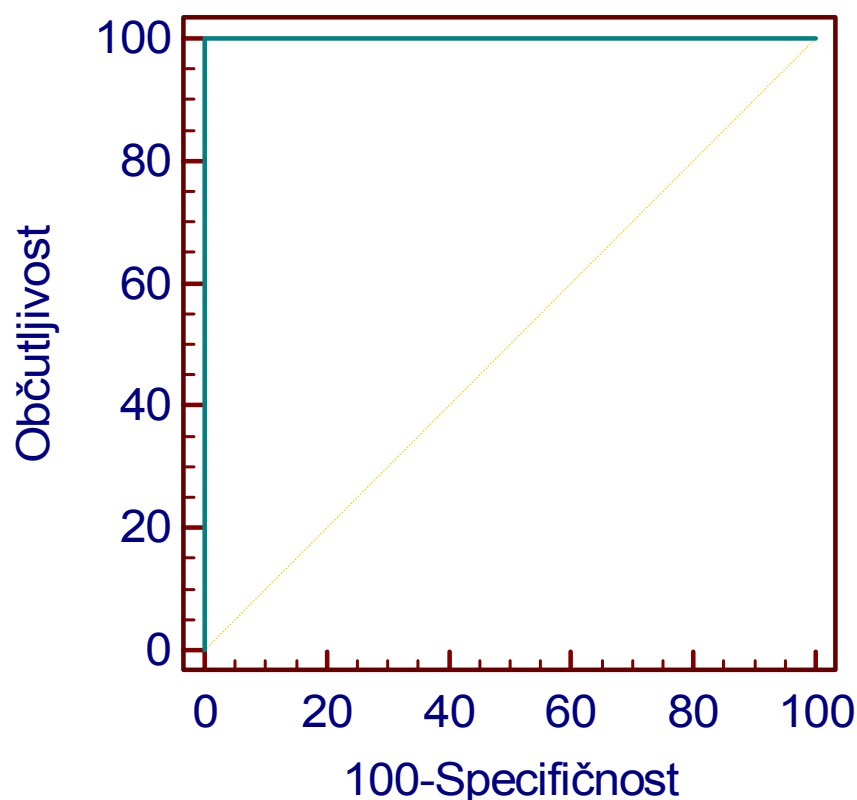
Slika 11: ROC krivulja za parameter PCT pri preiskovancih z bakterijskim vnetjem

Tabela 12: Diagnostična občutljivost in specifičnost glede na posamezno mejno vrednost pri bakterijski PTC

MEJNA VREDNOST ($\mu\text{g/l}$)	OBČUTLJIVOST (%)	SPECIFIČNOST (%)
$\geq 0,02$	100,00	0,00
$> 0,03$	100,00	30,00
$> 0,04$	99,36	40,00
$> 0,05$	99,36	45,00
$> 0,06$	98,72	55,00
$> 0,07$	97,44	60,00
$> 0,08$	97,44	65,00
$> 0,09$	96,15	70,00
$> 0,1$	95,51	70,00
$> 0,11$	94,23	80,00
$> 0,14$	92,95	80,00
$> 0,15$	92,95	85,00
$> 0,22$	88,46	85,00

>0,23	88,46	90,00
>0,24	87,18	95,00
>0,66	67,31	95,00
>0,7	67,31	100,00
>121,45	0,00	100,00

Odločili smo se za mejno vrednost 0,24 $\mu\text{g/l}$ saj je tu najboljša občutljivost in specifičnost testa

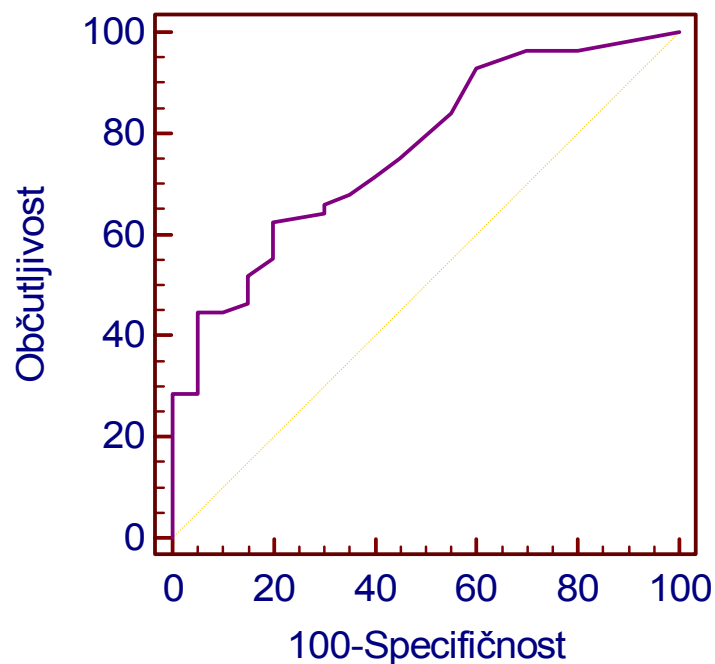


Slika 12: ROC krivulja za parameter CRP pri preiskovancih z bakterijskim vnetjem.

Tabela 13: : Diagnostična občutljivost in specifičnost glede na posamezno mejno vrednost pri bakterijski CRP

MEJNA VREDNOST (mg/L)	OBČUTLJIVOST (%)	SPECIFIČNOST (%)
≥ 3	100,00	0,00
>5	100,00	100,00
>543	0,00	100,00

Pri mejni vrednosti 5 mg/l je občutljivost in specifičnost testa 100%.

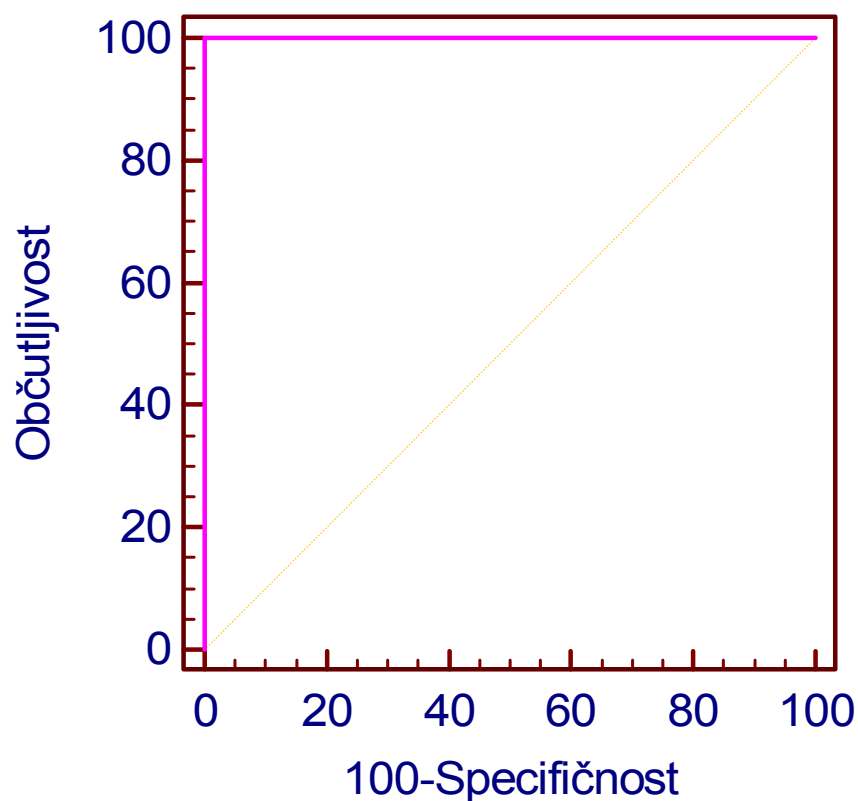


Slika 13: ROC krivulja za parameter PCT pri preiskovancih z virusnim vnetjem.

Tabela 14: : Diagnostična občutljivost in specifičnost glede na posamezno mejno vrednost pri virusnem PTC

MEJNA VREDNOST ($\mu\text{g/l}$)	OBČUTLJIVOST (%)	SPECIFIČNOST (%)
$\geq 0,02$	100,00	0,00
$> 0,02$	96,43	20,00
$> 0,03$	96,43	30,00
$> 0,04$	92,86	40,00
$> 0,05$	83,93	45,00
$> 0,06$	75,00	55,00
$> 0,07$	71,43	60,00
$> 0,08$	67,86	65,00
$> 0,09$	66,07	70,00
$> 0,1$	64,29	70,00
$> 0,11$	62,50	80,00
$> 0,14$	55,36	80,00
$> 0,15$	51,79	85,00
$> 0,2$	46,43	85,00
$> 0,23$	44,64	90,00
$> 0,24$	44,64	95,00
$> 0,7$	28,57	100,00
$> 42,68$	0,00	100,00

Odločili smo se za mejno vrednost 0,11 $\mu\text{g/l}$ saj je tu najboljša občutljivost in specifičnost testa.



Slika 14: ROC krivulja za parameter CRP pri preiskovancih z virusnim vnetjem.

Tabela 15: : Diagnostična občutljivost in specifičnost glede na posamezno mejno vrednost pri virusnem CRP

MEJNA VREDNOST (mg/l)	OBČUTLJIVOST (%)	SPECIFIČNOST (%)
≥ 3	100,00	0,00
>5	100,00	100,00
>78	0,00	100,00

Pri mejni vrednosti 5 mg/l je občutljivost in specifičnost testa 100%.

Površina pod krivuljo (AUC) nam pove zmožnost testa, da daje pravilne rezultate. Večja kot je AUC, bolj je uporaben test. Rezultate smo interpretirali glede na dane kriterije in sicer:

0,90 - 1 = izvrsten test

0,80 - 0,90 = dober test

0,70 - 0,80 = srednje dober test

0,60 - 0,70 = slabši test (29).

Rezultate smo prikazali v Tabeli 16.

Tabela 16: Površina pod krivuljo

	POVRŠINA POD KRIVULJO	STANDARDNA NAPAKA	95% INTERVAL ZAUPANJA
PCT-bakterijska	0,958	0,0189	0,916 do 0,982
CRP-bakterijska	1,000	0	0,979 do 1,000
PCT-virusna	0,766	0,0588	0,654 do 0,855
CRP-virusna	1,000	0	0,953 do 1,000

Največjo površino pod krivuljo zavzema parameter CRP tako pri preiskovancih z virusnim kot bakterijskim vnetjem. AUC parametra PCT pri preiskovancih z bakterijskim vnetjem je 0,95, medtem ko AUC parametra PCT pri pacientih z virusnim vnetjem znaša 0,76.

5. RAZPRAVA

Vnetje je zapleten odziv ožiljenega tkiva na poškodbo ali draženje zaradi delovanja škodljivih dejavnikov, ki povzročijo oteklino, rdečino, bolečino, kot najvidnejši znak tega procesa. Namen vnetja je odstraniti ali uničiti škodljivi dejavnik ali vsaj preprečiti njegovo širjenje (1). Pri ugotavljanje vnetja spremljamo parametre, kot so; bela krvna slika, sedimentacija eritrocitov in proteine akutne faze (CRP in PCT). V razpravi bomo primerjali vnetna označevalca CRP in PCT.

Pri skupini preiskovancev iz Univerzitetnega kliničnega centra smo primerjali koncentracije prokalcitonina in C-reaktivni proteina. Analiza je zajemala 212 preiskovancev, ki smo jih grobo razdelili glede na vrednosti CRP v serumu. Paciente z vrednostjo CRP < 80 mg/l smo opredelili kot preiskovance z virusnim vnetjem, z vrednostjo CRP > 80 mg/l pa preiskovance z bakterijskim vnetjem. Skupina preiskovancev z bakterijskim vnetjem je tako zajemala 156 preiskovancev, skupina preiskovancev z virusnim vnetjem pa 56 preiskovancev.

Za posamezno skupino preiskovancev smo izračunali srednjo vrednost, standardni odklon in mediano za oba dejavnika. Povprečna vrednost PCT pri skupini z virusno okužbo je znašala 3,6 µg/l (SD =9,56), mediana 0,185 µg/l; CRP pa 47,98 mg/l (SD =20,42), mediana 51,5 mg/l. Povprečna vrednost PCT pri preiskovancih z bakterijskim vnetjem je znašala 8,6 µg/l (SD =17,65), mediana 2,21 µg/l; CRP pa 191,98 mg/l (SD =92,16), mediana 168 mg/l.

Višje vrednosti smo dobili, po pričakovanjih, za oba dejavnika, pri preiskovancih z bakterijskim vnetjem.

Ugotovili smo, da so vse vrednosti CRP pri preiskovancih z bakterijskim in virusnim vnetjem presegle referenčne vrednosti (CRP <3 mg/l), medtem ko smo pri preiskovancih z virusnim vnetjem določili 30 % vseh vzorcev, ki so vsebovali PTC nad referenčno vrednostjo (PTC < 0,50 µg/l), pri pacientih z bakterijskim vnetjem pa je imelo PTC nad referenčno vrednostjo 76 % preiskovancev.

Izračunali smo diagnostično specifičnost in diagnostično občutljivost za posamezno skupino pacientov z virusnim in bakterijskim vnetjem. 100 % diagnostično specifičnost in 100 % diagnostična občutljivost bi pomenila popolno razlikovanje zdravih pacientov od bolnih

pacientov. Ker pa žal vedno ne moremo doseči teh rezultatov, je zaželeno da imamo čim višjo diagnostično občutljivost in specifičnost.

Izračunali smo 100 % občutljivost CRP pri pacientih z virusnim in bakterijskim vnetjem, kar pomeni, da je koncentracija CRP-ja povišana pri vseh bolnikih tako z virusnim kot bakterijskim vnetjem, specifičnost CRP pa je 90 %.

Občutljivost PCT se razlikuje glede na to ali gre za virusno ali bakterijsko vnetje. Občutljivost PCT pri preiskovancih z virusnim vnetjem je 30,35 %, občutljivost pri preiskovancih z bakterijskim vnetjem pa je 75,64 %. Specifičnost PCT pa je 95 %. Iz tega lahko sklepamo, da je PCT boljši pokazatelj bakterijskega vnetja, kot pa virusnega, saj ima večjo diagnostično občutljivost.

V študiji, ki so jo opravili v Splošni bolnišnici Celje, so primerjali parametra PCT in CRP ter prišli, do ugotovitve, da je PCT zanesljiv kazalec akutne bakterijske okužbe in bolj specifičen kazalec bakterijskega vnetja kot CRP (18).

V še eni raziskavi, ki je bila opravljena na Kliniki za infekcijske bolezni in vročinska stanja v Ljubljani, so ugotavljali pomen CRP-ja in levkocitov za razlikovanje bakterijske in virusne okužbe pri otrocih. Ugotovili so, da jasne meje med virusnim in bakterijskim vnetjem ni mogoče določiti, za njuno razlikovanje pa je potrebno istočasno določanje vrednosti CRP, levkocitov in spremljanje klinične slike bolezni (14).

Želeli smo ugotoviti, katere mejne vrednosti (cut-off value) bi bilo potrebno uporabiti, da bi dosegli kar največjo možno občutljivost in specifičnost. Pri tem smo si pomagali s krivuljo občutljivosti in specifičnosti (krivulja ROC). Ugotovili smo, da bi bila najboljša mejna vrednosti za ugotavljanje virusnega in bakterijskega vnetja 5 mg/l, pri tem bi dosegli 100 % občutljivost in 100 % specifičnost. Najboljša mejna vrednost PCT pri pacientih z virusnim vnetjem bi bila 0,11 µg/l, saj bi bila občutljivost PCT 62,5 % in specifičnost 80 %. Pri pacientih z bakterijskim vnetjem pa bi bila najboljša mejna vrednost PCT pri 0,24 µg/l, pri tem pa bi dosegli 87,18 % občutljivost in 95 % specifičnost.

Diagnostično zanesljivost smo ocenili s pomočjo površine pod ROC krivuljo. Ugotovili smo, da imata CRP pri preiskovancih z virusnim in bakterijskim vnetje ter PCT pri preiskovancih z

bakterijskim vnetjem večjo površino pod krivuljo, kot pa PTC pri preiskovancih z virusnim vnetjem.

Korelacijski koeficient, ki predstavlja moč linearne povezave med dvema metodama, je pokazal, da med CRP in PCT ne obstaja korelacija. Če bi potrdili korelacijo, bi bilo za opredelitev vnetja potrebno določiti le en parameter.

Zaključimo lahko, da je za razlikovanje bakterijske od virusne okužbe najboljše istočasno določati CRP in PCT.

6. SKLEP

- Ugotovili smo, da ima več preiskovancev glede na razmejitveno vrednost CRP bakterijsko vnetje (156/212).
- Med CRP in PCT ni korelacije.
- PCT je boljši pokazatelj bakterijskega vnetja.
- Diagnostična specifičnost CRP-ja je bila 90 %, PCT-ja pa 95 %.
- Diagnostična občutljivost PCT pri preiskovancih z virusnim vnetjem je bila 30,35 %, z bakterijskim vnetjem pa 75,64 %. Diagnostična občutljivost parametra CRP pri preiskovancih z virusnim in bakterijskim vnetjem pa 100 %.
- Ugotovili smo, da je pri določanju CRP najboljša mejna vrednost 5 mg/l, saj je pri tej vrednosti občutljivost in specifičnost testa 100 %. Pri virusnem PCT je najboljša vrednost 11 µg/l saj je tu občutljivost testa 62,50 %, specifičnost pa 80 %. Pri bakterijskem PCT pa je najboljša mejna vrednost 0,24 µg/l, saj pri tej vrednosti test doseže 87,18 % občutljivost in 95 % specifičnost.
- Za razlikovanje bakterijske od virusne okužbe je najbolje istočasno določati CRP in PCT.

7. LITERATURA

1. Cerar A., Luzar B., Rott T., Zidar N.: Patologija, Komisija za založništvo in inštitut za patologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, 3. izdaja; Ljubljana 2006: 37-40
2. Vozelj M.: Temelji imunologije, 2. in 16. poglavje, DZS, d.d., 1. izdaja, Ljubljana 2000: 32-37, 343-348
3. Barovič V.: Patologija, patološka fiziologija in osnove interne medicine (učbenik za srednjo zdravstveno šolo), DZS, d. d., Ljubljana 2004: 31-37
4. Vozelj M.: Imunologija, enciklopedijski priročnik, 1. izdaja, DZS, d.d., 1996: 364-365
5. Pretnar J., Kralj J., Podgornik H., Pajič T., Žontar D.: Bolezni krvi in krvotvornih organov; Poglavje 12, Interna medicina; glavni urednik Kocjančič A., Mravelj F., 3. izdaja, Littera Picta, d.o.o., 2005: 1173-1195
6. Dr.med Dietlinde Burkhardt: Laboratorijski izvidi, Mavrica 1998: 26-31
7. Kuhar D.: SR po Westergreenu, delovno navodilo. Dostopno na: <http://www.zd-mb.si/fileadmin/Dokumenti/DokSluzbeZaLabDiagn/DelovnaNavodila/Preiskave/HematoloskePreiskave/3-DN-LAB-3-006-SrPoWestergreenu.pdf> (datum zadnjega ogleda strani: 22.6.2012)
8. <http://www.medicine.mcgill.ca/physio/vlab/bloodlab/esr.htm> (datum zadnjega ogleda strani 04.03.2013)
9. Turk R.: Disproteinemija i diagnostičko značenje proteina akutne faze. Dostopno na: http://www.vef.unizg.hr/org/pathphys/prezentacije/prezentacije_vjezbe/2_disproteinemije.pdf (datum zadnjega ogleda strani 24.6.2012)
10. <http://www.medizin.unikoeln.de/institute/kchemie/Diagnostik/Parameter/Daten/CRP.html> (datum zadnjega ogleda strani 04.03.2013)
11. Osredkar J., Poredoš P.: 51. Tavčarjevi dnevi, Zbornik prispevkov: C-reaktivni protein: Od odkritja do napovedovalca žilnih zapletov, november 2009: 157-164
12. Black S., Kushner I., Samols D.: C-reactive protein, The Journal of Biological Chemistry, 2004: 48487 – 48490, dostopno na: <http://www.jbc.org/content/279/47/48487.full.pdf+html> (datum zadnjega ogleda strani 24.6.2012)
13. Skalerič E.: Raven nekaterih kazalcev vnetja in inflamatornih citokinov v serumu bolnikov z parodontalno boleznijo, Med. Raz. 2004; 43: 1-17
14. Vidmar M., Tonin I., Čižman M.: Pomen C-reaktivnega proteina (CRP) v diagnostiki akutno nastale vročine brez žariščnih znakov bolezni pri otrocih, Med. Raz. 2007; 46: 111-118

15. C-reaktivni protein (CRP) v zdravniški praksi, dostopno na: http://www.dr-gorkic.si/pdf/CRP_konc.pdf (datum zadnjega ogleda strani 10.08.2012)
16. Jereb M., Derganc M., Kremžar B., Kitanovski L.: Prokalcitonin v klinični praksi; Onkologija, Ljubljana 2009; 2: 110-113
17. <http://www.procalcitonin.com> (datum zadnjega ogleda strani 10.08.2012)
18. Gabršček L., Vogla G., Krivec B., Skale R., Parežnik R., Podbregar M.: Pomen prokalcitonina pri prepoznavanju bakterijske okužbe, Zdrav Vestn 2001; 70: 5-11.
19. <http://www.aacc.org/publications/cln/2009/july/Pages/series0709.aspx#> (datum zadnjega ogleda strani 04.03.2013)
20. Jereb M., Strle F., Derganc M., Kremžar B., Stecher A., Skitek M., Kitanovski L.: Smernice za določanje prokalcitonina v urgentnih ambulantah ter na oddelkih kliničnega centra, Klinični center Ljubljana, Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo. Dostopno na: http://www.kikkb.si/smernice_za_dolocanje_pct.pdf (datum zadnjega ogleda strani 12.11.2012)
21. Novak Z.: 3 Černičevi dnevi, Zbornik prispevkov, Sepsa in septični šok po kirurških posegih-pogled infektologa, marec 2011, 67-70
22. Jereb M., Trampuž A.: Novosti v patogenezi in zdravljenju sepse, Zdrav Vestn 2005; 72: 675 - 680
23. SOP: Določanje koncentracije C-reaktivnega proteina
24. SOP: Navodila za delo na biokemičnem analizatorju ADVIA 1800
25. <http://www.medical.siemens.com> (datum zadnjega ogleda strani 07.03.2013)
26. SOP: Merjenje koncentracije prokalcitonina
27. <http://www.roche.sk> (datum zadnjega ogleda strani 07.03.2013)
28. NCCLS: Assessment of the Clinical Accuracy of Laboratory Tests Using Receiver Operating Characteristic (ROC) Plots; Approved Guideline. NCCLS document GP10-A (ISBN 1-56238-285-3). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087, 1995
29. Zhu W., Zeng N., Wang N.: Sensitivity, Specificity, Accuracy, Associated Confidence Interval and ROC Analysis with Practical SAS[®] Implementations, Health Care and Life Sciences, Nesung 2010. Dostopno na : <http://www.cpdm.ufpr.br/documentos/ROC.pdf> (datum zadnjega ogleda strani 22.11.2012)
30. MedCalc[®] statistic for biomedical reserch; software manual