



Neonatologie zaznamenala za poslední desetiletí obrovský pokrok, a to převážně v péči o předčasně narozené novorozence. Co však zůstává stále palčivým problémem a tématem mnoha výzkumných skupin, je novorozenecká seps. Péče o předčasně narozené novorozence se soustřeďuje do perinatologických center (v ČR 12), je to tedy okruh velmi úzký. Avšak se septickým novorozencem se setkává i lékař pracující na oddělení fyziologických novorozenců. V tomto článku uvádíme přehled běžně užívaných laboratorních markerů. Druhou část sdělení věnujeme novým možnostem diagnostiky sepse.

Možnosti laboratorní diagnostiky novorozenecké sepse

MUDr. ANNA BAŠTAN,¹ RNDr. JITKA PROŠKOVÁ²

¹ Dětská klinika Lékařské fakulty a Fakultní nemocnice Olomouc

² Oddělení klinické biochemie Fakultní nemocnice Olomouc

Úvod

Novorozeneckou sepsi dělíme na časnou, tzv. early-onset sepsis (EOS), a pozdní, tzv. late-onset sepsis (LOS). EOS je definována jako seps, která vznikla přestupem bakterií vertikálně z matky na dítě před porodem nebo během něj a objeví se do 72 hodin od porodu.

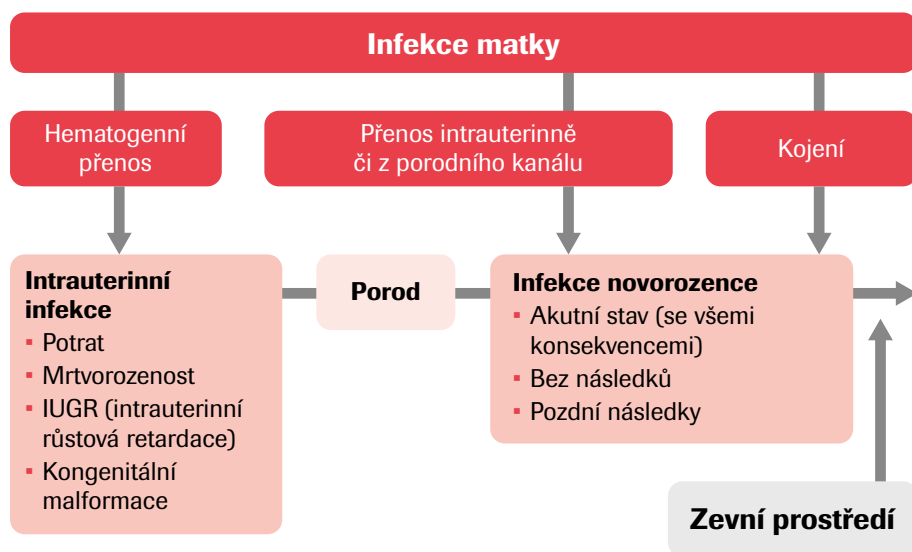
Naproti tomu pozdní sepsi definujeme jako sepsi vzniklou až po 72 hodinách života novorozence a je způsobena

patogeny získanými během porodu či častěji „díky“ pobytu dítěte v nemocnici.¹

Včasná diagnostika a zahájení terapie rozhodují zásadním způsobem o osudu dítěte. Novorozenecká seps je důležitou příčinou morbidit a mortality novorozenců.

Klasická definice sepse se opírá o výskyt klinických příznaků zánětlivé reakce organismu (SIRS) a průkaz patogenní bakterie v krevním vzorku (pozitivní hemokultura).

Interpretace výsledků je však komplikovaná (viz níže) a klinické příznaky zánětlivé reakce organismu jsou v novorozeneckém období nespecifické, proto je zapotřebí dalších laboratorních diagnostických nástrojů.



▲ Cesty přenosu kongenitálních infekcí a časné a pozdní novorozenecké sepse a jejich následky. Upraveno dle Vergnano S., Heath, P.T. Fetal and neonatal infections. *Medicine* 41(12). 723-729 (2013).



Laboratorní markery sepsy – běžně využívané

Hemokultura

Zlatým standardem v diagnostice sepsy je průkaz původce z hemokultury. Jak již bylo řečeno, u novorozence je interpretace výsledků mnohdy složitá. Výsledek nemáme k dispozici dříve než za 24 či 48 h. Výtěžnost vyšetření klesá kvůli částečnému antenatálnímu podání ATB matce, technickým potížím či malému množství odebraného vzorku. Minimální požadované množství by mělo být 1 ml, ideálně 2 ml, což v případě novorozence není množství zanedbatelné.²

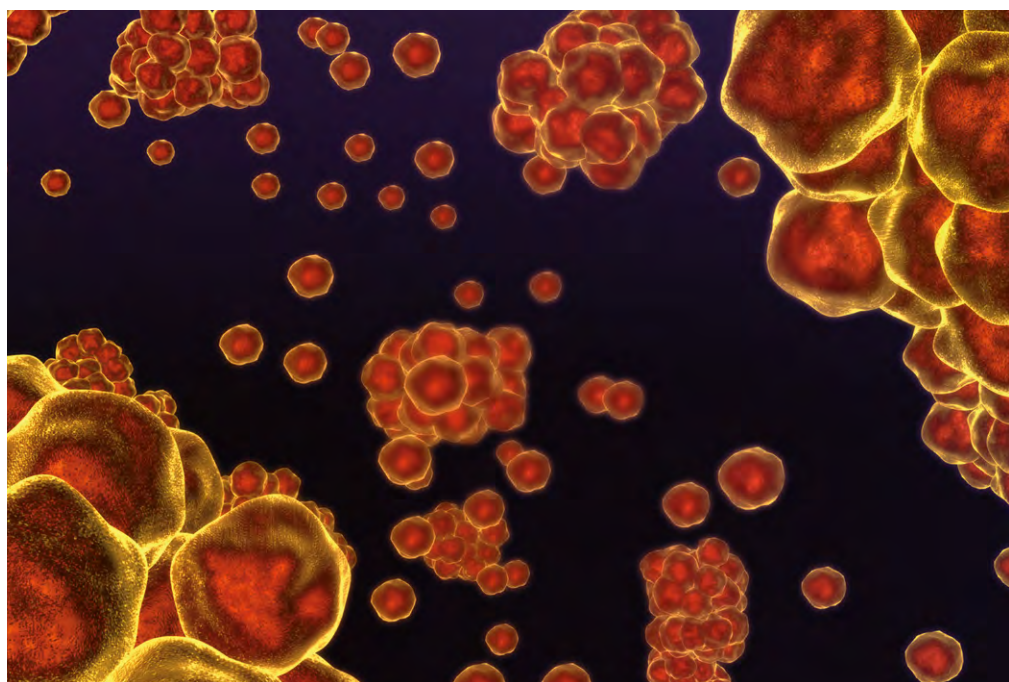
C-reaktivní protein

C-reaktivní protein (CRP) je syntetizován játry a patří mezi tzv. proteiny akutní fáze. Je to nejčastěji používaný laboratorní marker infekce. V porovnání s ostatními markery sepsy je levný a běžně dostupný ve všech nemocnicích. Interpretace hodnoty CRP v akutní fázi infekce je ale sporná. CRP není vhodným markerem pro včasnou diagnostiku časně novorozenecké sepsy, je však vhodný k monitoraci léčby, jelikož jeho hladina klesá po eradikaci infekčního stimulu.³

Stimulem pro vyplavení CRP je interleukin-6.^{4,5} Bender a kol. ve své studii z roku 2008 uvádějí, že medián maximální hladiny CRP je po infekčním stimulu 16–24 h, a zároveň zjistili, že CRP začne stoupat v době, kdy sérové hladiny IL-6 již klesají.⁶ Je to také marker nespecifický – zvýšené koncentrace CRP byly pozorovány i u neinfekčních stavů, jako je aspirace mekoniuma, nekróza tkáně, ale i po operaci.^{7,8}

Prokalcitonin

Prokalcitonin (PCT) je peptid, který je kódován CALC-1 genem lokalizovaným na chromozomu 11, a je prekurzorem kalcitoninu. Bakteriální infekce má za následek zvýšení exprese CALC-1 a následné uvolnění prekurzorů kalcitoninu ze všech tkání a buněk.⁹



▲ 3D ilustrace znázorňuje *Staphylococcus aureus* na černém pozadí, autor sonorileto, zdroj: Shutterstock

Prokalcitonin je využíván k diagnostice bakteriálních infekcí a k hodnocení prognózy septických onemocnění. V diagnostice časně novorozenecké sepsy je však hlavním úskalím jeho fyziologické zvýšení v prvních hodinách a dnech života. Nejvyšších fyziologických hodnot dosahuje mezi 18. a 30. hodinou života a k poklesu na obvyklé hodnoty dochází až během 48 hodin.^{10,11}

V diagnostice pozdní novorozenecké sepsy patří PCT svou dynamikou mezi střednědobé laboratorní markery infekce, jeho reakce je tedy rychlejší ve srovnání s CRP a také rychleji reaguje na úspěšnou ATB léčbu infekce.¹² Hladina PCT koreluje s tíží infekce, není ovlivněna virovými infekty.^{13,14} Při zohlednění fyziologického postnatálního vzestupu je PCT dobrým a poměrně specifickým markerem bakteriální infekce v novorozeneckém věku.

Stanovení PCT má ve své nabídce již většina laboratoří a výsledky jsou k dispozici ve statimovém režimu. PCT se stanovuje imunochemicky s vysokou přesností a citlivostí, cena vyšetření je oproti CRP více než desetinásobná.

Interleukin-6

Dalším proteinem akutní fáze využívaným v rámci časně diagnostiky novorozenecké sepsy časně i pozdní je interleukin-6 (IL-6). IL-6 je cytokin, který hraje jednu z hlavních rolí v obraně organismu, a to díky svému imunitnímu a hematopoetickému působení a – jak už bylo řečeno – schopnosti vyvolat odpověď akutní fáze.¹⁵ Cytokiny jsou malé molekuly, jejichž poločas v séru jsou minuty až hodiny.¹⁶ Jakmile dojde k uvolnění složek bakteriální buněčné stěny, hladina IL-6 rychle vzroste a maximálních hladin dosahuje v řádu několika hodin.¹⁷ Jde o velmi časný marker novorozenecké sepsy. Vzhledem k jeho krátkému poločasu je již 24 hodin po infekčním stimulu v plazmě téměř neměřitelný a není tedy vhodný k monitorování léčby.¹⁸

Překážkou pro dostupnost IL-6 na některých pracovištích zůstává jeho vysoká cena. Dnem 1. ledna 2020 nabyla účinnost vyhláška č. 269/2019 Sb., která mimo jiné přináší zařazení nového výkonu 81301 – *Stanovení interleukinu IL6 v lidském séru a plazmě pro odbornost 801 (klinické biochemie)*. Tím by se měla zlepšit dostupnost IL-6 na některých



▲ Ilustrační foto z Novorozeneckého oddělení FN Olomouc

pracovištích, protože dříve byl výkon vázán pouze na odbornost 813 (alergologie a klinická imunologie).

Všechna jmenovaná vyšetření ve FN Olomouc provádíme také z pupečnickové krve. Cut-off hodnoty vyšetření, které používáme v naší nemocnici, jsou uvedeny v tab. č. 1.

Laboratorní markery sepse – „nové“

Existuje celá řada slibných laboratorních markerů sepse. Jejich užití je však zatím koncentrováno převážně do perinatologických center, a to v rámci probíhajících studií.

Kalprotektin

Kalprotektin je členem rodiny S100 proteinů.¹⁹ Je to antimikrobiální protein,

který se nachází v cytosolu buněk vrozené imunity a uvolňuje se bezprostředně po interakci hostitel-patogen. Pro tuto svou vlastnost se používá jako laboratorní známka aktivace granulocytů a mononukleárů.²⁰ Měření hladiny tohoto S100 proteinu je již rutinně zavedeno např. v gastroenterologii v rámci diagnostiky nespecifických střevních zánětů či v revmatologii pro strategii biologické léčby juvenilní idiopatické artritidy.²¹⁻²³

Studii zaměřených na diagnostiku novorozenecké sepse je však zatím stále málo. V roce 2011 se Terrin a spol. zaměřili na diagnostiku pozdní novorozenecké sepse. Porovnávali kalprotektin s běžně užívanými laboratorními markery (leukocyty, trombocyty, poměr nezralých a zralých forem neutrofilů, CRP). Sérová koncentrace kalprotektinu byla signifikantně vyšší ($p < 0,001$) u novorozenců

s potvrzenou sepsí oproti novorozencům neinfekčním a zdravým.²⁴

O 4 roky později, v roce 2015, Decembrino a spol. také porovnávali diagnostické možnosti a přesnost již zavedených laboratorních znaků (leukocyty, neutrofilů, trombocyty, CRP) a kalprotektinu u novorozenecké sepse (tentokrát nerozlišovali sepsi časnou a pozdní). Data z této studie ukazují, že by kalprotektin mohl být užíván jako časný marker sepse. Jeho sérová hladina není ovlivněna stářím, pohlavím, způsobem porodu či počtem leukocytů.²⁵

Dynamika tohoto proteinu během novorozenecké sepse není zatím detailně prozkoumána, ale z dostupné literatury se zdá, že se jedná o marker pozdní, vhodný spíše pro monitoraci klinického stavu a léčby.

CD64

CD64 je vysoko afinní Fc receptor, tedy receptor, který specificky váže Fc oblast protilátek. Za fyziologických okolností je exprimován převážně monocytů a velmi slabě neaktivními neutrofilů.²⁶ Při aktivaci imunitního systému vidíme výrazný nárůst exprese CD64 na neutrofilech, a to do jedné hodiny po invazi bakteriálním patogenem.²⁷ Tento Fc receptor je možné rychle a elegantně detekovat pomocí průtokové cytometrie, kde je zapotřebí velmi malého množství krve, což je v případě nezralého novorozence velkou výhodou.²⁸ Exprese CD64 je u septických novorozenců signifikantně vyšší ve srovnání s neinfekčními pacienty.²⁹⁻³³

Presepsin

Presepsin je solubilní fragment molekuly CD14. CD14 je glykoprotein exprimovaný na membránách makrofágů, monocytů a granulocytů. Fyziologickou funkcí presepsinu je identifikace antigenů bakterií, virů a plísní a spuštění signální dráhy zprostředkované toll-like receptory. Po aktivaci této signální dráhy

Stáří dítěte	CRP mg/l	PCT ug/l	IL-6 ng/l
při narození	>4	>1	>30 (2. h života >300)
24 h	>10	>100	>300
48 h	>10	>50	>300

▲ Tab. č. 1: Cut-off hodnoty vyšetření

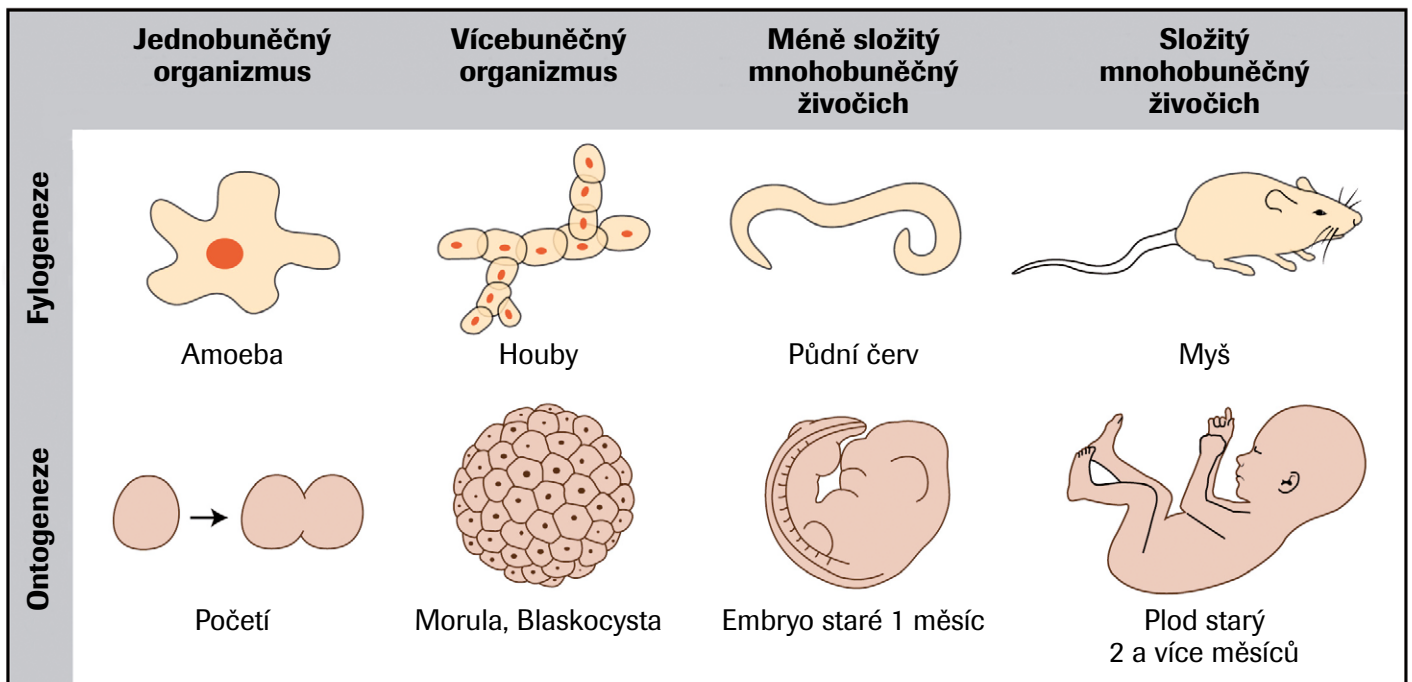


je CD14 odloučen z buněčné membrány a detekován v krvi.³⁴ Studií zabývajících se presepsinem jakožto možným laboratorním markerem novorozenecké sepse je celá řada, avšak užití v praxi zatím běžné není. Jako u všech „nových“ markerů je třeba detailně prozkoumat jeho dynamiku, stanovit cut-off hodnoty a zjistit jeho chování v prvních hodinách života novorozence.

Diskuse

Základní poučka pediatrie zní, že dítě není malý dospělý. O novorozenci to platí dvojnásob. Novorozenecké období je charakteristické nezralým a rozvíjejícím se imunitním systémem a tím se novorozenec stává vulnerabilnějším vůči infekci. Včasná diagnostika novorozenecké sepse je základním předpokladem pro

úspěšnost léčby a outcome dítěte. Existuje řada klinických i laboratorních znaků novorozenecké sepse. Klinické znaky jsou však převážně u předčasně narozených novorozenců značně nespecifické, proto je třeba využít a hlavně umět správně interpretovat markery laboratorní. Je třeba znát jejich fyziologickou dynamiku a k hodnocení výsledků je nutno přistupovat individuálně.



Autonomní vrozená buněčná imunita

Nezávislá na ostatních buňkách

Nutriční vrozená imunita

Komunikace mezi buňkami; žádné buňky se nespécializovaly na obranu

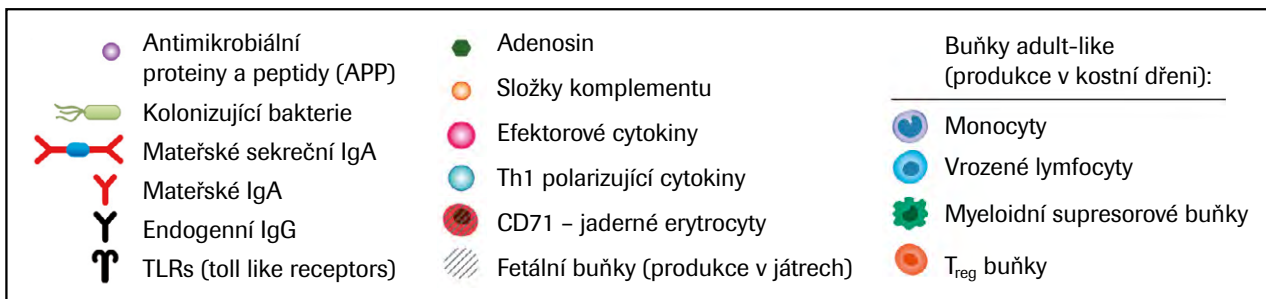
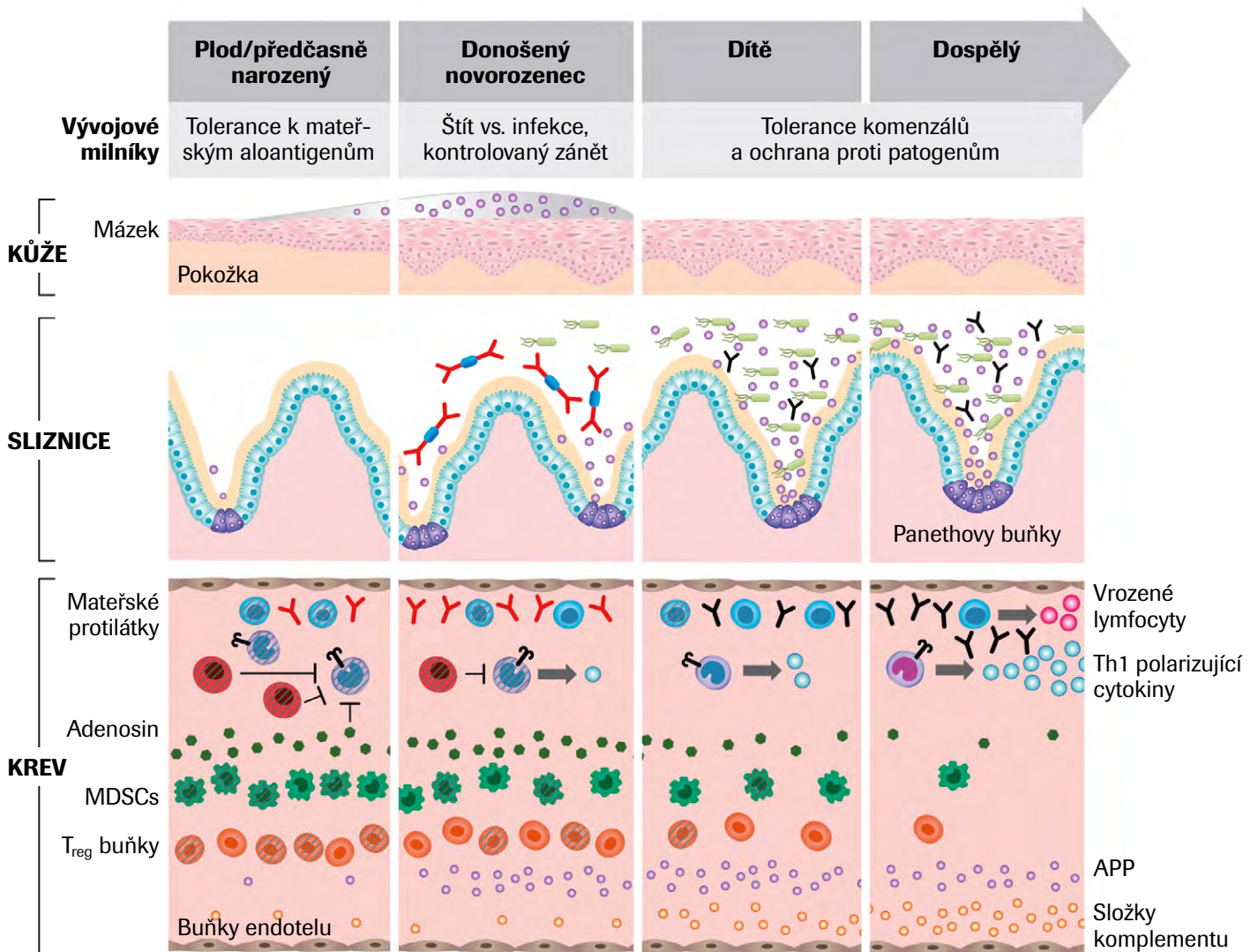
Vrozená imunita založená na leukocytech

Specializované buňky v obraně hostitele

Antigen-specifická získaná imunita

Specializované buňky a tkáně

▲ Obr. č. 1: **Klíčové prvky imunity.** Obrana hostitele proti infekci se vyvíjela v průběhu evoluce (fylogeneze) a dále se vyvíjí po celou dobu života daného jedince (ontogeneze). U jednobuněčného stadia (améba, stadium brzy po koncepci) je buněčná autonomní imunita klíčem k přežití. Biochemická komunikace mezi mnohobuněčnými organismy jakými jsou např. houby je zprostředkována pomocí tzv. nutriční imunity, to stejné se děje v průběhu stadia moruly a blastuly. Imunita méně komplexních mnohobuněčných živočichův jako např. *C. elegans* je typem vrozené imunity založené na expresi leukocytů. Stejně tak je tomu v prvním měsíci embryonálního vývoje. U vysoce komplexních živočichů již popisujeme klasickou získanou imunitu založenou na spolupráci vysoce specializovaných buněk a tkání imunitního systému a to stejně jako u plodu od 2. měsíce těhotenství.³⁵



▲ Obr. č. 2: **Ontogeneze přirozené obrany hostitele (plodu, novorozence a kojence) vůči patogenu.** Mezi základní bariérové obranné mechanismy patří fyzikální, chemická a funkční složka epitelu kůže a sliznice. Je třeba tento vývoj chápat i v kontextu vývoje jedince jako takového (plod, novorozenec, kojeneček atd.). (A) **Kůže.** Fyzikální a chemická složka je – a to především u předčasně narozených novorozenců – zredukována. Oproti tomu mázeq u donošených novorozenců exprimuje velké množství APP (antimikrobiální protein a peptid). (B) **Sliznice.** Současně se zmnóžením střevní mikroflóry se mění také struktura novorozenecké střevní sliznice, a to zvětšením krypt a zmnóžením Panethových buněk. Funkční změna představuje zvýraznění exprese APP. (C) **Krev.** Krev novorozence má relativně nízkou koncentraci komplementu a APP a vysokou koncentraci imunopresivního purinového metabolitu adenosinu. Plazma obsahuje jednak mateřské protilátky, které se transplacentárně přenášejí od poloviny těhotenství, a na straně druhé také protilátky, které se do krve novorozence a kojence dostávají z mateřského mléka. Vrozená imunita se dá detekovat od konce prvního měsíce těhotenství, přičemž následné změny jsou způsobeny převážně rostoucí expozicí mikrobům životního prostředí. Monocyty exprimují PRR (Pattern recognition receptors, např. Toll-like receptory; TLR) s odlišnou funkční odpovědí, jako je například menší produkce Th1 polarizujících cytokinů na většinu podnětů. Získaná imunita se vyvíjí od 4. měsíce těhotenství.³⁵



MUDr. Anna Baštan, roz. Medková

Fakultní nemocnice Olomouc, Dětská klinika, JIRP, I. P. Pavlova 6, Olomouc
Kontakt: medkova.andula@gmail.com

Studium všeobecného lékařství úspěšně zakončila na 1. lékařské fakultě Univerzity Karlovy. Lékařské povolání zahájila na Novorozeneckém oddělení Nemocnice na Bulovce. Od roku 2015 pracuje na Dětské klinice Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, t. č. na Jednotce intenzivní a resuscitační péče. Ve svém Ph.D. studiu se věnuje diagnostice novorozenecké sepsy.

RNDr. Jitka Prošková

Fakultní nemocnice Olomouc, Oddělení klinické biochemie, I. P. Pavlova 6, Olomouc
Kontakt: jitka.proskova@fnol.cz

Absolventka PŘF UP Olomouc – obor Analytická chemie. Atestace z Vyšetřovacích metod v klinické hematologii a v klinické biochemii. Ve zdravotnických laboratořích pracuje od roku 1999. V současnosti jako zástupce vedoucího Oddělení klinické biochemie ve Fakultní nemocnici Olomouc. Ve volném čase ráda čte, cestuje nebo tráví čas v přírodě.



LITERATURA

- Hornik, C., Fort, P., Clark, R. & Al, E. Early and late onset sepsis in very-low-birth-weight infants from a large group of neonatal intensive care units. *Early Hum Dev* 88, 69–74 (2012).
- Neal, P. R. et al. Volume of blood submitted for culture from neonates. *J. Clin. Microbiol.* 24, 353–356 (1986).
- Ehl, S., Gehring, B. & Pohlandt, F. A detailed analysis of changes in serum C-reactive protein levels in neonates treated for bacterial infection. *Eur. J. Pediatr.* 158, 238–242 (1999).
- Cekic, C. et al. Evaluation of the relationship between serum ghrelin, C-reactive protein and interleukin-6 levels, and disease activity in inflammatory bowel diseases. *Hepatogastroenterology* 61, 1196–1200 (2014).
- Worthmann, H. et al. Lipopolysaccharide binding protein, interleukin-10, interleukin-6 and C-reactive protein blood levels in acute ischemic stroke patients with post-stroke infection. *J. Neuroinflammation* 12, 13 (2015).
- Bender, L. et al. Early and late markers for the detection of early-onset neonatal sepsis. *Dan. Med. Bull.* 55, 219–223 (2008).
- Ng, P. C. et al. Diagnosis of late onset neonatal sepsis with cytokines, adhesion molecule, and C-reactive protein in preterm very low birthweight infants. *Arch. Dis. Child. - Fetal Neonatal Ed.* 77, F221 LP-F227 (1997).
- Pourcyrus, M., Bada, H. S., Korones, S. B., Baselski, V. & Wong, S. P. Significance of Serial C-Reactive Protein Responses in Neonatal Infection and Other Disorders. *Pediatrics* 92, 431 LP – 435 (1993).
- Müller, B. et al. Ubiquitous Expression of the Calcitonin-I Gene in Multiple Tissues in Response to Sepsis. *J Clin Endocrinol Metab.* 86, 396–404 (2016).
- Chiesa, C. et al. Reliability of procalcitonin concentrations for the diagnosis of sepsis in critically ill neonates. *Clin Infect Dis* 26, 664–72 (1998).
- Sachse, C., Dressler, F. & Henkel, E. Increased Serum Procalcitonin in Newborn Infants without Infection. *Clin. Chem.* 44, 1343 LP – 1344 (1998).
- Becker, K., Snider, R. & Nylen, E. Procalcitonin assay in systemic inflammation, infection, and sepsis: Clinical utility and limitations. *Crit. Care Med.* 36, 941–952 (2008).
- Meisner, M. Pathobiochemistry and clinical use of procalcitonin. *Clin Chim Acta* 323, 17–29 (2002).
- Rossum, A. M. C. Van, Wulkan, R. W. & Oudesluys-Murphy, A. M. Procalcitonin as an early marker of infection in neonates and children. *Lancet Infect. Dis.* 4, 620–630 (2004).
- Modi, N. et al. A case definition for national and international neonatal bloodstream infection surveillance. *Arch. Dis. Child. - Fetal Neonatal Ed.* 94, F8 LP-F12 (2008).
- De Jong, H. K., Van Der Poll, T. & Wiersinga, W. J. The systemic pro-inflammatory response in sepsis. *J. Innate Immun.* 2, 422–430 (2010).
- Krueger, M. et al. Cord blood levels of interleukin-6 and interleukin-8 for the immediate diagnosis of early-onset infection in premature infants. *Biol Neonate* 80, 118–123 (2001).
- Abdollahi, A., Shoaib, S., Nayyeri, F. & Shariati, M. Diagnostic value of simultaneous measurement of procalcitonin, interleukin-6 and hs-CRP in prediction of early-onset neonatal sepsis. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* 4, (2012).
- Donato, R. et al. Functions of S100 proteins. *Curr. Mol. Med.* 13, 24–57 (2013).
- Stríž, I. & Trebichavský, I. Calprotectin - A pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation. *Physiol. Res.* 53, 245–253 (2004).
- ME, L. A., I, de L. H. G., M, M. V., JA, N. V. & F, A. P. Faecal calprotectin, an useful marker in discriminating between inflammatory bowel disease and functional gastrointestinal disorders. *Gastroenterol Hepatol.* 40, 125–131 (2017).
- Zhulina, Y. et al. The prognostic significance of faecal calprotectin in patients with inactive inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 44, 495–504 (2016).
- Anink, J. et al. MRP8/14 serum levels as a predictor of response to starting and stopping anti-TNF treatment in juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 17, 200 (2015).
- Terrin, G. et al. Serum calprotectin: An antimicrobial peptide as a new marker for the diagnosis of sepsis in very low birth weight newborns. *Clin. Dev. Immunol.* 2011, (2011).
- Decembrino, L., De Amici, M., Pozzi, M., De Silvestri, A. & Stronati, M. Serum Calprotectin: A Potential Biomarker for Neonatal Sepsis. *J. Immunol. Res.* 2015, 147973 (2015).
- Fjaertoft, G., Hakansson, L., Ewald, U., Foucard, T. & Venge, P. Neutrophils from Term and Preterm Newborn Infants Express the High Affinity Fc[gamma]-Receptor I (CD64) During Bacterial Infections. *Pediatr Res* 45, 871–876 (1999).
- van der Meer, W., Pickkers, P., Scott, C., van der Hoeven, J. & Gunnewiek, J. Hematological indices, inflammatory markers and neutrophil CD64 expression: comparative trends during experimental human endotoxemia. *J Endotoxin Res* 13, 94–100 (2007).
- Umlauf, V. N., Dreschers, S. & Orlikowsky, T. W. Flow cytometry in the detection of neonatal sepsis. *Int. J. Pediatr.* 2013, 763191 (2013).
- El-Raggal, N. M., El-Barbar, M. N., Youssef, M. F. & El-Mansy, H. A. Neutrophil-surface antigens CD11b and CD64 expression: a potential predictor of early-onset neonatal sepsis. *Egypt J Pediatr Allergy Immunol* 2, 90–100 (2004).
- Mohamed, I., Abdel- Azeem, M., Maher, S. & Mohamed, F. Original article Neutrophil CD64 in early-onset neonatal sepsis. *J Pediatr Allergy Immunol* 8, 19–25 (2010).
- Streimish, I. et al. Neutrophil Cd64 as a Diagnostic Marker in Neonatal Sepsis. *Pediatr Infect Dis J.* 31, 777–781 (2012).
- Du, J. et al. Diagnostic utility of neutrophil CD64 as a marker for early-onset sepsis in preterm neonates. *PLoS One* 9, (2014).
- Halek, J., Novak, M., Medkova, A., Furst, T. & Juranova, J. The role of nCD64 in the diagnosis of neonatal sepsis in preterm newborns. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* (2018).
- https://www2.ike.m.cz/plm_lp/_LP_18011-L0000006.htm.
- Kollmann, T.R., Kampmann, B., Mazmanian, S.K., Marchant A., Levy, O. Protecting the Newborn and Young Infant from Infectious Diseases: Lessons from Immune Ontogeny *Immunity* 46: 350-362 (2017).