

VÝZNAM PROTEINŮ AKUTNÍ FÁZE A NEUTROFILNÍCH GRANULOCYTŮ PŘI DIAGNOSTICE BAKTERIÁLNÍHO ZÁNĚTU

doc. MUDr. Vladimír Mihál, CSc.

Dětská klinika LFUP a FN Olomouc

Rychlé rozlišení bakteriálního původu probíhajícího zánětu je zejména u kojenců předpokladem správného terapeutického postupu: včasného zahájení iniciální antibiotické léčby a případného zvážení nemocniční péče. Vzhledem k nespecifickému charakteru průvodních klinických příznaků může být správná diferenciace bakteriálního a virového zánětu, zejména v počátku infekčního procesu, velmi nesnadným úkolem. Autor diskutuje význam opakované analýzy některých humorních (C-reaktivní protein – CRP) a celulárních (neutrofilní granulocyty) faktorů, které provázejí a dobře charakterizují průběh akutní fáze infekce. Správnou interpretací naměřených hodnot i jejich dynamického pohybu můžeme celkem spolehlivě minimalizovat diagnostické pochybení. Vzhledem ke krátkému biologickému poločasu sérového C-reaktivního proteinu, ale i cirkulujících neutrofilních granulocytů, autor zdůrazňuje přijaté doporučení respektovat opakované (párové) vyšetření obou zmíněných laboratorních parametrů v intervalu 12–24 hodin od iniciální analýzy. Hraniční hodnoty CRP i neutrofilních granulocytů, stanovené v počátku bakteriálního zánětu, se obvykle dramaticky mění v průběhu několika málo hodin, což lze přesně dokumentovat právě jejich opakovaným vyšetřením.

Klíčová slova: bakteriální zánět, diagnostika, proteiny akutní fáze, neutrofilní granulocyty.

THE SENSE OF PROTEINS AT THE ACUTE PHASE AND NEUTROPHIL GRANULOCYTES FOR BACTERIAL INFLAMMATION DIAGNOSIS

A quickly determination of continuesly inflammation from bacterial originate, meanly in sucplings assumes a correct therapeutic proceeding: timely beginning with antibiotic treatment and if necessary an admission to hospital. Considering the character of concomitant syndroms the difference between bacterial and viroous inflammation could be meanly by beginning of infectious processing a very difficult problem. The author diskuses the importance of repeated analysis some humoral (C-reactive proteine) and celular (neutrophil granulocytoses) factors, accompanied and clearly characterized the continuesly acute phase of infection. By a right interpretation of measured values and their dynamic movement we could reliably to minimize an incorrectly diagnose in all. Considering the short biologic half-life of serum C-reactive protheine and in the same way because of neutrofile granulocytes cirkulation, the author pointed out the recomendation of repeated both above named laboratory outfindings in an intervall from 12 do 24 hours since the inicialy analyzis. The border values of CRP but neutrofile granulocytes too, determined by the begining of bacterial inflammation, usualy will change dramatic in the term of few hours what is possible to document by repeted outfinding.

Key words: bacterial inflammation, diagnosis, proteins of acute phase, neutrophile granulocytes.

Zánět patří mezi jednu z fylogeneticky nejstarších reakcí organismu na poškození tkání a na vniknutí cizorodého materiálu. Jedná se o reakci obrannou, která směřuje nejen k eliminaci noxy, ale i k následné reparaci. Rozlišení původu probíhajícího zánětu je předpokladem správného terapeutického postupu. Rychle diferencovat mezi bakteriální a virovou infekcí je mnohdy nesnadný úkol, vzhledem k nespecifickému charakteru průvodních klinických příznaků, které doprovázejí febrilní stav dítěte. Pokud nejsou přítomny specifické (lokální) příznaky nemoci, jako je například meningismus u hnisavé meningitidy, může být rychlá iden-

tifikace těžké bakteriální infekce velmi problematická. Léčebná strategie (podání antibiotik, hospitalizace, zavodnění aj.) vždy probíhá na základě kombinace klinických i laboratorních nálezů.

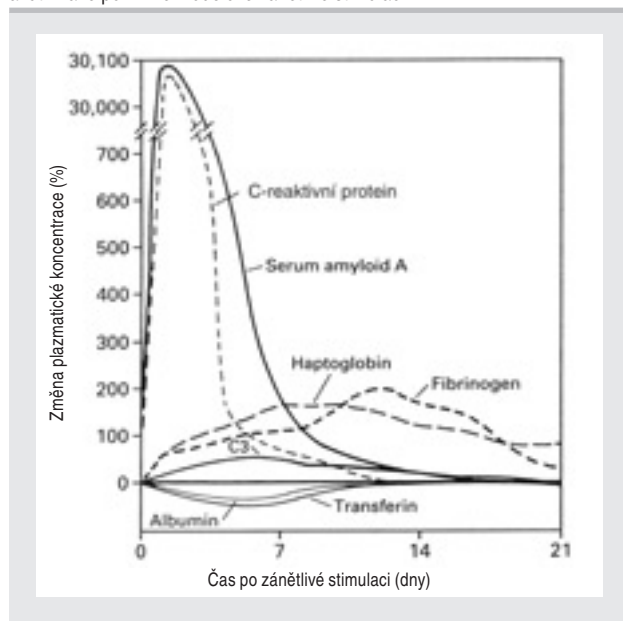
Úvodní tzv. alarmová fáze bakteriální infekce – působení noxy o vysoké intenzitě – je dobře známá v medicíně akutních stavů a trvá spíše hodiny než dny. Nejde-li o primárně letální intenzitu poškození, rozvíjí se období obrany, které označujeme jako **reakce akutní fáze**. Vznik a vývoj zánětlivé reakce je výsledkem souhry humorních a celulárních faktorů. Jaké dnes máme nejjednodušší možnosti, kterými můžeme monitorovat **imunologické** a **hematologické** změny reakce akutní fáze bakteriálního zánětu?

Jako cytokiny jsou dnes souborně označovány signální peptidy, které mají imunomodulační efekt a jsou odlišné od růstových faktorů jiných než imunokompetentních buněk. Jsou považovány za prostředky mezibuněčné komunikace a řada z nich má jasné systémové působení (tabulka 1). Cytokiny s rozhodujícím vlivem na reakci akutní fáze (prozánětlivé cytokiny) jsou interleukin-1 (IL-1), tumor nekrotizující faktor (TNF) – oba ve formách alfa a beta, dále IL-6 a gama interferon (IFN).

Proteiny akutní fáze (APP- acute phase protein) – hrají velmi významnou roli v regulaci intenzity a trvání zánětlivé odpovědi. Působením prozánětlivých cytokinů TNF alfa, IL-1, IL-8 a IL-6 se kromě účasti v zánětlivé odpovědi (kaskádě)

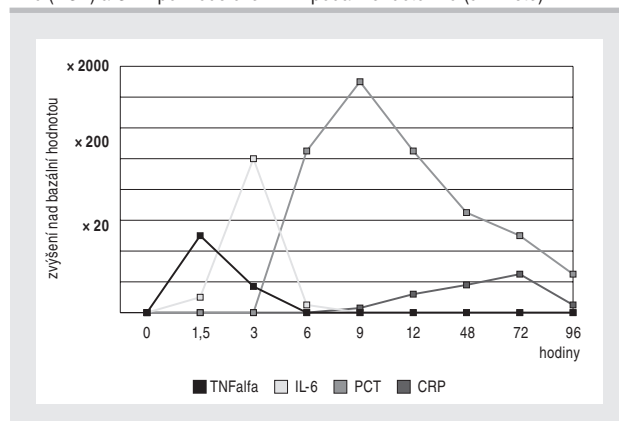
Tabulka 1. Spektrum významných systémových změn v průběhu akutní fáze zánětu

1. Neuroendokrinní změny	teplota, spavost a anorexie uvolnění kortikotrofinu zvýšená sekrece argininu/vazopresinu snížená produkce inzulin-like growth factor 1 zvýšená sekrece katecholaminů v nadledvinách
2. Hematopoetické změny	anemie chronických chorob leukocytóza trombocytémie
3. Metabolické změny	ztráta svalové hmoty a negativní dusíková bilance snížená glukoneogeneze osteoporóza zvýšená jaterní lipogeneze kachexie

Graf 1. Charakteristické změny plazmatické koncentrace některých proteinů akutní fáze po mírné modelové zánětlivé stimulaci

dramaticky mění i kvalita proteosyntézy v játrech (2). Nejdůležitějším (regulujícím) induktorem syntézy proteinů akutní fáze v hepatocytech je IL-6. Dynamika proteinů akutní fáze je znázorněna v tabulce 2 a grafech 1 a 2.

Zvláštní postavení mezi proteiny akutní fáze má CRP – protein s briskní dynamikou – v hodinách – a až tisícnásobným zvýšením. Již v roce 1930 byl CRP popsán (název dostal od jeho reaktivity k pneumokokovému proteinu C) v plazmě pacientů v průběhu akutní fáze pneumokokové pneumonie (5). Pro své výhodné vlastnosti je široce používán jako vhodný, rychlý a cenově nenáročný laboratorní znak (marker) intenzity zánětu (2, 3, 4). Tabulka 3 uvádí některé vlastnosti a charakteristiky CRP a porovnává jeho použití s další pomocnou laboratorní metodou – se stanovením rychlosti sedimentace erytrocytů. **Rychlost sedimentace erytrocytů** je velkou měrou závislá na plazmatické koncentraci **fibrinogenu**. Výhodou je zejména její dobrá znalost a široké využití, jednoduchost a množství literárních zpráv. Nicméně měření C-reaktivního proteinu má v porovnání se stanovením sedimentace erytrocytů mnoho výhod. Sedimentace erytrocytů je nepřímé stanovení hladiny plazmatických proteinů akutní fáze a může být značně ovlivněna velikostí, tvarem a počtem červených krvinek, stejně jako dalšími komponenty plazmy, jakými jsou například imunoglobuliny. Proto její naměřené hodnoty mohou být někdy nepřes-

Graf 2. Schematické znázornění relativního zvýšení TNF alfa, IL-6, prokalcitoninu (PCT) a CRP po modelovém i. v. podání endotoxinu (u zvířete)**Tabulka 2.** Dynamika proteinů akutní fáze

1. Pozitivní APP	
Plazmatické proteiny, kterých produkce se v průběhu zánětu v játrech zvyšuje	
A) vzrůst asi o 50 %, odezva za 2–3 dny	ceruloplazmin hemopexin C3 složka komplementu
B) vzrůst asi 2–3x, odezva za 1–2 dny	alfa-1 antitrypsin haptoglobin fibrinogen alfa-1 antichymotrypsin
C) vzrůst asi 100–1000x, odezva do 8 hodin	C-reaktivní protein (CRP) amyloid A protein A
2. Negativní APP	
Plazmatické proteiny, kterých produkce se v průběhu zánětu v játrech snižuje	
	albumin transferin prealbumin alfa fetoprotein (AFP) thyroxin-binding protein faktor XII

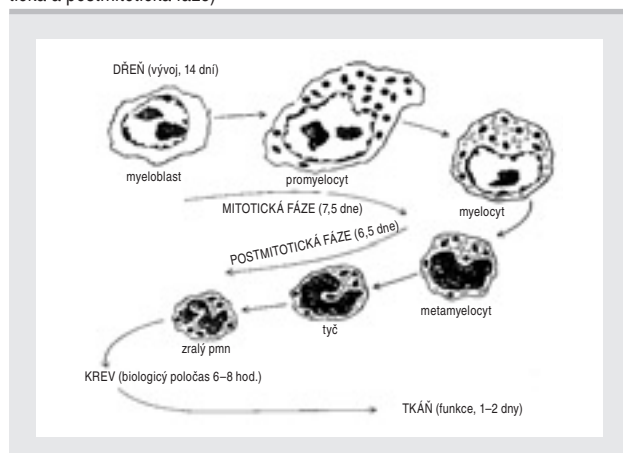
né až zavádějící. V roce 1920, kdy bylo měření rychlosti sedimentace erytrocytů zavedeno, představovala tato laboratorní metoda velký pokrok. Dnes, když můžeme hladinu fibrinogenu stanovit přímo, jeví se její použití omezené. Výhody stanovení CRP tkví v jeho rychlé dynamice, biologickém poločasu, ale také v tom, že sérová hladina není ovlivněna věkem ani pohlavím vyšetřovaných osob. Po antigenní stimulaci dochází během několika hodin k nárůstu jeho sérových hladin (za fyziologických podmínek jeho sérová hladina nepřesahuje hodnotu 20 mg/l). Vrchol dosahuje sérová hodnota CRP mezi 36–50. hodinou a po odeznění stimulace poměrně rychle klesá k vý-

Tabulka 3. Porovnání některých charakteristik CRP a sedimentace erytrocytů (FW)

Okolnosti/podmínky	CRP	FW
Potřeba vzorku	sérum/plazma; stabilní při uschování	čerstvá plná krev; nemožnost uschování
Metoda měření	přímá kvantifikace proteinů akutní fáze	nepřímé stanovení zvýšeného fibrinogenu
Význam a rychlost vzestupu	zvýšení nastupuje: 4–6 hod. maximum: 36–50 hod. biol. poločas: 4–7 hod. návrat k normě: 3–7 dnů	nastupuje pomaleji a vrací se k normě za několik týdnů přes klinické zlepšení
Efekt anémie, polycytémie, interakce proteinů, velikosti a tvarů ery	nepodléhající vlivu	falešně pozit./negat. reakce, v závislosti na abnormalitách
Věk a pohlaví	minimální změny mezi novorozenci a dospělými	zvyšuje se s věkem, vyšší hodnoty u žen

chozím hladinám (Graf 1 a 2). CRP a komponenty komplementu jsou jediné proteiny akutní fáze, které se přímo podílejí na eliminaci mikroorganismů. Z praktického hlediska je nutné **upozornit na vhodnost (až nutnost) párového vyšetření sérové hodnoty CRP**: může se totiž stát, že při prvním vyšetření jen krátce od iniciace infekce můžeme překvapivě naměřit jen mírně zvýšené hodnoty. Proto je doporučeno provést vždy druhé (párové) vyšetření CRP v intervalu 12–24 hodin od vstupního stanovení. Z pohledu praktického lékaře se vhodnějším jeví interval 24 hodin (opakované vyšetření pacienta v následující den). Při rychle probíhající infekci (sepsi) je určitě vhodnější zvolit kratší interval (6–12 hodin). Kromě sérové hladiny CRP je zejména jeho dynamika pro výběr vhodné léčebné strategie nejpodstatnější. Dynamický pokles sérové hladiny CRP v průběhu prvních 48 hodin infekčního procesu poměrně přesně odráží správnost iniciační (empirické) antibiotické léčby a v tomto období je již obvykle doprovázen poklesem teploty i celkovým klinickým zlepšením. Nadále však platí, že jen výsledek kultivačního mikrobiologického vyšetření (zlatý standard diagnostiky zánětu) může potvrdit nebo zpochybnit správnost zahájené antibiotické léčby. Zároveň chci upozornit, že při klesajícím trendu sérové hladiny CRP není opětovný vzestup teploty indikací (argumentem) pro změnu antibiotika, jelikož ten může být třeba projevem virové superinfekce. Hladina sérového CRP >40–50 mg/l je mnohými autory považována za jeden z pomocných laboratorních znaků bakteriální infekce, ale ještě větší prediktivní význam získá svým zvýšením v průběhu několika následujících hodin, jak již bylo uvedeno výše. Morley a spol. (1) až u 80–85 % pacientů v iniciační fázi těžké bakteriální infekce pozorovali sérové hladiny CRP > 100 mg/l. Ještě rychlejší laboratorní odraz probíhající akutní fáze bakteriálního zánětu může poskytnout analýza sérové hladiny IL-6 (cytokin, který kontroluje syntézu CRP v hepatocytech), TNF alfa nebo procalcitoninu (PCT). Tyto prozánětlivé cytokiny mají výrazně kratší biologický poločas a takřka nulové hodnoty v období zdraví. Jakékoliv zvýšení jejich sérových hladin může velmi rychle (0–3 hodiny) signalizovat bakteriální stimulaci (3, 7). Vzhledem k jejich cenové náročnosti se dnes hledá jejich využití zejména v oblasti neonatologie nebo intenzivní medicíny (JIP, ARO).

Graf 3. Schematické znázornění fyziologické myelopoézy v kostní dřeni (mitotická a postmitotická fáze)



Kromě již výše uvedených humorálních faktorů hrají formované krevní elementy (zánětové buňky) ústřední úlohu v zánětlivé reakci. Jsou to především neutrofilní granulocyty (mikrofágy, polymorfonukleáry, neutrofilny), které mají schopnost rozeznat cizorodý materiál, migrovat přes cévní stěnu do místa zánětu, pohltit, usmrtit, rozložit nebo jinak zpracovat fagocytovaný obsah. Neutrofilní granulocyty zrají v kostní dřeni a následně jsou uvolňovány do krve a tkání, kde plní první obranou linii hostitele. Celkové množství neutrofilních granulocytů (v průběhu bakteriálního zánětu tvoří převážnou část všech leukocytů – leukocytózy) je rozděleno do dvou částí: do kostní dřene a periferní krve. Kostní dřeň zajišťuje vhodné prostředí pro proliferaci (buňky mají schopnost se mitoticky dělit – mitotická fáze) myeloblastů, promyelocytů a myelocytů a také pro maturaci metamyelocytů a tyčí (postmitotická fáze). Proliferační a maturační fáze neutrofilů v kostní dřeni vyžaduje 8–14 dnů (Graf 3). Metamyelocyty a tyče jsou již nadány fagocytární aktivitou a slouží jako hlavní zásobní část (storage pool) neutrofilních prekursorů. Zralé neutrofilní granulocyty jsou neustále uvolňovány do periferní krve v celkovém počtu $1\text{--}2 \times 10^9$ buněk/kg/den. Polymorfonukleáry v krvi představují cirkulující část ($0,3\text{--}0,4 \times 10^9$ buněk/kg) stejně jako tzv. marginální část ($0,4 \times 10^9$ buněk/kg). **Neutrofilní granulocyty vyplavené do periferní krve mají krátkou životnost, s biologickým poločasem 6–8 hodin.** Když se neutrofilny dostanou do tkání, jejich životnost se prodlužuje na 1–2 dny. Vzhledem ke krátkému biologickému poločas, je počet neutrofilů udržován v rozmezí 3 000–6 000 buněk/mm³ (počet se u dětí mění v závislosti na věku). Neurohumorální látky (adrenalin a noradrenalin), fragmenty komplementu (C3e, C3d, g), stresové hormony a infekce zapříčiňují zrychlené vyplavování dřeňových neutrofilních granulocytů do cirkulace, což vede k leukocytóze – neutrofilii (tabulka 4). Zánět (endotoxin) stimuluje i G-CSF (granulocytární kolonie stimulující faktor), v důsledku čehož, kromě vyplavení dřeňových neutrofilů, dochází i k prodloužení jejich životnosti a funkce. Aktivované neutrofilny ve tkáních jsou schopné produkovat chemotaktické faktory pro monocyty a lymfocyty, což má za následek vstup buněk tohoto typu do místa zánětu, kde vyvolají specifickou imunitní odpověď.

Bakteriální zánět je jednou z nejčastějších příčin neutrofilní leukocytózy. Závažnost neutrofilní odpovědi na bakteriální

Tabulka 4. Neutrofilní granulocytóza

Mechanismus	Příklady
Zvýšená produkce	infekce tumory zánět léky (litium)
Mobilizace ze dřene	infekce zánět kortikosteroidy endotoxin
Demarginace	akutní stres fyzická námaha adrenalin
Snížená migrace z cirkulace	kortikosteroidy
Mimodřeňová krvetvorba	hematologické malignity

Tabulka 5. Hodnoty sérového CRP, leukocytů a jejich nezralých forem (tyčí) u 15 dětí s akutní gastroenteritidou (Salmonella enteritidis) v den přijetí na Dětskou kliniku v Olomouci

CRP (mg/l)	LEUKOCYTY ($\times 10^9/l$)	TYČE (%)
16	13,8	30
54	8,8	30
37,9	6,4	21
33,9	10,3	22
12,9	11	26
34,3	12,4	37
16	13,8	30
171	4,8	41
152	13,2	61
45,5	7,8	19
131	8	19
69,5	14,7	16
209	4,9	61
115	29,8	14
142,5	16,7	20

podnět (zánět) bývá obvykle menší než $30 \times 10^9/l$, i když počty vyšší než $50 \times 10^9/l$ mohou být pozorovány, obzvlášť v novorozeneckém období (tzv. leukemoidní reakce). **Posun doleva** (nadměrné množství nezralých forem neutrofilů v periferní krvi) obvykle doprovází neutrofilní leukocytózu (8). Těžkou bakteriální infekci doprovázejí i některé morfologické změny neutrofilů: přítomnost toxických granulací, Dohleho tělísek a vakuolizace. Prediktivní hodnotu pro sepsi mají tyto změny až když jsou přítomny ve více než 50 % granulocytů. Vysoký stupeň leukocytózy nebývá přítomný u všech bakteriálních infekcí, ale například **salmonelóza a brucelóza** je charakterizována vysokou leukocytózou a zejména posunem doleva (až 60 %), což má pro tento typ infekce takřka diagnostický význam (tabulka 5). Philip a Hewitt (6) u novorozenců prokázali, že poměr tyčí k celkovému počtu neutrofilů vyšší než 0,2 má pro diagnózu sepse vysokou senzitivitu (90 %). Neutrofilie není charakteristická pro virovou infekci, lehčí stupeň můžeme zaznamenat například v časně fázi planých neštovic. Systémová infekce, příčinou které jsou plísňe, protozoa, rickettsie nebo spirochety, může být rovněž doprovázena neutrofilii (tabulka 6). Všechny mechanismy, které v průběhu zánětu regulují vzestup neutrofilních granulocytů, zatím nejsou dostatečně objasněny.

V iniciační fázi zánětu můžeme někdy pozorovat přechodnou neutropenii, která se vyvine v důsledku přesunu periferních neutrofilů do marginální části (adherence k cévnímu endotelu). V důsledku zvýšené produkce ve dřeni dochází v průběhu několika dalších hodin znovu ke zvýšení počtu cirkulujících leukocytů. V prvním dnu zánětu se převážně vyplavují vyzrálší formy granulocytů (tyče a metamyelocyty). Při septickém průběhu ani přítomnost ojedinělých myelocytů nebo myeloblastů nebývá až

Tabulka 6. Hlavní příčiny neutrofilní leukocytózy

Infekce	primární bakteriální, plísňové aj.
Zánět	onemocnění pojiva, glomerulonefritida
Poškození tkáně a nekróza	popáleniny, jaterní nekróza, chirurgický zákrok
Metabolické nemoci	ketoacidóza, uremie
Léky a hormony	adrenalin, noradrenalin, histamin, glukokortikoidy, litium, akutní otravy
Maligní nemoci	myeloproliferativní nemoci, myeloidní leukémie, MDS, solidní tumory
Fyziologické stavy	stres, fyzická námaha, intenzivní pláč u novorozence
Vrozené příčiny	hereditární neutrofilie, syndrom trombocytopenie s absencí radia (TAR)
Jiná příčina	akutní krvácení nebo hemolýza, kouření

tak vzácná. Při **děle trvající infekci (nepoznané/neléčené)** můžeme v periferní krvi znovu pozorovat přechod do **neutropenie**, která je zapříčiněna **vyčerpáním** většiny **dřeňových zásob** zralých i nezralých forem neutrofilů. Při nesprávné interpretaci může být tento pokles leukocytózy mylně považován za znak odeznívajícího zánětu, což obvykle má závažné důsledky. Neutropenie, kterou provází výrazný posun doleva, takřka jednoznačně upozorňuje na děle trvající zánět s vyčerpáním kostní dřeně a tudíž s minimální rezervou mikrořágů účastnit se obranné reakce. K restauraci kostní dřeně, která je zapříčiněna deplecí myelopoézy, jsou nutné nejméně 2–3 týdny. Stavy dřeňové vyčerpanosti, které jsou zapříčiněny bakteriální infekcí, pozorujeme zejména v novorozeneckém období, kdy dřeňové zásoby, vztaženy na hmotnost dítěte, jsou několikrát menší než u dospělých (u nezralých novorozenců až $>10\times$).

Pro diagnostiku bakteriálního zánětu u dětí můžeme pro praxi doporučit tato pravidla:

1. při vyšetření leukocytů je vhodné současně stanovit počet (%) jejich nezralých forem (posun doleva)
2. pro posouzení intenzity zánětu je potřeba výše uvedené vyšetření opakovat v intervalu 12–24 hodin
3. výskyt zvýšeného počtu nezralých forem neutrofilních granulocytů, který doprovází neutropenii, je považován za alarmující znak nízké dřeňové rezervy
4. při analýze sérového C-reaktivního proteinu je vzhledem ke krátkému biologickému poločasu vhodné jeho vyšetření opakovat v intervalu 12–24 hodin – dynamika jeho hodnot má vysokou prediktivní hodnotu
5. zlatým standardem diagnózy bakteriálního zánětu zůstává kultivační mikrobiologické vyšetření, ke kterému využijeme všech dostupných/vhodných biologických vzorků pacienta (výtěr ze sliznice, likvor, krev, moč, stolice).

Literatura

1. Morley, J. J., Kushner, I. (1982): Serum C reactive protein levels in disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 389: 406–418.
2. Gabay, C., Kushner, I. (1999): Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N. Engl. J. Med.* 340: 448–454.
3. Hatherill, M., Tibby, S. M., Sykes, K., Turner, Ch., Murdoch, I. A. (1999): Diagnostic markers of infection: comparison of procalcitonin with C reactive protein and leucocyte count. *Arch. Dis. Child.* 81: 417–421.
4. Pisarciková, M., Filka, J., Uher, M., Kurák, M., Barlová, E., Kovářová, M., Molokáčová, M., Šašinka, M. (2001): Význam stanovení koncentrace cytokinů a prsm skóre u detí so sepsou. *Čes.-slov. Pediatr.* 56: 510–515.

5. Tillet, W. S., Francis, T. (1930): Serological reactions in pneumonia with non-protein somatic fraction of pneumococcus. *J. Exp. Med.* 52: 561.
6. Philip, A. G. S., Hewitt, J. R. (1980): Early diagnosis of neonatal sepsis. *Pediatrics.* 65: 1036.
7. Assicot, M., Gendrel, D., Carsin, H. et al. (1993): High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. *Lancet*, 341: 515.
8. Christensen, R. D., Bradley, P. P., Rothstein, G. (1981): The leukocyte left shift in clinical and experimental neonatal sepsis. *J. Pediatr.* 98: 101.