

Časná diagnostika sepse pomocí nezralých forem trombocytů a granulocytů

Dominik P., Fedora M.

Klinika dětské anesteziologie a resuscitace, Fakultní nemocnice Brno a Lékařská fakulta Masarykovy univerzity v Brně

Sepsa představuje heterogenní dynamický syndrom, jehož podstatou je závažná orgánová dysfunkce způsobená dysregulovanou odpovědí hostitele na infekci. Klíčovou úlohu v reakci na infekční inzult hraje patofyziologie imunitního systému, jak vrozená, tak získaná imunitní odpověď při rozvoji sepse či septického šoku, který představuje nejtěžší formu této nosologické jednotky. Nekompatovaná a pozdě diagnostikovaná infekce může fatálně ovlivnit i doposud zdravé jedince, zvýšeně náchylní jsou chroničtí pacienti s komorbiditami. Dramaticky nejvíce ohroženou skupinu představují kriticky nemocní pacienti všech věkových skupin se selháváním základních životních funkcí na jednotkách intenzivní péče. Rychlá a efektivní diagnostika hrozícího rozvoje septického stavu je pro zvládnutí nemoci a dobrý klinický výsledek rozhodující. Současná medicína využívá celou řadu diagnostických možností od stále důležité a neopomenutelné pečlivé anamnézy až po nejsložitější laboratorní, funkční či zobrazovací metody. Výraznou pomoc při časném rozpoznání sepse představují biomarkery, které by ideálně měly být komplexní pro časnou diagnostiku, prognózu, stratifikaci rizika onemocnění a jeho léčbu. Autoři v prezentaci předkládají výsledky studií zaměřené na dva parametry, které jsou levné, rychle dostupné a jsou součástí rutinně indikovaného vyšetření krevního obrazu s diferenciálním rozpočtem krevních buněk. Frakce nezralých trombocytů a granulocytů jsou předmětem zájmu klinických i výzkumných pracovníků při předpovědi zánětlivého procesu i v predikci tíže onemocnění a mortality. Následující text shrnuje dosavadní poznatky o nezralých formách krevních destiček a nezralých granulocytech v problematice sepse u pacientů v prostředí intenzivní péče.

Klíčová slova: sepsa, kriticky nemocný pacient, frakce nezralých trombocytů a granulocytů.

Early diagnosis of sepsis using immature forms of platelets and granulocytes

Sepsis is a heterogeneous dynamic syndrome characterized by severe organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection. The innate and adaptive immune response plays a key role in the response to infectious insult in the development of sepsis or septic shock, the most severe form of this nosological entity. Uncontrolled and late diagnosed infection can be fatal even in previously healthy individuals, chronic patients with comorbidities have an increased risk of developing sepsis. Critically ill patients of all ages with failure of basic life functions in intensive care units are the most at risk group. Rapid and effective diagnosis of impending septicemia is crucial for disease management and good clinical outcome. Modern medicine uses a range of diagnostic options from the ever-important and unforgettable anamnesis taking to the most sophisticated laboratory, functional or imaging methods. Biomarkers play an important aid in the early recognition of sepsis and should ideally be comprehensive for early diagnosis, prognosis, disease risk stratification and treatment. This review article notes two parameters that are inexpensive, rapidly available, and part of the routinely indicated blood count with differential blood cell budget. Immature platelet and granulocyte fractions are of interest to clinicians and researchers in the diagnosis of sepsis and in the prediction of disease severity and mortality. The following text summarizes the current knowledge about immature platelet and immature granulocyte forms, mainly in the field of sepsis in intensive care patients.

Key words: sepsis, critically ill patient, fraction of immature platelets and granulocytes.

Úvod

Navzdory úsilí experimentálního a klinického výzkumu se v posledních letech nedaří významně a pozitivně ovlivnit průběh sepse a septického

šoku, výsledky léčby tohoto onemocnění zůstávají celosvětově nelichotivé. Každoročně je globálně sepsí postiženo přibližně 49 milionů lidí a kvalifikované odhady hovoří o 11 milionech úmrtí v souvislosti

KORESPONDENČNÍ ADRESA AUTORA:

MUDr. Petr Dominik, dominik.petr@fnbrno.cz

Článek přijat redakcí: 6. 4. 2023; **Článek přijat k tisku:** 5. 6. 2023

Cit. zkr: Anest intenziv Med. 2023;34(2):51-60

s tímto syndromem, což představuje až 20 % všech úmrtí na celém světě [1]. Obecně se v souvislosti s novými poznatky lékařské vědy úmrtnost ve světě snižuje, přesto až 25 % infekčních pacientů zemře v důsledku rozvoje sepsy. I přes veškerý pokrok v diagnostice a léčbě kriticky nemocných je sepsa stále hlavní příčinou smrti na jednotkách intenzivní péče, kde nejtěžší formu představuje septický šok charakterizovaný těžkými oběhovými a metabolickými abnormitami s téměř 60% nemocniční úmrtností [2].

I samotná definice sepsy se v časové ose vyvíjí s ohledem na poznatky v patofyziologii imunitních mechanismů organismu, nicméně naše možnosti úspěšné a rychlé diagnostiky společně se specifickými terapeutickými přístupy zůstávají omezené. Přestože stále lépe rozumíme patofyziologii tohoto syndromu, dodnes neexistuje přesná metoda pro jeho rychlou diagnostiku [3], přičemž spolehlivá a zejména rychle stanovená diagnóza je podmínkou správné a efektivní léčby, která vede k prevenci orgánové dysfunkce, a tím ke snížení mortality a morbidit [4]. Včasná tekutinová resuscitace a podání širokospektrých antibiotik prokazatelně snižují úmrtnost společně se zahájením podpůrných opatření v léčbě sepsy [5]. Právě využití diagnostické i prediktivní úlohy specifických biomarkerů při odhalení sepsy nebo její odlišení od systémové zánětlivé odpovědi organismu na vyvolávající inzult (SIRS) je zásadní. Pozornost k získání jednoduchých, spolehlivých a všeobecně dostupných laboratorních biomarkerů zánětlivého procesu je předmětem neustálého zájmu v komplexním přístupu k problematice sepsy. Jedna z recentních prací s touto problematikou uvádí až 50 možných jednoduchých či složitých molekul (složky komplementu, chemokiny, cytokiny, DAMPs – damage-associated molecular patterns, receptory buněčných membrán apod.), které se v intenzivní medicíně používají pro diagnostiku a léčbu sepsy [6]. Nejčastější biomarkery používané v praxi a citované ve studiích jsou prokalcitonin, C-reaktivní protein, IL-6, presepsin, CD64, sTREM 1 a LBP [4]. Bezsporně mají velký diagnostický a prognostický význam, ale jsou rovněž známy jejich limity. Proto se hledají nové, klinicky významné, finančně racionální parametry – biomarkery s dostatečnou senzitivitou a specificitou pro diagnostiku sepsy – SIRS.

Biomarkery s těmito vlastnostmi by mohly být 2 parametry (IPF – frakce nezralých trombocytů, IG – nezralé granulocyty), které jsou součástí rutinního vyšetření krevního obrazu, a které podle výsledků nevelké skupiny studií u dospělých i dětských kriticky nemocných pacientů vypadají slibně.

Úloha krevních destiček a bílých krvinek v patofyziologii sepsy

Je známou skutečností, že granulocyty jako subpopulace bílé krevní řady, a trombocyty jsou efektorové buňky první linie v cílené imunitní obraně jedince vůči zdroji infekce. Krevní destičky, jejichž primární úlohou je proces hemostázy, hrají rovněž klíčovou roli v antimikrobiální obraně hostitele, protože podporují zánětlivou reakci a spouští koagulační kaskádu s možnou mikrotrombotizací [7]. Tyto procesy jsou zprostředkovány specifickými receptory na povrchu membrány trombocytů s následným uvolněním cytokinů

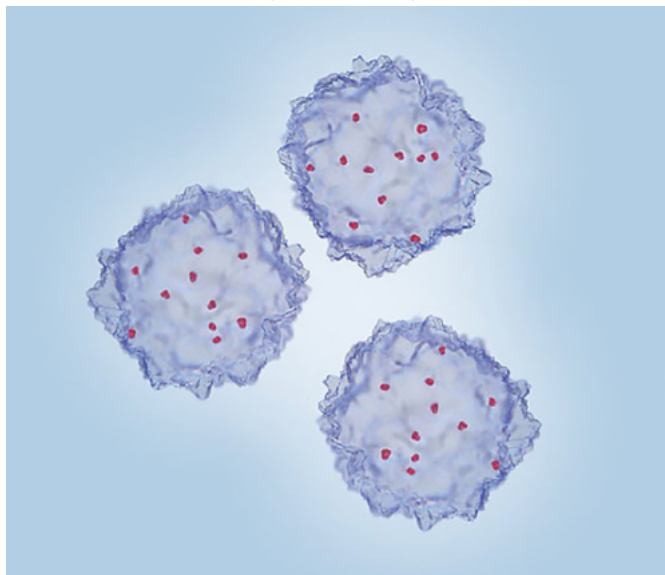
a chemokinů. Souběžně se objevují prozánětlivé cytokiny produkované hostitelem proti infekci, aktivují koagulační kaskádu, což vede k masivní tvorbě trombinu [8]. Aktivované trombocyty interagují s leukocyty a buňkami endotelu, které poskytují fosfolipidový povrch pro koagulaci, a následně jsou trombocyty spotřebovány zachycením na fibrinové síťce. Trombocytopenie je proto častá u pacientů s těžkou infekcí nebo sepsí a ukazuje na závažný patofyziologický stav spojený s koagulopatií.

Četné studie prokázaly, že trombocytopenie je spojena se špatnou prognózou kriticky nemocných pacientů [9]. Bylo prokázáno, že 30% pokles počtu krevních destiček během pobytu na jednotce intenzivní péče je spojen s vyšší mortalitou [10]. Kromě toho je trombocytopenie relevantním markerem závažné sepsy indukované koagulopatie a představuje nezávislý rizikový faktor mortality [11]. Všechny tyto procesy a faktory podmiňující pokles hladiny krevních destiček vedou zpětnovazebně ke zvýšené produkci a uvolňování nezralých forem trombocytů do oběhu.

Neutrofilní granulocyty představují nejpočetnější podskupinu bílé krevní řady reprezentující vrozený imunitní systém. Jsou hlavními efektorovými buňkami, které se podílejí na akutní fázi zánětu a eliminaci patogenů v případě bakteriální infekce. Hlavní chemotaktickou molekulou pro neutrofile je IL-8 [12]. Závažné bakteriální infekce vyvolávají uvolňování zralých i nezralých forem neutrofilů z kostní dřeně. Nezralé neutrofilní granulocyty, které vznikají na podkladě zpětných vazeb regulace imunitní odpovědi předčasným vyplavením z kostní dřeně, vykazují sníženou schopnost fagocytózy a mají schopnost spouštět oxidativního stresu na buněčné úrovni [13].

Krevní destičky a frakce nezralých destiček (immature platelet fraction – IPF)

Krevní destičky mají původ v kostní dřeni, kde z pluripotentní kmenové buňky vznikají kmenové buňky pro linii erytroidní a megakaryocytární. Vývoj megakaryocyty je charakterizován replikací chromatinu v jádře i změnami v cytoplazmě, která mění zabarvení a objevují se v ní azurofilní granule. Celý proces trvá přibližně 8 až 10 dní [14]. Další vývojová stadia při tvorbě krevních destiček představují promegakaryoblast, megakaryoblast, promegakaryocyt a konečně megakaryocyt, který se již nedělí a pouze vyzářává. Ten je z vývojové řady největší buňkou, má výrazné laločnaté jádro bez jadérek, cytoplazma je charakterizovaná jemnou granulací a povrchovým zvrásněním [15]. Z vyzrálého megakaryocyty jsou trombocyty uvolňovány do periferní krve procesem tvorby pseudopodií mezi endotelovými buňkami do sinusů kostní dřeně. V cytoplazmě pomocí mikrotubulů dojde k přemístění organel a definitivnímu oddělení od megakaryocyty, který dokáže vytvořit 1 000 až 3 000 destiček. Trombocyty mají diskoidní tvar, jsou několikanásobně menší než předcházející buňky příslušné vývojové řady, jsou bezjaderné, cytoplazma charakteristická přítomností 3 typů granul a membrána je vybavená specifickými destičkovými receptory. Životnost krevních destiček je za fyziologických podmínek 9 až 12 dní se zánikem v endotelu cév.

Obr. 1. IPF – nezralé destičky (podle www.sysmex-europe.com)

Frakce nezralých trombocytů

Nezralé trombocyty (IPF – immature platelet fraction) se liší v několika ohledech od shora stručně popsaných trombocytů (Obr. 1). Předčasně vyplavené nevyzrálé trombocyty uvolněné z kostní dřeně se označují jako nezralé krevní destičky, nebo rovněž retikulované trombocyty s obsahem zbytků RNA větší velikosti než u zralých forem. IPF jsou ukazatelem trombopoézy v kostní dřeně, obecně řečeno při vysokém počtu destiček v periférii měříme malé zastoupení IPF a naopak [16]. Právě přítomnost zbytků ribonukleové kyseliny umožňuje jejich detekci a kvantifikaci pomocí automatizovaných laboratorních analyzátorů, které využívají měření intenzity fluorescenčního světla k detekci RNA a bočního světelného detektoru ke zjištění velikosti destičky [17]. Kombinace těchto dvou fyzikálních jevů umožňuje odlišení IPF od ostatních buněčných forem krevního obrazu a jejich vyjádření buď v absolutním počtu vztaženém k objemu krve ($\times 10^9/\text{ml}$) nebo jako procentuální zastoupení nezralých destiček k celkovému počtu trombocytů (IPF%). Referenční hodnoty uvedených parametrů závisí zejména na použité metodě a přístrojovém vybavení laboratoře, na věku a pohlaví. V našich podmínkách nejčastěji automatizované analyzátory firmy Sysmex uvádějí referenční rozmezí IPF% pro dospělou populaci v rozmezí 1,1–6,1 %.

Vztah IPF a trombocytopenie

Počet IPF tudíž poskytuje informaci o aktuálním stavu a funkci kostní dřeně z hlediska trombopoézy. Parametr nezralých krevních destiček se mění dle vyvolávající příčiny trombocytopenie. Trombocytopenie způsobená nedostatečnou produkcí nových trombocytů v kostní dřeně je typická pro aplastickou anémii, akutní leukemii, myelodysplastický syndrom, pro chemo/radioterapii a provází ji normální nebo snížené množství IPF. Naopak zvýšené hodnoty tohoto parametru nacházíme při zvýšené destrukci trombocytů v periferní krvi jako při trombotické trombocytopenické purpře, hemolyticko-uremickém syndromu, diseminované intravaskulární koagulopatii a v neposlední řadě i při sepsi [15]. Rovněž sledování dynamiky parametru IPF napomáhá při načasování substituční terapie trombocytárním koncentrátem. Transfuze

trombocytů je indikována při nízkých a nestoupajících hodnotách IPF%, které odpovídají nízké trombopoetické aktivitě v kostní dřeně.

Úloha parametru IPF (immature platelet fraction) u kriticky nemocných pacientů

První původní práce s tematikou nezralých forem trombocytů a granulocytů jsou nejčastěji unicentrické, prospektivní nebo retrospektivní na relativně malém počtu pacientů jednotek intenzivní péče v počtu desítek nebo nízkých stovek kriticky nemocných pacientů.

Jednu z prvních publikací představil R. A. De Blasi et al. se snahou prokázat prediktivní schopnost nezralých destiček v diagnostice sepsy u kriticky nemocných pacientů [13]. Prospektivní unicentrická studie byla založena na 7denním pozorování pacientů, kteří byli přijati na všeobecnou jednotku intenzivní péče v kritickém stavu, ale při přijetí ani v prvních 24 hodinách neměli diagnostikovanou či potvrzenou sepsi. Cílem bylo zjistit, zda koncentrace IPF% měřená při přijetí a v dalších 7 dnech je senzitivní a specifický biomarker, který předpovídá vývoj pacienta do sepsy a rovněž jeho porovnání s nejčastěji používanými markery infekce (C-reaktivní protein, prokalcitonin). Dalším cílem bylo zjištění korelace koncentrace IPF% a tíže onemocnění. Kontrolní skupinu představovali pacienti ze stejného časového období, u kterých se potvrdila kritéria sepsy při přijetí nebo do 12 hodin od počátku pobytu na JIP. Jediný laboratorní parametr, který ve skupině původně neseptických pacientů dokázal předpovědět jejich vývoj do sepsy, byl právě IPF% v plazmě ($p < 0,001$; hladina $> 4,7$ %: senzitivita 56,2 % IC 37,7–73,6; specifita 90,0 % IC 73,4–97,8). Biomarkery IPF% a PCT byly statisticky významně vyšší u pacientů se sepsí při příjmu nebo v průběhu týdenního sledování než u těch, u kterých se sepsa nerozvinula (IPF%: $p = 0,017$; PCT: $p = 0,030$). Hodnoty IPF% nebyly závislé na koagulačních faktorech, nekorelovaly s hodnotami IG nebo WBC. Nezralé trombocyty nejspíše reflektují časovou odpověď a reaktivitu kostní dřeně na infekci a jejich elevace předchází klinické manifestaci o 2 dny. Tedy zvýšená hodnota IPF% u neseptických pacientů při přijetí nebo v průběhu pobytu na JIP je prognosticky významná s vývojem pacienta do sepsy.

Jen s malým časovým odstupem vychází studie z Jižní Asie autorů Sang Hyuk Park et al. s názvem Nezralé trombocyty u septických pacientů, s několika cíli zaměřenými na výkonnost IPF a IG v porovnání s jinými biomarkery [18]. Do studie bylo zařazeno celkem 312 dospělých pacientů přijatých na multioborovou jednotku intenzivní péče ($N = 186$) a na ICU ($N = 126$), následně byli rozděleni do pěti podskupin (neseptická ($N = 47$), neseptická s lokální infekcí, ($N = 50$), nekomplikovaná sepsa ($N = 64$), těžká sepsa ($N = 61$) a septický šok ($N = 90$) v závislosti na klinickém nálezů v době odběru vzorků. Jako biomarkery sepsy byly použity ke srovnání a statistickému zpracování laktát (LA), prokalcitonin (PCT), C-reaktivní protein (CRP), nezralá frakce granulocytů (IG%), nezralá frakce retikulocytů (IRF%) a trombocytů (IPF%). Všechny zmíněné sledované biomarkery byly významně vyšší u septických pacientů v porovnání s neseptickými. Ze šesti biomarkerů měly nejlepší výsledky PCT i CRP, jejichž specifita (100 %, 95 % [CI] 87,1–100 % resp. 97,9 %, 95 % [CI] 88,9–99,6 %) i pozitivní prediktivní hodnota pro odlišení septických od neseptických pacientů (100 %, resp. 99,4 %) byly velmi vysoké. Parametr IPF% vykazoval srovnatelnou výkonnost s PCT, CRP, LA

a IG% a vykazoval významně lepší statistický výsledek než IRF ($p = 0,007$). Pozoruhodné je, že IPF% vykázal nejvyšší senzitivitu (84,2 %, 95%CI 78,7–88,5 %) a specificitu (78,0 %, 95 % CI 64,8–87,2 %) ze všech šesti biomarkerů, když byla jako cut-off IPF% použita hodnota 3,1 %. V této práci se neprokázala pozitivní úloha nezralých trombocytů při rozlišení závažnosti stavu septických pacientů, zde nejcitlivějším parametrem byla hladina kyseliny mléčné.

Enz Hubert et al. studovali v retrospektivní studii populaci 41 dospělých pacientů přijatých v průběhu jednoho měsíce na jednotky intenzivní péče se zaměřením na vztah mezi počtem nezralých trombocytů a retikulocytů při diagnostice sepsy a zjištění korelace k tíži orgánového poškození u jednotlivých forem sepsy (19). Hodnoty parametrů IPF% a IRF% byly odebrány nejpozději 24 hodin od přijetí do prostředí intenzivní péče. Oba studované parametry IPF% i IRF% byly vyšší u pacientů se sepsí než u zdravých pacientů, ale obě hodnoty nezralých forem nedokázaly odlišit pacienty v sepsi od nemocných se syndromem systémové zánětlivé odpovědi. Aby bylo možné vyhodnotit, zda IPF% nebo IRF% souvisí se závažností sepsy, byli pacienti s těžkou sepsí nebo septickým šokem porovnání s pacienty s nekomplikovanou sepsí. Hodnoty IRF% byly mezi těmito dvěma skupinami podobné, naproti tomu parametr IPF% byl významně vyšší u pacientů s těžkou sepsí ve srovnání s nekomplikovanou sepsí. Podobné nálezy byly pozorovány i u pacientů stratifikovaných podle mediánu skóre SOFA, přičemž pacienti se SOFA ≥ 6 vykazovali významně vyšší IPF% oproti pacientům se SOFA ≤ 6 (IPF = 6,2% vs. 2%; $p = 0,02$).

Po úvodních klinických demonstracích prospěšnosti a účelnosti používání nezralých forem trombocytů v procesu diagnostiky septických pacientů pokračuje T. Murolo et al. v klinickém výzkumu prediktivního využití IPF v situaci konsumpční koagulopatie a jeho dopadu na mortalitu pacientů v sepsi [20]. Doposud nebyl hodnocen IPF jako prediktor koagulopatie a poklesu trombocytů kriticky nemocných pacientů. Proto cílem studie této pracovní skupiny bylo posouzení, zda IPF je časným prediktorem poklesu počtu trombocytů v důsledku konsumpční koagulopatie a zda souvisí s nemocniční mortalitou septických pacientů. Do studie bylo zařazeno celkem 149 pacientů s počtem trombocytů $\geq 80 \times 10^3/\mu\text{l}$ v době přijetí na jednotku intenzivní péče, přičemž prospektivně bylo hodnoceno 101 nemocných se sepsí, kontrolní skupinu představovalo 48 intenzivně nemocných bez sepsy. Při přijetí byla zjištěna hodnota IPF% a následně sledován vývoj poklesu počtu trombocytů (definován jako snížení o 30 % vstupní hodnoty nebo absolutní snížení pod hladinu $80 \times 10^3/\mu\text{l}$) za 5 dní od admise a konečně sledována úmrtnost za 28 dní. K hodnocení trombopoézy byl zaznamenáván absolutní počet nezralých trombocytů (AIPC). Výsledky byly hodnoceny u 47 pacientů se sepsí s poklesem počtu krevních destiček dle definovaných kritérií. Vstupní hodnota IPF% byla nejvyšší u pacientů, u nichž došlo během 5 dní k poklesu počtu trombocytů, následovali pacienti bez poklesu počtu trombocytů a nejmenší IPF% měla kontrolní skupina (medián 4,3 % (3,1–8,1 %) vs. 3,7 % (2,6–4,6 %) vs. 2,1 % (1,6–3,5 %); $p < 0,0001$). Koagulační nerovnováha byla výraznější u septických pacientů s registrovaným poklesem počtu krevních destiček. Proběhlo porovnání parametru IPF% při přijetí a skóre APACHE II u septických pacientů, kteří následně zemřeli do 28 dnů, s těmi, kteří

přežili. Zemřelí vykazovali významně vyšší hodnotu IPF% a APACHE II skóre při přijetí než přeživší (IPF: 8,2 % (5,6–10,9 %) vs. 3,8 % (2,7–5,7 %), $P = 0,0003$; APACHE II: 30,5 (27,3–34,0) vs. 19,0 (16,0–26,0), $P = 0,0008$). Statistickým hodnocením byla zjištěna skutečnost, že parametr IPF% byl silným nezávislým prediktorem mortality po 28 dnech hospitalizace.

Tyto první studie strhávají pozornost ostatních pracovišť a autorů k podobným výzkumným záměrům s využitím jednoduchých a dostupných parametrů krevního obrazu, stejně jako hledání odpovědí na patofyziologické aspekty spotřeby trombocytů v sepsi a jejich uvolňování z kostní dřeně. Dříve zmiňované uvolňování nových nezralých trombocytů v sinusoidách kostní dřeně pomocí mikrotubulů v cytoplazmě megakaryocytů [21] je doplněno o novou patofyziologickou cestu, kdy v situaci zánětem indukované trombocytopenie je za uvolňování nezralých forem destiček odpovědný Interleukin 1 alfa. Tento patofyziologický proces vede spíše k ruptuře megakaryocytů s uvolněním IPF než k uvolňování nezralých forem pomocí mikrotubulů. I tento proces má za následek excesivní uvolnění nezralých trombocytů s větším středním objemem (MPV) a menším množstvím mikrotubulů v cytoplazmě [22].

Několik dalších studií si klade za cíl ověření užitečnosti nezralé frakce krevních destiček jako diagnostické a prognostické metody u septických pacientů. V observační studii, která zahrnovala prozatím nejvyšší počet zkoumaných pacientů s tematikou IPF ($N = 535$ dospělých pacientů s neutrofilii), Di Mario et al. prokázali statistickou významnost mezi elevací IPF u pacientů s pozitivní hemokulturou [23]. Podobné výsledky jako De Blasi prezentuje Buoro S. et al. [24], který pozoroval nárůst absolutního počtu nezralých krevních destiček (IPF#) 2 dny před klinickou manifestací sepsy. Parametr IPF měl lepší výkonnost v porovnání s hodnotou CRP a počtem retikulocytů v předpovědi vzniku sepsy.

Parametr IPF hodnotí Okasha D. et al., kteří pracují se specifickou podskupinou neutropenických pacientů s cílem zjištění významu nezralých trombocytů a jejich prediktivní schopnosti vývoje klinického stavu a mortality u pacientů náchylných k sepsi [25]. Byly srovnávány 2 skupiny pacientů na jednotce intenzivní péče, 104 neutropenických vs. 138 přijatých bez neutropenie. Parametr IPF byl vyšší u pacientů bez neutropenie než u neutropenických pacientů, což naznačuje predikci vývoje sepsy u těch pacientů, jejichž kostní dřeň nebyla ohrožena v důsledku chemoterapie. Vysoká hodnota IPF souvisela s delším pobytem v nemocnici, úmrtím a špatným hemodynamickým stavem.

S parametrem retikulovaných nezralých trombocytů pracují 2 skupiny lékařů v Jižní Asii, Qin-Hua Liu et al. [26] a Qin Wu et al. [27]. Qin-Hua Liu zkoumal vztah diagnostiky sepsy mezi retikulovanými trombocyty (RP) a dalšími zvyklými biomarkery se zařazením 190 dospělých pacientů. V 89 případech byla diagnostikována sepsy, 39 pacientů mělo těžkou sepsí a 18 septický šok, 70 neseptických dospělých kriticky nemocných představovalo kontrolní skupinu. Výsledky ukázaly užitečný parametr RP% při předvídání rozvoje sepsy při použití cut-off hodnoty 5,5 % a prokázaly lepší výsledky než jiné rutinní laboratorní markery (WBC, CRP, prokalcitonin). Parametr RP% při kalkulaci společně s prokalcitoninem měly statistickým hodnocením zjištěnou vysokou senzitivitu 90,41 % a specificitu 90,9 % pro časnou diagnostiku sepsy.

Qin Wu et al. [27] na chirurgické jednotce intenzivní péče srovnával 68 pacientů v septickém šoku s kontrolní skupinou 68 neseptických pacientů. Retikulované trombocyty byly měřeny do dvou hodin od přijetí pomocí průtokové cytometrie z žilní krve. Biomarker RP% byl vyšší u zemřelých pacientů v sepsi než u přeživších. Při porovnání mezi nezralou formou trombocytů, PCT a laktátem, byly nezralé formy výkonnějším diagnostickým i prognostickým prediktorem sepse a 28denní mortality. Senzitivita a specifita mezi přeživšími a nepřeživšími při referenční hladině retikulovaných trombocytů 8,77 % byla 88 % resp. 84 %. Pozitivní a negativní prediktivní hodnoty RP% pro identickou klinickou charakteristiku souboru byly 66 % a 95 %.

Mezi recentní výzkumné práce patří srovnání IPF a PCT z hlediska závažnosti sepse u 64 dospělých septických pacientů autorů Djuang M. H. et al. [28]. Podle této studie nevykazovala frakce IPF žádné statisticky významné rozdíly při zhodnocení tíže sepse při porovnání parametrů IPF, PCT, počtu trombocytů ani se středním objemem krevních destiček. Naproti tomu Nathan Jones et al. [29] porovnával u 82 pacientů IPF, AIPC, PCT, laktát a CRP z hlediska rozlišení mezi pacienty s bakteriemií a bez bakteriemií. U pacientů s bakteriemií byly IPF% a AIPC (absolutní počet nezralých trombocytů) výrazně zvýšené oproti nemocným, kteří neměli bakteriemií a byly schopny detekovat tyto pacienty dříve než hodnota CRP a hladina laktátu.

IPF a pediatrická problematika

Situace v dostupnosti a množství publikovaných dat s danou problematikou u pediatrické populace je ještě mnohem svízelnější než u dospělých nemocných. Je to dáno jednak odlišnou charakteristikou vyvíjejícího se imunitního systému, tak specifickou úlohou trombocytů jako first responderů zejména u novorozenců a kojenců. Tudíž absence dat z pediatrické kohorty je více než zřejmá. Sepse, dysregulovaná reakce hostitele na infekci, je u dětí obtížně definovatelná. Nespecifický klinický obraz spolu s nedostatkem ověřených biomarkerů brání v přesnějším a rychlém určení rozvíjející se sepse. Krevní destičky, které jsou tradičně považovány za mediátory hemostázy a trombózy, jsou stále častěji spojovány s funkcemi v imunitním systému s účastí v celém spektru vrozených a adaptivních funkcí imunity. V celosvětovém měřítku se odhadují 3 miliony případů novorozenecké sepse a 1,2 milionu případů pediatrické sepse ročně [30]. Proto mnoho neonatologů a pediatriů léčí podezření na sepsi empiricky s cílem eliminace opožděné diagnózy, a tím zabránění vzniku horších výsledků morbidit a mortality [31]. I přes intenzivní výzkum v posledních dekáдах není definován spolehlivý a rychlý biomarker validovaný v rámci EBM, který by přesně diagnostikoval sepsi v průběhu bakteriální či jiné infekce při projevech dysregulační odpovědi hostitele [32].

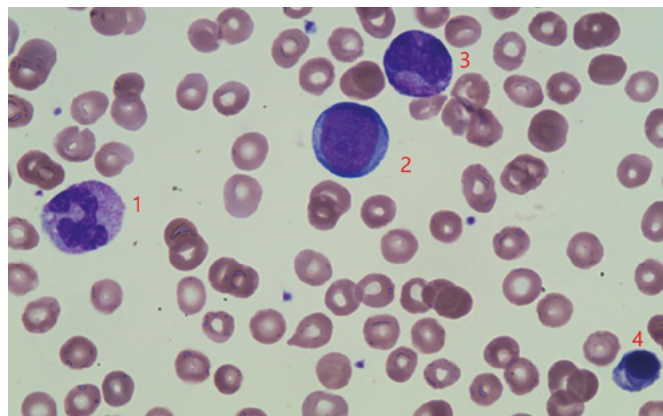
Jednou z mála publikovaných studií, která se věnuje problematice nezralých forem trombocytů a granulocytů u dětí, je práce autorů Turkmen et al. [33]. Během 30 měsíců bylo v dětské univerzitní nemocnici zařazeno 190 pacientů, z toho 125 kriticky nemocných (septických i neseptických), kteří byli přijati na pediatrickou jednotku intenzivní péče s různými diagnózami. 65 zdravých dětí představovalo kontrolní skupinu. Kritický stav byl definován jako život ohrožující, multisystémové onemocnění, které může mít za následek významnou morbiditu nebo

mortalitu. V den přijetí vyšetřen krevní obraz včetně nezralých forem, dále CRP, PCT a hemokultura. Nebyl zaznamenán rozdíl ve skóre PRISM a PELOD II mezi septickými a neseptickými dětmi ze skupiny kriticky nemocných. Když byli kriticky nemocní pacienti hodnoceni podle pozitivitivity hemokultur, klinických a laboratorních údajů, pak 62,4 % dětí bylo klasifikováno jako septičtí a 37,6 % jako neseptičtí. Hodnoty CRP, PCT, IG a IPF byly statisticky významně vyšší ve skupině septických pacientů než ve skupině neseptické. Při zjišťování účinnosti jednotlivých biomarkerů sepse bylo dosaženo následných hodnot sensitivity a specifity. Pro CRP vyšší než 47,5 mg/l byla senzitivita 61,5 % a specifita 85 %, pro PCT vyšší než 0,9 ng/ml byla senzitivita 80 % a specifita 77 % a konečně pro IPF% nad 2,7 % hodnocena senzitivita 67 % a specifita byla 61 %. Jedná se o první prospektivní studii, která srovnává hodnoty CRP, PCT, IG a IPF u kriticky nemocných pediatrických pacientů se zjištěním, že zmíněné biomarkery (CRP, PCT, IPF%) byly vyšší u septických pacientů v korelaci s neseptickými pacienty se statistickou významností.

Bílá krevní řada a nezralé granulocyty (immature granulocytes – IG)

Nezralé granulocyty (IG) zahrnují metamyelocyty, myelocyty a promyelocyty a jsou prekurzory neutrofilů. Zastoupení IG lze měřit pomocí automatických hematologických analyzátorů a elevované hodnoty počtu IG zjištěné v periferní krvi ukazují na zvýšenou aktivitu kostní dřeně [34]. Existuje několik forem nezralých neutrofilů, které se objevují v průběhu granulopoese v kostní dřeni. Na počátku proliferace bílé krevní řady opět stojí pluripotentní kmenová buňka, ze které se postupně vytváří zástupci bílých krvinek. Po sedmidenním mitotickém stadiu (myeloblast, promyelocyt, myelocyt) následuje sedmidenní maturační stadium (myelocyt, metamyelocyt, tyčka, neutrofil se segmentovaným jádrem) a zralé neutrofilů jsou uskládněny v kostní dřeni a připraveny k vyplavení do periferní krve (Obr. 2). Polymorfonukleární neutrofilní granulocyty jsou efektorové buňky první linie v obraně organismu proti infekci a tvoří 50 až 60 % všech cirkulujících leukocytů. IG nejsou u zdravých jedinců přítomny v periferní krvi, a proto je jejich přítomnost považována za významně zvýšenou aktivaci kostní dřeně, jak je vidět u sepse [4]. Do skupiny nezralých granulocytů, které jsou k dispozici při vyšetření krevního obrazu s diferenciálním počtem bílých krvinek, patří promye-

Obr. 2. Populace vyzrávajících granulocytů v záplavě červených krvinek: 1 – neutrofilní segment, 2 – myeloblast, 3 – neutrofilní metamyelocyt, 4 – erytroblast (NRBC). Z archivu Oddělení dětské hematologie a biochemie LF a FN Brno



locyt, myelocyt a metamyelocyt. Nezralé granulocyty mají pevnější membránu než zralé neutrofilie, tento rozdíl v buněčné reologii může mít vliv na akumulaci nezralých neutrofilů v mikrovaskulatuře orgánů. Prodloužená interakce s cévním endotelem může zapříčinit hypoxii vlivem hypoperfuze a může být příčinou mikrovaskulární obstrukce.

Nezralé granulocyty se s výjimkou novorozenců a těhotných žen prakticky nevyskytují v periferní krvi u lidí. Jejich přítomnost poukazuje na reaktivní fázi kostní dřeně jako odpověď na přítomnost infekce a závažné reakce. Stanovení absolutní nebo percentuální hodnoty IG se využívá zejména v prostředí intenzivní péče při časně diagnostice sepse a rovněž u imunokompromitovaných pacientů v ohrožení bakteriální či virové infekce, neboť indikují prvotní akutní fázi imunitního systému při odpovědi na závažný proces v organismu [35].

Úloha parametru IG (immature granulocytes) u kriticky nemocných pacientů

Podobně jako u parametru IPF je absolutní nebo relativní hodnota nezralých granulocytů (IG – immature granulocytes) sledována a zkoumána v posledním desetiletí se zvýšeným zájmem.

Mezi prvními Nierhaus et al. [3] provedl studii s cílem zjistit, zda hladina nezralých granulocytů (IG) je ve srovnání s jinými biomarkery vhodná pro časnou diagnostiku sepse. Do studie bylo zařazeno celkem 70 po sobě jdoucích pacientů na chirurgické jednotce intenzivní péče, kdy IG byly měřeny ze vzorků plné krve pomocí automatizovaného analyzátoru a porovnávány s hladinou C-reaktivního proteinu (CRP), proteinu vázajícího lipopolysacharid (LBP) a interleukinu-6 (IL-6). Doba sledování pacientů trvala maximálně 21 dní a skončila propuštěním pacientů z jednotky intenzivní péče nebo úmrtím. Bylo prokázáno, že parametr IG je výrazně vyšší u pacientů s infekcí a tudíž spolehlivě odlišuje dospělé pacienty s infekcí od neinfekčních. V této kohortě měl počet IG% vyšší senzitivitu (89,2 %) a specifitu (76,4 %) než ostatní parametry (CRP, LBP a IL-6), které zaznamenaly senzitivitu pod 68 %. Hodnota IG% má tedy lepší schopnost odlišit infekci než CRP, LBP a IL-6, zvláště v prvních 48 hodinách od začátku SIRS. V průběhu onemocnění ukázaly analýzy ROC lepší pozitivní prediktivní hodnotu IG% pro odlišení neinfekčních pacientů ve srovnání s ostatními ukazateli během prvních pěti dnů po splnění kritérií SIRS. Nicméně počet IG% nebyl v korelaci s úmrtností na jednotce intenzivní péče.

V studii Diagnostický a prognostický význam sledování množství nezralých neutrofilů v krvi u pacientů se systémovým zánětem autorů Mare T. A. et al. [35] byla sledována korelace mezi množstvím IG% u infekčních a neinfekčních pacientů a jejich prognostický význam vzhledem k mortalitě. Retrospektivní zaslepená studie pracovala se 136 kriticky nemocnými a 20 zdravými pacienty v kontrolní skupině. Dle klinických a laboratorních parametrů bylo provedeno rozdělení na podskupiny se SIRS (n = 122) a pacienty bez SIRS (n = 14), pacienti se SIRS byli následně rozděleni do kategorií definitivní sepse (n = 51), možná sepse (n = 32) a neinfekční SIRS (n = 39). Nezralé neutrofilie v krevních nátěrech byly identifikovány podle jaderné morfologie a cytoplazmatického barvení. U většiny pacientů se SIRS byly přítomny nezralé formy (66 %) ve srovnání s pacienty bez SIRS (29 %; $P < 0,01$) a se zdravými osobami (0 %). Prevalence

IG% byla vyšší u definitivní sepse (průměr = 82 %) než u pacientů s možnou sepsí (průměr = 63 %; $P < 0,05$) nebo s neinfekčním SIRS (průměr = 39 %; $P < 0,001$) a měly senzitivitu 84 % a specifitu 71 % pro detekci definitivní sepse. Pacienti, kteří zemřeli do 1 týdne od odběru vzorku krve, měli vyšší hladiny myelocytů a metamyelocytů (median IG% = 9 %; $P < 0,05$) než pacienti, kteří zemřeli za 2 až 4 týdny (median IG = 0,5 %). Tedy u septických pacientů hodnota nezralých neutrofilů IG% korelovala se závažností stavu a predikovala zhoršení stavu pacienta.

V problematice nezralých forem granulocytů pokračuje Laura S. Ayres et al. [36] otázkou, zda je index IG časný marker sepse. Ve studii byla stanovena hodnota nezralých granulocytů IG% vyšší než 2 % jako ukazatel rizika sepse. Cílem této studie bylo zhodnotit IG% jako prediktor sepse ve srovnání s výsledky kultivace krve a potvrzením sepse. U dospělých pacientů obou pohlaví v celkovém počtu 301 byla vyšetřena hodnota IG% a rovněž hemokultura. Pozitivní hemokultury byly zjištěny u 37 pacientů (12,3 %), počet pacientů s pozitivní krevní kulturou a IG% $\geq 2,0$ % byl 16 (43,2 %). Provedenou analýzou byla zjištěna statistická souvislost mezi výsledky krevní kultivace a IG% ($P = 0,009$). Celkový počet potvrzených případů sepse byl 169 (56,1 %) a následně prokázána statistická souvislost mezi potvrzením diagnózy sepse a IG% ($P < 0,001$). Dále studie prokázala, že počet IG% $< 2,0$ % je užitečná při vyloučení diagnózy sepse s velmi vysokou specifikou (90,9 %). Výsledkem je rovněž konstatování, že IG% je užitečným a efektivním doplňkem markerů pro potvrzení sepse, který umožňuje včasné zahájení terapie, a tím dosažení lepších výsledků léčby.

Jednoduchost a dostupnost parametru IG% se pokusili využít autoři Park J. S. et al. [37] v diagnostice akutní apendicitidy u dospělých pacientů v porovnání s jinými markery tohoto onemocnění (WBC, CRP). Retrospektivní analýza více než 400 pacientů s podezřením na akutní zánět červovitého výběžku prokázala zvýšené parametry zánětu (CRP, WBC, IG%) u potvrzené zánětlivé formy (50,6 %) včetně komplikované apendicitidy v porovnání s pacienty bez apendicitidy. Nicméně IG% nebyl shledán jako užitečný nástroj k odlišení akutní apendicitidy a její komplikované formy (medián 0,3 % v obou skupinách), rovněž ROC analýza zastoupených markerů zánětu byla u IG% nejnížší.

Po zhruba patnácti letech výzkumu se zaměřením na klinickou využitelnost různých nezralých forem neutrofilních granulocytů provádí Park H. J. [38] v roce 2018 systematickou review analýzu, do které je zařazeno pouze 12 článků splňujících kritéria z pohledu EBM. Byl zkoumán tzv. delta neutrophil index (DNI), který je reprezentován nezralými formami bílé krevní řady jako diagnostický nástroj sepse a prediktor morbidity a mortality. V metaanalýze bylo přezkoumáno 499 nemocničních případů a 9549 kontrol. DNI jako prediktor infekce měl senzitivitu 0,67 (95% CI 0,62–0,71, $I^2 = 86,0$ %) a specifitu 0,94 (95% CI 0,94–0,95, $I^2 = 92,8$ %). Plocha pod křivkou ROC byla 0,89. Jako prognostický faktor pro úmrtí u infikovaných pacientů měl DNI senzitivitu 0,70 (95% CI 0,56–0,81, $I^2 = 0,0$ %) a specifitu 0,78 (95% CI 0,73–0,83, $I^2 = 26,6$ %). Závěr této analýzy ukazuje nezralé formy granulocytů (zde charakterizované jako DNI index) jako potenciálně užitečný diagnostický nástroj infekce a prediktor mortality infikovaných pacientů s doporučením, že by měl být v klinické praxi více využíván.

Tab. 1. Přehled studií s problematikou sepse a IPF (immature platelet fraction)

Autor, rok, typ studie N (počet pacientů)	Téma	Výsledky
De Blasi R. A. et al. 2013, unicentrická prospektivní kohortová studie, N = 64	IPF jako prediktor rozvoje sepse u kriticky nemocných pacientů.	Hodnota IPF% vyšší u pacientů se sepsí při příjmu i v průběhu hospitalizace v porovnání s neseptickými. IPF% jediný parametr v predikci sepse ($p < 0,001$; IPF% 4,7 %: citlivost 56,2 %, specifická 90,0 %).
Sang Hyuk Park et al. 2015, unicentrická prospektivní kohortová studie, N = 312	Rozlišení jednotlivých úrovní sepse, lokální infekce a neinfekčních pacientů na ICU.	IPF% vykázal nejvyšší senzitivitu (84,2 %) a specifitu (78,0 %) ze všech sledovaných biomarkerů sepse, když byla jako cut-off IPF% použita hodnota 3,1 %, ale nedokázal rozlišit závažnost sepse.
Hubert E. et al., 2015, unicentrická retrospektivní studie, N = 41	Asociace mezi hladinou IPF a IRF při diagnostice sepse a jejich vztah k tíži orgánového poškození u jednotlivých forem sepse.	Parametr IPF% vyšší u septických než u zdravých pts, rovněž výrazný rozdíl hladin u těžké formy sepse, pacienti se SOFA ≥ 6 vykazovali významně vyšší IPF% (IPF = 6,2 % vs. 2%; $p = 0,02$) oproti pacientům se SOFA ≤ 6 .
Murono T. et al., 2016, unicentrická prospektivní studie, N = 149	IPF jako ukazatel poklesu počtu trombocytů v důsledku konsumpční koagulopatie a predikce nemocniční mortality septických pacientů.	IPF% byl nejvyšší v kategorii pacientů s poklesem destiček na ICU, méně zvýšený byl u pacientů bez poklesu trombocytů. IPF % byl silným nezávislým prediktorem 28denní mortality.
Buoro S. et al., 2018, unicentrická prospektivní studie, N = 62	Inovativní hematologické parametry (IPF) pro včasnou diagnostiku sepse u dospělých pacientů přijatých na ICU.	IPF byl porovnáván s CRP s výsledkem, že IPF poskytuje významné klinické údaje pro předpověď vzniku sepse s 2 denním předstihem.
Okasha D. et al., 2014, unicentrická prospektivní studie, N = 242	Nezralá frakce krevních destiček předpovídá výsledek nemoci a rozvoj sepse u kriticky nemocných pacientů s neutropenií.	IPF% byl vyšší u pacientů bez neutropenie než u pacientů s neutropenií. Rovněž byl schopen předpovědět rozvoj sepse u pacientů, kteří neměli neutropenii. Vysoká hodnota IPF souvisela s delším pobytem v nemocnici, úmrtím a špatným hemodynamickým stavem.
Wu Q. et al., 2015, unicentrická prospektivní studie, N = 192	Jsou elevované retikulované trombocyty spojeny se zvýšenou mortalitou u pacientů v septickém šoku?	RP% resp IPF% byly výrazně vyšší u zemřelých se sepsí v porovnání s přeživšími septickými pacienty. Senzitivita parametru IPF% při hladině 8,77 % byla 88 % a specifita 84 % mezi přeživšími a nepřeživšími.
Liu Q. et al., 2017, unicentrická prospektivní studie, N = 136	Predikce sepse pomocí retikulovaných trombocytů a jejich porovnání s ostatními biomarkery sepse.	Parametr RP% při predikci rozvoje sepse při použití cut-off hodnoty 5,5 % prokázal lepší výsledky než jiné rutinní laboratorní testy. RP% v kombinaci s PCT vykazovaly senzitivitu 90,41 % a specifitu 90,9 %.
Djuang, M. H. et al., 2018, unicentrická cross-sectional study, N = 64	Porovnání IPF a PCT při zhodnocení tíže bakteriální sepse.	Parametr IPF nekoreloval se skupinami pacientů se sepsí, kteří byli rozděleni dle hodnot PCT.
Jones N. et al., 2020, unicentrická prospektivní studie, N = 82	Srovnání parametrů IPF%, IPF#, PCT, CRP, laktát u pacientů na ICU s bakteriemií a bez bakteriémie.	U pacientů s bakteriemií byly IPF% a IPF# výrazně zvýšené oproti nemocným, kteří neměli bakteriemií, a byly schopny detekovat tyto pacienty dříve než hodnota CRP a hladina laktátu.
Turkmen, D. et al., 2022, unicentrická pediatrická prospektivní studie, N = 190	Srovnání parametrů IPF, IG, PCT, CRP, hemokultur u kriticky nemocných septických, neseptických a zdravých dětí.	PCT, IG a IPF byly statisticky významně vyšší ve skupině septických pacientů než ve skupině neseptických kriticky nemocných. Pro CRP vyšší než 47,5 mg/l senzitivita 61,5 % a specifita 85 %, pro PCT vyšší než 0,9 ng/ml byla senzitivita 80 % a specifita 77 % a konečně pro IPF% nad 2,7 % hodnocena senzitivita 67 % a specifita byla 61 %.

Recentní zajímavá práce z méně vyspělého světa (mortalita těžké sepse v Indii 62 %) autorů Bhansaly P. et al. [39] si kladla za cíl srovnání absolutního (IG#) a relativního (IG%) počtu nezralých granulocytů se zavedenými infekčními parametry séra PCT a laktátem na jednotce intenzivní péče u kriticky nemocných neinfekčních pacientů a jejich vývojem v časové ose. V prospektivní observační studii bylo 137 kriticky nemocných pacientů na neseptické jednotce intenzivní péče denně po dobu 7 dnů od přijetí analyzováno s náběrem IG#, IG%, prokalcitoninem v séru a laktátem z krve. Rozvoj sepse byl definován podle kritérií Sepsis-3. Studie byla rozdělena do čtyř časových úseků po 24 hodinách

s ohledem na den vzniku orgánové dysfunkce. Pomocí statistických analýz byl vypočítán nejlepší biomarker pro predikci sepse v každém časovém období. IG# a IG% byly vyhodnoceny jako nejúčinnější prediktor rozvoje sepse 24 hodin před klinickou diagnostikou sepse s AUC 0,81 resp. 0,82 v porovnání s PCT a laktátem.

Jelikož parametr IG a jeho význam jako časného prediktoru sepse a bakteriémie je v různých klinických situacích hodnocen pozitivně, ale také nejednoznačně, provedl další šetření Kibum J. [40] na populaci těžce popálených pacientů, kde časnost záchytu sepse je více než žádoucí. Metodikou práce bylo retrospektivní zhodno-

Tab. 2. Přehled studií s problematikou sepse a IG (immature granulocytes)

Autor, rok, typ studie N (počet pacientů)	Téma	Výsledek
Nierhaus, A. et al., 2013, unicentrická observační prospektivní studie, N = 70	Časná diagnostika sepse pomocí parametru nezralých granulocytů (IG) a jejich srovnání s jinými biomarkery sepse (CRP, LBP, IL-6).	IG% výrazně vyšší u pacientů s infekcí. IG% měl vyšší senzitivitu (89,2 %) a specifitu (76,4 %) než ostatní parametry (CRP, LBP a IL-6) se senzitivitou pod 68 %. Hodnota IG% nekorelovala s mortalitou na ICU.
Mare et al., 2015, unicentrická retrospektivní kohortová studie, N = 136	Diagnostický a prognostický význam sledování hladiny nezralých neutrofilů v krvi u pacientů se systémovým zánětem.	Prevalence IG% byla vyšší u definitivní sepse (82 %) než u pacientů s infekcí (63 %; $P < 0,05$) nebo s neinfekčním SIRS (39 %; $P < 0,001$), senzitivita 84 % a specifita 71 % pro dg definitivní sepse. Zemřeli do 1 týdne od odběru vzorku krve měli vyšší hladiny IG% (median IG% = 9 %; $P < 0,05$) než zemřeli za 2 až 4 týdny (median IG = 0,5 %).
Ayres L. S. et al., 2019, unicentrická retrospektivní studie, N = 301	IG% jako prediktor sepse ve srovnání s výsledky kultivace krve a potvrzením sepse.	Statistická souvislost mezi pozitivní hemokulturou a IG% ($P = 0,009$). Rovněž prokázána korelace mezi potvrzením diagnózy sepse a hladinou IG% > 2 % ($P < 0,001$).
Park J. S. et al., 2018, retrospektivní kohortová studie, N = 403	Užitečnost IG v diagnostice akutní apendicitidy u dospělých pacientů v porovnání s jinými markery (WBC, CRP).	Elevace CRP, WBC, IG% u potvrzené zánětlivé formy (50,6 %) včetně komplikované apendicitidy. IG% nebyl shledán jako užitečný nástroj k odlišení akutní apendicitidy a její komplikované formy, rovněž ROC analýza zastoupených markerů zánětu byla u IG% nejnižší.
Bhansaly P. et al., 2022, prospektivní observační studie, N = 137	Srovnání IG# a IG% se zavedenými infekčními parametry PCT a laktátem na ICU u primárně neinfekčních pacientů.	IG# a IG% byly vyhodnoceny jako nejužitečnější prediktory rozvoje sepse 24 hodin před klinickou diagnostikou sepse s AUC 0,81 resp. 0,82 v porovnání s PCT a laktátem.
Kibum Jeon et al., 2021, retrospektivní unicentrická studie, N = 117	IG a jeho užitečnost v kombinaci dalších infekčních ukazatelů u těžce popálených pacientů.	Kombinace parametru IG% a C-reaktivního proteinu predikovala rozvoj sepse při hladině IG% 6 % a C-reaktivního proteinu 160 mg/l. Autoři hodnotí IG% pro predikci sepse jako středně užitečný parametr pro předpověď nástupu sepse.
Porizka M. et al., 2019, retrospektivní unicentrická kohortová studie, N = 124	Rozlišení neseptického SIRS a sepse po elektivní kardiologické operaci pomocí IG%, PCT, WBC a klinickými parametry.	AUC vyšší pro IG% (0,71) a PCT (0,72) ve srovnání s počtem bílých krvinek (0,62) a teplotou (0,58). Nejlepší cut-off hodnota pro IG% byla 1,45 % (senzitivita 70,5 %, specifita 60 %). Kombinace IG% a PCT poskytla nejlepší predikci sepse (AUC 0,8, senzitivita 63,6 % a specifita 88,8 %).
Georgakopoulou V. et al., 2022, prospektivní observační kohortová studie, N = 1 005	Diagnostická a prognostická role IG# u kriticky nemocných při infekci koronavirem Sars-Cov-2.	IG# byl statisticky významně spojen se závažností infekce covidu-19, nejvyšší hodnoty IG# v kritických případech infekce ($P = 0,0001$). Rovněž prokázána asociace mezi IG# a délkou hospitalizace, nutností intubace a úmrtností ($P = 0,002$).
Yigit, M. et al., 2022, retrospektivní kohortová studie, N = 761	Úlohu delta neutrophil indexu (DNI) jako potenciálního markeru k předpovědi těžké bakteriální infekce (SBI) u dětské populace a porovnání s tradičními infekčními markery.	DNI byl signifikantně nejvyšší ve skupině s těžkou bakteriální infekcí v porovnání s nezávažnou infekcí ($P < 0,001$), tato skupina měla DNI vyšší než skupina covidu-19 ($P = 0,005$). Predikce sepse pomocí AUC bylo následující: DNI 0,82, CRP 0,71, ANC 0,72 a pro WBC 0,63.

cení 2 465 výsledků IG% od 117 pacientů s těžkými popáleninami na jednotce intenzivní péče jednoho pracoviště. Bylo provedeno statistické hodnocení klinických poznatků a laboratorních markerů sepse, včetně WBC, prokalcitoninu a C-reaktivního proteinu. U 26 ze 117 pacientů byla diagnostikována sepse s mediánem nezralých granulocytů 2,6 % (95% CI: 1,4–3,1). AUC byla 0,77 (95% CI: 0,78–0,84) pro cut-off 3 % se senzitivitou 76,9 % a specifitou 68,1 %. Kombinace parametru IG% a C-reaktivního proteinu ukázala zvýšení pravděpodobnosti sepse při IG% 6 % a CRP nad 160 mg/l. Autoři hodnotí IG% pro predikci sepse jako středně užitečný parametr, zejména pro jeho stanovení z rutinních laboratorních testů, které nevyžadují žádný další zásah ani finanční náklady.

Další specifickou kohortu pacientů, kteří vyžadují odlišení septického a neseptického SIRS a předpověď rozvoje sepse představují kardiologičtí pacienti. M. Porizka et al. [41] zkoumal v retrospektivní studii úlohu IG% jako prediktoru rozvoje neseptického SIRS a sepse po elektivní kardiologické operaci. Schopnost IG% předpovědět sepsi byla porovnána s prokalcitoninem (PCT), počtem bílých krvinek, teplotou a různými kombinacemi biomarkerů.

U 44 pacientů byla diagnostikována sepse a u 80 pacientů neinfekční SIRS. V analýze AUC byly hodnoty vyšší pro IG% (0,71) a PCT (0,72) ve srovnání s počtem bílých krvinek (0,62) a teplotou (0,58). Nejlepší cut-off hodnota pro IG% byla 1,45 % (senzitivita 70,5 %, specifita 60 %) a 1,43 mg/l pro PCT (senzitivita 65,9 %, specifita 75 %).

Kombinace parametrů IG% a PCT poskytla nejlepší predikci sepse (AUC 0,8, senzitivita 63,6 % a specifická 88,8 %). IG% má srovnatelnou výkonnost jako PCT rozlišit sepsi od neinfekčního SIRS po kardiokirurgické operaci elektivních dospělých pacientů, kombinace těchto parametrů zlepšila celkovou prediktivní schopnost pro rozvoj sepse.

Podobných témat a studií vzniká napříč spektrem kriticky nemocných a intenzivních pacientů několik s podobnými závěry prospěšnosti a užitečnosti parametru nezralých forem bílých krvinek. Bylo potvrzeno, že počet IG je nezávisle spojen s rozvojem syndromu akutní respirační tísně u pacientů s akutní pankreatitidou [42]. Nízký počet IG může vyloučit sepsi s vysokou specifičností a počet IG je významněji spojen s infekcemi a pozitivními hemokulturami, než počet bílých krvinek [43]. Navíc bylo prokázáno, že pooperační zvýšení počtu IG je spojeno s rozvojem orgánového selhání a může být použito k identifikaci pacientů, u nichž hrozí riziko vzniku infekčních komplikací po operaci na otevřeném srdci pod kardiopulmonálním bypasselem [44].

V nedávné době nemohla uplynout pozornost role nezralých forem granulocytů při zjišťování jejich diagnostické a prognostické úlohy při infekci Coronavirem Sars-Cov-2. Kolektiv autorů okolo V. Georgakopoulou [45] hodnotili roli IG u pacientů hospitalizovaných v nemocnici v důsledku infekce covid-19. Pacienti byli převážně infikováni variantou alfa a všichni byli neočkovaní. Parametr IG v absolutních hodnotách byl statisticky významně spojen se závažností infekce covid-19, přičemž nejvyšší hodnoty IG# byly zaznamenány v kritických případech infekce ($P = 0,0001$), rovněž byla prokázána asociace mezi IG# a délkou hospitalizace. Kromě toho bylo zjištěno, že počet IG# je nezávislým prognostickým ukazatelem nutnosti intubace a úmrtnosti ($P = 0,002$). Úloha neutrofilů a jejich prekurzorů je známa zejména u bakteriálních a fungálních zánětů, kde působí jako efektorové buňky první linie. Jejich funkce u virových onemocnění není doposud zcela objasněna, nicméně patří mezi buňky protivirové imunitní odpovědi a jsou první a převažující buněčnou populací, která se dostává do postižených tkání při virové infekci [46].

IG a pediatriká problematika

V případě pediatrických intenzivních pacientů jsou poznatky jako vždy s určitým zpožděním za dospělými pacienty, publikací s touto tematikou je k dispozici pouze několik. Autoři M. Yigit et al. [47] zkoumali úlohu delta neutrophil indexu (DNI) jako potenciálního markeru k předpovědi těžké bakteriální infekce (SBI) u dětské populace a provedli porovnání s tradičními infekčními markery. Účtyhodný soubor zahrnoval 761 pacientů, kteří byli retrospektivně rozděleni do 4 skupin. S potvrzenou těžkou bakteriální infekcí ($N = 150$), bez těžké bakteriální infekce, ale s potvrzenou infekcí ($N = 397$), další skupina s covidem-19 ($N = 112$) a kontrolní skupina ($N = 102$). Parametr DNI byl signifikantně nejvyšší ve skupině s těžkou bakteriální infekcí v porovnání s pacienty s nezávažnou infekcí ($P < 0,001$),

tato skupina měla DNI vyšší než skupina covidu-19 ($P = 0,005$). Nejvyšších hodnot nezralých granulocytů reprezentovaných parametrem DNI ve skupině SBI dosahovali pacienti se sepsi s meningokokovou etiologií. Porovnání markerů jako prediktorů tíže infekce pomocí AUC bylo následující: DNI 0,82, CRP 0,71, ANC 0,72 a pro WBC 0,63. Tedy těžká bakteriální infekce u dětí je spojena se zvýšením hladiny DNI. V porovnání s ostatními biomarkery DNI vykazoval vyšší specifitu a nižší senzitivitu při predikci těžké bakteriální infekce. Parametr DNI je snadno měřitelný, rychlý, levný a vysoce specifický, velmi dobře rozlišuje skupiny s infekcí a bez infekce, je vhodným doplňkem ke stávajícím zaužívaným biomarkerním zánětlivých procesů u dětských intenzivních pacientů.

Závěr

Frakce nezralých trombocytů (IPF – immature platelet fraction) a nezralé granulocyty (IG – immature granulocytes) se stále více dostávají do širokého povědomí nejen lékařů pracujících s kriticky nemocnými pacienty. Jejich dostupnost, nízké finanční náklady, jednoduchá interpretovatelnost a zejména časová nenáročnost z nich činí spolehlivý biomarker při podezření na zánětlivý proces s možnou evolucí do sepse a jejich těžkých forem. Zvýšené hodnoty IPF a IG v prostorách urgentního příjmu nebo ICU mohou upozornit s vysokou mírou pravděpodobnosti na nežádoucí vývoj klinického stavu pacienta s prodloužením doby hospitalizace včetně výrazné morbidit a mortality. Právě taková předpověď umožňuje klinickému pracovníkovi zahájit adekvátní léčbu sepse, zejména použití antibakteriálních látek, optimalizaci tekutinové resuscitace s časnou aplikací vazopresorů. V posledních desetiletích se pozornost více zaměřuje na hostitele a jeho reaktivitu imunitního systému než na vyvolávajícího původce. Klinické poznatky se neustále vyvíjejí směrem k imunologickému pohledu, podařilo se odhalit komplexní prozánětlivé a protizánětlivé dráhy, poruchy komplementu a koagulačního systému, čímž se ukazuje heterogenita a složitost tohoto syndromu. Bohužel se získané informace o složitosti komplexní imunitní odpovědi nepodařilo přetavit v jednoduché a vysoce efektivní terapeutické postupy, které by vedly k lepšímu zvládnutí sepse. Začlenění nových biomarkerů do diagnostického procesu, které potvrdí nastupující sepsi se všemi důsledky pro nemocného, je více než žádoucí. V tomto přehledovém článku poukazujeme na prospěšnost a využitelnost nezralých forem bílé krevní řady a trombocytů, které mají potenciál efektivního a snadno dostupného parametru při diagnostice sepse.

Zpracování tohoto přehledového článku a zejména probíhající prospektivní observační studie „Včasná diagnostika sepse u dětí“

(řešitel Dominik P. et al., Klinika dětské anesteziologie a resuscitace LF a FN Brno) probíhá s grantovou podporou výboru ČSİM

PROHLÁŠENÍ AUTORŮ: Prohlášení o původnosti: Práce je původní a nebyla publikována ani není zaslána k recenznímu řízení do jiného média. **Střet zájmů:** Autoři prohlašují, že nemají střet zájmů v souvislosti s tématem práce. **Podíl autorů:** MUDr. Petr Dominik: 60 %, doc. MUDr. Michal Fedora, Ph.D.: 40 %. **Financování:** Grantová podpora výboru ČSİM. **Poděkování:** N/A. **Registrace:** N/A. **Projednáno etickou komisí:** není potřeba.

LITERATURA

- Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, Shackelford KA, Tsoi D, Kievlan DR, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 2020;395:200-11. doi: 10.1016/S0140-6736(19)32989-7.
- Vincent JL, Jones G, David S, Olariu E, Cadwell KK. Frequency and mortality of septic shock in Europe and North America: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care*. 2019;23:196. doi: 10.1186/s13054-019-2478-6.
- Nierhaus A, Klatte S, Linssen J, Eismann NM, Wichmann D, Hedke J, et al. Revisiting the white blood cell count: immature granulocytes count as a diagnostic marker to discriminate between SIRS and sepsis—a prospective, observational study. *BMC Immunol*. 2013 Feb 12;14:8. doi: 10.1186/1471-2172-14-8. PMID: 23398965; PMCID: PMC3575223.
- Liu Y, Hou JH, Li Q, Chen KJ, Wang SN, Wang JM. Biomarkers for diagnosis of sepsis in patients with systemic inflammatory response syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Springerplus*. 2016 Dec 12;5(1):2091. doi: 10.1186/s40064-016-3591-5. PMID: 28028489; PMCID: PMC5153391.
- Levy MM, Rhodes A, Phillips GS, Townsend SR, Schorr CA, Beale R, et al. Surviving Sepsis Campaign: association between performance metrics and outcomes in a 7.5-year study. *Crit Care Med*. 2015;33:12. doi: 10.1097/CCM.0000000000000723.
- Barichello T, Generoso JS, Singer M, Dal-Pizzol F. Biomarkers for sepsis: more than just fever and leukocytosis—a narrative review. *Crit Care*. 2022 Jan 6;26(1):14. doi: 10.1186/s13054-021-03862-5. PMID: 34991675; PMCID: PMC8740483.
- Li Z, Yang F, Dunn S, Gross AK, Smyth SS. Platelets as immune mediators: their role in host defense responses and sepsis. *Thromb Res*. 2011 Mar;127(3):184-8. doi: 10.1016/j.thromres.2010. 10. 010. Epub 2010 Nov 13. PMID: 21075430; PMCID: PMC3042496.
- Levi M, van der Poll T. Inflammation and coagulation. *Crit Care Med*. 2010 Feb;38(2 Suppl):S26-34. doi: 10.1097/CCM.0b013e3181c98d21. PMID: 20083910.
- Vanderschueren S, De Weertd A, Malbrain M, Vankersschaever D, Frans E, Wilmer A, et al. Thrombocytopenia and prognosis in intensive care. *Crit Care Med*. 2000 Jun;28(6):1871-6. doi: 10.1097/00003246-200006000-00031. PMID: 10890635.
- Moreau D, Timsit JF, Vesin A, Garrouste-Orgeas M, de Lassence A, Zahar JR, et al. Platelet count decline: an early prognostic marker in critically ill patients with prolonged ICU stays. *Chest*. 2007 Jun;131(6):1735-41. doi: 10.1378/chest.06-2233. Epub 2007 May 2. PMID: 17475637.
- Zeerleder S, Hack CE, Willemin WA. Disseminated intravascular coagulation in sepsis. *Chest*. 2005 Oct;128(4):2864-75. doi: 10.1378/chest.128. 4. 2864. PMID: 16236964.
- Kobayashi Y. The role of chemokines in neutrophil biology. *Front Biosci*. 2008 Jan 1;13:2400-7. doi: 10.2741/2853. PMID: 17981721.
- De Blasi RA, Cardelli P, Costante A, Sandri M, Mercieri M, Arcioni R. Immature platelet fraction in predicting sepsis in critically ill patients. *Intensive Care Med*. 2013 Apr;39(4):636-43. doi: 10.1007/s00134-012-2725-7. Epub 2012 Oct 24. PMID: 23093245.
- Pecka M. Laboratorní hematologie v přehledu: Buňka a krvetvorba. Díl 1. Český Těšín: Finidr; 2002. ISBN 80-86682-01-3.
- Penka M, Tesařová E. Hematologie a transfúzní lékařství I – Hematologie. Praha: Grada; 2011. ISBN 978-80-247-3459-0.
- Ryží M, Gumulec J. Využití parametru IPF (Immature platelet fraction) v laboratorní diagnostice. *Vnitř lék*. 2010;56:109-111.
- Sinclair L. The immature platelet fraction: where is it now? *Australian Journal of Medical Science*. 2012;33(1):10-17.
- Park SH, Ha SO, Cho YU, Park CJ, Jang S, Hong SB. Immature platelet fraction in septic patients: clinical relevance of immature platelet fraction is limited to the sensitive and accurate discrimination of septic patients from non-septic patients, not to the discrimination of sepsis severity. *Ann Lab Med*. 2016 Jan;36(1):1-8. doi: 10.3343/alm.2016. 36. 1. 1. PMID: 26522752; PMCID: PMC4697337.
- Enz Hubert RM, Rodrigues MV, Andreguetto BD, Santos TM, de Fátima Pereira Gilberti M, de Castro V, et al. Association of the immature platelet fraction with sepsis diagnosis and severity. *Sci Rep*. 2015 Jan 26;5:8019. doi: 10.1038/srep08019. PMID: 25620275; PMCID: PMC4306131.
- Muronoi T, Koyama K, Nunomiya S, Lefor AK, Wada M, Koinuma T, et al. Immature platelet fraction predicts coagulopathy-related platelet consumption and mortality in patients with sepsis. *Thromb Res*. 2016 Aug;144:169-75. doi: 10.1016/j.thromres.2016. 06. 002. Epub 2016 Jun 3. PMID: 27380496.
- Thon JN, Montalvo A, Patel-Hett S, Devine MT, Richardson JL, Ehrlicher A, et al. Cytoskeletal mechanics of proplatelet maturation and platelet release. *J Cell Biol*. 2010 Nov 15;191(4):861-74. doi: 10.1083/jcb.201006102. PMID: 21079248; PMCID: PMC2983072.
- Nishimura S, Nagasaki M, Kunishima S, Sawaguchi A, Sakata A, Sakaguchi H, et al. IL-1 α induces thrombopoiesis through megakaryocyte rupture in response to acute platelet needs. *J Cell Biol*. 2015;209:453-66.
- Di Mario A, Garzia M, Leone F, Arcangeli A, Pagano L, Zini G. Immature platelet fraction (IPF) in hospitalized patients with neutrophilia and suspected bacterial infection. *J Infect*. 2009;59:201-206.
- Buoro S, Manenti B, Seghezzi M, Dominoni P, Barbui T, Ghirardi A, et al. Innovative haematological parameters for early diagnosis of sepsis in adult patients admitted in intensive care unit. *J Clin Pathol*. 2018;71:330-335.
- Okasha D, Sarig G, Benyamini N. Immature Platelet Fraction Predicts Outcome and Sepsis Development in Critically Ill Patients Admitted to a General Intensive Care Unit. *Blood*. 2014;21:1-7.
- Liu QH, Song MY, Yang BX, Xia RX. Clinical significance of measuring reticulated platelets in infectious diseases. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96:e9424.
- Wu Q, Ren J, Hu D, Jiang P, Li G, Anjum N, et al. An elevated percentage of reticulated platelet is associated with increased mortality in septic shock patients. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94:e814.
- Djuang MH, Ginting F, Hariman H. Immature Platelet Fraction in Bacterial Sepsis Severity Assessment. *Earth and Environmental Science*. 2018;125:012024.
- Jones N, Tridante A, Dempsey-Hibbert NC. Immature platelet indices alongside procalcitonin for sensitive and specific identification of bacteremia in the intensive care unit. *Platelets*. 2020;32:1-9. doi: 10.1080/09537104.2020.1809646.
- Fleischmann-Struzek C, Goldfarb DM, Schlattmann P, Schlapbach LJ, Reinhart K, Kissoon N. The global burden of paediatric and neonatal sepsis: a systematic review. *Lancet Respir Med*. 2018 Mar;6(3):223-230. doi: 10.1016/S2213-2600(18)30063-8. PMID: 29508706.
- Weiss SL, Fitzgerald JC, Balamuth F, Alpern ER, Lavelle J, Chilutti M, et al. Delayed antimicrobial therapy increases mortality and organ dysfunction duration in pediatric sepsis. *Crit Care Med*. 2014 Nov;42(11):2409-17. doi: 10.1097/CCM.0000000000000509. PMID: 25148597; PMCID: PMC4213742.
- Marshall JC, Reinhart K; International Sepsis Forum. Biomarkers of sepsis. *Crit Care Med*. 2009 Jul;37(7):2290-8. doi: 10.1097/CCM.0b013e3181a02af. PMID: 19487943.
- Türkmen D, Özsoylu S, Akyıldız BN. Comparison of the value of immature reticulocyte and immature platelet in the diagnosis of sepsis. *Pediatrics International*. 2022;64:e14882. doi: 10.1111/ped.14882.
- Lipiński M, Rydzewska G. Immature granulocytes predict severe acute pancreatitis independently of systemic inflammatory response syndrome. *Prz Gastroenterol*. 2017;12(2):140-144. doi: 10.5114/pg.2017.68116. Epub 2017 Jun 13. PMID: 28702104; PMCID: PMC5497134.
- Mare TA, Treacher DF, Shankar-Hari M, Beale R, Lewis SM, Chambers DJ, et al. The diagnostic and prognostic significance of monitoring blood levels of immature neutrophils in patients with systemic inflammation. *Crit Care*. 2015 Feb 25;19(1):57. doi: 10.1186/s13054-015-0778-z. PMID: 25887201; PMCID: PMC4355545.
- Ayres LS, Sgnaolin V, Munhoz TP. Immature granulocytes index as early marker of sepsis. *Int J Lab Hematol*. 2019;41:392-396.
- Park J-S, Kim J-S, Kim Y-J, Kim WY. Utility of the immature granulocyte percentage for diagnosing acute appendicitis among clinically suspected appendicitis in adult. *J Clin Lab Anal*. 2018;32:e22458.
- Park JH, Byeon HJ, Lee KH, Lee JW, Kronbichler A, Eisenhut M, et al. Delta neutrophil index (DNI) as a novel diagnostic and prognostic marker of infection: a systematic review and meta-analysis. *Inflamm Res*. 2017 Oct;66(10):863-870. doi: 10.1007/s00011-017-1066-y. Epub 2017 Jun 23. PMID: 28646289.
- Bhansaly P, Mehta S, Sharma N, Gupta E, Mehta S, Gupta S. Evaluation of Immature Granulocyte Count as the Earliest Biomarker for Sepsis. *Indian J Crit Care Med*. 2022 Feb;26(2):216-223. doi: 10.5005/jp-journals-10071-23920. PMID: 35712744; PMCID: PMC8857719.
- Jeon K, Lee N, Jeong S, Park MJ, Song W. Immature granulocyte percentage for prediction of sepsis in severe burn patients: a machine learning-based approach. *BMC Infect Dis*. 2021 Dec 16;21(1):1258. doi: 10.1186/s12879-021-06971-2. PMID: 34915849; PMCID: PMC8680375.
- Porizka M, Volny L, Kopecky P, Kunstýr J, Waldauf P, Balík M. Immature granulocytes as a sepsis predictor in patients undergoing cardiac surgery. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2019 Jun 1;28(6):845-851. doi: 10.1093/icvts/ivy360. PMID: 30689873.
- Huang Y, Xiao J, Cai T, Yang L, Shi F, Wang Y, et al. Immature granulocytes: A novel biomarker of acute respiratory distress syndrome in patients with acute pancreatitis. *J Crit Care*. 2019;50:303-308.
- Ayres LS, Sgnaolin V, Munhoz TP. Immature granulocytes index as early marker of sepsis. *Int J Lab Hematol*. 2019 Jun;41(3):392-396. doi: 10.1111/ijlh.12990. Epub 2019 Feb 26. PMID: 30806482.
- Daix T, Guérin E, Tavernier E, Marsaud JP, Hacan A, Gauthier F, et al. Immature granulocytes: A risk factor of infection after cardiac surgery. *Cytometry B Clin Cytom*. 2018;94:887-894.
- Georgakopoulou VE, Makrodimriti S, Triantafyllou M, Samara S, Voutsinas PM, Anastasopoulou A, et al. Immature granulocytes: Innovative biomarker for SARS-CoV2 infection. *Mol Med Rep*. 2022 Jul;26(1):217. doi: 10.3892/mmr.2022.12733. Epub 2022 May 13. PMID: 35551416; PMCID: PMC9175277.
- Galani IE, Andreacos E. Neutrophils in viral infections: Current concepts and caveats. *J Leukoc Biol*. 2015 Oct;98(4):557-64. doi: 10.1189/jlb.4VMR1114-555R. Epub 2015 Jul 9. PMID: 26160849.
- Yigit M, Ozkaya-Parlakay A, Yilmaz N, Akyol O, Gulhan B, Kanik Yuksek S, et al. Potential and promising marker for serious bacterial infections in children: Delta neutrophil index. *J Paediatr Child Health*. 2022 Sep;58(9):1623-1628. doi: 10.1111/jpc.16065. Epub 2022 Jun 23. PMID: 35734900.