

Utjecaj predanalitike na pretrage u likvoru

Drenšek, Zrinka

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:960192>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-26**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Zrinka Drenšek

Utjecaj predanalitike na pretrage u likvoru

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Hitna laboratorijska dijagnostika Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Dunje Rogić i suvoditeljstvom dr.sc. Željke Vogrinc.

Zahvala

Od srca zahvaljujem svojoj komentorici dr.sc. Željki Vogrinc na stručnom vodstvu te nesebičnom prenošenju znanja i iskustava tijekom izrade diplomskog rada, kao i mentorici izv. prof. dr. sc. Dunji Rogić. Posebnu zahvalu želim iskazati i svim djelatnicima Odjela za opću kliničku biokemiju i analitiku cerebrospinalne tekućine KBC Zagreb te mag. med. biochem. Ani Mlinarić na pomoći i savjetima prilikom izrade eksperimentalnog dijela ovog rada.

Neizmjernu zahvalu želim iskazati svojim bližnjima. Sestrama Aniti i Sanji na svim studentskim savjetima i ljubavi, nećaku Franu i nećakinjama Sari i Emi što su unosili dječju bezbrižnost i veselje u studentske rokove, Matiji na velikodušnoj ljubavi i razumijevaju te Damiru i Bojanu na podršci. Ipak, ovaj rad želim posvetiti svojim roditeljima, Branki i Josipu. Hvala Vam na podršci, strpljenju, savjetima i ohrabrenjima, a najveća hvala na ljubavi koja nema granica i nikada ne prestaje. Volim vas!

Popis kratica:

SŽŠ – središnji živčani sustav

CFS – eng. central nervous system

TAT – eng. turn around time

FSC – eng. forward-scattered light

SSC - eng. side-scattered light

POD – enzim peroksidaza

LOD – enzim laktat oksidaza

HK – enzim heksokinaza.

G-6-PD – enzim glukoza-6-fosfat dehidogenaza

Min – minuta

Sadržaj:

1. Uvod.....	1
1.1. Središnji živčani sustav	1
1.1.1. Krvno - moždana i krvno - likvorska barijera.....	1
1.1.1.1. Krvno-moždana barijera	2
1.1.1.2. Krvno-likvorska barijera	2
1.1.1.3. Prolazak tvari kroz sustav barijera	3
1.2. Cerebrospinalna tekućina (Likvor)	4
1.2.1. Punkcija likvora	4
1.2.2. Izgled i boja likvora	5
1.2.3. Vrste stanica likvora.....	5
1.2.4. Sastav likvora.....	9
1.2.4.1. Proteini	9
1.2.4.2. Glukoza	9
1.2.4.3. Laktat	11
1.3. Predanalitika	11
2. Obrazloženje teme.....	13
3. Materijali i metode	14
3.1. Uzorci	14
3.2. Brojanje stanica likvora u Fuchs –Rosenthaltovoj komorici.....	14
3.3. Brojanje stanica likvora na Sysmex XE 5000	16
3.4. Određivanje koncentracije glukoze, laktata i ukupnih proteina u likvoru na analizatoru Cobas 6000 c501	19
3.4.1. Glukoza	20
3.4.2. Laktat	20
3.4.3. Ukupni proteini	21
3.5. Statistička obrada podataka	21

3.5.1.	Passing-Bablok regresija	21
3.5.2.	Wilcoxonov test	22
3.5.3.	Parni t-test uzorak-uzorak za zavisne uzorke.....	23
4.	Rezultati i rasprava.....	25
4.1.	Rezultati.....	25
4.1.1.	Određivanje broja stanica u likvoru ručnim brojanjem u Fuch-Rosenthaltovoj komorici i na hematološkom brojaču	25
4.1.1.1.	Broj stanica u likvoru dobiven brojanjem na Sysmex XE 5000	25
4.1.1.2.	Broj i vrste stanica u likvoru dobivene ručnim brojanjem i nativnim diferenciranjem na mikroskopu Olympus BX41	26
4.1.1.3.	Statistička obrada rezultata brojanja stanica u likvoru dobivenih ručnim brojanjem na mikroskopu Olympus BX41 i analizatoru Sysmex XE 5000.....	28
4.1.1.4.	Usporedba broja stanica u likvoru dobivenih ručnim brojanjem na mikroskopu Olympus BX41 unutar 60 min, 61-90 min i 91-120 min.....	29
4.1.2.	Određivanje koncentracije glukoze, lakata i ukupnih proteina u likvoru	31
4.1.2.1.	Rezultati mjerenja koncentracije glukoze, lakata i ukupnih proteina u likvoru.....	32
4.1.2.2.	Usporedba koncentracije glukoze, lakata i ukupnih proteina unutar 60 min i 91-120 min u centrifugiranom i necentrifugiranom likvoru	33
4.2.	Rasprava	38
5.	Zaključci.....	41
6.	Literatura	42
7.	Sažetak/summary	45
7.1.	Sažetak.....	45
7.2.	Summary.....	45

Temeljna dokumentacijska kartica/Basic documentation card

1. Uvod

1.1. Središnji živčani sustav

Središnji živčani sustav je najmanje poznati, a uz to i najsloženiji dio našeg tijela. Složene je građe i funkcije (Trbojević-Čepe i Vogrinc, 2014.). Sastoji se od stotinu milijardi neurona (živčanih stanica), a zbog svoje kompleksnosti osjetljiv je na vanjske i unutarnje poremećaje (Guyton i Hall, 2012.). Posjeduje karakteristična anatomska i fiziološka svojstva. Ona uvelike utječu na očitovanje bolesti, međutim i etiološki čimbenici također mogu imati veliki utjecaj na poremećaje funkcije živčanog sustava. Veliku ulogu igra zahvaćenost, odnosno lokaliziranost ozljede mozga. Neka mala žarišta na ključnim dijelovima mozga mogu uzrokovati puno veća oštećenja od površinom velikih, „manje važnih“ dijelova mozga (Sertić i sur., 2008.). Specijalizirane stanice krvno-moždane i krvno-likvorske barijere odvajaju SŽS od periferije i štite ga od djelovanja štetnih čimbenika, a likvor (cerebrospinalna tekućina) pruža mehaničku zaštitu mekom moždanom tkivu (Trbojević-Čepe i Vogrinc, 2014.).

1.1.1. Krvno - moždana i krvno - likvorska barijera

Barijere igraju važnu ulogu u zaštiti SŽS-a. Kontroliraju i omogućavaju stalan sastav likvora i intersticijske tekućine. Lokalizirane su na svim mjestima gdje dolazi do kontakta između periferije i SŽS-a. Na taj način omogućavaju stabilan sastav likvora i normalnu funkciju mozga. Stoga je uloga barijera nezamjenjiva. Omogućavaju nesmetanu dopremu hranjivih tvari, a istovremeno onemogućavaju ulazak potencijalno štetnih tvari poput nekih makromolekula i mikroorganizama. Reguliraju balans iona te ograničavaju upalni i imunološki odgovor ograničavajući ulazak imunoaktivnih tvari iz periferije kao što su imunociti, komplement i protutijela (Trbojević-Čepe i Vogrinc, 2012.). U bolesti se propusnost barijera mijenja. Povećana propusnost barijera u bolesti dozvoljava ulazak leukocita i različitih imunokompetentnih molekula iz periferije čime omogućava obranu SŽS-a, ali predstavlja i opasnost. Normalno u ljudi dolazi do prenatalnog razvoja tolerancije gdje organizam „uči“ prepoznati vlastito od tuđeg. Zbiva se u timusu i koštanoj srži. Zbog postojanja barijera imunološki sustav nije upoznat sa antigenim sastavom SŽS-a pa oštećenjem barijera i kontaktom s ovim antigenima vlastito prepoznaje kao tuđe. To dovodi

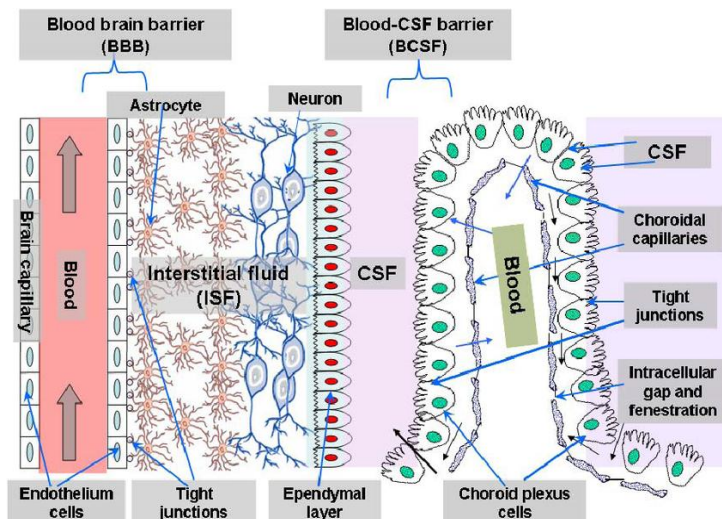
do imunoloških reakcija i razvoja autoimunih bolesti SŽS-a poput multiple skleroze (Andreis i sur., 2010.).

1.1.1.1. Krvno-moždana barijera

Glavna građevna komponenta krvno-moždane barijere su endotelne stanice dubokih moždanih kapilara. Za razliku od endotelnih stanica ostalih organa, ovdje su one povezane tijesnim vezama, čvrstom elektrostatskom vezom koju nazivamo „tight junctions“. Na taj način onemogućavaju prolazak polarnih molekula iz krvi (Slika 1), a nedostaje im i mogućnost transendotelih mehanizama transporta putem fenestri i transpinocitoze. Njihova je uloga različitim aktivnim, ali i pasivnim mehanizmima štititi mozak. Mogu sadržavati različite enzime čija je uloga metaboliziranje lijekova. Veoma su slični enzimima koji to obavljaju u sklopu jetra. Cilj je zaštititi mozak od potencijalno štetnih tvari metabolizacijom različitih toksičnih kemikalija. Također, pomoću ATP ovisnih efluksnih pumpi imaju sposobnost uspješno pumpati hidrofobne molekule, koje su ušle difuzijom, natrag u krvotok (Lieberman i sur., 2013.). Smatra se da stvaranje čvrstih elektrostatskih veza u SŽS potječe od astrocita. Čak 80 % površine moždanih kapilara obavijeno je nožicama astrocita i stanicama glatkog mišićja (Štraus, 2009. I Sertić i sur., 2008.).

1.1.1.2. Krvno-likvorska barijera

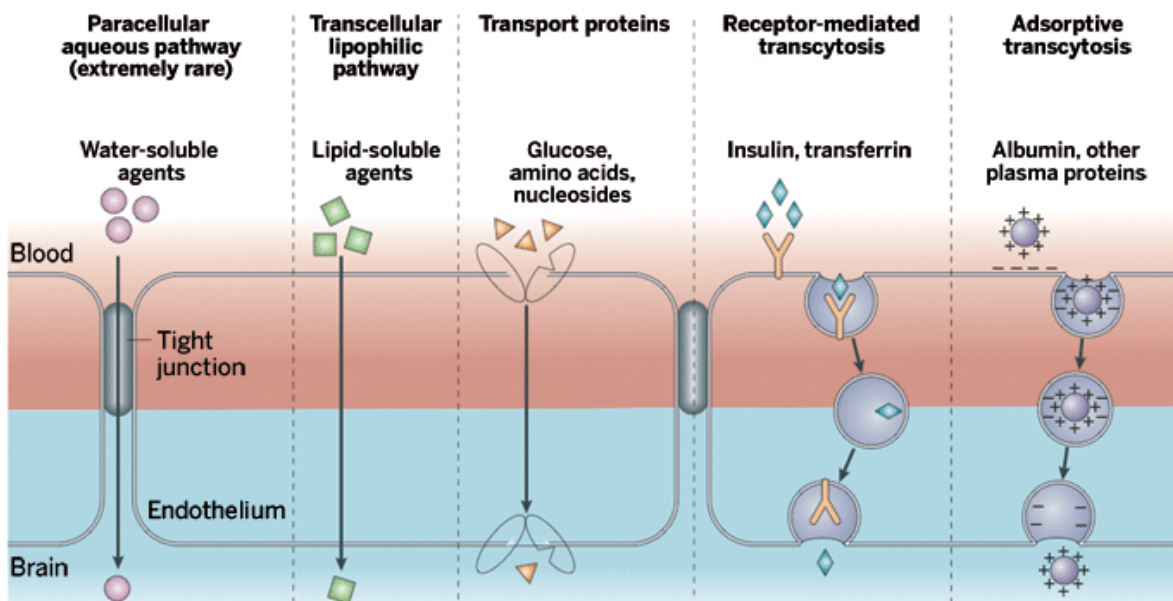
Za razliku od krvno-moždane barijere, krvno-likvorska barijera anatomske je smještena u području koroidnih spletova moždanih komora (Slika 1). Endotelne stanice koroidnog spleta posjeduju brojne pinocitne vakuole i povezane su slabim vezama, no površina moždanih komora obložena je jednoslojnim kubičnim epitelom (koroidne stanice) koje su povezane čvrstim elektrostatskim vezama i reguliraju propusnost potencijalno štetnih tvari (Štraus, 2009.).



Slika 1. Krvno moždana i krvno likvorska barijera (www.researchgate.net)

1.1.1.3. Prolazak tvari kroz sustav barijera

Zbog ranije spomenutih čvrstih veza ograničen je transport tvari kroz sustav barijera, a način na koji će pojedina molekula proći ovisi o njezinim karakteristikama, kao što su polarnost, veličina molekule i strukturi. Slika 2 opisuje transport tvari kroz sustav barijera ovisno o njihovim fizikalno-kemijskim značajkama. Male, u vodi topljive tvari proći će kroz pore u „čvrstim spoju“ procesom pasivne difuzije. Takav transport nazivamo i paracelularni, vodeni transport, a koriste ga plinovi. Kreću se niz koncentracijski gradijent, bez utroška energije i transportera. Lipofilni lijekovi i opijati također se kreću niz koncentracijski gradijent, ali procesom transcelularne difuzije. Glukozi i aminokiselinama potreban je specifični transporter kako bi se kretale niz koncentracijski gradijent. Tako je njihova jačina difuzije ograničena brojem specifičnih transportera. Takav transport nazivamo olakšanom difuzijom. Makromolekule se transportiraju transcitozom. Pritom razlikujemo endocitozu posredovanu specifičnim receptorima, za npr. inzulin i transferin te adsorptivnu endocitozu za neselektivni prolaz pozitivno nabijenih proteina plazme. Sve ostale tvari, kao što su stanični elementi i neki mikroorganizmi koje susrećemo pri patološkim stanjima, transportiraju se specifičnim mehanizmom vakularno-tubularnog prolaza (Trbojević-Čepe i Vogrinc, 2012.; Sertić i sur., 2008.).



Slika 2. Transport tvari kroz sustav barijera (<http://pubs.acs.org/>)

1.2. Cerebrospinalna tekućina (Likvor)

Cerebrospinalna tekućina oblaže mozak i kralježničku moždinu te predstavlja svojevrsnu zaštitu istih. Ona ispunjava četiri moždane komore, središnji kanal moždine te prostor između pije i arahnoidne (subarahnoidalni prostor između mozga i kralježničke moždine) (Trbojević-Čepe i Vogrinc, 2012.; Štraus, 2009.). Najveći postotak likvora (70%) smatra se da stvaraju bogato vaskularizirani korodini spletovi procesima filtracije i sekrecije koji se nalaze u krovu treće i četvrte moždane komore te lateralnim komorama. Manji postotak likvora (20%-30%) stvara se putem endipima (Trbojević-Čepe i Vogrinc, 2014.; Sertić i sur., 2008.). Dnevno se stvara oko 140 mL likvora u odraslih ljudi, dok je kod male djece taj broj nešto manji, uglavnom od 60-100 mL. Kompletan se likvorski volumen izmjeni 3-4 puta tokom dana odnosno svakih 5-7 sati (Sertić i sur., 2008.; Stavljenić i sur., 1988.).

1.2.1. Punkcija likvora

Punkcija likvora najčešće se izvodi postupkom lumbalne punkcije između L4 i L5 kralješka. Može se vršiti i subokcipitalna punkcija iznad prvog cervikalnog kralješka te subduralna punkcija samo kod dojenčadi s otvorenom fontanelom (Sertić i sur., 2008.).

1.2.2. Izgled i boja likvora

Likvor je bistra i bezbojna tekućina, a promjena boje i njegova zamućenost može ukazivati na neke patološke promjene ili traumatsku punkciju. Ovisno o boji možemo naslutiti o vrsti poremećaja. Tako žuto obojeni likvor nazivamo ksantokromnim likvorom koji se može pojaviti ili zbog razgradnje i oslobađanja hemoglobina iz eritrocita ili difuzije bilirubina iz krvi. Smeđe obojeni likvor može se pojaviti kod melanosarkoma SŽS-a. Eritrokroman odnosno krvavi likvor je likvor ružičaste do crvene boje te ukazuje na primjesu krvi. Bijeli zamućeni likvor nastaje zbog prisutnosti velikog broja stanica, povećane koncentracije ukupnih proteina i velikog broja bakterija. Upravo se takav likvor najčešće uočava kod meningokoknog meningitisa (Weisglass i Arko, 1977.).

1.2.3. Vrste stanica likvora

Broj stanica u normalnom likvoru iznosi do 5 u 1 mm³. Sve te stanice su krvnog, hematogenog porijekla. Njihov broj može se mijenjati ovisno o dobi. Tablica 1 upućuje na vrstu i broj stanica ovisno dobi. Uglavnom su u likvoru zastupljene limfocitne stanice u iznosu od 70% do 100%. Preostalih 30% stanica čine monociti. Kod novorođenčadi broj stanica može biti veći, odnosno normalno je pronaći do 30 stanica u 1 mm³. Djeca imaju veći udio stanica monocitno/fagocitnog reda i moguće je pronaći neutrofilne granulocite. Normalan likvor ne sadrži eritrocite (Sertić i sur.,2008.).

Tablica 1. Očekivani broj i vrste stanica u normalnom likvoru ovisno o dobi (Trbojević-Čepe i Vogrinc, 2012.)

Vrsta stanica	Dojenčad (≤ 1 god)	Djeca (1-4 god)	Odrasli
Leukociti	$< 30 \times 10^6/L$	$< 20 \times 10^6/L$	$< 5 \times 10^6/L$
Limfociti	5-35	5-35	40-80%
Monociti	50-90%	50-90%	15-45%
Neutrofilni granulociti	$< 8\%$	$< 8\%$	$< 6\%$
Eritrociti	varijabilno	varijabilno	0

Brojna patološka stanja i neurološke bolesti uzrokuju povećanje broja stanica u likvoru odnosno stanje koje nazivamo pleocitoza. Obično je uzrokovana povećanim pritjecanjem stanica iz krvi, ali i različitim infekcijama i ozljedama (Sertić i sur.,2008.). Stanice patološkog

likvora mogu biti hematogenog porijekla (mononuklearni leukociti, polimorfonuklearni leukociti), tumorske stanice, stanice tkivnog podrijetla i dodatni elementi. Detaljniju podjelu vrsta stanica i njihovog podrijetla u likvora u neurološkim bolestima prikazana je u Tablici 2 (Sertić i sur.,2015.).

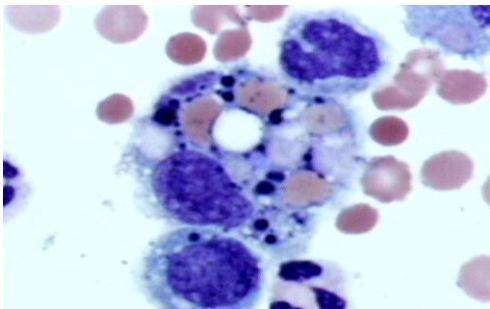
Tablica 2. Vrste i podrijetlo stanica u likvoru u različitim neurološkim bolestima (Sertić i sur., 2015.).

Vrste stanica u neurološkim bolestima	Stanice hematogenog podrijetla	Mononuklearni leukociti -limfociti, monociti, plazmociti, makrofagi, limfoidne stanice, monocitodine stanice
		Polimorfonuklearni leukociti -nurtofilni granulociti, eozinofilni granulociti, bazofilni granulociti
		Eritrociti
	Tumorske stanice	-stanice primarnih tumora SŽS -stanice metastatkh tumora
	Stanice tkivnog podrijetla	-stanice pije i arahnoideje -stanice koroidnog epitela -stanice ependima
	Dodatni elementi	-stanice koštane srži -stanice hrskavice -stanice kože -kristali hematoidina -mikroorganizmi

- Monociti - stanice koje imaju najviše sličnosti prema veličini i izgledu s onima iz krvi. Karakterizira ih dug životni vijek, sivo-plava citoplazma i polimorfna, potkovasta jezgra sa sitnozrnatim kromatinom. Kod neurodegenerativnih bolesti, upalnih bolesti i krvarenja pojavljuju se u kasnijoj fazi bolesti, dok se u djece pojavljuju u akutnoj fazi.

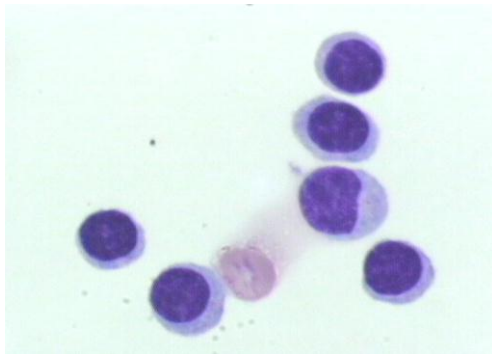
Uloga im je fagocitiranje stranog tijela, njegovo razaranje te mogućnost predočavanja limfocitima nakon prerade.

- Fagociti - nazivaju se zaštitnim stanicama. Nastaju transformacijom iz monocita i histiocita. Glavna funkcija im je fagocitoza. Postoje razne vrste fagocita ovisno o fagocitiranom sadržaju. Eritrofag (Slika 3) zadužen za fazu „čišćenja“ prilikom krvarenja u likvorski prostor, leukofag u bakterijskom meningitisu te lipofag, pigmentofag, siderofag.



Slika 3. Eritrofag prisutan u krvarenju

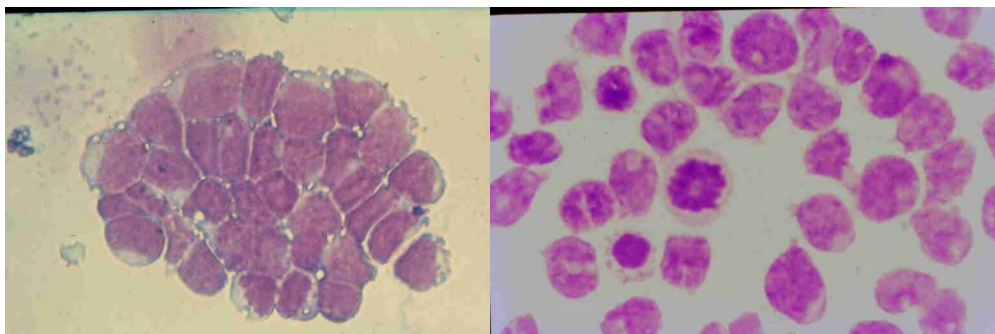
- Limfociti - male stanice oskudne citoplazme i okrugle jezgre intenzivnog obojenja. Prepoznavanjem antigena pokreću specifičnu imunološku reakciju. Pojavljuju se kod svih seroznih upala SŽS-a, virusnog meningitisa te pleocitozama različitog uzroka.



Slika 4. Stanice limfocita

- Plazma stanice - pojava u likvoru česta je u subakutnim i kroničnim upalnim bolestima SŽS-a. Pokazatelj su aktivacije humoralne imunosti. Citoplazma je intenzivno plava, a unutar nje moguće je pronaći vakuole. Jezgra je gustog kromatina, ekscentrično položena. Može biti okrugla i udubljena. Veličina plazma stanica može varirati.

- Neutrofilni granulociti - pojavljuju se u akutnoj fazi upalnih promjena SŽS-a te tada mogu činiti 80-100% stanica likvora. Fagocitiraju strano tijelo i razore ga, ali pri tome i sami ugibaju. Kako podliježu degenerativnim procesima nije rijetkost vidjeti hipersegmentaciju. Blijeda citoplazma neutrofilnih granulocita nije strogo ograničena, a uz njezin rub vide se segmenti jezgre. Predstavljaju veoma uspješan obrambeni mehanizam sa velikim potencijalom razaranja kojem je svrha brzo uništiti strano tijelo. U početku je takva reakcija dobra, no ona je veoma nespecifična pa postaje potencijalno opasna za tkivo SŽS-a.
- Eozinofilni granulociti - odgovaraju izgledom onima iz krvi. Veličina stanica iznosi 10-14µm. Sadrže izrazito crvene granule unutar citoplazme. Javljaju se u kasnijim fazama upale i povezujemo ih najčešće s parazitarnim infekcijama.
- Stanice tkivnog podrijetla - velike stanice koje često vidimo u nakupinama. Nemaju veliku dijagnostičku značajnost, no veoma je bitno da ih se ne zamjeni sa malignim stanicama. Rijetko se nađu u normalnom likvoru, a ukoliko se pronađu obično se radi o gnojnim upalama. Češće ih je moguće pronaći u djece. Stanice ependima sklone su lakom ozljeđivanju i njihova je citoplazma slabo očuvana, moguće ju je vidjeti samo ponegdje uz okruglastu jezgru. Stanice koroidnog plexusa karakterizira kubični oblik sa sitnim produžetcima, citoplazma je sivo-plave boje, a jezgra okrugla.
- Tumorske stanice - moguće je pronaći stanice primarnih tumora i tumora koji metastaziraju. Najčešće govorimo o karcinomu pluća, gastrointestinalnog trakta i melanomu. To su velike stanice nerijetko bazofilne i hiperkromne u velikim nakupinama, ali moguće ih je vidjeti i zasebne. Veliki broj stanica nalazi se u mitози (Sertić i sur.,2015.; Rodak, 2002.; Weisglass i Arko, 1977.).



Slika 5. Tumorske stanice

1.2.4. Sastav likvora

1.2.4.1. Proteini

Proteini u likvoru su normalno prisutni, ali u veoma niskim koncentracijama. Uglavnom su krvnog podrijetla u iznosu od 80%, dok preostalih 20 % je antigenski srodno krvnim proteinima i dodatno se stvaraju unutar SŽS-a. Primjer tome je transtiretin. Koncentracije proteina u likvoru izvrsno ukazuju na promjene ili upale unutar SŽS-a. Njegove referentne vrijednosti mijenjaju se ovisno o dobi pacijenta. Kod djece 0-6 mjeseci koncentracija proteina u likvoru iznosi 0,10-1,20 g/L. Referenti interval odraslih osoba iznosi 0,15-0,40 g/L, a iznad četrdesete godine života dolazi do porasta njihove koncentracije s dobi (www.moodle.srce.hr) Koncentracija proteina u likvoru do 200 puta je manja u odnosu na serum, ali unatoč niskim vrijednostima imaju iznimno veliku dijagnostičku značajnost. Zbog niskih koncentracija, u analitici je potrebno koristiti metode dovoljno velike osjetljivosti.

U nekim stanjima je dovoljno odrediti samo ukupnu koncentraciju proteina, dok je u drugim potrebno napraviti i detaljnije analize. Sadržaj proteina u likvoru određujemo kvalitativnim i kvantitativnim metodama. Kvalitativne metode obuhvaćaju različite elektroforetske tehnike koje se mogu kombinirati s imunofiksacijom. Kvantitativne metode omogućavaju određivanje koncentracije ukupnih proteina, ali i koncentracije pojedinačnih proteina. Biokemijskim metodama određujemo ukupne, a imunokemijskim metodama koncentracije pojedinačnih proteina.. Kroz krvno-likvorsku barijeru lakše prolaze proteini male molekulske mase, poput albumina, stoga je njihova koncentracija u likvoru veća. Za procjenu funkcije barijere koristi se omjer proteina u likvoru i serumu. Protein koji se u tu svrhu koristi je albumin jer se sintetizira samo u jetri i ne stvara se u SŽS-u.

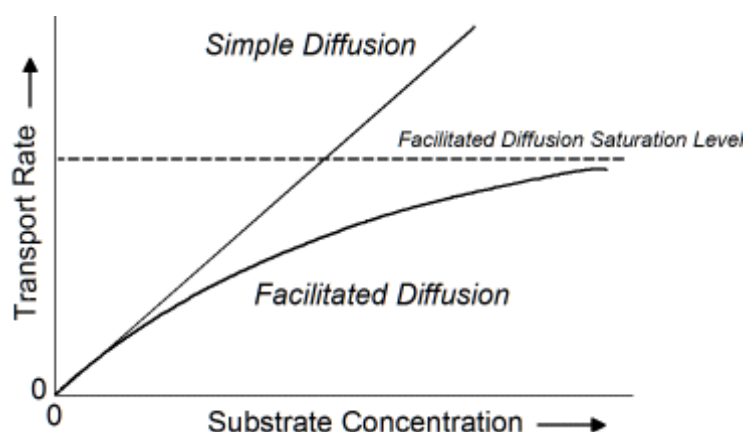
$$Q_{alb} = \frac{\text{Albumin likvor (g/L)}}{\text{Albumin serum (g/L)}} \times 100$$

1.2.4.2. Glukoza

Glavni izvor energije u mozgu je glukoza. Podrijetlom je iz krvi, a njezina koncentracija u likvoru ovisi o koncentraciji u krvi. Referenti interval za glukozu u likvoru iznosi 2,2-4,4 mmol/L. Određuje se istim kvantitativnim metodama kojima se određuje i u krvi. Porast koncentracije u krvi uzrokuje i porast koncentracije u likvoru. Odnos glukoze likvor/serum

kod odraslih iznosi 0,6. Taj odnos podložan je promjenama. Ravnotežno stanje postiže se nakon 3-4 sata. Prilikom testova opterećenja uočeno je da koncentracija glukoze u likvoru sporije raste, ali i sporije pada u odnosu na krv. Maksimalna vršna koncentracija postiže se nakon 150 minuta, što u krvi iznosi 30-60 minuta. Povratak u normalne vrijednosti događa se nakon 4 sata u odnosu na krv gdje se taj proces odvija unutar 2 sata. Stabilnost koncentracije glukoze u likvoru ovisi o broju stanica i prisutnosti bakterija. Sniženje koncentracije u likvoru koje je neovisno o koncentraciji u krvi događa se u akutnim bakterijskim meningitisima. Ta vrijednost u nekim stanjima može pasti i na nulu. Povećanje koncentracije glukoze u likvoru, neovisno o koncentraciji u krvi karakteristično je za encefalitis, epilepsiju (Štraus, 2009.; Weisglass i Arko, 1977.).

Glukoza u likvor dopijeva procesom olakšane difuzije, odnosno difuzije posredovane nosačem (GLUT1). Takva difuzija prati saturacijsku kinetiku. (Slika 6) Za razliku od jednostavne difuzije gdje veličina difuzije raste neprekidno i razmjerno koncentraciji tvari koja difundira, ovdje veličina difuzije ovisi o koncentraciji transportera (Guyton i Hall, 2012.). Dokle imamo dovoljno transportera, porastom koncentracije glukoze rasti će i veličina difuzije. Međutim, kada koncentracija glukoze postane toliko velika da nemamo više transportera, odnosno svi transporteri su zasićeni, tada veličina difuzije postiže svoj maksimum V_{max} i nije moguće postići više vrijednosti.



Slika 6. Grafički prikaz utjecaja koncentracije tvari na veličinu difuzije kroz membranu mehanizmima olakšane i jednostavne difuzije (www.acbrown.com).

1.2.4.3. Laktat

Koncentracija laktata u likvoru neovisna je o koncentraciji u krvi. On je pokazatelj anaerobne glikolize u mozgu. Njegova koncentracija normalno je viša u likvoru nego u krvi, a referentni interval koncentracije u likvoru iznosi 1,2-2,2 mmol/L. Njegovo određivanje ima veliku važnost prilikom dijagnostike i diferencijalne dijagnostike bolesti SŽS-a. Koncentracije laktata povećavaju se pri apscesu mozga, epilepsiji, traumi mozga. Veoma važnu ulogu ima prilikom razlikovanja odnosno diferencijalne dijagnostike bakterijskog od virusnog meningitisa. Koncentracija veća od 3,33 mmol/L uvijek se uočava kod bakterijskog meningitisa, dok vrijednosti manje od 2,78 mmol/L gotovo uvijek uočavamo kod virusnog meningitisa. Veoma je važan pokazatelj odgovora na terapiju kao i praćenja tijekom terapije (Štraus, 2009.).

1.3. Predanalitika

Čitav niz različitih čimbenika utječe na mjereni rezultat laboratorija. Svakodnevna kontrola kvalitete od iznimne je važnosti za točnost, preciznost i pouzdanost rezultata koji se izdaju. No, problemi ne proizlaze samo iz analitičkog dijela analize. Veliki utjecaj na sam rezultat ima predanalitika. Brojni su čimbenici koji prije same analize mogu utjecati na rezultat. Neke od njih možemo kontrolirati, a neki su izvan dosega mogućnosti kontrole. Dužnost laboratorija nije samo izdati rezultat, već podučavati pacijente i ukazivati im na problematiku pravilnog pripremanja za uzorkovanje svih vrsta uzoraka, educirati osoblje kako na pravilan način uzorkovati, transportirati, skladištiti i pripremiti uzorak za analizu. Međutim, brojne čimbenike ne možemo kontrolirati. Spol, rasa pa i godišnje doba samo su neki od primjera. Zato čimbenike koji mogu utjecati na analizu, a sastavni su problem predanalitičkog dijela analize možemo podijeliti na biološke i metodološke čimbenike. Biološki čimbenici mogu biti dugotrajni ili. nepromjenjivi i kratkotrajni ili promjenjivi. Važno je uzeti u obzir sve čimbenike. Primjerice, dugotrajni i nepromjenjivi uzimaju se u obzir pri procjeni rezultata pretrage, dok se kratkotrajni biološki i metodološki čimbenici raznim postupcima pokušavaju svesti na najmanju moguću mjeru (Štraus, 2009.).

Tablica 3. Predanalitički čimbenici (Štraus, 2009.)

Dugotrajni biološki čimbenici
-genetički (spol, rasa, nasljedne greške, sklonost prema bolesti) -povezani s procesom života (stupanj razvoja, životna dob (novorođenčad, djeca do puberteta, odrasle osobe, starije odrasle osobe), reproduksijski ciklus) -ekološki (opći uvjeti života, fizikalni, kemijski i biološki učinci okoliša, način prehrane) -cikličke promjene (godišnje doba, menstrualni ciklus) -tjelesni ustroj -navike (alkoholizam, pušenje, sredstva ovisnosti)
Kratkotrajni biološki čimbenici
-metabolički (prehrana, stresno-emocijsko stanje, nesvjestica, buka, tjelesni napor, lokalne metaboličke promjene) -hemodinamički (položaj tijela) -dnevni ritam -indukcija mirkosomalnih jetrenih enzima -oštećenje stanica
Metodološki čimbenici
a) Uzimanje uzorka krvi -vrsta krvi (arterijska, venska, kapilarna) -postupak uzimanja krvi (punkcija, podveza krvne žile) -pribor (igle, spremnici) -dodatci (antikoagulansi) -način punjenja epruveta
b) Postupak s uzorkom prije analize -dostava do laboratorija (spremnik, zaštitne tvari, temperatura, vrijeme trajanja dostave) -zgrušavanje (vrijeme, temperatura, spojevi koji potiču zgrušavanje) -odvajanje seruma ili plazme od stanica (snaga centrifugiranja, vrijeme, temperatura) -način pohranjivanja uzorka (spremnik, zaštitne tvari, temperatura, vrijeme pohranjivanja) -priprema uzorka za analizu (otapanje, miješanje)

2. Obrazloženje teme

Važnost rezultata pretraga dobivenih laboratorijskom analizom svakim danom je sve veća. Pouzdanost, točnost i vrijeme izdavanja nalaza sastavni su dio dobre laboratorijske prakse, a nalazi koje laboratorij izdaje imaju veliku važnost u postavljanju točne i pravovremene dijagnoze.

Pretrage likvora su sastavni dio dijagnostike različitih neuroloških bolesti, a posebno su važne u dijagnostici hitnih neuroloških stanja. U hitnim stanjima (npr. meningitis ili inzult) važno je da je nalaz likvora što prije dostupan liječniku, a standardne pretrage koje se u tim stanjima zahtijevanju od laboratorija su određivanje broja stanica te mjerenje koncentracije ukupnih proteina, glukoze i laktata. Ne postoji preporučeni protokol o TAT-u za hitne pretrage likvora, no poželjno je da to bude unutar 60 minuta od zaprimanja materijala.

Poznato je da u uzorku likvora s povećanim brojem stanica *in vitro* dolazi do ubrzane razgradnje stanica i biokemijskih reakcija koje mogu značajno utjecati na rezultate pretraga. Stoga je važno da je vrijeme proteklo od punkcije do izrade analize što kraće. U literaturi nema podataka o tome koje je kritično vrijeme u kojem je uzorak stabilan odnosno u kojem se ne očekuje utjecaj navedenih predanalitičkih čimbenika na rezultate analiza. Jedan od rijetkih dokumenata jest protokol o standardizaciji obrade cerebrospinalne tekućine iz 2009. godine (22) u kojem je opisan način uzorkovanja i predobrade uzorka, no u njemu nije definirano kritično vrijeme za navedene pretrage.

Svrha ovog rada je stoga bila proučiti utjecaj vremena proteklog od uzorkovanja likvora na rezultate hitnih pretraga likvora. Osim toga, u radu se željelo ispitati i utjecaj prisutnih staničnih elemenata na rezultate biokemijskih pretraga u svrhu skraćivanja vremena izdavanja nalaza hitnih pretraga likvora.

3. Materijali i metode

3.1. Uzorci

U radu su analizirana 32 uzorka likvora zaprimljena u sklopu rutinske laboratorijske obrade. Ispitivani uzorci likvora dobiveni su lumbalnom punkcijom te iz različitih postoperativnih drenaža. Svi uzorci uzorkovani su na KBC Zagreb i obrađeni u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku. U svim uzorcima likvora su napravljene sljedeće pretrage: broj stanica, glukoza, ukupni proteini i laktat.

Svi uzorci su analizirani tri puta prema sljedećoj shemi:

1. Broj stanica je u svakom uzorku likvora analiziran u 3 vremenska intervala:

- odmah po prijemu, a najkasnije unutar 60 minuta (u Fuchs-Rosenthalovoj komorici i na brojaču Sysmex XE5000) - **uzorak 1**
- unutar 61-90 minuta od prijema (samo u Fuchs-Rosenthalovoj komorici) - **uzorak 2**
- unutar 91-120 minuta od prijema (samo u Fuchs-Rosenthalovoj komorici).- **uzorak 3**

2. Biokemijske pretrage (ukupni proteini, glukoza, laktat) su napravljene:

- odmah po prijemu, a najkasnije unutar 60 minuta, u nativnom, necentrifugiranom uzorku i u bistrom supernatantu dobivenom nakon centrifugiranja
- unutar 91-120 minuta od prijema u nativnom, necentrifugiranom uzorku i u bistrom supernatantu

Svi uzorci su tijekom ispitivanja čuvani na sobnoj temperaturi.

3.2. Brojanje stanica likvora u Fuchs –Rosenthalovoj komorici

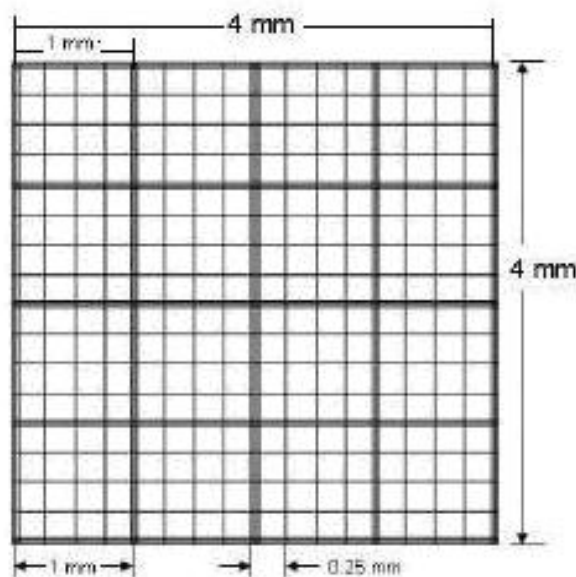
Prije same analize uzorak likvora je potrebno lagano promiješati kako bi se stanice jednakomjerno rasporedile u uzorku. Iz matičnog uzorka likvora brojanje stanica je vršeno u Fuchs-Rosenthalovoj komorici. Stanice se pri tom broje nativno.

Uzorak likvora nanosi se u komoricu pomoću pipete. Fuchs-Rosenthaltova komora ima površinu od 16 mm² (4 x 4), dubinu od 0,2 mm pa ukupni volumen komore iznosi 3,2 mm³. Prilikom brojanja valja uzeti u obzir i stanice koje se nalaze na graničnim linijama, najčešće se za svaki kvadratić uzima linija gore i lijevo. Ovisno o broju stanica, brojanje se može izvršiti na čitavoj površini komorice, a u slučaju velikog broja stanica u 1/4 odnosno 1/8 komorice te se dobiveni broj množi s 4 odnosno 8 (Weisglass i Arko, 1977.). Kod jako krvavih likvora zbog velikog broja stanica uzorak se razrjeđuje s fiziološkom otopinom u omjeru 1:5 ili 1:10, a konačni rezultat množi se s razrjeđenjem.

$$\text{Broj stanica u 1 mm}^3 \text{ likvora} = \frac{n}{16 \times 0,2} = \frac{n}{3,2}, \text{ tj. } \frac{n}{3}$$

Prilikom brojanja stanice su diferencirane na:

1. Mali limfociti
2. Veliki limfociti
3. Neutrofilni granulociti
4. Stanice u raspadu
5. Fagociti
6. Eritrociti



Slika 7. Fuchs-Rosenthaltova komorica za nativno brojanje stanica u likvoru (www.incyto.com)

Brojanje je izvršeno na mikroskopu Olympus BX41 (Olympus Tokyo, Japan) pod povećanjem 400x.

3.3. Brojanje stanica likvora na Sysmex XE 5000

Automatizirano brojanje stanica izvršeno je na analizatoru Sysmex XE 5000 (Sysmex, Njemačka). Svrha ovog brojanja je usporediti točnost rezultata ručnog brojanja s automatiziranom metodom. Stanice su diferencirane na polimorfonuklearne leukocite, mononuklearne leukocite i eritrocite.

Sysmex XE 5000 uređaj omogućava analizu nekoliko vrsta uzoraka: venska krv, kapilarna krv, razne tjelesne tekućine poput ascitesa, sadržaja drena, pleuralnog izljeva, dijalizata, sinovijalne tekućine i likvora. Međutim, valja paziti da uzorak nije previše gust i sluzav te isključiti postojanje ugruška. Takve uzorke nije preporučeno stavljati na analizator.

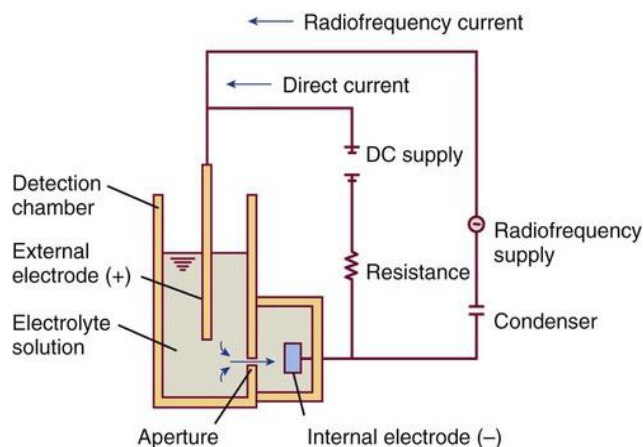
Uzorci se mogu aspirirati automatski pomoću specijaliziranih rack-ova ili ručno. Kada se analiza vrši automatizirano potrebno je obratiti pažnju na postavljanje uzorka na specijalizirane stalke. Prvenstveno se to odnosi na pravilno okretanje barkod naljepnica kako bi čitač mogao skenirati crtični kod. Prilikom ručne analize uzorka, kao što je to s likvorom, minimalna količina uzorka za analizu iznosi 300 μ L. Barkod se očitava ručno ili se ime zadaje utipkavanjem. Kako na istom uređaju dolazi do obrade različitih vrsta uzoraka, prije analize broja stanica u likvoru analizator je potrebno očistiti. Likvor je tekućina sa znatno manjim brojem stanica, stoga se čišćenje prije analize najčešće vrši varikinom.

Princip rada Sysmex XE 5000:

1. RF/DC (engl. *radio frequency/direct current*) metoda
2. DC metoda s hidrofinamičkim fokusiranjem
3. Protočna citometrija s poluvodičkim laserom

RF/DC metoda na temelju promijene otpora istosmjerne struje daje informacije o veličini stanice, dok promjena otpora radiofrekvencije o gustoći stanice (Slika 8). Uzorak se aspirira, razrjeđuje do specifičnog omjera i mjeri. Unutar detekcijske komore nalazi se mala pukotina koju nazivamo „apertura“, a sa svake strane nalaze se elektrode. Između elektroda uspostavljen je specifičan otpor. Prolaskom stanica suspendiranih u elektrolitskoj otopini kroz aperturu otpor između elektroda se mijenja. Promjena otpora istosmjerne struje govori o veličini stanice, a promjena otpora radiofrekvencije o gustoći stanice (granuliranost, veličina

jezgre...). Rezultat je prikazan dvodimenzionalnim prikazom, takozvanim „scattergramom“ (Sysmex, 2008.).



Slika 8. Sustav za mjerenje veličine i gustoće stanice RF/DC metodom.

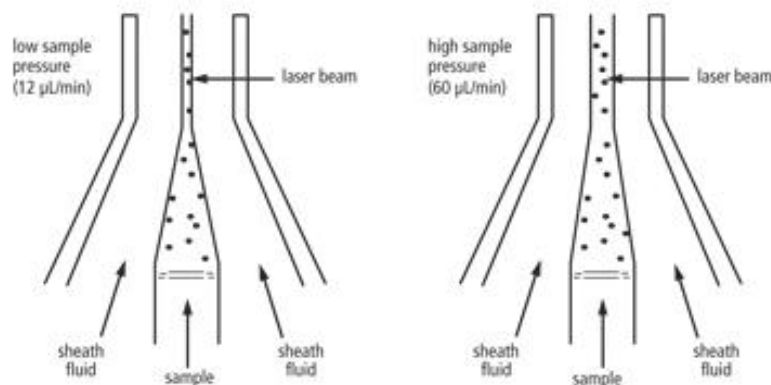
(www.clinicalgate.com)

Protočna citometrija je tehnologija kojom se mjere fizikalna svojstva bioloških čestica i stanica tijekom njihovog prolaska kroz mjerni uređaj u struji tekućine. Glavna značajka je istodobno mjerenje više parametara svake stanice u suspenziji. U određenom trenutku mjere se parametri samo jedne stanice.

Sastoji se od tri osnovna dijela:

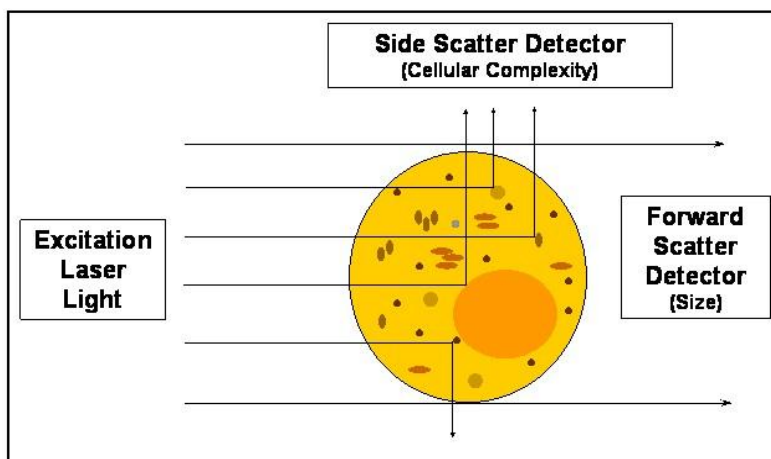
1. Sustav za protok stanica
2. Optički sustav
3. Elektromagnetski sustav

Sustav za protok stanica osigurava prijenos stanice iz epruvete u struji tekućine i osigurava da pri susretu sa laserskom zrakom stanice protječu pojedinačno tj. stanica za stanicom. Glavna značajka ovog dijela je hidrodinamičko fokusiranje. Uzorak se ubrizgava u tok obložne tekućine tzv. „sheat fluid“ unutar protočne komore koja zbog razlike u tlaku u odnosu na tlak uzorka omogućuje kontrolu prolaska stanica kroz lasersku zraku i sprječava odlaganje stanica na stijenke i njihov povratak. Tako protok stanica reguliramo tlakom. Što je veći tlak uzorka u odnosu na tlak „sheat fluida“ veća je brzina protoka. Pri tome se mlaz tekućine povećava te stanice postaju nagurane, odnosno nisu u nizu jedna za drugom. Ovaj način protoka koristi se prilikom brzog prikupljanja podataka kada okvirno želimo vidjeti što je prisutno u uzorku. Što je tlak uzorka manji to je brzina protoka manja pa većina stanica prolazi točno kroz centar lasera. Ona se primjenjuje kada je potrebna visoka rezolucija analize.



Slika 9. Hidrodinamičko fokusiranje i reguliranje protoka stanica tlakom
(www.bdbiosciences.com).

Optički sustav sastoji se od dva osnovna dijela. Ekscitacijskog sustava kojeg čine laser, leća i filter te sustava za prikupljanje svjetlosnih signala odnosno fotodetektora. Kada laserska zraka obasja stanicu obilježenu fluoroforom dolazi do rasapa svjetlosti na stanici i emisije fluorescencije. Raspršeno i fluorescentno zračenje prikuplja se pomoću prikladno postavljenih leća te se usmjerava do odgovarajućih detektora. Rasap nastaje ovisno o svojstvima stanice kao što su granularnost tj. unutrašnja kompleksnost i veličina stanice. Stanični oblik i površina također utječu na ukupni rasap svjetlosti. Mjere rasapa svjetlosti definiramo kao FSC (forward-scattered light) i SSC (side-scattered light). FSC mjera je uglavnom ogiba svjetla. Rasap svjetlosti ovdje korelira sa staničnom veličinom, a detektira se fotodiodom smještenom pod kutem od 0° u odnosu na upadnu zraku. SSC nastaje uslijed refrakcije i refleksije svjetla. Rasap korelira sa stupnjem granularnosti odnosno složenosti stanice. Otkriva se detektorom smještenim pod kutem od 90° u odnosu na smjer upadne laserske zrake.



Slika 10. SSC i FSC (www.nikitavsurpatne.yolasite.com)

Elektromički sustav omogućava nam prevođenje zabilježenih svjetlosnih signala u elektronske podatke (Sysmex, 2008.).

Analizom uzoraka određivane su slijedeće vrijednosti:

1. broj leukocita (WBC – BF)
2. broj eritrocita (RBC – BF)
3. broj i udio mononuklearnih stanica (MN#, MN%)
4. broj i udio polimorfonuklearnih stanica (PMN#, PMN%)
5. broj i udio visokofluorescentnih stanica (HF – BF#, HF – BF%)
6. ukupan broj stanica (TC – BF)

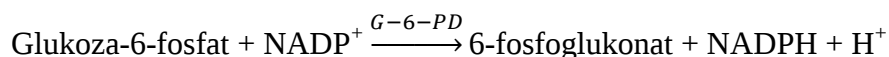
3.4. Određivanje koncentracije glukoze, laktata i ukupnih proteina u likvoru na analizatoru Cobas 6000 c501

Za mjerenje koncentracije glukoze, laktata i ukupnih proteina u likvoru korišten je potpuno automatizirani analizator Cobas 6000 c501 (Roche Diagnostics, Njemačka). Prvo mjerenje izvršeno je u necentrifugiranom uzorku unutar 60 min. U istom vremenskom periodu izvršeno je mjerenje zadanih analita i u centrifugiranom uzorku bez stanica. Postupak je ponovljen nakon 120 minuta najprije u necentrifugiranom uzorku, a zatim i u centrifugiranom uzorku. Centrifugiranje uzorka je izvršeno pomoću Centrifuge MPW-223e 10 minuta na 3500 okretaja.

3.4.1. Glukoza

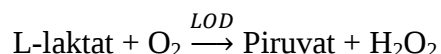
Koncentracija glukoze u likvoru određena je UV fotometrijski s heksokinazom. Glukoza se u prisutnosti ATP-a djelovanjem heksokinaze i Mg^{2+} fosforilira u glukoza-6-fosfat. Glukoza-6-fosfat djelovanjem glukoza-6-fosfat dehidogenaze i $NADP^+$ oksidira u 6-fosfoglukonat. Pri tome nastaje ekvivalentna koncentracija NADPH koja se mjeri fotometrijski (Cobas 6000 analyzer series, 2001.-2009.).

Ova metoda primjer je optičkog testa. On se zasniva na asorpcijskim svojstvima koenzima NADH2 i NADPH2. Reducirani oblici koenzima apsorbiraju svjetlo između 300 i 390 nm, dok njihovi oksidirani oblici ne apsorbiraju svjetlo na tom području. Na temelju tog svojstva mogu se pratiti promjene apsorpcije pri oksido-redukcijskim reakcijama na 339 nm. Njihovom oksidacijom apsorpcija se smanjuje razmjerno pretvorbi reduciranog oblika u oksidirani i obratno se povećava (Štraus, 2009.).



3.4.2. Laktat

Koncentracija laktata u uzorku likvora određuje se fotometrijski s laktat-oksidadom (LOD). L-laktata oksidira se u piruvat djelovanjem enzima laktat oksidaze pri čemu nastaje vodikov peroksid. U drugoj reakciji nastali vodikov peroksid zajedno s 4-aminoantipirinom i donorom vodika djelovanjem enzima peroksidaze (POD) prelazi u obojeni produkt (kromogen). Intenzitet nastale boje je direktno proporcionalan koncentraciji L-laktata i mjeri se fotometrijski (Cobas 6000 analyzer series, 2001.-2009.).



3.4.3. Ukupni proteini

Mjerna metoda korištena za određivanje ukupnih proteina u likvoru je turbidimetrija. Uzorak se preinkubira u alkalnoj otopini koja sadrži EDTA čime se proteini denaturiraju i uklanja se interferencija magnezijevih iona. U reakciji s benzetonij kloridom proteini stvaraju stabilno i homogeno zamućenje čiji intenzitet se mjeri (Cobas 6000 analyzer series, 2001.-2009.).

Turbidimetrija pripada izravnim imunokemijskim metodama u otopini. One su veoma slične klasičnim precipitacijskim metodama. Kada svjetlost prolazi kroz otopinu dolazi do njenog raspršenja, ali i smanjena njezinog intenziteta. Turbidimetrijom mjerimo količinu apsorbirane svjetlosti. Ona se određuje prema izrazu:

$$T = \frac{I}{I_0}$$

Gdje je I_0 intenzitet ulazne svjetlosti, a I intenzitet svjetlosti nakon prolaska kroz uzorak. Na temelju propuštene svjetlosti zaključujemo o koncentraciji suspendiranog analita koji je proporcionalan zamućenju otopine:

$$S = \log \frac{I}{I_0} = kbc$$

gdje S označava zamućenje, k koeficijent zamućenja, b duljinu puta kroz uzorak, c koncentraciju analita. Intenzitet svjetlosti mjeri se fotodetektorom smještenom u smjeru ulazne svjetlosti. Valna duljina emitirane svjetlosti koja se mjeri nalazi se u rasponu od 290 nm do 410 nm (Dodig, 2014.).

3.5. Statistička obrada podataka

Statistička obrada eksperimentalnih podataka učinjena je pomoću programa MedCalc Version 17.4.4. Korišteno je nekoliko vrsta statističkih testova ovisno o vrsti podataka i željenoj usporedbi.

3.5.1. Passing-Bablok regresija

Usporedba broja stanica dobivenih ručno prilikom prvog brojanja (uzorak 1) i broja stanica dobivenih Sysmex XE 5000 analizirana je Passing-Bablok regresijom. Passing-Bablok regresija posebna je vrsta linearne regresije koja za razliku od ostalih vrsta regresija, koje

sadržavaju jednu zavisnu i jednu nezavisnu varijablu, pretpostavlja da niti jedna od dviju varijabli nije niti zavisna niti nezavisna. Niti jedna varijabla nije apsolutno točna. Passing-Bablok regresija je neparametrijska metoda idealna za usporedbu dvaju metoda kada želimo usporediti njihove rezultate mjerenja. Rezultat mjerenja je vrijednost odsjeka i nagiba pravca s intervalom pouzdanosti koji ukazuju na postojanje stalne ili proporcionalne razlike između mjerenja (Šimundić, 2008.).

Jednadžba pravca glasi $y = a + bx$, gdje je a odsječak na osi y , a b je nagib pravca. Vrijednost odsjeka predstavlja konstantno, a vrijednost nagiba proporcionalno odstupanje u mjerenjima. Jednadžba idealnog pravca glasi $y = x$, gdje je $a = 0$, $b = 1$. Pri analizi potrebno je definirati granice pouzdanosti odnosno raspon vrijednosti rezultata unutar kojeg s određenom sigurnošću nalazimo predviđene rezultate. Uobičajeno se uzima vrijednost 95% (Bilić-Zule, 2011.). Prilikom mjerenja tj. usporedbe metoda težimo upravo dobivanju idealnog pravca te u tom slučaju zaključujemo da nema statistički značajne razlike između metoda.

3.5.2. Wilcoxonov test

Usporedba broja stanica u tri vremenska intervala dobivena ručnim brojanjem na mikroskopu Olympus BX41 analizirana je Wilcoxonovim testom. To je neparametrijski analog parnog t -testa kojeg koristimo kada želimo usporediti postoji li razlika u srednjim vrijednostima između dvije serije parova međusobno zavisnih podataka. Uvjet je da razdioba nije normalna, podaci su zavisni i ne mogu se transformirati u normalnu raspodjelu. On koristi više informacija tj. koristi rangove, a ne samo podjelu u dvije kategorije i zato se može smatrati boljim i "snažnijim" testom (Šimundić, 2008. i www.pmf.unizg.hr). Postupak se sastoji u tome da izračunamo razlike (d) između oba člana u svakom paru. Ako razlike nema, ona je 0, taj se par ispušta iz daljnje obrade. Razlike mogu biti pozitivne i negativne i rangiraju se bez obzira na predznak. Ako su dvije ili više razlika jednake veličine, dobivaju zajednički rang. Pri tom testiramo hipoteze, nul-hipoteza koja nam govori da nema razlike među uzorcima odnosno postoji tendencija da suma pozitivnih i suma negativnih bude jednaka. Ako postoji značajna razlika u sumi tada ćemo odbaciti nul-hipotezu. Pri tome izračunavamo T koji označava manju sumu rangova (odabir između sume pozitivnih i sume negativnih rangova), N broj parova rezultata, koji nam omogućavaju čitanje p vrijednosti uz određenu razinu značajnosti pomoću tablica (www.pmf.unizg.hr).

3.5.3. Parni t-test uzorak-uzorak za zavisne uzorke

T test uzorak-uzorak za zavisne uzorke koji se još naziva „paired t-test“ korišten je za usporedbu vrijednosti koncentracija glukoze, lakata i ukupnih proteina u centrifugiranom i necentrifugiranom likvoru u dva vremenska intervala. T-test za zavisne uzorke koristi metodu diferencijacije u kojoj se uspoređuje prosječna diferencijacija s njenom pogreškom. Postavljanje hipoteza jednako je kao i u studentovom t-testu za nezavisne uzorke, ali je t-varijabla drugačija, a time je i test statistika drugačija. Formule za izračun test statistike za zavisne uzorke su slijedeće:

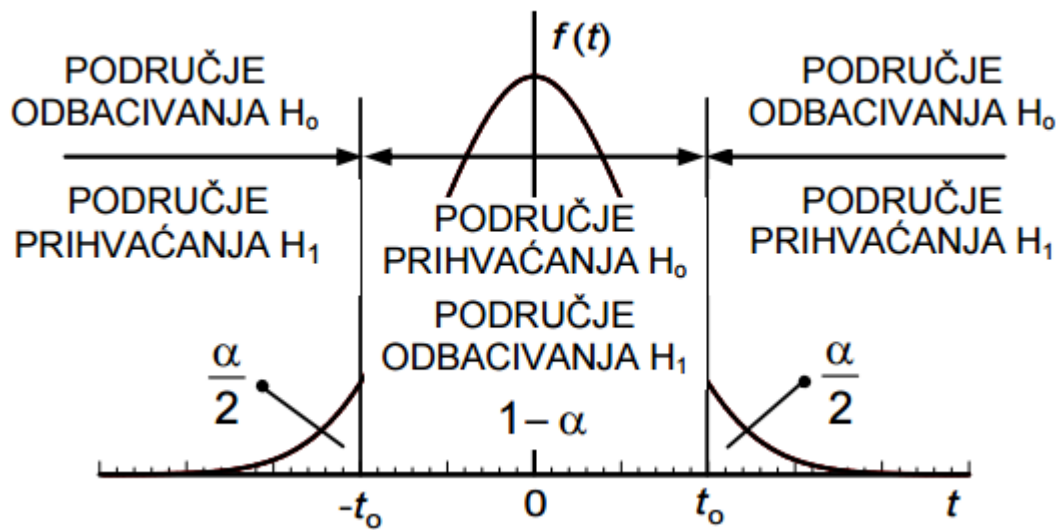
$$t = \frac{\bar{x} \text{ dif}}{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n d^2}{n(n-1)}}} \quad \bar{x} \text{ dif} = \frac{\sum_{i=1}^n \text{dif}}{n} \quad d = \text{dif} - \bar{x} \text{ dif}$$

T označava t varijablu t-testa uzorak-uzorak kada su uzorci zavisni, $\bar{x} \text{ dif}$ prosječnu diferencijaciju, a d razliku pojedine diferencijacije i prosječne diferencijacije pri čemu dif označava diferencijaciju tj. razliku rezultata prvog i drugog mjerenja. n je oznaka za broj uzoraka.

U ovom slučaju koristi se dvosmjerni t-test. Sukladno tome postavljamo i hipoteze. Nul-hipoteza pretpostavlja da su očekivanja oba uzorka jednaka. $H_0: \mu_1 = \mu_2$. Ukoliko su očekivanja uzoraka manja ili veća tj. različita dolazi do odbacivanja nul-hipoteze i prihvatanja alternativne hipoteze $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$. T_0 koji je potreban za interpretaciju testa i prihvatanje ili odbacivanje hipoteza izračunavamo prema slijedećem izrazu:

$$t_0 = \left\{ \alpha \text{ ili } 2 \alpha \right\}_{k = n - 1} = \text{tablica}$$

Gdje α označava razinu značajnosti, signifikantnosti testa, k broj stupnjeva slobode, n broj uzoraka. Za dvosmjerni t-test koristimo izraz s α . Nakon što smo pomoću tablica odredili željeni t_0 donosimo zaključke o postavljenim hipotezama. Ukoliko je $t \in \langle -t_0, t_0 \rangle$ prihvaća se hipoteza H_0 i odbacuje hipoteza H_1 . Ukoliko je $t \in \langle -\infty, -t_0 \rangle \cup \langle t_0, +\infty \rangle$ odbacuje se hipoteza H_0 i prihvaća hipoteza H_1 (www.moodle.srce.hr).



Slika 11. Grafički prikaz test statistike t-testa uzorak-uzorak kada su uzorci zavisni i područja prihvatanja i odbacivanja hipoteze H_0 za dvosmjerni t-test ([www. moodle.srce.hr](http://www.moodle.srce.hr))

4. Rezultati i rasprava

4.1. Rezultati

4.1.1. Određivanje broja stanica u likvoru ručnim brojanjem u Fuch-Rosenthaltovoj komorici i na hematološkom brojaču

Brojanje stanica u likvoru vršeno je odmah po prijemu u laboratorij ručno u Fuch-Rosenthaltovoj komorici i na analizatoru Sysmex XE 5000. Broj stanica izražen je kao $n/3$ u μL . Uspoređeni su dobiveni rezultati za ukupan broj stanica, eritrocite, mononuklearne leukocite i polimorfonuklearne leukocite. Da bi se rezultati ručnog brojanja mogli usporediti s rezultatima dobivenim brojanjem na Sysmex XE 5000, veliki i mali limfociti su zbrojeni i uspoređivani s mononuklearnim leukocitima, a neutrofilni granulociti su uspoređivani s polimorfonuklearnim leukocitima. Nakon toga određen je broj i vrsta stanica u likvoru ručnim brojanjem i nativnim diferenciranjem u vremenu 61-90 minuta i 91-120 minuta od prijema čiji su rezultati uspoređeni s brojem stanica likvora dobivenih unutar 60 minuta

4.1.1.1. Broj stanica u likvoru dobiven brojanjem na Sysmex XE 5000

U Tablici 4 su prikazani rezultati brojanja stanica u uzorcima likvora na uređaju Sysmex XE 5000 unutar 60 minuta od prijema u laboratorij.

Tablica 4. Broj stanica u likvoru dobiven brojanjem na Sysmex XE 5000

Pacijent	Ukupan broj stanica	Mononuklearni leukociti	Polimorfonuklearni leukociti	Eritrociti
1.	57	18	39	15600
2.	1278	495	783	12000
3.	669	48	621	15000
4.	264	255	9	0
5.	360	294	66	600
6.	249	219	30	3000
7.	177	156	21	8700
8.	378	369	9	3000
9.	450	21	429	23400
10.	1854	54	1800	81300
11.	384	231	153	1500

Pacijent	Ukupan broj stanica	Mononuklearni leukociti	Polimorfonuklearni leukociti	Eritrociti
12.	126	72	54	1500
13.	1506	69	1437	21900
14.	48	6	42	900
15.	168	9	159	1800
16.	159	63	96	5100
17.	102	24	78	14400
18.	60	3	57	5400
19.	63	54	9	9600
20.	288	225	63	8100
21.	5709	1194	4506	600
22.	2136	327	1809	543000
23.	4104	810	3294	1500
24.	975	180	795	132600
25.	144	36	78	48000
26.	276	102	174	25200
27.	381	372	9	0
28.	570	174	396	300
29.	60	57	3	1200
30.	36	15	21	36900
31.	117	9	108	7200
32.	16263	3177	13086	6000

4.1.1.2. Broj i vrste stanica u likvoru dobivene ručnim brojanjem i nativnim diferenciranjem na mikroskopu Olympus BX41

U Tablici 5 su prikazani rezultati ručnog brojanja i nativnog diferenciranja stanica u likvoru u tri vremenska intervala protekla od prijema uzorka u laboratorij.

Tablica 5. Broj stanica dobiven ručnim brojanjem u tri vremenska intervala (unutar 60 min, 61-90 min, 91-120 min)

Pacijent	Ukupan broj stanica			Mali limfociti			Veliki limfociti			Neutrofilni granulociti			Fagociti			Stanice u raspadu			Eritrociti		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
1	44	41	45	1	2	2	5	8	4	35	28	34	0	0	0	3	3	5	11260	14800	14800
2	796	760	825	112	7	95	49	63	45	590	600	640	15	60	45	30	30	0	10240	11260	9980
3	500	500	552	0	0	0	8	15	8	480	530	496	0	0	0	12	15	48	16384	15600	12030
4	212	196	221	174	173	193	27	16	23	2	3	1	2	1	1	7	3	3	15	10	12
5	248	251	191	222	214	151	15	29	53	4	3	1	4	3	0	3	2	6	35	30	34
6	240	272	239	148	190	172	38	48	28	34	20	24	4	2	3	16	12	12	80	95	70
7	163	149	155	132	114	124	13	23	18	3	3	1	1	0	0	14	10	12	208	180	138
8	353	380	398	319	353	370	27	20	20	0	0	0	1	0	0	6	7	8	15	16	16
9	400	374	372	64	48	32	32	60	48	256	200	256	3	2	4	48	64	32	22000	21500	22500
10	1680	1680	1584	0	0	0	0	0	0	1630	1680	1584	0	0	0	0	0	0	67584	68352	66816
11	175	189	175	4	6	8	36	40	20	100	120	96	5	3	3	30	20	48	160	150	135
12	121	108	106	9	8	0	14	12	12	63	60	64	5	8	5	30	20	25	1050	1152	1024
13	1520	1050	989	0	0	14	30	0	10	1480	1040	944	10	10	0	0	0	20	23000	23040	22270
14	34	29	30	18	10	15	9	2	5	4	6	6	2	1	3	1	10	1	576	592	576
15	122	111	100	15	8	45	3	1	3	90	88	57	1	0	1	10	14	34	6016	6084	6020
16	185	180	151	3	4	0	2	2	1	180	168	140	0	1	0	0	5	10	1712	1504	1376
17	76	69	59	2	3	1	4	6	6	51	47	35	13	8	7	6	5	10	14850	14492	14850
18	46	37	36	6	5	2	4	4	3	30	24	28	0	0	1	6	4	2	5600	5600	5800
19	21	30	19	6	5	4	6	10	4	4	6	5	1	1	0	4	8	6	4740	4864	5120
20	155	134	154	72	52	80	24	20	24	36	32	28	3	2	2	20	28	20	7900	7900	8190
21	4830	4860	4176	350	512	496	480	350	160	4000	4000	3520	0	0	0	0	0	0	150	120	160
22	1330	1362	1268	19	0	0	114	95	76	969	1020	1020	133	152	75	95	95	115	632320	622590	612860
23	960	3280	3360	320	288	240	80	48	48	2860	2944	3072	0	0	0	0	0	0	3260	912	880
24	600	610	610	60	60	60	110	80	100	340	400	360	10	10	10	80	60	80	95000	96000	90000
25	50	35	49	8	5	9	13	14	13	16	8	15	5	6	6	8	2	6	2800	2300	2400
26	35	24	22	4	2	1	9	2	4	3	2	1	12	12	6	7	6	10	1580	1660	1650
27	415	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-		-	-
28	423	400	424	95	76	68	8	4	4	240	260	308	0	0	0	80	60	44	128	110	96
29	123	99	94	-			-			-			-			-			704	432	544
30	14	16	21	4	2	2	2	2	2	8	9	16	0	0	0	0	3	1	28160	30000	33000
31	88	94	53	2	2	0	2	6	0	80	82	41	1	0	0	3	4	12	6400	6700	6528
32	17760	15520	15200	1280	1440	1120	1600	1280	1120	14880	12800	12960	0	0	0	0	0	0	4000	3680	3880

Legenda: Broj stanica dobiven ručnim brojanjem: I- unutar 60 min, II -unutar 61-90 min, III - unutar 91-120 min

4.1.1.3. Statistička obrada rezultata brojanja stanica u likvoru dobivenih ručnim brojanjem na mikroskopu Olympus BX41 i analizatoru Sysmex XE 5000

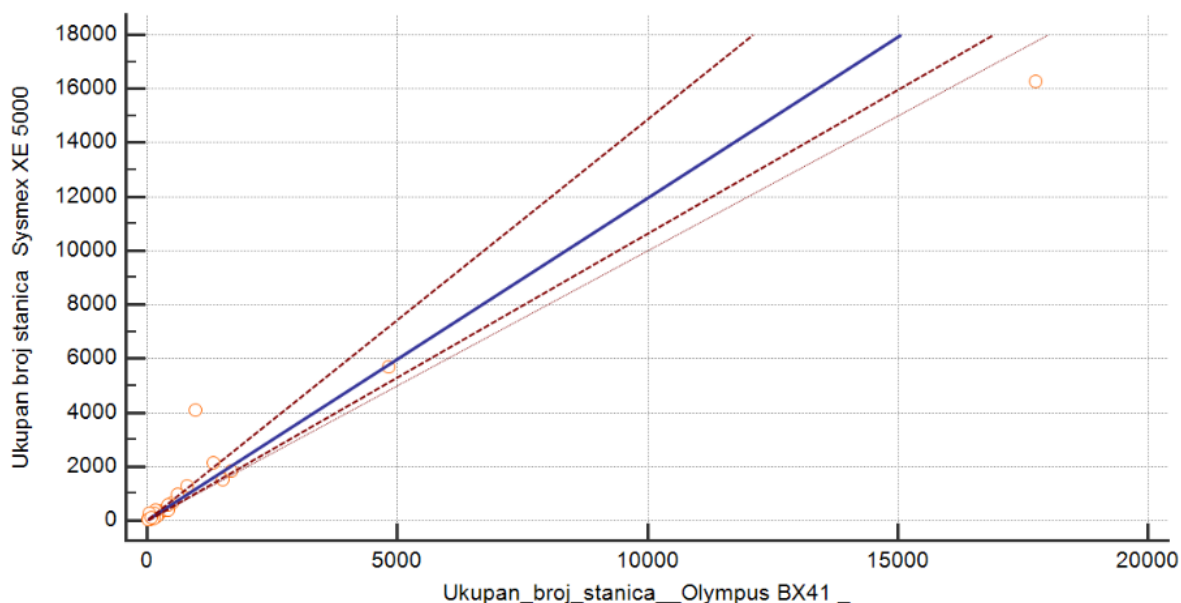
Procjena linearnosti izvršena je na temelju parametra p čije vrijednosti možemo vidjeti u Tablici 6. Kako njena vrijednost nije manja od 0,05 kod svih skupina stanica, zaključujemo da nema statistički značajne razlike, odnosno nema odstupanja od linearnosti.

Tablica 6. p vrijednosti dobivene Passing-Bablok testom regresije te Spermanov koeficijent korelacije i pripadajuće p vrijednosti Spermanovog testa korelacije za broj stanica dobivenih mikroskopom Olympus BX41 i analizatorom Sysmex XE 5000

Vrsta stanica	p	r	p (Sperman)
Eritrociti	0,91	0,814	<0,0001
Ukupan broj stanica	1	0,934	<0,0001
Mononuklearni leukociti	0,19	0,683	<0,0001
Polimorfonuklearni leukociti	0,34	0,908	<0,0001

Procjena korelacije rezultata učinjena je pomoću Spermanovog koeficijenta korelacije r. U Tablici 6 prikazane su vrijednosti pojedinih koeficijenata korelacije i pripadajuća p vrijednosti za procjenu značajnosti. Što je Spearmanov koeficijent korelacije r bliži +/-1 to je korelacija između obilježja jača. Kako je kod svih stanica vrijednost parametra $p < 0,05$, zaključujemo da postoji dobra korelacija rezultata.

Na Slici 12 prikazan je primjer rezultata statističke obrade podataka ukupnog broja stanica dobivenih mikroskopom Olympus BX41 i analizatorom Sysmex XE 5000. Metodom Passing-Bablok regresije dobiven je pravac $y = 11,207307 + 1,193005 x$. Odsječak na osi y, odnosno A iznosi 11,2073 (CI 95%), dok nagib pravca B iznosi 1,1930 (CI 95%). Ovakav pravac regresije ukazuje na postojanje proporcionalne razlike između vrijednosti dobivenih navedenim metodama.



Slika 12. Grafički prikaz Passing-Bablok pravca regresije dobivenog usporedbom ukupnog broja stanica mikroskopom Olympus BX41 i analizatorom Sysmex XE 5000

4.1.1.4. Usporedba broja stanica u likvoru dobivenih ručnim brojanjem na mikroskopu Olympus BX41 unutar 60 min, 61-90 min i 91-120 min

Statističkom obradom podataka dobivenih analizom broja stanica u dva vremenska intervala, unutar 60 minuta i 61-90 minuta, nije uočena statistički značajna razlika istih. Ne postoji p vrijednost čiji je iznos manji od 0,05 koji smo odredili kao razinu značajnosti. U Tablici 7 su prikazane p vrijednosti dobivene usporedbom pojedinih vrsta stanica.

Tablica 7. p vrijednosti dobivene usporedbom broja stanica u likvoru dobivenih ručnim brojanjem unutar 60 min i 61-90 min

Vrsta stanica	p
Eritrociti	0,9397
Ukupan broj stanica	0,2608
Mali limfociti	0,1829
Veliki limfociti	0,2977
Neutrofili	0,9904
Fagociti	0,4307
Stanice u raspadu	0,5922

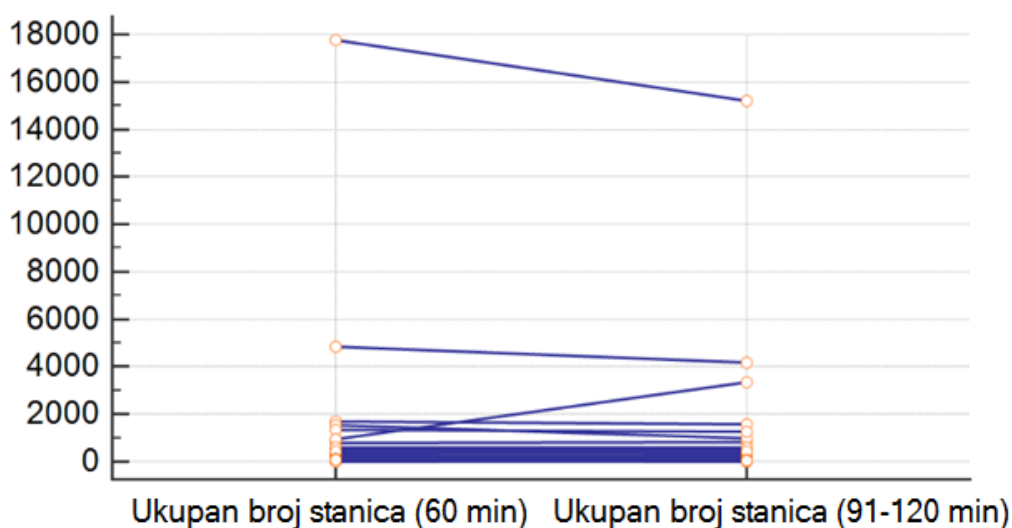
Kako niti jedna od usporedba broja stanica dobivenih unutar 60 minuta i unutar 61-90 minuta nije pokazala statističku značajnost prihvaćena je nul hipoteza koja nam govori da nema razlike u dobivenim rezultatima

Isti postupak usporedbe broja stanica učinjen je i za vremenske intervale 60 minuta i 91-120 minuta. Ovom usporedbom je uočena statistički značajna razlika u ukupnom broju stanica i u broju velikih limfocita. Pripadajuće p vrijednosti su prikazane u Tablici 8.

Tablica 8. p vrijednosti dobivene usporedbom broja stanica u likvoru dobivenih unutar 60 min i 91-120 min ručnim brojanjem na mikroskopu Olympus BX41

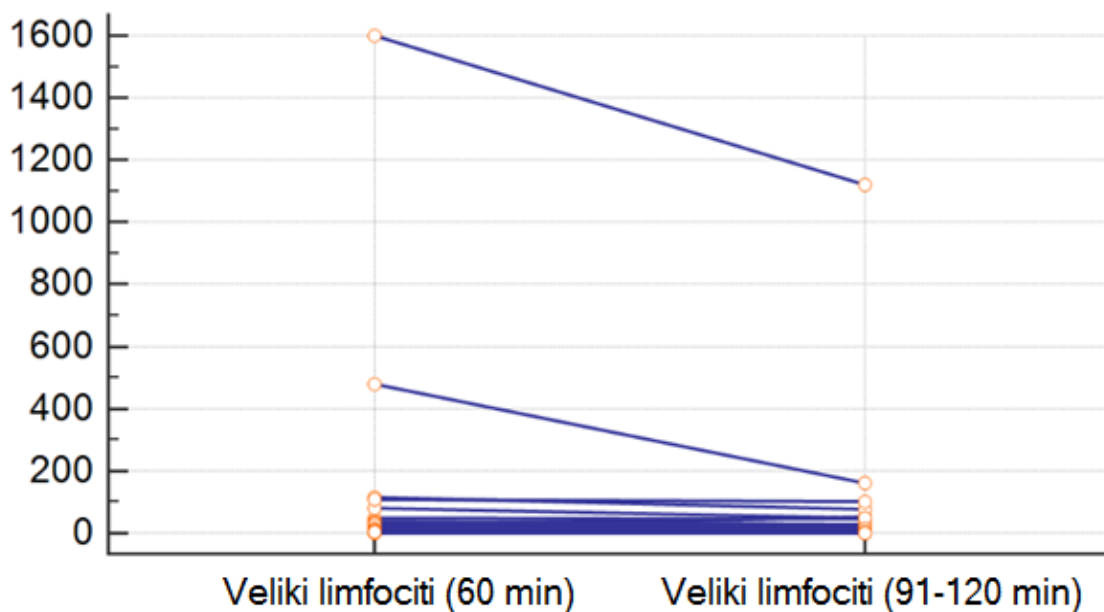
Vrsta stanica	p
Eritrociti	0,2020
Ukupan broj stanica	0,0316
Mali limfociti	0,3305
Veliki limfociti	0,0079
Neutrofili	0,2502
Fagociti	0,0539
Stanice u raspadu	0,4291

Na slici 13 je prikazan grafički prikaz Wilcoxonovog testa za ukupan broj stanica. Broj suma pozitivnih rangova iznosi 9, a broj suma negativnih rangova iznosi 21, broj analiziranih uzoraka je 31. S obzirom na p vrijednost od 0,0316 donosimo odluku o odbacivanju nul hipoteze i prihvaćanju H1 hipoteze, odnosno postoji statistički značajna razlika za ukupan broj stanica određivan unutar 60 minuta i 91-120 minuta od prijema.



Slika 13. Grafički prikaz Wilcoxonovog testa dobiven usporedbom ukupnog broja stanica unutar 60 min i 91-120 min

Značajnija razlika u sumi rangova uočena je prilikom statističke obrade podataka dobivene brojanjem stanica velikih limfocita. Broj analiziranih uzoraka iznosi 30, broj pozitivnih rangova 4, negativnih rangova 20 uz p vrijednost 0,0079 (Tablica 8) čime je dokazana statistički značajna razlika u broju velikih limfocita određivanog unutar 60 minuta i 91-120 minuta od prijema.



Slika 14. Grafički prikaz Wilcoxonovog testa dobiven usporedbom broja velikih limfocita unutar 60 min i 91-120 min

4.1.2. Određivanje koncentracije glukoze, lakata i ukupnih proteina u likvoru

Biokemijske pretrage likvora učinjene su u dva vremenska intervala, odmah prilikom prijema uzorka, a najkasnije unutar 60 minuta te 91-120 minuta u necentrifugiranom i centrifugiranom uzorku likvora na potpuno automatiziranom analizatoru Cobas 6000 c501. Pri tome su mjerene koncentracije glukoze, laktata i ukupnih proteina.

4.1.2.1. Rezultati mjerenja koncentracije glukoze, lakata i ukupnih proteina u likvoru

U Tablici 9 prikazani su rezultati mjerenja glukoze, lakata i ukupnih proteina u centrifugiranom i necentrifugiranom likvoru u dva vremenska intervala. Uzorci su do izrade analize čuvani na sobnoj temperaturi.

Tablica 9. Koncentracija glukoze, lakata i ukupnih proteina u necentrifugiranom i centrifugiranom likvoru u 60 min i 91-120 min

Pacijent	Ukupni proteini (g/L)				Glukoza (mmol/L)				Laktat (mmol/L)			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
1.	0,73	0,7	0,71	0,7	4,04	4,08	4,05	4,09	2,54	2,61	2,57	2,62
2.	0,36	0,35	0,34	0,33	4,59	5,17	4,74	4,7	3,84	4,32	3,98	4
3.	0,96	1,06	0,97	0,96	4,45	5,13	4,59	4,56	2,73	3,14	2,76	2,84
4.	1,49	1,48	1,45	1,62	1,8	1,8	1,79	1,82	4,7	4,91	4,8	4,94
5.	1,65	1,81	1,63	1,94	1,97	2,25	2,07	2,41	5,13	5,87	5,31	6,01
6.	2,5	2,53	2,51	2,42	1,78	1,82	1,82	1,84	6,15	6,2	6,25	6,24
7.	1,25	1,33	1,27	1,29	1,42	1,41	1,33	1,38	5,5	5,68	5,4	5,54
8.	0,28	0,29	0,28	0,27	3,93	3,42	3,33	3,49	1,6	1,6	1,62	1,71
9.	1,48	1,64	1,58	1,68	4,69	4,98	4,76	5,49	2,39	2,63	2,44	2,83
10.	2,5	2,36	2,34	2,41	0,17	4,01	4,05	0,17	2,19	2,17	2,22	2,21
11.	0,48	0,52	0,49	0,57	2,7	3	2,81	0,14	3,82	4,72	3,93	4,47
12.	0,5	0,55	0,52	0,52	2,65	2,88	2,65	2,67	3,42	3,62	3,47	3,5
13.	0,6	0,65	0,61	0,64	4,01	4,68	4,14	4,65	4,09	4,75	4,14	4,76
14.	0,46	0,49	0,47	0,47	3,29	3,42	3,38	3,3	3,06	3,34	3,18	3,25
15.	0,77	0,81	0,77	0,78	2,02	2,08	2,04	1,99	3,76	3,85	3,84	3,81
16.	0,99	1,13	1,01	1,03	4,12	4,69	4,31	4,3	1,78	2,01	1,8	1,85
17.	0,15	0,14	0,15	0,13	3,73	3,91	3,71	3,85	1,64	1,77	1,7	1,73
18.	0,19	0,19	0,2	0,19	3,75	3,72	3,77	3,78	1,62	1,64	1,62	1,62
19.	0,33	0,37	0,33	0,36	4,15	4,44	4,15	4,61	2,84	3,09	2,86	3,13
20.	2,74	0,66	0,66	0,65	0,66	2,78	2,72	2,73	4,17	4,28	4,16	4,2
21.	0,68	0,62	0,69	0,65	3,64	3,67	3,68	3,7	2,74	2,7	2,79	2,82
22.	5,86	6,24	5,84	6,1	7,23	7,81	7,18	8,11	3,92	4,5	4,13	4,8
23.	5,1	4,97	-	-	1,41	1,41	-	-	5,18	5,02	-	-
24.	0,62	0,58	0,63	0,6	4,05	4,41	4,07	4,45	5,21	5,99	5,36	6,13
25.	0,2	0,17	0,2	0,17	3,4	3,41	3,43	3,46	2,36	2,35	2,41	2,44
26.	0,15	0,13	0,14	0,12	3,61	3,92	3,78	3,8	1,83	1,98	1,9	1,89
27.	3,05	3,06	3,09	3	1,15	1,08	1,15	1,13	6,01	5,98	6,08	6,05
28.	1,4	1,6	1,6	1,6	3,05	3,05	3,03	3,05	2,56	2,56	2,57	2,61
29.	1,21	1,33	1,2	1,22	3,71	4,09	3,69	3,81	3,69	4,16	3,76	3,79
30.	0,57	0,55	0,61	0,57	4,29	4,22	4,29	4,34	2,59	2,62	2,62	2,63
31.	0,17	0,16	0,17	0,19	3,94	3,97	3,97	3,94	1,55	1,56	1,57	1,58
32.	2,93	2,75	2,6	2,8	2,54	2,55	2,49	2,51	4,56	4,76	4,77	5,15

Legenda: I-necentrifugirani likvor u 60 minuta, II-centrifugirani likvor u 60 minuta, III-necentrifugirani likvor u 91-120 minuta, IV-centrifugirani likvor u 91-120 minuta.

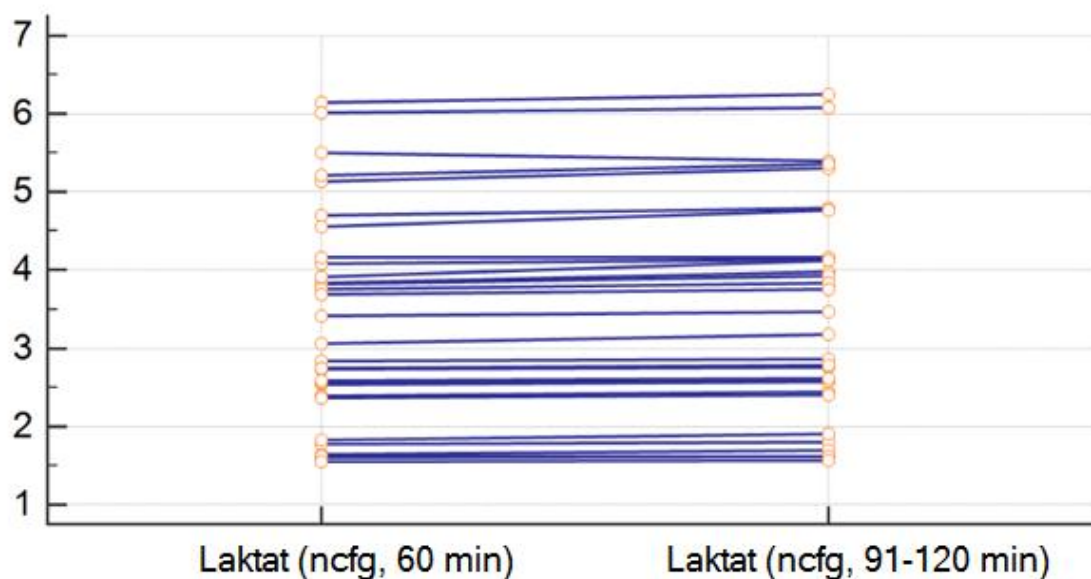
4.1.2.2. Usporedba koncentracije glukoze, laktata i ukupnih proteina unutar 60 min i 91-120 min u centrifugiranom i necentrifugiranom likvoru

Statističkom obradom podataka dobivenih mjerenjem koncentracije glukoze, laktata i ukupnih proteina uočeno je da je raspodjela normalna te je upotrijebljen parni t-test uzorak-uzorak. Uzorci su analizirani u necentrifugiranom likvoru i u bistrom supernatantu odvojenom od stanica unutar 60 minuta i 91-120 minuta od prijema.

Tablica 10. p vrijednosti dobivene statističkim testom usporedbe koncentracije glukoze, laktata i ukupnih proteina u necentrifugiranom likvoru unutar vremenskog intervala od 60 minuta i 91-120 minuta

Analit	p
Glukoza	0,1512
Laktat	<0,0001
Ukupni proteini	0,3107

Usporedba koncentracije glukoze, laktata i ukupnih proteina izvršena je u dva vremenska intervala u necentrifugiranom likvoru sa svrhom proučavanja utjecaja vremena stajanja u prisutnosti stanica na koncentraciju istih. Kao razina značajnosti uzeta je vrijednost α 0,05, stoga samo one vrijednosti sa $p < 0,05$ smatramo statistički značajnim. U Tablici 10 je vidljiva statistički značajna razlika u koncentraciji laktata.



Slika 15. Grafički prikaz t-testa uzorak-uzorak za laktat u necentrifugiranom likvoru u 60 min i 91-120 min

Isti postupak učinjen je u bistrom supernatantu nakon centrifugiranja u 60 minuta i 91-120 minuta. Centrifugiranjem uzorka i odvajanjem od stanica, koncentracija analita nije se značajno promijenila stajanjem. Statističkom obradom podataka nije dobivena p vrijednost manja 0,05 (Tablica 11) što znači da ne postoji statistički značajna razlika u koncentracijama analita u centrifugiranom likvoru.

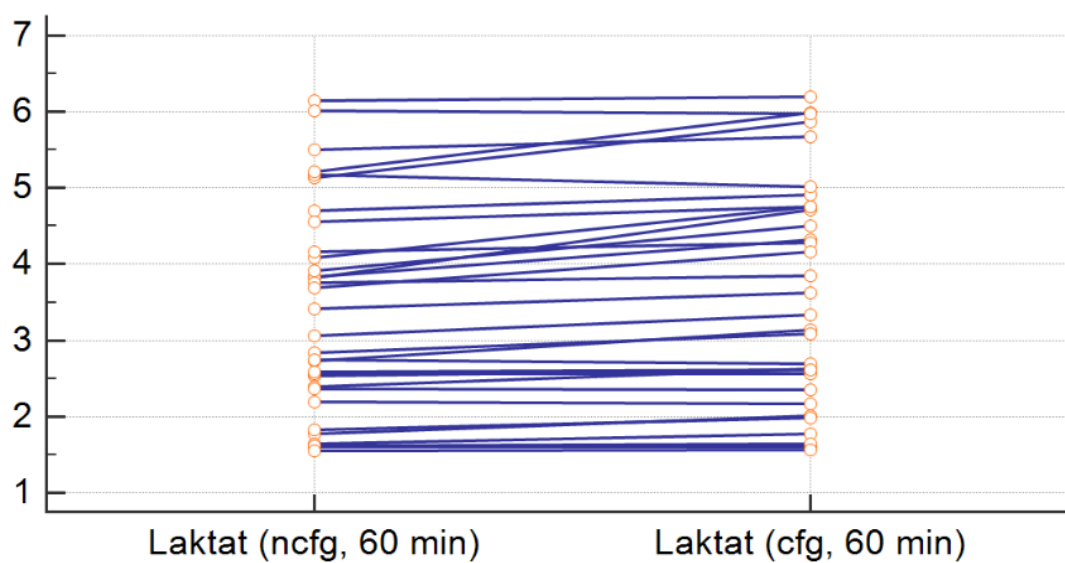
Tablica 11. p vrijednosti dobivene usporedbom koncentracije glukoze, laktata i ukupnih proteina u centrifugiranom likvoru unutar vremenskog intervala od 60 min i 91-120 min

Analit	p
Glukoza	0,1254
Laktat	0,8238
Ukupni proteini	0,4461

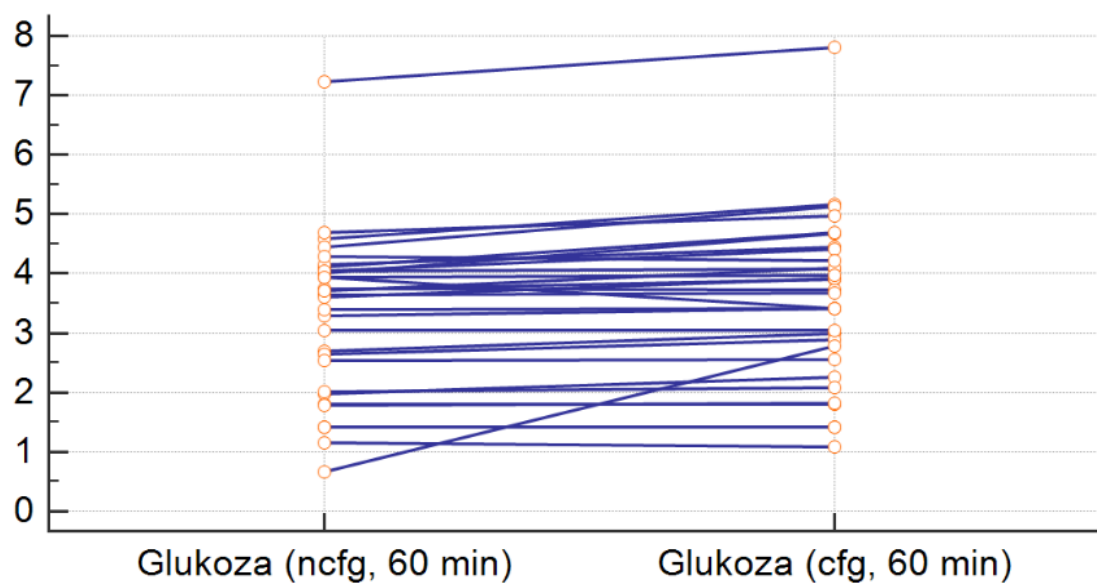
Nadalje, promatrao se utjecaj staničnih elemenata na koncentraciju analita u uzorku unutar vremena od 60 min. U Tablici 12 ističe se vrijednost $p = 0,0138$ za koncentraciju glukoze i $p < 0,0001$ za koncentraciju laktata u uzorcima. Iz tog zaključujemo da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji glukoze i laktata mjerenih u necentrifugiranom i centrifugiranom likvoru.

Tablica 12. p vrijednosti dobivene usporedbom vrijednosti koncentracija glukoze, laktata i ukupnih proteina u necentrifugiranom i centrifugiranom likvoru unutar 60 min

Analit	p
Glukoza	0,0138
Laktat	<0,0001
Ukupni proteini	0,6101



Slika 16. Grafički prikaz t-testa uzorak-uzorak za laktat u necentrifugiranom i centrifugiranom likvoru unutar 60 min

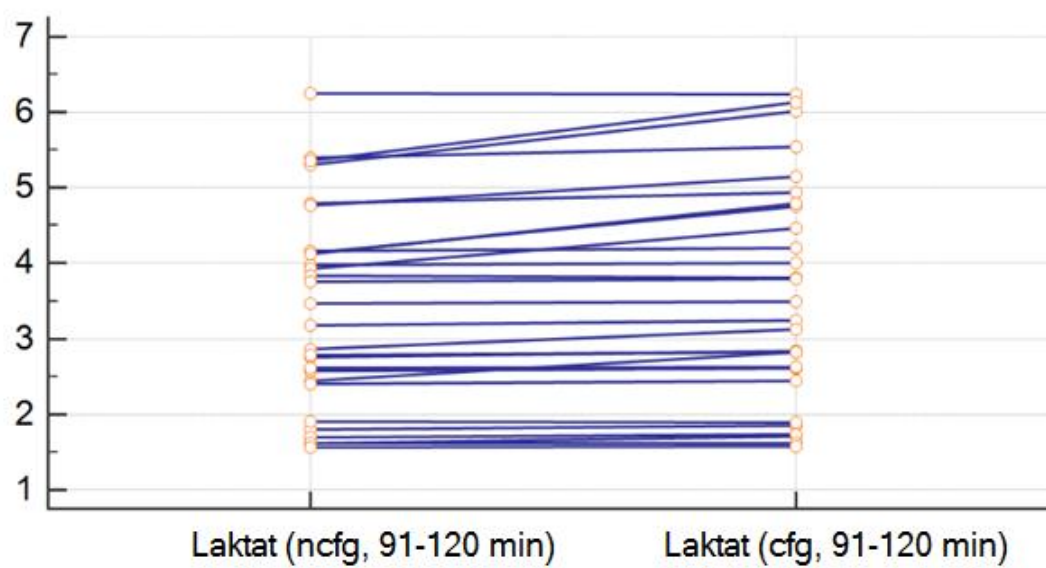


Slika 17. Grafički prikaz t-testa uzorak-uzorak za glukozu u necentrifugiranom i centrifugiranom likvoru unutar 60 min

Obradom podataka, dobivenim mjerenjem koncentracija analita u necentrifugiranom i centrifugiranom likvoru unutar vremenskog intervala od 91-120 minuta od primitka u laboratorij, uočavamo statistički značajnu razliku samo u koncentracijama laktata. Pripadne p vrijednosti prikazane su Tablicom 13, a ona za laktat iznosi $p < 0,0007$.

Tablica 13. p vrijednosti dobivene statističkim testom usporedbom vrijednosti koncentracija glukoze, laktata i ukupnih proteina u necentrifugiranom i centrifugiranom likvoru unutar 91-120 min

Analit	p
Glukoza	0,5929
Laktat	0,0007
Ukupni proteini	0,0819



Slika 18. Grafički prikaz t-testa uzorak-uzorak za laktat u necentrifugiranom i centrifugiranom likvoru unutar 91-120 min

4.2. Rasprava

Pretrage likvora su sastavni dio dijagnostike različitih neuroloških bolesti, a neizostavne su u dijagnostici hitnih neuroloških stanja kada nalaz treba biti dostupan liječniku u što kraćem vremenu. Poznato je da predanalitički čimbenici mogu značajno utjecati na rezultate laboratorijskih pretraga, a to vrijedi i za pretrage u likvoru. Dužim stajanjem likvora nakon punkcije stanice se ubrzano raspadaju što s jedne strane rezultira lažno sniženim brojem stanica, a s druge strane dolazi do biokemijskih reakcija koje mogu značajno utjecati na rezultate pretraga. To je naročito izraženo u uzorcima likvora s velikim brojem neutrofilnih granulocita koji su najviše podložni *in vitro* razgradnji. U literaturi nema podataka o tome koje je kritično vrijeme u kojem je uzorak likvora stabilan nakon punkcije odnosno u kojem se ne očekuje utjecaj navedenih predanalitičkih čimbenika na rezultate analiza. Postoji jedino preporuka da se rezultati hitnih pretraga likvora izdaju unutar 60 minuta od zaprimanja materijala u laboratorij (21). Svrha ovog rada je stoga bila proučiti utjecaj vremena proteklog od uzorkovanja likvora na rezultate hitnih pretraga likvora te ispitati mogu li se osnovne biokemijske pretrage napraviti iz uzorka bez prethodnog centrifugiranja da bi se skratilo vrijeme izdavanja nalaza u hitnim stanjima.

U radu su analizirana 32 uzorka likvora dobivena lumbalnom punkcijom i iz različitih postoperativnih drenaža. Ispitivani uzorci su preostali nakon rutinske obrade. Pretrage za koje je ispitivan utjecaj predanalitičkih čimbenika su: broj stanica, glukoza, laktat i ukupni proteini u likvoru.

Citološka analiza je napravljena u tri vremenska intervala: unutar 60 minuta od prijema, 61-90 minuta od prijema i 91-120 minuta od prijema. Stanice su u prvom vremenskom intervalu (unutar 60 minuta od prijema) brojane ručno u Fuchs-Rosenthalovoj komorici i na automatiziranom brojaču Sysmex XE 5000 kao kontrolnom uređaju. Ručno brojanje u Fuchs-Rosenthalovoj komorici je „zlatni standard“ za likvor, a u laboratoriju se koristi kao rutinska metoda za brojanje i nativno diferenciranje stanica likvora. Nove generacije hematoloških brojača kao što je u radu korišteni Sysmex XE 5000 imaju posebne kanale za analizu drugih bioloških tekućina koje omogućuju brojanje i malog broja stanica u uzorku. Zbog ograničene količine dostupnog materijala, u ostalim porcijama stanice su brojane samo ručno. Biokemijske pretrage su napravljene u necentrifugiranom i centrifugiranom uzorku likvora

unutar 60 minuta od prijema i 91- 120 minuta od prijema na potpuno automatiziranom analizatoru Cobas 6000 c501. Svi su uzorci prilikom ispitivanja čuvani na sobnoj temperaturi.

Rezultati brojanja stanica u likvoru ručnom metodom i pomoću automatiziranog analizatora nisu se statistički razlikovali (Tablica 6) čime smo ujedno potvrdili da se analizator Sysmex XE 5000 može koristiti za brzo izdavanje broja stanica u likvoru, posebice u hitnoj službi.

Rezultati ručnog brojanja stanica likvora u komorici dobiveni unutar 60 minuta (uzorak 1) uspoređeni su s rezultatima ručnog brojanja u vremenu 61-90 minuta (uzorak 2) i 91-120 minuta (uzorak 3) (Tablica 7 i Tablica 8). Nije dokazana statistički značajna razlika u broju stanica u uzorku 1 i uzorku 2, no dobivene su razlike za uzorak 3. Statistički značajna razlika dobivena je za ukupan broj stanica ($p=0,0316$) i velike limfocite ($p=0,0079$). U oba slučaja, u uzorku 3 je dobiven niži broj stanica u odnosu na uzorak 1 što je potvrdilo već poznatu činjenicu da se stanice stajanjem na sobnoj temperaturi u epruveti razgrađuju. Dobiveni rezultati su pokazali da je kritično vrijeme u kojem se broj stanica u likvoru značajno smanjio 90 minuta od prijema u laboratorij. Stoga, ukoliko se ne radi o hitnim stanjima, vrijeme izdavanja nalaza stanica likvora može se prolongirati do 90 minuta.

Rezultati mjerenja koncentracije glukoze, laktata i ukupnih proteina u necentrifugiranom likvoru u 60 minuta od prijema uspoređivani su s rezultatima mjerenja u bistrom supernatantu nakon centrifugiranja u 60 minuta od prijema. Statistički značajna razlika dokazana je u koncentraciji glukoze $p = 0,0138$ i laktata $p < 0,0001$ (Tablica 12). Poznato je da se stajanjem uzorka u epruveti koncentracija glukoze smanjuje zbog prisutnosti leukocita. Leukociti sadrže glikolitičke enzime koji razgrađuju glukozu te njezina koncentracija pada 5-7% unutar jednog sata. Također, glukoza je topiva u vodi. Centrifugirani likvor sadrži više vodenog medija zbog odsutnosti stanica pa je time više glukoze otopljeno. Zbog toga su koncentracije glukoze u necentrifugiranom uzorku 12-15 % manje nego u centrifugiranom. Također, zbog odsutnosti stanica u centrifugiranom likvoru, dobivamo više koncentracije laktata u odnosu na one gdje stanice zauzimaju veliki dio vodenog medija. Statistički značajna razlika uočena je i prilikom usporedbe koncentracije laktata u necentrifugiranom i centrifugiranom likvoru u vremenu 91-120 minuta od prijema s $p < 0,0007$ (Tablica 13). Rezultati mjerenja koncentracije glukoze, laktata i ukupnih proteina u necentrifugiranom likvoru u 60 minuta od prijema uspoređivani su s rezultatima mjerenja u necentrifugiranom likvoru u 91-120 minuta od prijema. Dokazana je statistički značajna razlika u koncentraciji laktata (Tablica 10). Stajanjem uzorka na sobnoj temperaturi zbog prisutnosti stanica, prvenstveno eritrocita, dolazi do povećanja koncentracije

laktata. Usporedbom koncentracije glukoze u necentrifugiranom i centrifugiranom likvoru u vremenu 91-120 minuta od prijema i usporedbom koncentracije glukoze u necentrifugiranom likvoru u 60 minuta i 91-120 minuta od prijema nije uočena očekivana statistički značajna razlika. Također, nije dokazana statistički značajna razlika u rezultatima mjerenja koncentracije glukoze, laktata i ukupnih proteina u centrifugiranom likvoru unutar 60 minuta i 91-120 minuta od prijema što znači da kad se uklone stanice, ispitivani analiti su stabilni duže vrijeme i na sobnoj temperaturi. Istraživanjem nije dokazan utjecaj staničnih elemenata na koncentraciju ukupnih proteina u likvoru, no s obzirom na očigledni utjecaj staničnih elemenata na koncentracije glukoze i laktata u likvoru, biokemijske pretrage se ne bi smjele raditi iz necentrifugiranog likvora.

5. Zaključci

- Postoji dobra korelacija između ručnog i automatiziranog brojanja stanica u likvoru što potvrđuje mogućnost korištenja analizatora Sysmex XE 5000 za brzo izdavanje broja stanica u likvoru.
- Nije dokazana statistički značajna razlika u broju stanica u uzorku likvora određenom unutar 60 minuta i nakon 61-90 minuta od prijema. To znači da bi se za stanice u likvoru, ako se ne radi o hitnim zahtjevima, mogao preporučiti TAT od 90 minuta.
- Stajanjem uzorka likvora duže od 90 minuta od prijema statistički značajno se smanjuje broj stanica u uzorku.
- U necentrifugiranom uzorku likvora je unutar 60 minuta od prijema dokazana statistički značajno niža vrijednost glukoze i laktata u odnosu na centrifugirani uzorak što je posljedica prisutnosti stanica. U vremenskom razdoblju unutar 91-120 minuta u istom je uzorku dokazana statistički niža vrijednost laktata u odnosu na centrifugirani uzorak. Stoga se likvor nakon prijema treba centrifugirati u što kraćem vremenu i stanice što prije odvojiti iz likvora.
- U necentrifugiranom uzorku likvora je unutar 91-120 minuta od prijema dokazana statistički značajno viša vrijednost laktata u odnosu na isti uzorak obrađen unutar 60 minuta od prijema
- Prisutnost staničnih elemenata u likvoru unutar 60 minuta od prijema nema utjecaja na rezultate mjerenja ukupnih proteina.
- Stajanje centrifugiranog likvora do 120 minuta od prijema na sobnoj temperaturi nema statistički značajnog utjecaja na vrijednosti ukupnih proteina, glukoze i laktata.

6. Literatura

1. Trbojević-Čepe M, Vogrinc Ž, Cerebrospinalna tekućina. U: Štrausova medicinska biokemija. Čvorišćec D, Čepelak I, urednice, Zagreb, Medicinska naklada, 2009; str. 558.-588
2. Weisglass H, Arko K, Mikrobiološke i biokemijske pretrage likvora, Zagreb, Školska knjiga, 1977; str. 49-60
3. Stavljenić A. i sur, Neurokemija, Zagreb, Školska knjiga, 1988; str. 64-70
4. Štraus B, Čepelak I, Uvodni dio. U: Štrausova medicinska biokemija. Čvorišćec D, Čepelak I, urednice, Zagreb, Medicinska naklada, 2009; str. 6-9
5. Trbojević-Čepe M, Vogrinc Ž, Likvorska dijagnostika, Zagreb, Medicinska naklada, 2012; str 19-29
6. Trbojević-Čepe M, Vogrinc Ž., Likvorska dijagnostika živčanih bolesti. U: Klinička kemija i molekularna dijagnostika, Sertić J. i sur, urednici, Zagreb, Medicinska naklada, 2008; str. 98-115
7. Trbojević-Čepe M, Vogrinc Ž, Likvorska dijagnostika. U: Klinička kemija i molekularna dijagnostika u kliničkoj praksi, Sertić J. i sur, Zagreb, Medicinska naklada, 2015; str.124-140
8. Marušić M, Grčević D, Imunološko prepoznavanje. U: imunologija, Andreis i sur,urednici, Zagreb, Medicinska naklada, 2010; str.173-189
9. Štraus B, Enzimi. U: Štrausova medicinska biokemija. Čvorišćec D, Čepelak I, urednice, Zagreb, Medicinska naklada, 2009; str. 260-261
10. Štraus B, Petlevski R, Ugljikohidrati. U: Štrausova medicinska biokemija. Čvorišćec D, Čepelak I, urednice, Zagreb, Medicinska naklada, 2009; str. 119-120
11. Guyton C. A, Hall E.J, Prijenos tvari kroz staničnu membranu. U: Medicinska fiziologija-udžbenik, Kukolja Taradi S, Andreis I, urednici, Zagreb, Medicinska naklada, 2012; str. 48-50
12. Guyton C. A, Hall E.J, Organizacija živčanog sustava, osnovne funkcije sinapsa, nurotransmitori. U: Medicinska fiziologija-udžbenik, Kukolja Taradi S, Andreis I, urednici, Zagreb, Medicinska naklada, 2012; str. 543

13. Lieberman M, Marks A, Peet A, Metabolism of the nervous system. U: Marks Basic medical biochemistry, A clinical approach, Baltimore, Lippincott Williams & Wilkins, 2013; str. 906-908
14. Rodak F. B, Body Fluids. U: Hematology, Clinical principles and applications, Philadelphia, W.B. Saunders Company, 2002; str. 593-596
15. Berne M. R, Levy N. M, Živčani sustav i njegovi sastavni dijelovi. U: Fiziologija, Andreis I, Pokrajac N, urednici, Zagreb, Medicinska naklada, 1996; str. 88-90
16. Petrovečki M, Bilić-Zule L, Korelacija i regresija. U: Osnove biosistatike u svakodnevnoj praksi, Šimundić A-M, urednica, Zagreb, Medicinska naklada, Hrvatska komora medicinskih biokemičara, 2008; str. 47-55, 62-63
17. Passing-Bablok regression for method comparison, <https://ncss-wpengine.netdna-ssl.com>, pristupljeno 24.4.2014.
18. Bilić-Zule L., Korelacija i regresija-seminar, http://mi.medri.hr/assets/S4_Korelacija%20i%20regresija.pdf, pristupljeno 24.4. 2017.
19. Izbor iz neparametrijskih testova, <http://zaf.biol.pmf.unizg.hr/behaviour/Neparametrijski%20%20testovi.pdf>, pristupljeno 1.5.2017.
20. BD Facscanto reserch system flow cytometer, <https://www.bdbiosciences.com/sg/instruments/facscantoresearch/features/fluidics.jsp>, pristupljeno 19.4.2017.
21. A consensus protocol for the standardization of cerebrospinal fluid collection and biobanking, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2839806/>, pristupljeno 15.11.2016.
22. Influence of pneumatic tube system transport on routinely assessed and spectrophotometric cerebrospinal fluid parameters, <https://www.degruyter.com/view/j/cclm.2017.55.issue-1/cclm-2016-0143/cclm-2016-0143.xml>, pristupljeno 15.11.2016.
23. Optical system, <http://nikitavsurpatne.yolasite.com/optics.php>, pristupljeno 19.4.2017.
24. Overview of the two main barriers in the CNS, https://www.researchgate.net/figure/41721469_fig1_Figure-1-Overview-of-the-two-main-barriers-in-the-CNS-blood-brain-barrier-and-blood, pristupljeno 10.5.2017.
25. Brain Barricade, <https://pubs.acs.org/cen/science/85/8523sci1.html>, pristupljeno 10.5.2017.

26. Automated Cell-Counting Instrumentation, <https://clinicalgate.com/automated-cell-counting-instrumentation/>, pristupljeno 17.5.2017.
27. Modes of membrane transport,
<http://www.acbrown.com/neuro/Lectures/Mmbr/NrMmbrMode.htm>, pristupljeno 8.5.2017.
28. Fuchs Rosenthal, http://www.incyto.com/product/product03_detail.php, pristupljeno 11.4.2017.
29. Biostatistika, <http://moodle.srce.hr>, pristupljeno 24.4.2017.
30. ,Cobas 6000 analyzer series, Mannheim, Roche diagnostics GmbH, 2001.-2009.
31. Sysmex, Automated hematology analyzer XE-5000, Instructions for Use, Kobe, Japan Sysmex corporation, 2008.

7. Sažetak/summary

7.1. Sažetak

Likvor kao sastavni dio SŽS-a ima veliku važnost u dijagnostici različitih neuroloških bolesti. Zbog izostanka preporučenog protokola o TAT-u za hitne pretrage likvora i utjecaja predanalitike, svrha ovog rada bila je proučiti utjecaj vremena proteklog od uzorkovanja na rezultate citoloških pretraga te ispitati kakav je utjecaj prisutnih staničnih elemenata na rezultate biokemijskih pretraga u likvoru

Analiza broja stanica izvršena je u 3 vremenska intervala, ručnim brojanjem u Fuchs-Rosenthalovoj komorici i uz korištenje automatiziranog hematološkog brojača Sysmex XE 5000 unutar 60 minuta od prijema te u Fuchs-Rosenthalovoj komorici nakon 61-90 minuta i 91-120 minuta od prijema. Biokemijske pretrage učinjene su odmah po prijemu i unutar 91-120 minuta u nativnom, necentrifugiranom uzorku i u bistrom supernatantu dobivenom nakon uklanjanja stanica centrifugiranjem. Mjerene su koncentracije ukupnih proteina, glukoze i laktata na automatiziranom analizatoru Cobas 6000 c501.

Upotrebom statističkog programa MedCalc nije dokazana statistički značajna razlika između broja stanica dobivenih zlatnim standardom u komorici i analizatora Sysmex XE 5000. Analizom je dokazano da se nalaz stanica u intervalu 91-120 minuta promijenio u odnosu na vrijednosti unutar preporučenih 60 minuta što je najviše vidljivo na ukupnom broju stanica i broju velikih limfocita čiji se broj smanjio. Uočeno je da prisutnost stanica u uzorku ima utjecaj na koncentraciju glukoze i laktata dok se koncentracija ukupnih proteina nije mijenjala u promijenjenim uvjetima mjerenja. Ovim radom je dokazano kako se vremenski period za izdavanje nalaza stanica u likvoru može produžiti do 90 minuta te da je za određivanje koncentracije glukoze i laktata uzorak likvora potrebno što prije centrifugirati.

7.2. Summary

Cerebrospinal fluid has a very important role in diagnosing various neurologic diseases. Since there are no official protocols concerning the turnaround time (TAT) for emergency tests of CSF and also no information on pre-analytical influence on test results, the main objective of

this Thesis was to evaluate the influence of CSF time sampling on cytological results combined with influence of cell elements on biochemistry test results.

The cell numbers were analyzed according to three different time intervals. After a 60-minute interval, the cells were counted in the Fuchs-Rosenthal counting chamber and with Sysmex XE 5000 Analyser, whereas only the Fuchs-Rosenthal counting chamber was used for measurements after 61-90 and after 91-120 minute time intervals. The biochemistry tests were conducted immediately upon the receipt of the samples and within the time interval of 91-120 minutes, both in a native sample without performing a centrifugation and in the supernatant without the cells after centrifugation. Glucose, lactate and total proteins were measured with Cobas 6000 c501 Analyser.

The implementation of the MedCalc statistical software did not show any statistically relevant differences between cell numbers as counted in the chamber and those measured by the Sysmex XE 5000 Analyser. However, the tests showed that the number of cells counted after the interval of 91-120 minutes is smaller than the number of cells counted after the 60-minute interval, which is clearly visible both in total number of cells and in the number of big lymphocytes. It has been observed that the presence of cells in the sample has influence on the concentration levels of glucose and lactate, whereas the concentration levels of total proteins does not change in different measuring conditions. This study proved that the time of TAT for CSF can be prolonged up to 90 minutes, but when biochemistry test are done, the sample should be centrifuged.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

UTJECAJ PREDANALITIKE NA PRETRAGE U LIKVORU

Zrinka Drenšek

SAŽETAK

Likvor kao sastavni dio SZS-a ima veliku važnost u dijagnostici različitih neuroloških bolesti. Zbog izostanka preporučenog protokola o TAT-u za hitne pretrage likvora i utjecaja predanalitike, svrha ovog rada bila je proučiti utjecaj vremena proteklog od uzorkovanja na rezultate citoloških pretraga te ispitati kakav je utjecaj prisutnih staničnih elemenata na rezultate biokemijskih pretraga u likvoru. Analiza broja stanica izvršena je u 3 vremenska intervala, ručnim brojanjem u Fuchs-Rosenthalovoj komorici i uz korištenje automatiziranog hematološkog brojača Sysmex XE 5000 unutar 60 minuta od prijema te u Fuchs-Rosenthalovoj komorici nakon 61-90 minuta i 91-120 minuta od prijema. Biokemijske pretrage učinjene su odmah po prijemu i unutar 91-120 minuta u nativnom, necentrifugiranom uzorku i u bistrom supernatantu dobivenom nakon uklanjanja stanica centrifugiranjem. Mjerene su koncentracije ukupnih proteina, glukoze i laktata na automatiziranom analizatoru Cobas 6000 c501. Upotrebom statističkog programa MedCalc nije dokazana statistički značajna razlika između broja stanica dobivenih zlatnim standardom u komorici i analizatora Sysmex XE 5000. Analizom je dokazano da se nalaz stanica u intervalu 91-120 minuta promijenio u odnosu na vrijednosti unutar preporučenih 60 minuta što je najviše vidljivo na ukupnom broju stanica i broju velikih limfocita čiji se broj smanjio. Uočeno je da prisutnost stanica u uzorku ima utjecaj na koncentraciju glukoze i laktata dok se koncentracija ukupnih proteina nije mijenjala u promijenjenim uvjetima mjerenja. Ovim radom je dokazano kako se vremenski period za izdavanje nalaza stanica u likvoru može produžiti do 90 minuta te da je za određivanje koncentracije glukoze i laktata uzorak likvora potrebno što prije centrifugirati.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 51 stranica, 9 grafičkih prikaza, 13 tablica i 32 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Likvor, predanalitika, središnji živčani sustav

Mentor: **Dr. sc. Dunja Rogić**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Dunja Rogić**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Željka Vogrinc, znanstveni suradnik, Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Zagreb
Dr. sc. Olga Gornik, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: srpanj 2017.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Biochemistry
Department of medical biochemistry and hematology
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

THE INFLUENCE OF PRE-ANALYTICS ON CSF ANALYSIS

Zrinka Drenšek

SUMMARY

Cerebrospinal fluid has a very important role in diagnosing various neurologic diseases. Since there are no official protocols concerning the turnaround time (TAT) for emergency tests of CSF and also no information on pre-analytical influence on test results, the main objective of this Thesis was to evaluate the influence of CSF time sampling on cytological results combined with influence of cell elements on biochemistry test results. The cell numbers were analyzed according to three different time intervals. After a 60-minute interval, the cells were counted in the Fuchs-Rosenthal counting chamber and with Sysmex XE 5000 Analyser, whereas only the Fuchs-Rosenthal counting chamber was used for measurements after 61-90 and after 91-120 minute time intervals. The biochemistry tests were conducted immediately upon the receipt of the samples and within the time interval of 91-120 minutes, both in a native sample without performing a centrifugation and in the supernatant without the cells after centrifugation. Glucose, lactate and total proteins were measured with Cobas 6000 c501 Analyser. The implementation of the MedCalc statistical software did not show any statistically relevant differences between cell numbers as counted in the chamber and those measured by the Sysmex XE 5000 Analyser. However, the tests showed that the number of cells counted after the interval of 91-120 minutes is smaller than the number of cells counted after the 60-minute interval, which is clearly visible both in total number of cells and in the number of big lymphocytes. It has been observed that the presence of cells in the sample has influence on the concentration levels of glucose and lactate, whereas the concentration levels of total proteins does not change in different measuring conditions. This study proved that the time of TAT for CSF can be prolonged up to 90 minutes, but when biochemistry test are done, the sample should be centrifuged.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 51 pages, 9 figures, 13 tables and 32 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Cerebrospinal fluid, pre-analytics, central nervous system

Mentor: **Dunja Rogić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Dunja Rogić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Željka Vogrinc, Ph.D. Assistant Research Scientist, Department of laboratory diagnostics, University Hospital Centre Zagreb
Olga Gornik, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2017.

