

01-2020/v.1.

**Laboratorijska analiza ekstravaskularnih
tjelesnih tekućina: Nacionalne preporuke
Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i
laboratorijsku medicinu. Dio I. – Serozne tekućine**

**Lara Milevoj Kopčinović, Jelena Culej,
Anja Jokić, Marija Božović, Irena Kocijan**

Zagreb, siječanj 2020.

Naslov:

Laboratorijska analiza ekstravaskularnih tjelesnih tekućina: Nacionalne preporuke Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu. Dio I. – Serozne tekućine

Autori:

Lara Milevoj Kopčinović, Jelena Culej, Anja Jokić, Marija Božović, Irena Kocijan

Izdavač:

Hrvatsko društvo za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu (HDMBLM)

Prijevod:

Lara Milevoj Kopčinović, Nora Nikolac Gabaj, Jelena Culej, Anja Jokić, Irena Kocijan, Milena Njegovan, Alen Vrtarić, Ivona Herceg

Ovaj dokument je prijevod članka objavljenog u časopisu Biochemia Medica: Laboratory testing of extravascular body fluids: National recommendations on behalf of the Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine. Part I – Serous fluids. Biochem Med (Zagreb) 2020;30(1):010502.

Korektura:

Nora Nikolac Gabaj, Lara Milevoj Kopčinović

Grafičko oblikovanje:

Maja Mravec, Braće Radića 107, Mraclin

ISBN: 978-953-57778-9-2

Laboratorijska analiza ekstravaskularnih tjelesnih tekućina: Nacionalne preporuke Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu. Dio I. – Serozne tekućine

Lara Milevoj Kopčinović

Klinički zavod za kemiju, Klinički bolnički centar Sestre milosrdnice, Zagreb

Anja Jokić

Odjel za medicinsku biokemiju, hematologiju i koagulaciju s citologijom, Klinika za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević", Zagreb

Irena Kocijan

Medicinsko biokemijski laboratorij, Opća bolnica Varaždin, Varaždin

Jelena Culej

Klinički zavod za kemiju, Klinički bolnički centar Sestre milosrdnice, Zagreb

Marija Božović

Klinički zavod za kemiju, Klinički bolnički centar Sestre milosrdnice, Zagreb

SADRŽAJ

SAŽETAK	4
UVOD	5
POZADINA I PODRUČJE PRIMJENE	5
1. VALIDACIJA ANALITIČKIH SPECIFIKACIJA ZA ETT	6
2. UNUTARNJA I VANJSKA KONTROLA KVALITETE KOD ANALIZE ETT	8
3. ANALIZA SEROZNIH TEKUĆINA	9
3.1 Pleuralna tekućina	9
3.1.1 Predanalitička faza	9
3.1.2 Analitička faza	11
3.1.3 Poslijeanalitička faza	18
3.2 Perikardijalna tekućina	19
3.2.1 Predanalitička faza	20
3.2.2 Analitička faza	20
3.2.3 Poslijeanalitička faza	21
3.3 Peritonealna tekućina (ascites)	22
3.3.1 Predanalitička faza	22
3.3.2. Analitička faza	22
3.3.3 Poslijeanalitička faza	27
LITERATURA	28
LITERATURA	28
DODATCI	33
Dodatak 1. – Brojenje stanica u seroznim tekućinama	33
Dodatak 2. – Sažetak kriterija za analizu seroznih tekućina.....	35
Dodatak 3. – 1. Komentari pristigli tijekom javne rasprave radne verzije dokumenta Laboratorijska analiza ekstravaskularnih tjelesnih tekućina: Nacionalne preporuke Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu. Dio I. – Serozne tekućine	37
2. Komentari pristigli tijekom recenzije radne verzije dokumenta Laboratorijska analiza ekstravaskularnih tjelesnih tekućina: Nacionalne preporuke Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu. Dio I. – Serozne tekućine od strane Povjerenstva za stručna pitanja Hrvatske komore medicinskih biokemičara	37

SAŽETAK

Analiza ekstravaskularnih tjelesnih tekućina (ETT) može pružiti korisne informacije u diferencijalnoj dijagnozi poremećaja koji uzrokuju njihovo nakupljanje. Kako bi se ublažile moguće negativne posljedice na sigurnost bolesnika, potrebno je prepoznati jedinstvenu prirodu takvih uzoraka i specifične zahtjeve povezane s njihovom laboratorijskom analizom.

Nacionalne preporuke za analizu ETT pripremili su članovi Radne grupe za ekstravaskularne tjelesne uzorke (RG ETU). Preporuke se odnose na ukupni laboratorijski proces te opisuju klinički značaj parametara korištenih u njihovoj analizi. Prvo poglavlje se osvrće na validaciju metoda koje se koriste za analizu ETT, a zatim se dokument nastavlja specifičnim preporukama za laboratorijsku analizu seroznih tekućina.

Dokument je podijeljen na poglavlja koja se odnose na predanalitičku, analitičku i poslijeanalitičku fazu, a specifične su preporuke istaknute u uokvirenom tekstu. Glavni cilj preporuka je pomoći u postizanju nacionalne harmonizacije u analizi seroznih tekućina i naposljetku poboljšati sigurnost bolesnika i ishod liječenja. Nacionalne preporuke za analizu ETT namijenjene su svim laboratorijskim djelatnicima koji provode analizu ETT i ostalim zdravstvenim djelatnicima uključenim u sakupljanje i obradu takvih uzoraka. Citološke i mikrobiološke pretrage ETT nisu obuhvaćene ovim dokumentom.

Ključne riječi: harmonizacija; pleuralni izljev; perikardijalni izljev; ascites

UVOD

U medicini se pojam „ekstravaskularna tjelesna tekućina“ specifično odnosi na sve tjelesne tekućine koje su različite od krvi. Ekstravaskularne tjelesne tekućine (ETT) koje se analiziraju u kliničkom laboratoriju su cerebrospinalna tekućina (CSF), serozne tekućine (pleuralna, peritonealna i perikardijalna), sinovijalna (zglobna) tekućina, amnijska tekućina (plodova voda), sadržaj iz drena, sjemena tekućina (ejakulat), mokraća, dijalizat i dr. Pojam „ne-standardna“ tjelesna tekućina se često koristi u literaturi, a odnosi se na sve tjelesne tekućine kojima nedostaju analitičke specifikacije proizvođača (odnosno, kojima specifikacije nisu navedene u odlomku „Namjena“ u uputama proizvođača reagensa). Međutim, pojam ETT treba jasno razlikovati od pojma „ne-standardna“ tjelesna tekućina obzirom da sve ekstravaskularne nisu ujedno i „ne-standardne“ tjelesne tekućine. Primjerice, iako se mokraća i CSF sukladno definiciji ubrajaju u ETT, u slučaju određivanja ukupnih proteina i/ili glukoze one se smatraju „standardnim“ tekućinama (1-4).

Sastav ETT je jedinstven i ovisi o poremećaju i/ili organu koji je poremećajem zahvaćen. U tom smislu, analiza ETT može dati korisne informacije za razlikovanje poremećaja koji su uzrokovali njihovo nakupljanje i pomoći u prepoznavanju specifičnih organa uključenih u poremećaj (5). Međutim, jedinstvena priroda uzorka i posebni zahtjevi vezani uz analizu ETT moraju se prepoznati kako bi se ublažile moguće negativne posljedice po sigurnost bolesnika. Izazovi koji prate analizu ETT uključuju: odabir prikladnih spremnika za uzorkovanje i uvjeta pohrane ukoliko je analiza odgođena, poznavanje stabilnosti analita u uzorku ETT, razlike u matriksu koje mogu utjecati na analitički proces, nedostatak materijala za kontrolu kvalitete, itd. Osim toga, u analizi ETT pojavljuju se dva važna dodatna problema: analitičke

značajke „standardnih“ tekućina ne mogu se prenijeti na ETT bez prethodne validacije/verifikacije koja mora biti specifična za vrstu uzorka i metodu koja se koristi, a nedostatak referentnih intervala za ETT zahtjeva istaknutije uključivanje laboratorijskih stručnjaka u tumačenje dobivenih rezultata. Potpuna klinička korisnost analize ETT može se postići samo harmonizacijom (2-6).

Cilj ovog dokumenta, pripremljenog od strane članova Radne grupe za ekstravaskularne tjelesne uzorke (RG ETU) Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu (HDMBLM), je pomoći u postizanju nacionalne harmonizacije postupaka koji se koriste u analizi ETT i naposljetku poboljšati sigurnost bolesnika i ishod liječenja. Uloga laboratorijskih stručnjaka nije samo osigurati pouzdane rezultate analize ETT, već i potaknuti primjenu upotrebu analiza u njihovoj obradi te savjetovati prilikom tumačenja dobivenih rezultata. Sukladno tome, ove preporuke su primarno namijenjene svim laboratorijskim djelatnicima koji provode analizu ETT, ali i svim zdravstvenim djelatnicima koji su uključeni u sakupljanje i obradu uzoraka ETT.

POZADINA I PODRUČJE PRIMJENE

Hrvatsko društvo za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu je prepoznalo važnost harmonizacije u području laboratorijske medicine te je do sada objavilo nekoliko nacionalnih preporuka (7-11). Ovaj dokument predstavlja prvu u nizu preporuka koje će se osvrnuti na predanalitičku, analitičku i poslijeanalitičku problematiku u analizi različitih ETT. Temelji se na rezultatima nacionalne ankete za laboratorijsku analizu ETT koja je omogućila uvid u postupke koji se trenutno koriste u laboratorijskoj analizi ETT u Hrvatskoj. Rezultati ankete su pokazali da postupci korišteni u analizi ETT u Hr-

vatskoj nisu harmonizirani te da su odstupanja od poželjnih postupaka nađena u svim fazama analize ETT (predanalitičkoj, analitičkoj i poslijeanalitičkoj) (12). Osim toga, kao predložak za ovaj dokument korištene su i dvije preporuke Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (engl. *Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI*) (Analysis of body fluids in clinical chemistry. Approved guideline. CLSI document C49-A; i Body fluid analysis for cellular composition: Approved guideline. CLSI document H56-A) (5,13). Naposljetku, proveden je temeljit i kritički pregled relevantnih dokaza dostupnih iz znanstvene literature. Koristeći ključne riječi/pojmove: analiza tjelesnih tekućina, pleuralni izljev, perikardijalni izljev, peritonealni izljev, ascites, analiza peritonealne tekućine, analiza perikardijalne tekućine i analiza ascitesa, pretražene su tražilice PubMed, Scopus i Google Scholar. Pretraživanje je ograničeno na članke objavljene na engleskom jeziku na ljudskim ispitanicima. Probirom naslova i sažetaka identificirane su odgovarajuće publikacije. Zatim su one preuzete kao cjeloviti tekstovi te je relevantnost njihova sadržaja kritički procijenjena. Nakon početnog pretraživanja, provedena je dodatna pretraga koristeći specifičnije pojmove (npr. Light-ovi kriteriji, kolesterol u pleuralnoj tekućini, gradijent albumina u ascitesu itd.). Naposljetku, korišteni su i relevantni članci navedeni u literaturi publikacija pronađenih u početnom pretraživanju.

Ovaj dokument započinje poglavljem koji se osvrće na validaciju metoda koje se koriste u analizi ETT, a nastavlja specifičnim preporukama za analizu seroznih tekućina (uključujući pleuralnu, peritonealnu i perikardijalnu) obzirom da se te vrste ETT analiziraju u gotovo svim laboratorijima u Hrvatskoj (12). Podijeljen je na poglavlja koja se odnose na predanalitičke, analitičke i poslijeanalitičke aspekte analize seroznih tekućina. Specifične preporuke istaknute su u uokvirenom tekstu, a njih slijede objašnjenja i podaci za tumačenje dobivenih

rezultata izvedeni iz relevantnih preporuka i literature. Na temelju snage i dostupnosti znanstvenih dokaza uokvirene preporuke su kategorizirane u dva stupnja: stupanj 1 (preporuka umjerene snage) i stupanj 2 (preporuka ograničene snage).

Kao i sa svim uzorcima koji se analiziraju u laboratoriju, i sa seroznim tekućinama je potrebno postupati u skladu s institucionalnim i/ili nacionalnim propisima koji se odnose na zdravlje i sigurnost kako bi se smanjili potencijalni zdravstveni rizici (5). Iako analiza ETT osim kliničke kemije i hematologije uključuje i druge specijalnosti, u hrvatskim se medicinsko-biokemijskim laboratorijima ne izvode citološke i mikrobiološke pretrage te su stoga izvan područja primjene ovog dokumenta.

1. VALIDACIJA ANALITIČKIH SPECIFIKACIJA ZA ETT

Laboratoriji trebaju provjeriti specifikacije proizvođača za metode koje se koriste u analizi ETT. Ukoliko su specifikacije za ETT navedene, potrebno je provesti postupak verifikacije (2). Ukoliko proizvođač nije naveo specifikacije, potrebno je provesti validaciju metode za svaku vrstu ETT za koju će se metoda koristiti (2-5,14-16). Kako su upute i protokoli za analitičku verifikaciju/validaciju metoda u ETT uglavnom nedostupni, svaki laboratorij treba provesti verifikaciju/validaciju ETT oslanjajući se na dostupne upute za "standardne" tekućine (npr. dostupne CLSI preporuke). Rezultate svih postupaka verifikacije/validacije je potrebno dokumentirati (Stupanj 1).

Analiza ETT se najčešće provodi korištenjem metoda namijenjenih „standardnim“ uzorcima (serum, plazma, puna krv, mokraća) na auto-

matskim analizatorima, što ih čini široko dostupnim i relativno jeftinim (2-6,14). Kako proizvođači uglavnom ne deklariraju analitičke specifikacije za ETT, upotreba metoda za „standardne“ uzorke smatra se modifikacijom metode i stoga zahtijeva validaciju prema stručnim i akreditacijskim standardima specifičnog laboratorija (2,15,16). Ovo je pitanje prepoznato u CLSI preporukama i akreditacijskim standardima Udruženja američkih patologa (engl. *College of American Pathologists, CAP*) (5,16,17).

Prvi korak u postupku verifikacije/validacije je odabir pretraga koje će se verificirati/validirati. Verifikacija/validacija treba obuhvatiti najčešće vrste ETT i pretrage s potvrđenom kliničkom korisnošću, što je potrebno definirati u suradnji s kliničkim osobljem. Retrospektivna analiza vrsta ETT i zatraženih pretraga načinjena iz laboratorijskog informacijskog sustava (LIS) može pružiti uvid u najčešće vrste uzoraka i pretraga kako bi se mogao načiniti plan za verifikaciju/validaciju. Pretrage koje nemaju kliničku korisnost u obradi bolesnika (tj. one koje nisu navedene u ovom dokumentu) potrebno je ukinuti (2-6,18,19).

Verifikacija metoda koje se koriste za ETT treba obuhvatiti ispitivanje preciznosti, točnosti, mjernog raspona (intervala izvještavanja) i ukoliko je moguće verifikaciju referentnih intervala. U verifikaciji ETT treba koristiti postupke koji se koriste u verifikaciji „standardnih“ uzoraka ETT (npr. CLSI preporuke) (2-6,18,20).

Validacija metoda koje se koriste u analizi ETT kompleksnija je i zahtjevnija uglavnom zbog nedostatka analitičkih specifikacija proizvođača i komercijalno dostupnih kontrolnih materijala odgovarajućeg matriksa za sve ETT (2,4,20). Kriterije prihvatljivosti potrebno je preuzeti iz verifikacijskih postupaka za „standardne“ tekućine (npr. kod validacije metode za albumin u uzorku peritonealne tekućine potrebno je preuzeti kriterije proizvođača reagensa za albumin, koji se odnose na serum)

(2,5). Ako u postupku validacije ti kriteriji nisu zadovoljeni, laboratorij treba procijeniti učinak dobivenog odstupanja na granice kliničke odluke i interpretaciju rezultata. Shodno tome treba se donijeti odluka o upotrebi ili odbacivanju „standardnih“ metoda za analizu ETT (2,5). Za potrebe validacije, laboratorij treba prikupiti ostatne uzorke ETT nakon rutinske obrade. Ovisno o učestalosti pojedinih vrsta ETT, ovaj postupak može potrajati dulje vrijeme, što zahtijeva pohranu uzoraka (u hladnjaku ili ledenici). Kako je stabilnost analita u uzorcima ETT uglavnom nepoznata, potrebno je provesti ispitivanje stabilnosti prije validacije (vidi poglavlje 3.1.3 Poslijeanalitička faza) (2,5,18-20).

Postupak validacije metoda koje se koriste za ETT treba obuhvatiti ispitivanje preciznosti, točnosti, analitičke osjetljivosti, analitičke specifičnosti (interferencija), mjernog raspona (intervala izvještavanja), i, ukoliko je potrebno, prijenosa analita (engl. *carry-over*) te kliničku osjetljivost i specifičnost. Sve postupke uključene u validaciju potrebno je provesti slično postupcima za „standardne“ tjelesne tekućine (2,5,18-20).

Učinak matriksa je najvažniji čimbenik koji doprinosi potencijalnoj nepouzdanosti kod upotrebe „standardnih“ metoda u analizi ETT. Učinak matriksa obuhvaća razlike u sastavu između ETT i seruma/plazme. Varijacije u pH te koncentraciji elektrolita, proteina i lipida koje su prisutne u specifičnim ETT mogu biti značajne. One mogu dovesti do promjena u fizikalnim i kemijskim svojstvima ETT koje onda utječu na predanalitičku i analitičku fazu analize ETT (2,5,20,21). Učinak matriksa ispituje se istovremeno s ispitivanjem točnosti i/ili mjernog raspona (odnosno u protokolima miješanja). Pri tome se, ovisno o dostupnosti uzoraka ETT s visokom/niskom koncentracijom analita, mogu primijeniti različiti pristupi. Primjerice, ukoliko su dostupni uzorci s niskom i visokom

koncentracijom analita, miješanjem tih uzoraka u različitim omjerima napravi se niz uzoraka s rastućom koncentracijom analita duž cijelog mjernog područja, kako bi se dobila krivulja u 5 točaka. Drugi pristup podrazumijeva miješanje „standardnog“ uzorka (seruma ili plazme), otopine standarda ili kalibratora poznate visoke koncentracije analita s ETT uzorkom niske koncentracije analita. Učinak matriksa se procjenjuje usporedbom izmjerenih vrijednosti i očekivanih ciljnih koncentracija. U oba pristupa, ukoliko je reproducibilnost usporediva onoj sa „standardnim“ uzorcima i/ili su dobivene očekivane vrijednosti prema faktorima razrjeđenja, učinak matriksa se može isključiti (2,5,17). Ako za specifičnu metodu nije detektiran učinak matriksa prilikom ispitivanja određene ETT, za specifičnost i interferirajuće tvari mogu se koristiti odgovarajuće specifikacije navedene od proizvođača za validirane vrste uzoraka (17,19). Ukoliko nije moguće isključiti interferencije zbog učinka matriksa, rezultate mjerenja u ETT potrebno je izvještavati samo uz komentar koji naglašava analitička ograničenja metode i potrebu interpretacije rezultata u kliničkom kontekstu (2,20).

Automatski analizatori s posebnim modulom za tjelesne tekućine (engl. *body fluid mode*, BF) nude automatizirano rješenje za određivanje ukupnog broja stanica i njihovu diferencijaciju u različitim vrstama ETT (vidi Dodatak 1). Ovi sustavi imaju specifikacije proizvođača za svaku vrstu ETT koja je validirana. Preporuke za provođenje verifikacije određivanja broja stanica u ETT na automatskim hematološkim analizatorima su dostupne pa neće biti detaljnije obrađivane u ovom dokumentu (15,22). Ukoliko neka vrsta ETT nije navedena u specifikacijama proizvođača, potrebno je provesti validaciju prije uvođenja u rutinsku upotrebu u laboratoriju. Validacija treba obuhvatiti procjenu preciznosti, točnosti, analitičke osjetljivosti, analitičke specifičnosti (interferencija), mjerni raspon (interval izvještavanja) i prijenos analita (13,15,22).

2. UNUTARNJA I VANJSKA KONTROLA KVALITETE KOD ANALIZE ETT

Kontrolu kvalitete za metode korištene u analizi ETT treba uspostaviti u skladu sa strategijom upravljanja kvalitetom u laboratoriju. Kontrolni materijali (neovisno o tome jesu li komercijalni ili ne) trebaju se analizirati na isti način kao i rutinski uzorci ETT (6,16). Potrebno je uspostaviti i dokumentirati postupke u slučaju neprihvatljivih vrijednosti kontrolnih uzoraka.

Laboratoriji trebaju sudjelovati u komercijalnim programima vanjske kontrole kvalitete (VKK) za metode koje se koriste u analizi ETT, ukoliko su oni dostupni (5). Minimalna preporučena učestalost je jednom godišnje. Ukoliko programi VKK nisu dostupni za specifične analite u ETT, potrebno je uspostaviti međulaboratorijsku usporedbu (Stupanj 1) (6).

Ako kontrolni materijali odgovarajućeg matriksa nisu dostupni, mogu se koristiti uzorci ETT prikupljeni u laboratoriju. Poželjno je da uzorci koji će se koristiti za unutarnju kontrolu kvalitete (UKK) pokriju čitav mjerni raspon, a posebno granice kliničke odluke. U laboratoriju je potrebno verificirati stabilnost analita u uzorcima koji će se pohranjivati na dulje vrijeme za potrebe provođenja UKK (5,19). Ukoliko se broj i vrsta stanica u ETT određuju upotrebom automatiziranih metoda na brojačima, odgovarajuća UKK treba uključiti provjeru pozadine analizatora (engl. *background check*). Laboratorij treba definirati prihvatljive granice provjere pozadine ovisno o vrsti ETT koja se određuje (13,15).

Programi VKK neovisnih dobavljača dostupni su za mokraću te pojedine analite u CSF, sje-menoj i sinovijalnoj tekućini, međutim ograničena je dostupnost odgovarajućih VKK materijala za sve vrste ETT. Kada odgovarajući VKK

materijal nije dostupan, laboratoriji trebaju organizirati međulaboratorijske usporedbe. Kod provođenja VKK i međulaboratorijske usporedbe potrebno je organizirati i evaluirati barem jedan ciklus godišnje uz sudjelovanje dva ili više laboratorija. Laboratoriji koji sudjeluju u međulaboratorijskoj usporedbi odgovorni su za definiranje kriterija prihvatljivosti za uključene analite (13,15).

Rezultati UKK, VKK i međulaboratorijske usporedbe trebaju se redovito evaluirati, a u slučaju nezadovoljavajućeg rezultata popravne radnje treba provesti odmah, kako bi se osigurala pouzdanost laboratorijskog nalaza. Sve postupke kontrole kvalitete je potrebno dokumentirati prema politici upravljanja kvalitetom u laboratoriju (16).

3. ANALIZA SEROZNIH TEKUĆINA

3.1 Pleuralna tekućina

U fiziološkim uvjetima u kapilarnom endotelu pleuralne šupljine ultrafiltracijom plazme nastaju samo mali volumeni pleuralne tekućine (< 10 mL). Njena je funkcija ublažavanje trenja nastalog prilikom gibanja jedne pleuralne membrane o drugu. Pleuralni izljev nastaje nakupljanjem pleuralne tekućine zbog neravnoteže između njenog stvaranja i/ili apsorpcije (5,6,14,23,24). Najčešći uzroci pleuralnih izljeva su kongestivno zatajenje srca, ciroza jetre, plućne infekcije, maligne bolesti ili plućna embolija, a obično se dijagnosticiraju fizikalnim pregledom i radiografijom prsnog koša. Uzorkovanje pleuralne tekućine za laboratorijsku analizu indicirano je u slučaju pleuralnog izljeva bez poznate konačne dijagnoze (5,6). Procjenjuje se da kliničar može temeljem podataka o anamnezi, fizikalnom pregledu i analizi pleuralne tekućine u 95% slučajeva dijagnosticirati specifičnu bolest koja je uzrokovala nakupljanje pleuralne tekućine (24).

3.1.1 Predanalitička faza

3.1.1.1 Uputnica

Uputnica za analizu pleuralne tekućine treba slijediti akreditacijske standarde (16). Mora sadržavati ime, prezime, spol, datum rođenja i jedinstveni identifikator bolesnika (npr. matični broj osiguranika), datum i vrijeme uzorkovanja, radnu dijagnozu, bolnički odjel, identifikaciju liječnika i njegove kontakt podatke te identifikaciju kliničkog osoblja koje je izvršilo uzorkovanje. Na zahtjevu moraju jasno biti naznačene tražene analize i sve klinički relevantne informacije (npr. terapija diureticima) kako bi se olakšalo tumačenje rezultata. Osim toga, na uputnici treba biti jasno naveden postupak uzorkovanja (tj. torakocenteza ili pleuralna punkcija), anatomska podrijetlo uzorka (Stupanj 1) (7,25).

Uzorke pleuralne tekućine poslane u laboratorij mora pratiti prikladna uputnica. Optimiranje obrasca uputnice, kako bi uključivala samo klinički korisne analize s dostupnim informacijama o tumačenju, poboljšat će laboratorijsku analizu pleuralne tekućine i interpretaciju dobivenih rezultata (4).

Neuobičajeni zahtjevi za analizom nisu prikladni ili su slučajno traženi. U takvim slučajevima laboratorij treba kontaktirati kliničara koji je tražio analizu i utvrditi radi li se o opravdanom i klinički umjesnom zahtjevu (tj. zašto je analiza tražena, kako će se tumačiti rezultati) ili ga je potrebno otkazati (2,4).

3.1.1.2 Identifikacija bolesnika i uzorka

Uzorke pleuralne tekućine treba označiti u prisutnosti bolesnika (najbolje neposredno prije uzorkovanja), s najmanje dva jedinstvena identifikatora (npr. ime, datum rođenja ili matični broj osiguranika), mjestom, datu-

mom i vremenom uzorkovanja te anatomskim podrijetlom uzorka (Stupanj 1) (5,7).

Neispravno označene (ili neoznačene) spremnike s uzorkom ne treba prihvatiti za analizu (5). Neprihvatanje uzorka treba dokumentirati unutar laboratorija, navesti na nalazu bolesnika i priopćiti kliničaru koji je analize zatražio.

3.1.1.3 Uzorkovanje i rukovanje uzorcima pleuralne tekućine

Spremnik za uzorkovanje i postupci za rukovanje uzorcima (tj. transport i obradu uzorka) koji se koriste u analizi pleuralne tekućine trebaju biti uvjetovani analizama koje se traže (5,17,26,27). Za određivanje ukupnog i diferencijalnog broja stanica treba koristiti epruvete s etilen-diamin-tetraoctenom kiselinom (EDTA), dok uzorke pleuralne tekućine za biokemijske analize treba uzorkovati u epruvete s heparinom. Alternativno, ukoliko su zadovoljeni uvjeti transporta, uzorci pleuralne tekućine za brojenje i diferencijaciju stanica te biokemijske analize mogu se uzorkovati u obične epruvete, odnosno one bez aditiva (13,22,26,28,29).

Uzorak pleuralne tekućine treba transportirati u laboratorij na sobnoj temperaturi odmah nakon uzorkovanja (unutar jednog sata za ukupni i diferencijalni broj stanica). Uzorak treba obraditi odmah po primitku.

Kako bi se olakšala interpretacija dobivenih rezultata, unutar jednog sata od uzorkovanja pleuralne tekućine treba uzorkovati i poslati u laboratorij i odgovarajući uzorak seruma (Stupanj 1) (6,13,18,30).

Uzorci pleuralne tekućine se obično uzorkuju na odjelu ili u operacijskim dvoranama od strane iskusnog kliničkog osoblja. Taj se postupak naziva torakocentezom, i obično se provodi uz

navođenje slikovnom tehnikom, primjerice ultrazvukom. Torakocenteza se izvodi u dijagnostičke ili terapijske svrhe (ili obje) aspiracijom pleuralne tekućine iz pleuralnog prostora pomoću igle. Iako nije pod izravnim nadzorom laboratorija, tehnika uzorkovanja može značajno utjecati na rezultate analize pleuralne tekućine. Stoga je potrebno slijediti kliničke smjernice kako bi se standardizirali postupci koji se koriste u torakocentezi (13,18,22,27,31).

Velike štrcaljke (s iglom ili bez nje) koje se koriste za torakocentezu, a sadrže pleuralnu tekućinu, nisu prihvatljivi spremnici. Velike volumene uzorka (obično više od 20 mL) prikupljene u štrcaljke za torakocentezu treba prenijeti u odgovarajuće spremnike na mjestu uzorkovanja, a prije transporta u laboratorij. To je osobito važno kako bi se izbjeglo zgrušavanje uzorka (osobito ako je uzorak hemolitičan) (13,22,26,28,29).

Epruvete koje sadrže antikoagulanse treba miješati u skladu s preporukama proizvođača kako bi se osiguralo pravilno miješanje i izbjeglo stvaranje ugruška (28). Epruvete za biokemijske analize treba centrifugirati prethodno analizi koristeći iste uvjete kao i za serum (14).

Za određivanje pH, uzorke pleuralne tekućine treba uzorkovati u anaerobnim uvjetima u štrcaljke koje sadrže liofilizirani, uravnoteženi litihev heparin (kao za analizu acidobazične ravnoteže) i odmah transportirati u laboratorij. Uzorke pleuralne tekućine za određivanje pH treba uzorkovati i analizirati slično uzorcima pune krvi namijenjenima određivanju acidobazične ravnoteže. Suvremeni analizatori plinova u krvi mogu određivati ne samo parametre acidobazne ravnoteže, već i vezana mjerenja (odnosno elektrolite i metabolite). Međutim, zbog ograničenih predanalitičkih podataka, mogućnost izvođenja svih spomenutih analiza iz uzorka pleuralne tekućine (kao i drugih seroznih tekućina) uzorkovanih u štrcaljkama s liofiliziranim heparinom nije poznata (5,6,9,22).

Za analizu pleuralne tekućine se trebaju dostaviti prihvatljivi volumeni uzorka. Minimalni volumeni uzorka trebaju se definirati u skladu s organizacijom svakog pojedinog laboratorija (npr. minimalno 3 mL za ukupni i diferencijalni broj stanica ako se koriste spremnici s EDTA; minimalno 2 mL za ukupni i diferencijalni broj stanica ako se koriste spremnici bez aditiva; minimalno 3 mL za biokemijske analize ako se koriste spremnici s heparinom; minimalno 2 mL za biokemijske pretrage ako se koriste spremnici bez aditiva; minimalno 1 mL za određivanje pH). Ukoliko je za analizu dostavljen ograničen (ili nedovoljan) volumen uzorka (manji od prihvatljivog), u dogovoru s kliničarom koji je analize zatražio treba utvrditi njihov prioritet (6,27).

3.1.1.4 Procjena kvalitete uzorka

Kvalitetu uzorka pleuralne tekućine treba provjeriti prije analize kako bi se izbjegli kvarovi instrumenata i/ili pogreške u mjerenju. Laboratorij treba prepoznati i dokumentirati mogući utjecaj hemolize, lipemije, ikterije i ekstremnih pH vrijednosti uzorka na rezultate mjerenja. Izrazito hemolitični i zgrušani uzorci mogu utjecati na točnost rezultata i trebaju se smatrati neprikladnim za analizu. Iznimke od pravila odbijanja neprikladnih uzoraka treba definirati i dokumentirati (Stupanj 1) (2,5,13,14).

Uzorke pleuralne tekućine treba vizualno provjeriti prije analize. Takve vrste uzoraka mogu imati izmijenjenu površinsku napetost, viskoznost i/ili sposobnost miješanja zbog učinka matriksa. Ove promjene mogu uzrokovati netočnu aspiraciju ili pipetiranje uzorka u reakcijsku smjesu, neodgovarajuće miješanje ili nepotpuno čišćenje mehanizama za pipetiranje i/ili reakcijskih kiveta, koje instrument često ne prepoznaje. U slučaju viskoznih uzoraka treba

razmotriti korištenje postupaka prethodne obrade uzorka (npr. ponovljeno centrifugiranje, razrjeđivanje) (5,20).

Iako nedovoljno točni za mjerenje pH pleuralne tekućine, pH-metar ili lakmus papir se mogu općenito koristiti za procjenu pH u uzorku pleuralne tekućine u slučaju sumnje na ekstremnu pH vrijednost. Primjena test traka za analizu mokraće pri procjeni ekstremnih pH vrijednosti pleuralne tekućine nije dovoljno istražena u literaturi (32,33).

3.1.2 Analitička faza

3.1.2.1 Izgled pleuralne tekućine

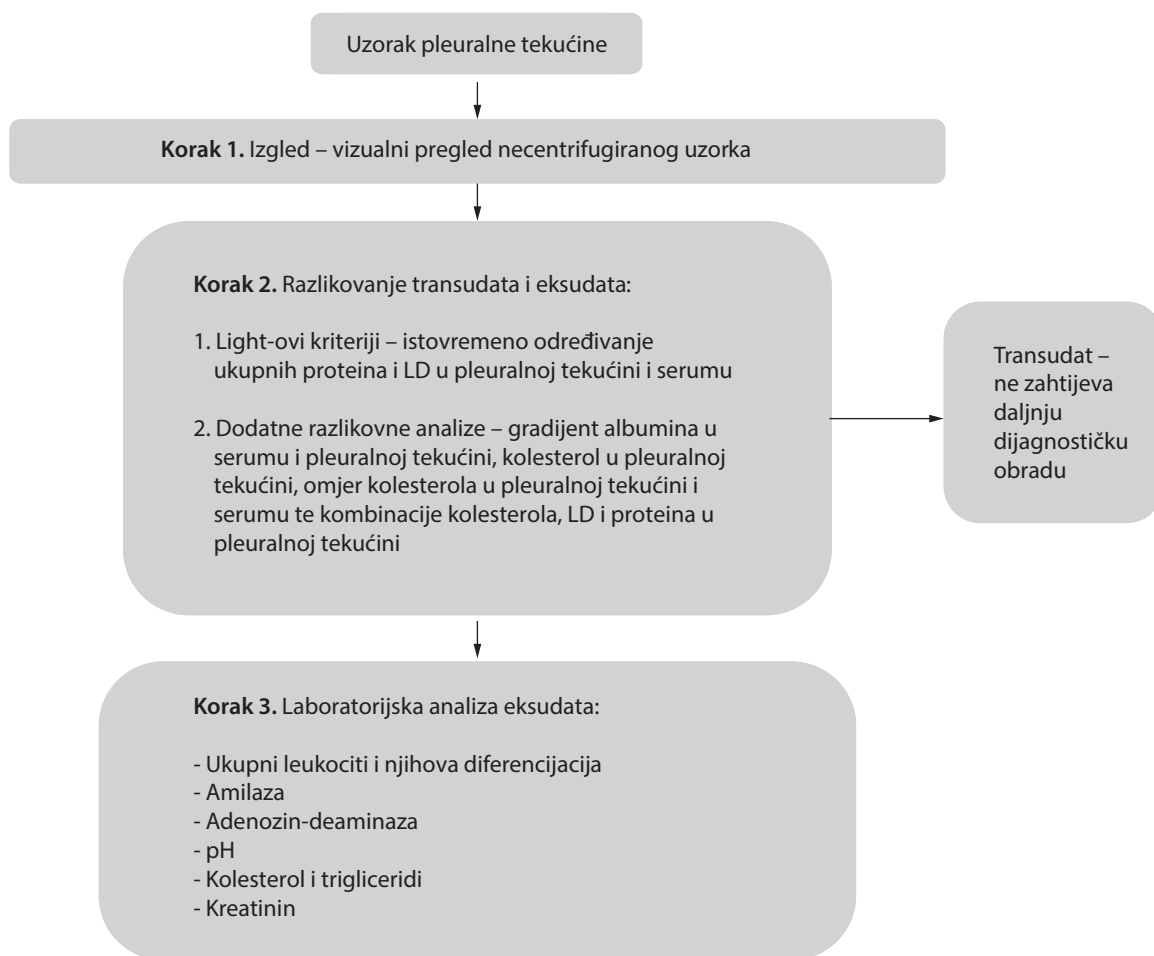
Izgled pleuralne tekućine treba odrediti nakon prihvaćanja uzorka i prije centrifugiranja. Izgled pleuralne tekućine se ne smije koristiti kao jedini kriterij za razlikovanje ekssudata (uzrokovanih lokaliziranim poremećajima) od transudata (uzrokovanih sistemskom bolešću) (Stupanj 1) (23,27,34).

Početni korak u laboratorijskoj analizi pleuralne tekućine je određivanje izgleda tekućine. Iako ne donosi konačnu dijagnozu, radi se o jednostavnoj procjeni koja može ukazati na moguću etiologiju izljeva (Tablica 1 i Slika 1). Izgled uzoraka pleuralne (kao i drugih seroznih) tekućina može se procijeniti jednako dobro iz običnih i/ili epruveta s antikoagulansom, prije postupka centrifugiranja.

Uzorak pleuralne tekućine dobiven traumatskom punkcijom može se razlikovati od krvavog uzorka pleuralne tekućine drugog uzroka. Uzorak dobiven traumatskom punkcijom obilježen je neujednačenim crvenim obojenjem ili prisutnošću stvorenih malih krvnih ugrušaka. Vrijednosti hematokrita $> 0,500$ L/L upućuju na pravi hemotoraks koji je obično prisutan u slučaju traume prsnog koša (6,22,23). Mutne, mliječne i/ili krvave uzorke pleuralne tekućine

TABLICA 1. Interpretacija mogućeg izgleda pleuralne tekućine

Izgled	Moguće kliničko značenje	Reference
TRANSUDAT		
Bistar, svijetložut, bez mirisa, nije viskoznan	Nema potrebe za daljnjim laboratorijskim analizama	22,26,34
EKSUDAT		
Zamućen, mutan, gnojni, izrazito sklon grušanju	Infekcija, empijem (miris po truleži ukazuje na prisutnost anaerobnih bakterija)	22,26,34
Lagano krvav ili krvav	Trauma, maligne bolesti, infarkt pluća, ruptura aneurizme aorte, tuberkuloza, pankreatitis	
Zeleno-bijel, mutan	Reumatski pleuritis	
Mutan, mliječni i/ili krvav	Hilozni izljev (izlivanje iz torakalnog duktusa, trauma ili idiopatskog porijekla)	
Mliječni ili zelen, metalnog sjaja	Pseudohilozni izljev (kronični izljev kod reumatskog pleuritisa ili tuberkuloze) ili bilio-pleuralna fistula	
Smeđ, boje čokolade	Ruptura amebnog apscesa jetre, dugotrajni krvavi izljev	
Crn	Spore <i>Aspergillus niger</i>	



SLIKA 1. Algoritam za laboratorijsku analizu pleuralne tekućine. LD – laktat-dehidrogenaza.

treba centrifugirati. Bistar supernatant nakon centrifugiranja ukazuje na prisutnost povećanog broja stanica ili debris (tj. empijema). Ako je uzorak zamućen i nakon centrifugiranja, najvjerojatnije se radi o hloznom ili pseudohloznom izljevu te je u tom slučaju opravdan zahtjev za određivanjem lipida (6,22,23,24,34).

3.1.2.2 Razlikovanje transudata i eksudata

Za razlikovanje transudacijskih od eksudacijskih pleuralnih izljeva treba primijeniti kriterije po Light-u. Oni podrazumijevaju istovremeno određivanje koncentracije ukupnih proteina i aktivnosti laktat-dehidrogenaze (LD) u pleuralnoj tekućini i serumu. Sukladno tome, eksudat treba zadovoljiti barem jedan od sljedećih kriterija:

- (a) omjer proteina u pleuralnoj tekućini i serumu $> 0,5$, i/ili
- (b) omjer LD u pleuralnoj tekućini i serumu $> 0,6$; i/ili
- (c) aktivnost LD u pleuralnoj tekućini $> 2/3$ gornje granice referentnog intervala (GGRI) LD u serumu (Stupanj 1) (34-36).

U slučajevima kada su Light-ovi kriteriji neodređeni (npr. kod bolesnika koji primaju terapiju diureticima; ili kada klinički simptomi ukazuju na transudat, ali Light-ovi kriteriji na eksudacijski izljev), u razlikovanju transudata od eksudata mogu pomoći gradijent albumina u serumu i pleuralnoj tekućini, kolesterol u pleuralnoj tekućini, omjer kolesterola u pleuralnoj tekućini i serumu te kombinacija kolesterola u pleuralnoj tekućini, LD u pleuralnoj tekućini i proteina u pleuralnoj tekućini (Stupanj 1) (37). Za potrebe izračuna omjera i gradijenata, analize u pleuralnoj tekućini i serumu trebaju biti provedene koristeći istu metodu (Stupanj 2).

Laboratorijska analiza uzoraka pleuralne tekućine prvenstveno je usmjerena na razlikovanje transudacijskih i eksudacijskih izljeva. Ovaj pri-

stup uvelike pojednostavljuje dijagnostički postupak jer omogućuje rano isključivanje nepotrebnih ispitivanja i pomaže u identifikaciji osnovnog mehanizma koji je uzrokovao stvaranje pleuralne tekućine. Transudacijski pleuralni izljevi su uzrokovani sistemskim procesima koji nisu upalne prirode i obično ne zahtijevaju daljnju dijagnostičku obradu. Eksudacijski izljevi ukazuju na prisutnost upalnog ili malignog procesa u pleuri i zahtijevaju opsežnija laboratorijska ispitivanja kako bi se utvrdio uzrok nakupljanja tekućine (14,23,34).

Određivanje koncentracije ukupnih proteina u uzorcima pleuralne tekućine, kao jedini kriterij za razlikovanje transudata od eksudata, treba napustiti zbog visokog udjela pogrešaka u razlikovanju (2,23). Umjesto toga, Light-ovi kriteriji se smatraju pouzdanom metodom za razlikovanje transudata od eksudata. Ukupni proteini i LD se jednostavno određuju koristeći automatizirane analizatore (spektrofotometrijskim metodama), kriteriji se lako pamte i pouzdani su u identifikaciji eksudata (osjetljivost 98%, specifičnost 74%) (Slika 1) (23,36,38). Međutim, Light-ovi kriteriji pogrešno klasificiraju oko 25% transudata u eksudate, osobito kod bolesnika koji su na terapiji diureticima ili u slučajevima prisutnosti visokog broja eritrocita u uzorcima ($> 10 \times 10^9/L$) (34,36,39).

U razlikovanju transudata od eksudata gradijent albumina pokazuje sličnu dijagnostičku točnost kao Light-ovi kriteriji (osjetljivost 63%, specifičnost 94%) (23,36,39-41). Potrebno je naglasiti da se gradijent albumina ne smije koristiti kao jedini kriterij za razlikovanje transudata od eksudata zbog njegovog visokog udjela pogrešaka u klasifikaciji (37%) (39).

Kolesterol u pleuralnoj tekućini smatra se korisnim biljekom za razlikovanje transudata od eksudata. Granična vrijednost navedena u Dodatku 2 utvrđuje prisutnost pleuralnih eksudata s osjetljivošću od 89% i specifičnošću od 81% (37). Omjer kolesterola u pleuralnoj teku-

ćini i serumu $> 0,3$ može razlikovati eksudate s osjetljivošću od 92% i specifičnošću od 81%, pokazujući sličnu dijagnostičku točnost Light-ovim kriterijima (5,18,37).

Za potrebe izračuna omjera i gradijenata, analize u pleuralnoj tekućini i serumu trebaju biti provedene koristeći istu metodu. Dodatno, prema dostupnim literaturnim podacima, određivanje analita u pleuralnoj tekućini (npr. ukupnih proteina i albumina) nije analitički zahtjevno kao određivanje istih u ascitesu (vidi 3.3.2.2 Razlikovanje peritonealnih izljeva).

Ostale kombinacije parnih i trostrukih analiza, provedenih isključivo u uzorcima pleuralne tekućine, pokazale su sličnu dijagnostičku točnost kao i Light-ovi kriteriji. Prednost ovog pristupa je njegova ekonomičnost bez utjecaja na dijagnostičku točnost (tj. nije potrebno uzorkovati prateći uzorak seruma) (22,37,42).

Određivanje koncentracije N-terminalnog-pro-B-tipa natriuretskog peptida (NT-proBNP) u pleuralnoj tekućini treba ograničiti na slučajeve s klinički sumnjivim pleuralnim izljevom srčanog uzroka koji zadovoljava kriterije eksudata prema Light-u, posebno kad su izljevi krvavi ili nakon terapije diureticima. Zatajenje srca odgovorno je za 80% transudacijskih pleuralnih izljeva. N-terminalni-pro-B-tip natriuretskog peptida je povišen kod bolesnika sa zatajenjem srca, a koncentracija NT-proBNP-a u pleuralnoj tekućini > 1500 ng/L postiže osjetljivost od 94% i specifičnost od 89% za dijagnozu zatajenja srca (43). Skupne značajke dijagnostičke točnosti NT-proBNP-a dobivene iz 14 studija koje su istraživale pleuralni izljev uzrokovan zatajenjem srca iznosile su 92% za osjetljivost i 88% za specifičnost (44). Obzirom da je potvrđena značajna korelacija između koncentracija NT-proBNP-a u serumu i pleuralnoj tekućini te da obje analize pokazuju jednakovrijedne značajke dijagnostičke točnosti, određivanje koncentracije NT-proBNP-a u uzorcima pleuralne tekućine ne doprinosi dija-

gnostičkom postupku kod zatajenja srca (18,39,45,46).

3.1.2.3 Analiza eksudacijskih izljeva

Laboratoriji su odgovorni za poticanje odgovarajućih ispitivanja u analizi pleuralne tekućine. Preporučene su samo analize dokazanog kliničkog značaja u obradi eksudacijskih izljeva. Rezultate dobivene analizom eksudacijskih izljeva treba uvijek korelirati s kliničkim simptomima i sumnjom na određenu dijagnozu (Slika 1).

Ukupni broj leukocita i diferencijacija stanica

Ukupni broj leukocita (Leu) ne treba određivati za razlikovanje pleuralnih transudata i eksudata (34,47,48). Međutim, Leu i diferencijaciju stanica treba određivati u eksudacijskim pleuralnim izljevima kao pomoć u opisanju prisutnih upalnih poremećaja (38,48). Određivanje Leu i diferencijaciju stanica u uzorcima pleuralne tekućine treba izvoditi koristeći automatizirane metode brojenja stanica, ili alternativno svjetlosnu mikroskopiju (odnosno hemocitometar) (Stupanj 1).

Kriteriji za odabir odgovarajuće metode brojenja stanica u pleuralnoj tekućini su: učestalost zahtjeva za određivanje broja stanica u pleuralnoj tekućini, dostupnost odgovarajuće tehničke opreme i stručnost/iskustvo laboratorijskog osoblja (13,48).

Iako Leu ima ograničenu vrijednost i nije preporučena za razlikovanje transudata od eksudata, pokazano je da eksudacijski izljevi imaju $\text{Leu} > 1000 \times 10^6/\text{L}$, dok transudacijski izljevi imaju $\text{Leu} < 1000 \times 10^6/\text{L}$ (47,48). Vrste stanica koje se mogu pronaći u pleuralnoj tekućini su: neutrofili, limfociti, plazma stanice, monociti i makrofagi, mezotelne i maligne stanice (6,34). Diferencijacija stanica u pleuralnom izljevima ima ograničenu vrijednost, ali može pomoći u ograničavanju izbora mogućih dijagnoza koje

su uzrokovale nastanak eksudacijskog izljeva (Tablica 2 i Dodatak 2) (27,45,48). Eozinofilija u pleuralnoj tekućini (broj eozinofila >10% Leu) se razvija unutar nekoliko sati u slučajevima spontanog pneumotoraksa, dok se u slučajevima traumatskog ili hemoragičnog pleuralnog izljeva razvija nakon 10 do 14 dana. Eozinofilija u pleuralnim izljevim nastalim nakon traume ili hemotoraksa zadržava se sve do nestanka izljeva i dobro korelira s eozinofilijom u perifernoj krvi (24,49). Najčešći uzroci neutrofilije, limfocitoze i eozinofilije prikazani su u Tablici 2. Obzirom da je neutrofilija prisutna u >10% transudata, a limfocitoza u >30% transudata, dobivene rezultate treba tumačiti u skladu s kliničkim simptomima (Tablica 2).

U uzorcima pleuralnog izljeva se uglavnom nalaze monociti/makrofagi (60-80% od ukupnih stanica), dok se bazofili u istom rijetko nalaze. Klinički značaj obje vrste stanica je nepoznat (13). Mezotelne stanice predstavljaju normalan nalaz u uzorcima pleuralnog izljeva i čine do 5% stanica s jezgrom. Njihov broj može biti povišen kod pneumonije, infarkta pluća i malignih bolesti. Kliničko značenje mezotelnih stanica je u isključivanju tuberkuloze; stoga ukoliko je u pleuralnoj tekućini prisutno > 5% mezotelnih stanica, dijagnoza tuberkuloze nije vjerojatna (13).

U slučaju nalaza atipičnih stanica (tumorske, atipične, reaktivne mezotelne stanice itd.) tije-

kom morfološke analize uzorka pleuralne tekućine (koristeći hemocitometar ili vidljive iz značajne razlike između ukupnog broja stanica s jezgrom (tj. svih stanica koje sadrže jezgru) i broja leukocita s automatskog brojača) treba odgovornog kliničara koji je analizu zatražio obavijestiti o nalazu i istaknuti potrebu za citološkom analizom (vidi 3.1.3 Poslijeanalitička faza).

Amilaza

Amilazu treba određivati u pleuralnom izljevu u slučaju sumnje na pankreatitis, malignu bolest, rupturu jednjaka, pseudocistu gušterače i cirozu jetre (Stupanj 1) (5,22,50-52).

Visoke aktivnosti amilaze u pleuralnim izljevim podrazumijevaju aktivnost amilaze koja je veća od serumske GGRI za amilazu ili je omjer aktivnosti amilaze u pleuralnoj tekućini i serumu >1. Iako se njeno određivanje ne preporučuje, aktivnost lipaze iz uzorka pleuralnog izljeva može pomoći u razlikovanju visokih aktivnosti amilaze u istom. Aktivnosti amilaze su visoke kod rupture jednjaka ili maligne bolesti zbog prisutnosti povišenih vrijednosti salivarnog izoenzima (s niskom aktivnosti lipaze). Pankreasni izoenzim amilaze će pak biti povišen u pleuralnim izljevim koji su povezani s bolestima pankreasa (s visokom aktivnosti li-

TABLICA 2. Poremećaji povezani s neutrofilijom, limfocitozom i eozinofilijom u pleuralnoj tekućini

Neutrofilija	Limfocitoza	Eozinofilija	Reference
Bakterijska pneumonija (parapneumonijski izljev)	Tuberkuloza	Pneumotoraks	34,38,47,48
Plućni infarkt	Virusna infekcija	Maligne bolesti	
Pankreatitis	Maligne bolesti	Trauma (hemotoraks)	
Rana tuberkuloza	Hilotoraks	Plućni infarkt	
Obično prisutno u > 10% transudata	Reumatski pleuritis	Kongestivno zatajenje srca	
	Obično prisutno u > 30% transudata	Parazitarne, gljivične infekcije	

paze). Interpretacija visokih aktivnosti amilaze u pleuralnim izljevima prikazana je u Dodatku 2 (5,18,24,52).

Adenozin-deaminaza

Aktivnost adenozin-deaminaze (ADA) u pleuralnom izljevu točan je i koristan pokazatelj tuberkuloznog pleuritisa. Treba se određivati kod bolesnika sa suspektnim tuberkuloznim izljevom kako bi se isti razlikovao od izljeva malignog porijekla (Stupanj 2) (53-55).

Dijagnoza tuberkuloznog pleuritisa se utvrđuje kombinacijom nalaza mikroskopskog pregleda pleuralnog izljeva i njegove mikrobiološke analize. Međutim, pozitivan mikrobioloških nalaz prisutan je u samo 36% bolesnika s tuberkuloznim izljevima, što u kombinaciji s nespecifičnim simptomima otežava razlikovanje tuberkuloznog pleuritisa od malignih pleuralnih izljeva (23,53,54). Iako se biopsija tkiva pleure smatra se najpouzdanijom potvrdnom metodom za dijagnozu tuberkuloznih pleuralnih eksudata, biomarkeri u pleuralnoj tekućini istraživani su kao alternativa ovom invazivnom dijagnostičkom postupku. Adenozin-deaminaza se oslobađa tijekom imunološkog odgovora pleure na prisutnost *Mycobacterium tuberculosis* i jednostavno se određuje u uzorcima pleuralne tekućine automatiziranim metodama. Aktivnosti ADA-e su značajno povišene u tuberkuloznom pleuritisu. Nedavne meta-analize su pokazale da granična vrijednost ADA od ≥ 40 U/L ima skupnu osjetljivost od 92% i specifičnost od 90%. Međutim, prediktivne vrijednosti ADA-e ovise o lokalnoj prevalenciji tuberkuloze, a lažno povišene aktivnosti ADA-e mogu se naći u parapneumonijskim izljevima i empijemu. Stoga se vrijednosti ADA-e trebaju tumačiti u skladu s kliničkim simptomima, mikrobiološkom analizom i rezultatima biopsije pleure (53-55).

pH

e u uzorcima pleuralne tekućine treba odrediti kod bolesnika s parapneumonijskim izljevom. Vrijednosti pH $> 7,30$ ukazuju na potrebu za farmakološkim liječenjem, dok vrijednosti pH $< 7,20$ (i/ili LD u uzorku pleuralne tekućine > 3 puta od serumske GGRI) ukazuju na prisutnost kompliciranog parapneumonijskog izljeva i potrebu za njegovim uklanjanjem kirurškim putem (Stupanj 2) (5,18,22,23).

pH u uzorku pleuralne tekućine treba određivati koristeći acidobazne analizatore. Lakmus papir i pH-metri nisu dovoljno točni za donošenje kliničkih odluka (14,24,32,33). Ostale parametre acidobazne ravnoteže dobivene analizom uzorka pleuralne tekućine acidobaznim analizatorom ne treba izdavati (vidi 3.1.1.3 Uzorkovanje i rukovanje uzorcima pleuralne tekućine). Ukoliko je izmjerena vrijednost pH niska ($< 7,35$), može se odrediti i pH iz uzorka arterijske krvi kako bi se isključila sistemska acidoza (5,23).

Ako nije moguće odrediti pH, u uzorku pleuralne tekućine treba odrediti glukozu. Koncentracije glukoze u uzorku pleuralne tekućine su u uskoj korelaciji s pH. Niska vrijednost koncentracije glukoze (< 3.4 mmol/L) u uzorku pleuralne tekućine ukazuje na kompliciran parapneumonijski izljev, ali se može naći i kod malignih bolesti, tuberkuloze te reumatske bolesti. Zbog niske specifičnosti i slabijih dijagnostičkih značajki u usporedbi s pH u pleuralnom izljevu, nalaz glukoze iz uzorka pleuralne tekućine treba tumačiti u skladu s kliničkom slikom (14,18,23).

Kolesterol i trigliceridi

U procjeni hloznog pleuralnog izljeva (tj. za dokazivanje primjesa limfe u uzorku pleural-

nog izljeva) treba koristiti istovremeno određivanje kolesterola i triglicerida u uzorku pleuralne tekućine (Stupanj 1) (5,18,23,56-58).

Hilozni izljev (ili hilotoraks) nastaje kao posljedica nakupljanja hilozne tekućine ili limfe u pleuralnom prostoru zbog njenog izlivanja iz torakalnog duktusa ili drugih limfnih žila (odnosno zbog njihovog oštećenja ili opstrukcije). Najčešći uzroci su maligne bolesti (primjerice Hodgkinov limfom) i traume. Iako su sličnog izgleda, hilozne izljeve treba razlikovati od pseudohiloznih zbog njihove različite etiologije i različitog pristupa terapiji. Hilozni izljev je pretežno sastavljen od hilomikrona, stoga sadrži visoke koncentracije triglicerida. Suprotno tome, pseudohilozni (ili hiliformni) izljevi su bogati kolesterolom, a nastaju kao posljedica kronične upale pleure (primjerice tuberkuloznog ili reumatskog pleuralnog izljeva). Uobičajeno je da se trigliceridi i kolesterol u pleuralnom izljevu određuju istovremeno kako bi se isključila prisutnost pseudohilotoraksa (5,14,23,24,27,57).

Koncentracije triglicerida ≥ 1.2 mmol/L i kolesterola < 5.2 mmol/L u uzorku pleuralne tekućine povezuju se s prisutnošću hiloznog izljeva. Pseudohilozni izljevi imaju koncentracije triglicerida < 1.2 mmol/L i kolesterola > 5.2 mmol/L (18,22,27,56,58).

Kreatinin

Kreatinin u uzorcima pleuralne tekućine treba određivati isključivo u slučajevima sumnje na prisutnost urinotoraksa (tj. za dokazivanje primjesa mokraće u uzorku pleuralnog izljeva). Omjer kreatinina u uzorku pleuralne tekućine i serumu > 1 smatra se temeljnim obilježjem urinotoraksa, ali se treba uvijek tumačiti u skladu s ostalim kliničkim pokazateljima (Stupanj 1) (5,14,59).

Urinotoraks (odnosno nakupljanje mokraće u pleuralnom prostoru) rijetki je uzrok pleuralnog izljeva, a može nastati kao posljedica opstrukcije mokraćnog sustava uslijed maligne bolesti, fibroze, kamenca, fizičke (nastale ozljedom) ili kirurške traume. Kreatinin je osjetljiv i specifičan pokazatelj prisutnosti primjesa mokraće u pleuralnom izljevu. Urinotoraks je obično transudat (zbog prisutnosti niske koncentracije proteina u takvim uzorcima). Međutim, ako su u uzorku prisutne povišene aktivnosti LD, pleuralni izljev se može pogrešno klasificirati kao eksudat. Ta se činjenica treba uzeti u obzir prilikom tumačenja Light-ovih kriterija kod kliničke sumnje na urinotoraks. Urinotoraks je obilježen izrazito povišenim koncentracijama kreatinina u uzorku pleuralne tekućine (177 – 884 $\mu\text{mol/L}$) u usporedbi s koncentracijama kreatinina u uzorku seruma koji je uzorkovan u isto vrijeme. Osim toga, omjer kreatinina u pleuralnoj tekućini i serumu smatra se biokemijskim kriterijem za postavljanje dijagnoze urinotoraksa: ako je omjer > 1 potvrđuje se prisutnost urinotoraksa (5,58-61).

Tumorski biljezi

Ne preporuča se rutinsko određivanje pojedinačnog tumorskog biljega ili njihove kombinacije za postavljanje dijagnoze malignog pleuralnog izljeva. Tumorske biljege u uzorku pleuralne tekućine treba određivati isključivo u slučaju citološkog nalaza koji nije jednoznačan (Stupanj 1) (38,62).

Citološka analiza uzorka pleuralne tekućine ima visoku dijagnostičku specifičnost i nisku dijagnostičku osjetljivost (50-60%) u razlikovanju malignog od ne-malignog uzroka nakupljanja pleuralne tekućine. Različiti tumorski biljezi, poput karcinoembrionalnog antigena (engl. *carcinoembryonic antigen*, CEA), ugljikohidratnog antigena (engl. *carbohydrate antigen*, CA) 19-9, CA 125, CA 15-3, citokeratinskog

fragmenta 19 (engl. *cytokeratin-19 fragment*, CYFRA 21-1), neuron specifične enolaze (engl. *neuron-specific enolase*, NSE) i dr., istraživani su u svrhu poboljšanja diferencijalne dijagnostike pleuralnog izljeva malignog i ne-malignog uzroka. Međutim, njihova je korisnost ograničena zbog male dijagnostičke osjetljivosti (5,14,18). Ukoliko se sumnja na maligni pleuralni izljev, a citološki nalaz je negativan, ili se traži za primarnim sijelom tumora, određivanje tumorskih biljega u uzorku pleuralnog izljeva može poslužiti kao komplementarni dijagnostički alat nalazu biopsije pleure (14,62,63).

3.1.3 Poslijeanalitička faza

Nalaz laboratorijske analize pleuralne tekućine treba sadržavati rezultat određivanja te vrstu tekućine koja se analizirala (5,10). Laboratoriji trebaju na nalazu navesti granice kliničke odluke i podatke za tumačenje nalaza ovisno o provedenoj analizi u pleuralnoj tekućini, kako bi se kliničarima olakšalo kliničko tumačenje i donošenje kliničke odluke (Tablica 3 i Dodatak 2) (Stupanj 1) (2,5,18,23).

Ako metode koje se koriste u analizi uzorka pleuralne tekućine nisu validirane, tu činjenicu treba jasno istaknuti u napomeni nalaza. Dodatno, treba kontaktirati kliničara koji je pretragu zatražio i objasniti mu ograničenja korištene metode (vidi primjer u Tablici 3) (Stupanj 1) (2,5,17).

Laboratoriji trebaju validirati stabilnost analita u uzorku pleuralne tekućine, kako bi se odredili uvjeti pohrane koji su prihvatljivi za naknadne analize i/ili ponavljanje analize iz specifičnog uzorka (Stupanj 1) (2,64).

Laboratoriji se snažno potiču da rezultate dobivene iz uzorka pleuralne tekućine javljaju i komentiraju s odgovornim kliničarom koji je analize zatražio. Na taj način doprinosi pravovremenom postavljanju dijagnoze,

liječenju bolesnika i mogu dati savjet u slučaju dodatnih zahtjeva za analizom. Nalazi laboratorijske analize uzorka pleuralne tekućine trebaju sadržavati standardizirane interpretativne komentare (Tablica 3) (Stupanj 1) (21,65,66).

Pleuralni se izljevi ne nakupljaju kod zdravih osoba, a invazivnost samog postupka torakocenteze priječi uzorkovanje u referentnoj populaciji. Upravo je zato nedostatak odgovarajućih referentnih intervala, koji bi se koristili u tumačenju rezultata, najvažniji poslijeanalitički problem u laboratorijskoj analizi pleuralne tekućine.

Kako bi se olakšalo tumačenje dobivenih nalaza, rezultate laboratorijske analize pleuralne tekućine treba izdavati u usporedbi s odgovarajućim rezultatima istovremeno uzorkovanog uzorka seruma (2,5,17,22).

U ovom dokumentu navedene su granice kliničke odluke u laboratorijskoj analizi pleuralne tekućine za klinički korisne analite. Navedene granice kliničke odluke trebaju se implementirati u tumačenju rezultata kod analize specifičnih vrsta seroznih tekućina (Dodatak 2).

Prema dostupnim literaturnim podacima, stabilnost proteina i albumina u uzorku pleuralne tekućine je 7 dana na sobnoj temperaturi (na 21–25°C), na 4°C i na temperaturi od –20°C. Kolesterol u uzorku pleuralne tekućine je stabilan 4 dana na sobnoj temperaturi, te 14 dana na temperaturi od 4°C i –20°C. Trigliceridi su u uzorku pleuralne tekućine stabilni 4 sata na sve tri navedene temperature. Glukoza u pleuralnoj tekućini je stabilna 2 sata na sobnoj temperaturi te 7 dana na 4°C i –20°C. Stabilnost LD u pleuralnoj tekućini je ograničena na 4 sata na sobnoj temperaturi, te 1 dan na 4°C, dok se zbog nestabilnosti LD na –20°C uzorci pleuralne tekućine ne smiju pohraniti u zamrzivaču (2,28,64). Za potrebe određivanja Leu i njihove

TABLICA 3. Primjer preporučenog izgleda nalaza

Test/Analit	Rezultat	Jedinica	Granice odluke/Tumačenje
(PT) Izgled		/	Transudati su bistri, svijetložuti, bez mirisa, nisu viskozni. Eksudati su zamućeni, mutni, mliječni, krvavi i skloni su grušanju.
Omjer proteina PT/serum		/	Eksudacijski izljevi zadovoljavaju barem jedan od sljedećih kriterija: 1. omjer proteina u pleuralnoj tekućini i serumu > 0,5 2. omjer LD u pleuralnoj tekućini i serumu > 0,6 3. aktivnost LD u pleuralnoj tekućini > 2/3 GGRI za LD u serumu
Omjer LD PT/serum		/	
(PT) LD		U/L	
Gradijent albumina		g/L	Transudati imaju gradijent albumina > 12 g/L, a eksudati imaju gradijent albumina ≤ 12 g/L.
(PT) Kolesterol		mmol/L	Eksudati imaju kolesterol >1,2 mmol/L.
Omjer kolesterola PT/serum		/	Kod eksudata je omjer kolesterola PT/serum > 0,3.

Napomena:

(npr. „Uzorak dobiven traumatskom punkcijom. Nije moguće isključiti utjecaj na rezultate analize.“)

Interpretativni komentar:

(npr. „Analize ukazuju da je izljev transudat/eksudat.“ ili „Moguće interferencije zbog razlike u matriksu nije moguće isključiti; rezultate treba tumačiti u odnosu na kliničku sliku.“)

Ova tablica predstavlja preporučeni izgled nalaza za analize koje se izvode u uzorcima pleuralne tekućine. Predložak se može prilagoditi (i proširiti) prema potrebama svakog pojedinog laboratorija, ovisno o najčešćim vrstama ETT i analizama koje se izvode. PT - pleuralna tekućina. LD – laktat-dehidrogenaza. GGRI - gornja granica referentnog intervala.

diferencijacije, uzorci pleuralne tekućine uzorkovani s EDTA mogu se pohraniti do 2 dana na 4°C (67). U idealnim uvjetima, laboratoriji trebaju u vlastitom rutinskom okruženju validirati stabilnost pojedinačnih analita u uzorcima pleuralne tekućine (2,5).

Interpretativni komentari mogu se odnositi na predanalitičku i analitičku fazu laboratorijske analize pleuralne tekućine. U obzir treba uzeti samo interpretativne komentare koji imaju kliničku vrijednost (npr. moguće zaključke proizašle iz rezultata, moguće dodatne analize koje doprinose diferencijalnoj dijagnostici). Komentari moraju biti standardizirani (unaprijed određeni) od strane laboratorija te moraju biti napisani jasnim i jednoznačnim jezikom (Tablica 3). Ako se LIS koristi za generiranje standardiziranih komentara za analizu pleuralne tekućine, na nalazu treba navesti relevantnu literaturu koja se koristila kao izvor za osmišljavanje komentara. Ako se interpretativni komentari navode u obliku slobodnog teksta, na nalazu treba biti jasno vidljivo tko je osoba odgovor-

na za komentiranje. Interpretativni komentari navedeni na nalazu ne trebaju zamijeniti praksu izravnog komuniciranja i tumačenja rezultata s odgovornim kliničkim osobljem (65,66).

3.2 PERIKARDIJALNA TEKUĆINA

Mali volumeni perikardijalne tekućine (15-50 mL) ispunjavaju perikardijalnu šupljinu i olakšavaju gibanje srca prilikom kontrakcije i relaksacije. Najčešći uzrok perikardijalnog izljeva je akutni perikarditis bakterijskog, tuberkuloznog ili gljivičnog porijekla. Osim toga, izljev može biti posljedica i infarkta miokarda, maligne bolesti, uremije i ozljede medijastinuma (5,6,18,22). Suprotno dobro utvrđenim postupcima laboratorijske analize pleuralne tekućine, korisnost parametara za analizu perikardijalne tekućine nije opsežno istraživana, prvenstveno zbog invazivnosti postupka uzorkovanja. Perikardiocenteza, postupak uklanjanja perikardijalne tekućine u dijagnostičke ili terapijske svrhe, je indicirana u slučaju prisutnosti

srednjeg/velikog perikardijalnog izljeva nejasne etiologije, zatim kod sumnje na gnojni, tuberkulozni ili maligni perikarditis, ili u slučaju prisutnosti hemodinamske nestabilnosti s prijetjećom tamponadom srca. Laboratorijska analiza uzorka perikardijalne tekućine započinje pretragama za razlikovanje transudacijskog od eksudacijskog izljeva. Općenito, ovaj pristup pojednostavljuje dijagnostički postupak, a potvrda prisutnosti transudacijskog izljeva ukazuje na postojanje sistemske bolesti i isključuje potrebu za daljnjom laboratorijskom obradom (Slika 2) (18,23,68).

3.2.1 Predanalitička faza

Preporuke iz predanalitičke faze koje se odnose na uputnicu, identifikaciju bolesnika i uzorka, uzorkovanje i rukovanje uzorcima te

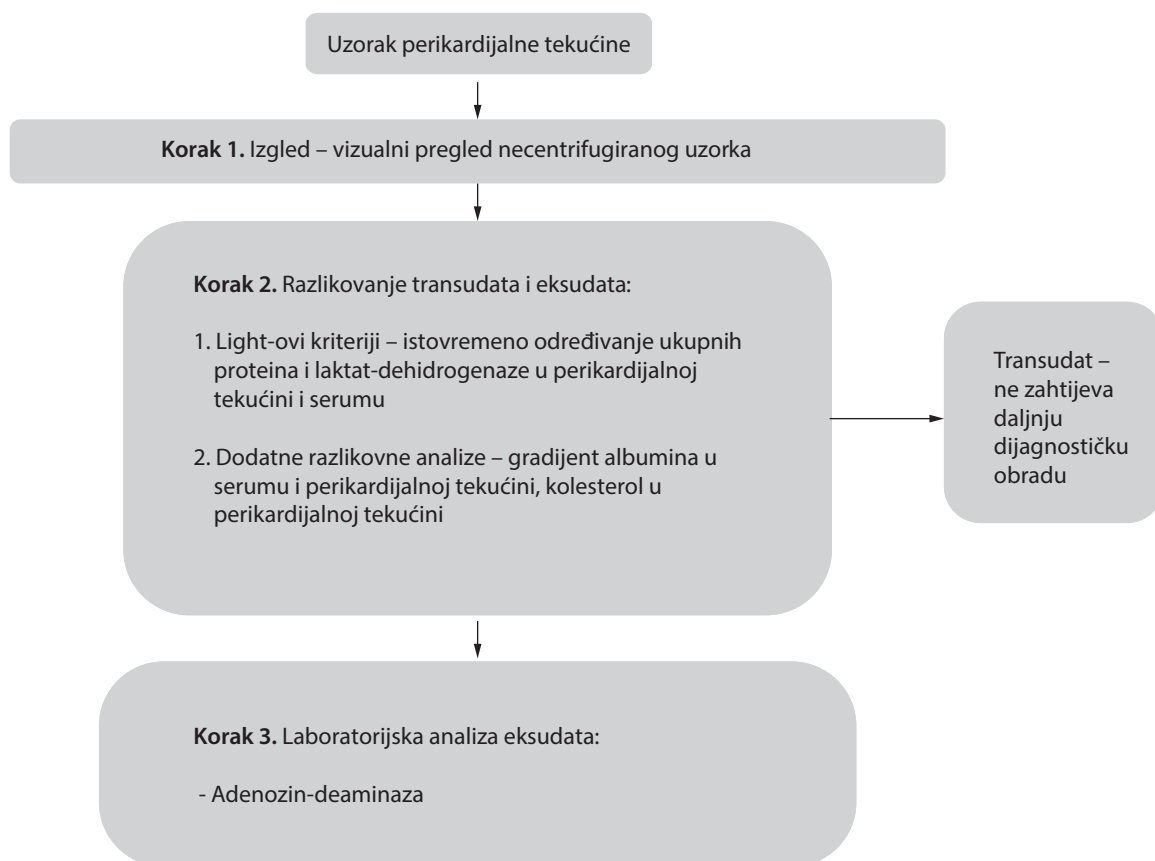
procjenu kvalitete uzorka za pleuralnu tekućinu trebaju se primijeniti i u analizi perikardijalne tekućine (Stupanj 1).

3.2.2 Analitička faza

3.2.2.1 Izgled perikardijalne tekućine

Izgled perikardijalne tekućine treba odrediti neposredno nakon prijema uzorka i prije centrifugiranja. Izgled perikardijalne tekućine ne treba koristiti kao jedini kriterij za razlikovanje transudata od eksudata (Stupanj 1) (6,22,23).

Normalna perikardijalna tekućina je bistra i svijetložuta žuta, dok je zamućena (serosanguinozna) prisutna kod infekcija ili malignih



SLIKA 2. Algoritam za laboratorijsku analizu perikardijalne tekućine

bolesti. Krvava perikardijalna tekućina može biti uzrokovana srčanom rupturom, punkcijom ventrikula tijekom perikardiocenteze ili traumatskom perikardiocentezom. Mliječni izgled perikardijalne tekućine ukazuje na prisutnost hiloperikarda (6,22,23).

3.2.2.2 Razlikovanje transudata i eksudata

Granične vrijednosti za Light-ove kriterije, gradijent albumina i kolesterol koje se odnose na pleuralnu tekućinu trebaju se koristiti za razlikovanje perikardijalnih eksudata od transudata. Iako su dostupni ograničeni dokazi koji opisuju upotrebu Light-ovih kriterija u razlikovanju perikardijalnih tekućina (uz iste granične vrijednosti kao za pleuralnu tekućinu), svi oni pokazuju njihove dobre dijagnostičke značajke (Slika 2, Dodatak 2). Međutim, rezultate treba uvijek tumačiti uzimajući u obzir i kliničke simptome (Stupanj 2) (18,69,70).

Slično pleuralnom izljevu, najveće stope pogrešno klasificiranih transudata u eksudate nađene su u bolesnika koji su primali terapiju diureticima. Koristeći gradijent albumina ≤ 12 g/L u prepoznavanju perikardijalnih eksudata dobivena je osjetljivost od 90% i specifičnost od 89%. Granična vrijednost kolesterola u perikardijalnom eksudatu od $\geq 1,6$ mmol/L postigla je osjetljivost od 71% i specifičnost od 83% (71). Drugo je pak istraživanje pokazalo da iako je sastav normalne perikardijalne tekućine bio sličan sastavu seruma/plazme, aktivnosti LD u perikardijalnoj tekućini bile su 2,4 puta više od onih u serumu, dok su koncentracije proteina iznosile 0,6 od onih nađenih u serumu. Stoga je korisnost određivanja ukupnih proteina i LD u perikardijalnoj tekućini od ograničene vrijednosti jer uzorci transudacijske perikardijalne tekućine zadovoljavaju Light-ove kriterije za eksudat (prilikom razlikovanja pleuralne tekućine) (69). Nadalje, ukupan broj stanica i njihova

diferencijacija, LD, proteini i glukoza, kao pojedinačne analize ili kao dio računskih omjera, pokazuju slabe razlikovne značajke u prepoznavanju uzroka perikardijalnog izljeva (72).

3.2.2.3 Analiza eksudacijskih perikardijalnih izljeva

Aktivnost ADA u perikardijalnoj tekućini treba određivati u prepoznavanju tuberkuloznog perikarditisa. Predložena granična vrijednost ADA za dijagnozu tuberkuloznog perikarditisa je ≥ 40 U/L (Dodatak 2) (Stupanj 2) (73).

Analiza eksudacijskih perikardijalnih izljeva najčešće je usmjerena na razlikovanje malignih od ne-malignih izljeva (pomoću citološke analize) i/ili na potvrdu specifične dijagnoze koja je uzrokovala izljev (npr. infekcija) (6). Trenutno dostupni znanstveni dokazi koji se odnose na laboratorijsku analizu eksudacijskih perikardijalnih izljeva su ograničeni. Analiza perikardijalnog izljeva može uključivati određivanje broja stanica, glukoze, ukupnih proteina i LD (70). Ukupni broj stanica i njihova diferencijacija imaju ograničenu dijagnostičku vrijednost u procjeni perikardijalnog izljeva. Ukupan broj leukocita $> 10 \times 10^9/L$ ukazuje na bakterijski, tuberkulozni ili maligni perikarditis (6,23,70).

Određivanje pH u uzorku perikardijalne tekućine nema kliničku vrijednost (74). Hilozni i pseudohilozni perikardijalni izljevi mogu se razlikovati određivanjem triglicerida i kolesterola u uzorcima perikardijalne tekućine. U tu svrhu mogu se primijeniti iste granice odlučivanja kao i za pleuralnu tekućinu (6,22,70).

3.2.3 Poslijeanalitička faza

Preporuke za poslijeanalitičku fazu koje se odnose na analizu pleuralne tekućine trebaju se primijeniti i na poslijeanalitičku fazu analize perikardijalne tekućine (Stupanj 1).

3.3 PERITONEALNA TEKUĆINA (ASCITES)

Peritonealni prostor je šupljina obložena slojem mezotelnih stanica koja fiziološki sadrži do 50 mL peritonealne tekućine nastale ultrafiltracijom plazme (23). Peritonealni izljev (ascites) odnosi se na patološko nakupljanje tekućine u peritonealnom prostoru zbog povećanog stvaranja tekućine ili njenog smanjenog uklanjanja. Najčešći uzroci ascitesa su ciroza jetre, maligne bolesti, zatajenje srca, tuberkuloza, nefrotski sindrom, bakterijski peritonitis i pankreatitis (18,23,75-77).

Radiološki i ultrazvučni dijagnostički postupci, te kompjuterizirana tomografija (CT) omogućavaju otkrivanje malih volumena peritonealne tekućine i pomažu u procjeni mogućeg uzroka ascitesa. Međutim, dijagnostička paracenteza kod svih bolesnika s ascitesom, a prethodno terapijskoj intervenciji, smatra se osnovnim postupkom u isključivanju spontanog bakterijskog peritonitisa (SBP-a) i drugih uzroka ascitesa osim ciroze. Nadalje, dijagnostička paracenteza indicirana je u bolesnika s novonastalim ascitesom, u bolesnika kojima je potrebna hospitalizacija zbog prisutnosti ascitesa i kod bolesnika s ascitesom popraćenim nerazjašnjenim kliničkim pogoršanjem (78-81). Analiza peritonealne tekućine smatra se isplativom i brzom metodom za utvrđivanje etiologije ascitesa (23,27,82).

3.3.1 Predanalitička faza

Preporuke iz predanalitičke faze koje se odnose na uputnicu, identifikaciju bolesnika i uzorka, uzorkovanje i rukovanje uzorcima te procjenu kvalitete uzorka za pleuralnu tekućinu trebaju se primijeniti i u analizi ascitesa (Stupanj 1).

3.3.2. Analitička faza

3.3.2.1 Izgled ascitesa

Izgled ascitesa treba odrediti nakon prijema uzorka i prije centrifugiranja. Izgled ascitesa treba koristiti kao pomoć u razjašnjavanju njegove etiologije, a ne kao jedini kriteriji za diferencijalnu dijagnozu nakupljanja tekućine (Stupanj 1) (21,23,77).

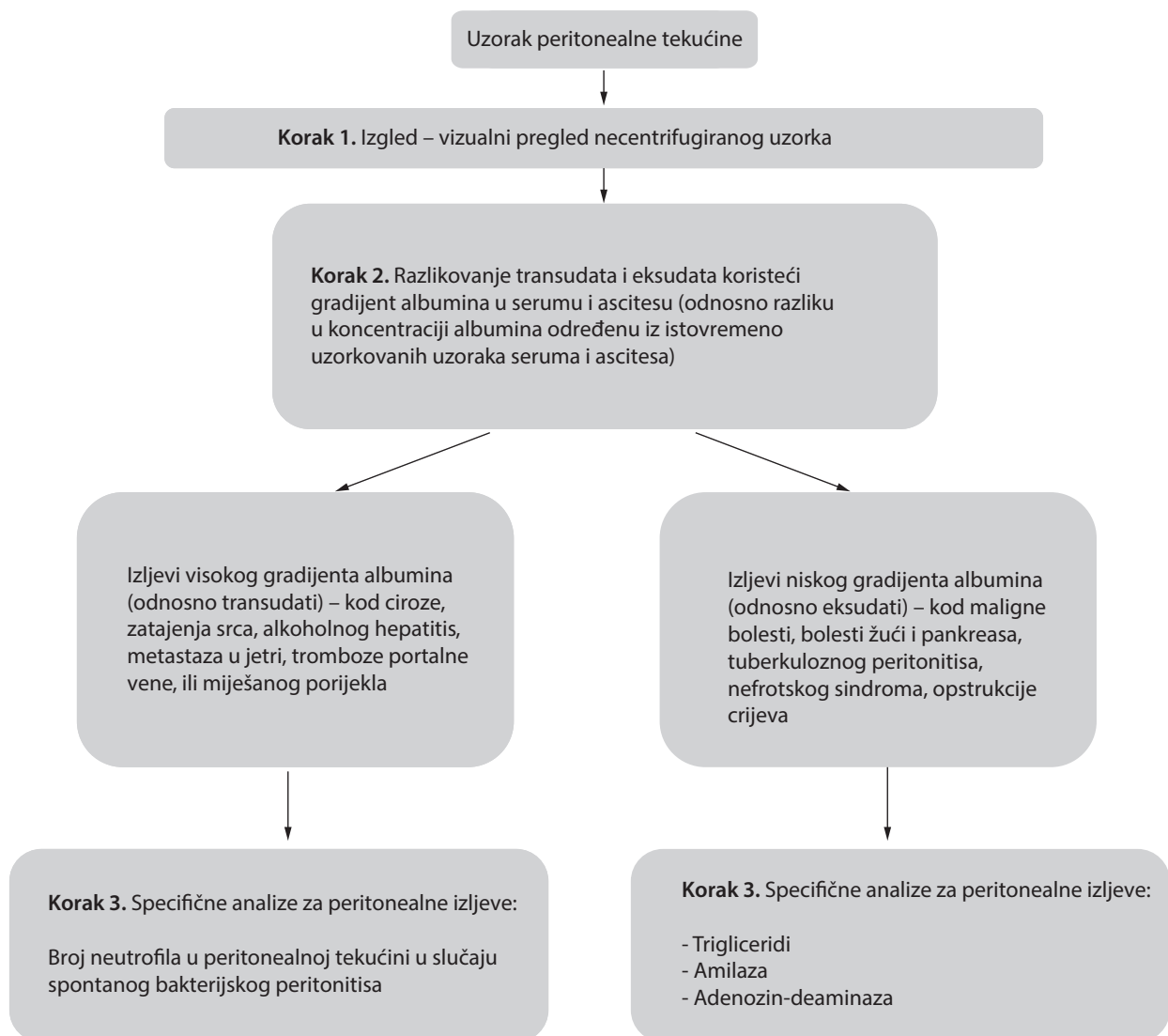
Normalan ascites je bistar i blijedožut. Ako je krvavi izgled ascitesa uzrokovan traumatskom punkcijom, uzorak stajanjem po uzorkovanju pokazuje sklonost zgrušavanju te se na kraju izbistri. Ako mliječni izgled zaostaje i nakon centrifugiranja, to ukazuje na prisutnost limfe u uzorku (odnosno na hilozni ili pseudohilozni izljev koji obiluje hilomikronima s visokim koncentracijama triglicerida). Gnojni ascites se povezuje s intra-abdominalnom infekcijom. Moguća tumačenja izgleda peritonealne tekućine prikazana su u Tablici 4 (23,27,75).

3.3.2.2 Razlikovanje peritonealnih izljeva

Gradijent albumina u serumu i ascitesu (SAAG), odnosno razliku između koncentracija albumina u serumu i ascitesu, treba koristiti za razlikovanje peritonealnih izljeva uzrokovanih portalnom hipertenzijom od onih uzrokovanih drugim patofiziološkim mehanizmima. Peritonealni izljevi sa SAAG \geq 11 g/L trebaju se klasificirati kao izljevi visokog gradijenta albumina i smatrati transudatima. Suprotno tome, peritonealni izljevi sa SAAG $<$ 11 g/L trebaju se klasificirati kao izljevi niskog gradijenta albumina, odnosno kao eksudati (Slika 3) (Stupanj 1) (21,23,78-80,82-84).

TABLICA 4. Interpretacija mogućeg izgleda peritonealne tekućine

Izgled	Moguće kliničko značenje	Reference
Bistar, svijetložut	Ciroza, nije potrebna daljnja laboratorijska obrada	21,23,27,75,77
Tamno žuta, zapnjen	Moguća prisutnost bilirubina, žutica	
Mliječan	Hilozni ili pseudohilozni ascites kod ciroze, infekcije, maligne bolesti, kongenitalne malformacije	
Krvav	Maligne bolesti, tuberkulozni peritonitis, abdominalna trauma, pankreatitis	
Zamućen, gnojni	Bakterijski peritonitis, pankreatitis ili maligne bolesti	
Tamnosmeđ (boje čaja)	Pankreasni ascites	
Crni	Hemoragični pankreatitis, maligni melanom	
Tamni, sličan melasi	Perforacija crijeva	
Zelen, smeđ	Prisutnost žuči, perforacija žučnog mjehura, perforacija crijeva, duodenalni ulkus, kolecistitis, akutni pankreatitis	

**SLIKA 3.** Algoritam za laboratorijsku analizu peritonealne tekućine

Tradicionalni koncept transudata/eksudata za razlikovanje peritonealnog izljeva, koji se temelji na pretpostavci da visoke koncentracije ukupnih proteina u ascitesu mogu pomoći u prepoznavanju eksudata, treba napustiti. Zapravo, kada su primijenjene tradicionalne granične vrijednosti ukupnih proteina u rasponu od 25-30 g/L, mnogi su maligni i infektivni uzorci peritonealnog izljeva pogrešno su klasificirani kao transudati; dok su izljevi bolesnika s cirozom i zatajenjem srca pogrešno klasificirani kao eksudati. Štoviše, uzorkovanjem peritonealnih izljeva zdravih žena pokazano je da su koncentracije ukupnih proteina oko 40 g/L, čime se takvi izljevi svrstavaju u eksudacijske. Konačno, tradicionalni koncept ne uzima u obzir mogućnost pojave miješanog ascitesa (odnosno ascitesa nastalog kombinacijom portalne hipertenzije i drugog poremećaja) (21,23,75,77,84).

Slabe dijagnostičke značajke ukupnih proteina dovele su do istraživanja korisnijih dijagnostičkih pokazatelja (i njihovih kombinacija) za razlikovanje peritonealne tekućine (23,84,85). Primjerice, Boyer-ovi kriteriji (koji uključuju određivanje ukupnih proteina i LD u ascitesu i serumu), zatim omjer bilirubina u ascitesu i serumu, kolesterol u ascitesu, omjer kolesterola u ascitesu i serumu te model koji kombinira koncentracije ukupnih proteina, LD, čimbenika nekroze tumora α (TNF- α), komplementa C4 i haptoglobina u ascitesu, predloženi su kao potencijalni biljezi za prepoznavanje eksudacijskog peritonealnog izljeva. Međutim, nedostatak ponovljivih dokaza onemogućio je njihovu primjenu u praksi (23,75).

Gradijent albumina u serumu i ascitesu nije ovisan o propusnosti peritonealne membrane, odražava prisutnost/odsutnost portalne hipertenzije i smatra se fiziološkom alternativom tradicionalnom konceptu transudata/eksudata. Ako je portalna hipertenzija uzrokom nakupljanja peritonealne tekućine, osmotski gradi-

jent između seruma i ascitesa povećat će se kako bi se kompenzirao visoki hidrostatski tlak. Koristeći SAAG graničnu vrijednost od 11 g/L, peritonealni izljevi se mogu razlikovati na one povezane s portalnom hipertenzijom (odnosno izljeve visokog gradijenta albumina koji se pojavljuju kod ciroze, zatajenja srca, alkoholnog hepatitisa, metastaza u jetri, tromboze portalne vene i ascitesa miješanog porijekla), i one povezane s normalnim portalnim tlakom (odnosno izljeve niskog gradijenta albumina koji se pojavljuju kod maligne bolesti, bilijarnog i pankreasnog ascitesa, tuberkuloznog peritonitisa, nefrotskog sindroma, opstrukcije crijeva) (23,75,79,83,84,86). U usporedbi s ukupnim proteinima, SAAG postiže dijagnostičku točnost od 97% (uz osjetljivost od 95% i specifičnost od 95%) u prepoznavanju eksudacijskih ascitesa (77,78,82). Ta razlika u dijagnostičkim značajkama može se objasniti činjenicom da je SAAG izravno proporcionalan portalnoj hipertenziji, dok su ukupni proteini obrnuto proporcionalni portalnom tlaku, ali u izravnoj vezi s ukupnim proteinima u serumu (23,77,82,84).

Unatoč nadmoćnosti SAAG-a, njegove vrijednosti treba tumačiti s oprezom, imajući na umu nekoliko metodoloških problema u određivanju albumina. Koncentracije albumina (u uzorcima seruma i ascitesa) mogu se određivati koristeći spektrofotometrijske metode (bromkrezol zelenilom). Alternativno, za njihovo se određivanje mogu koristiti i nefelometrijske metode. Određivanje koncentracije albumina u niskom koncentracijskom području je analitički izazovno. Bolesnici s cirozom mogu imati vrlo niske koncentracije albumina u serumu (odnosno < 15 g/L), što može rezultirati izračunom netočno niskih vrijednosti SAAG-a. Spektrofotometrijske metode za određivanje albumina precjenjuju koncentracije albumina u niskom koncentracijskom području u usporedbi s imunokemijskim metodama (23,27,75). Metode s bromkrezol zeleni-

lom u niskom su koncentracijskom području podložne interferenciji transferinom i lipoproteinima, što se posebno odnosi na analizu peritonealne tekućine (npr. u hloznom ascitesu, zbog interferencije lipoproteinima, koncentracije albumina mogu biti lažno precijenjene). Nadalje, koncentracije globulina doprinose osmotskom tlaku, ali su obrnuto proporcionalne albuminu. Stoga, prisutnost hiperglobulinemije (> 50 g/L) može uzrokovati lažno sniženju vrijednost SAAG (23,87). Albumin je osjetljiv na različite predanalitičke čimbenike, kao što su položaj tijela, produljena staza zbog duljeg držanja podveze, uzimanje diuretika (75,88). Budući da je učinak vremenskog intervala proteklog između uzorkovanja seruma i uzorkovanja peritonealne tekućine na sam izračun SAAG-a još uvijek slabo istražen, obje se vrste uzoraka trebaju uzorkovati istovremeno (27,75).

3.3.2.3 Specifične analize peritonealnih izljeva

Broj neutrofila u peritonealnoj tekućini

Broj neutrofila u peritonealnoj tekućini $\geq 250 \times 10^6/L$ je, u odsutnosti perforacije ili upale unutarnjih organa trbušne šupljine, ključni kriterij za dijagnozu SBP-a. Treba se odrediti kod svih hospitaliziranih bolesnika s cirozom popraćenom ascitesom, za isključivanje SBP-a (21,23,48,78-81). Broj neutrofila u uzorcima peritonealne tekućine treba određivati koristeći automatske hematološke brojače ili alternativno svjetlosnu mikroskopijom (odnosno hemocitometar) (Stupanj 1).

Spontani bakterijski peritonitis se definira kao infekcija postojeće peritonealne tekućine (ascitesa), a bez nekog drugog intra-abdominalnog izvora infekcije. Česta je komplikacija kod bolesnika s cirozom i ascitesom, a uzrokovana je premještanjem bakterija iz crijeva u peritonealnu šupljinu. Procjenjuje se da je njena prevalencija u hospitaliziranih bolesnika s cirozom i

ascitesom između 10-30%. Premda su povišeni Leu u ascitesu brzi pokazatelj prisutnosti infekcije te se još uvijek određuju u dijagnozi SBP-a neovisno o diferencijalnoj slici (uz graničnu vrijednost $> 500 \times 10^6/L$), kod dijagnoze SBP-a treba koristiti broj neutrofila u ascitesu. Granične vrijednosti od $250 \times 10^6/L$ i $500 \times 10^6/L$ neutrofila imaju sličnu dijagnostičku točnost za dijagnozu SBP-a. Međutim, prva granična vrijednost pokazuje bolju osjetljivost, a druga bolju specifičnost. Ukoliko je uzorak peritonealne tekućine izrazito krvav (s brojem eritrocita $> 10 \times 10^9/L$) potrebno je izvršiti korekciju broja neutrofila u uzorku na način da se od apsolutnog broja neutrofila oduzme po jedan neutrofil na svakih 250 eritrocita (npr. u uzorku broja neutrofila $250 \times 10^6/L$ i broja eritrocita $20 \times 10^9/L$ korigirani je broj neutrofila $170 \times 10^6/L$) (21,48,78-82,89).

Određivanje broja neutrofila u peritonealnoj tekućini koristeći test trake

Obzirom da SBP predstavlja stanje koje životno ugrožava bolesnika, njegovo rano prepoznavanje i brze terapijske odluke od velike su važnosti u smanjivanju stopa smrtnosti hospitaliziranih bolesnika. U skladu s tim, test traka za mokraću (odnosno analiza s leukocitnom esterazom) je predstavljena kao brza i dostupna metoda za rano otkrivanje povišenog broja neutrofila u peritonealnoj tekućini. Međutim, test trake za mokraću su pokazale nisku osjetljivost i visoke stope lažno negativnih rezultata, pogotovo u slučajevima SBP-a i niskim brojem neutrofila. Stoga, ne preporučuju se za brzu dijagnozu SBP-a. Napredak automatiziranih tehnika za brojenje i diferenciranje stanica u ETT je prevladao kvalitativne metode poput test trake (90-95).

Ostale analize u peritonealnoj tekućini u dijagnozi SBP-a

Ukupni proteini u peritonealnom izljevu mogu se određivati kao pomoć u procjeni rizika za

nastanak SBP-a. Koncentracija ukupnih proteina < 10 g/L povezuje se sa povećanim rizikom za razvoj SBP-a. U SBP-u i sekundarnom bakterijskom peritonitisu nađene su visoke aktivnosti LD-a (75,81,96).

Kalprotektin je protein koji potječe iz neutrofila. Njegove visoke koncentracije dokazane su u plazmi i stolici bolesnika s infektivnim i upalnim bolestima. Kalprotektin u ascitesu je predložen kao novi osjetljivi i specifičan pokazatelj u prepoznavanju SBP-a kod bolesnika s cirozom i ascitesom. Moguće ga je kvantificirati koristeći komercijalno dostupnu metodu za pretrage uz krevet bolesnika. Pokazao se kao pouzdana zamjenska metoda kod broja neutrofila u peritonealnoj tekućini > 250 x10⁶/L. Nije još široko prihvaćen za rutinsku primjenu zbog ograničenih podataka o njegovom dijagnostičkom značaju (97-99).

Trigliceridi

Trigliceride treba određivati u peritonealnim izljevima kod sumnje na prisutnost hloznog ascitesa (tj. za dokazivanje primjesa limfe u uzorku ascitesa). Omjer koncentracije triglicerida u ascitesu i serumu > 1 ili koncentracija triglicerida u ascitesu > 1,2 mmol/L kriteriji su za prepoznavanje hloznog ascitesa (Stupanj 1) (100,101).

Nastanak hloznog ascitesa povezuje se sa opstrukcijom i/ili ozljedom intestinalnog limfnog sustava te posljedičnim nakupljanjem limfe u peritoneumu. Pseudohlozni ascites nastaje kao posljedica raspada stanica u bakterijskom peritonitisu ili malignoj bolesti. Hlozni ascites se od pseudohloznog razlikuje po sadržaju triglicerida: u hloznom ascitesu je koncentracija triglicerida veća od one serumu (omjer triglicerida u ascitesu i serumu je > 1 ili trigliceridi u ascitesu > 1,2 mmol/L). Budući da je hlozni ascites bogat trigliceridima, dodatno određiva-

nje koncentracije kolesterola u ascitesu nije potrebno. Kako koncentracije triglicerida ovise o nutritivnom statusu bolesnika, bitno je da se uzorak seruma uzima istovremeno sa uzorkom peritonealne tekućine (23,75,102,103).

Amilaza

Aktivnost amilaze u peritonealnoj tekućini treba određivati u isključivo za potvrdu ili isključivanje dijagnoza pankreatičnog ascitesa, perforacije crijeva, ruptore pseudociste i mezenterične tromboze. Najviše aktivnosti (odnosno tri puta veća od normalne serumске vrijednosti ili ≥ 2000 U/L) obično se povezuju sa oštećenjem pankreasa (Stupanj 1) (21,23,75,78).

Adenozin-deaminaza

Aktivnosti ADA u peritonealnom izljevu osjetljiv su i specifičan pokazatelj tuberkuloznog ascitesa i trebaju se određivati za potvrdu dijagnoze, pogotovo u područjima visoke prevalencije. Optimalna granična vrijednost od ≥ 39 U/L ima visoku dijagnostičku točnost za dijagnozu tuberkuloznog peritonitisa (s osjetljivošću od 100% i specifičnošću od 97%) (Stupanj 2) (104).

Ostale specifične analize

Ureja, kreatinin, ukupni bilirubin, glukoza i kolesterol u peritonealnoj tekućini mogu se određivati u specifičnim kliničkim situacijama. Međutim, dokazi o njihovoj dodanoj dijagnostičkoj vrijednosti su ograničeni, što posljedično ograničava njihovo uključivanje u preporučene analize (75,80). Koncentracije kolesterola u peritonealnoj tekućini mogu biti korisne u razlikovanju malignog ascitesa od ostalih mogućih etiologija (npr. ciroze). Povišene koncentracije kolesterola su svojstvene malignom asciti-

tesu, a nastaju kao posljedica povećane propusnosti, sinteze kolesterola i njegovog oslobađanja iz malignih stanica. Granična vrijednost kolesterola u ascitesu od $> 1,2$ mmol/L ima dijagnostičku osjetljivost od 93% i dijagnostičku specifičnost od 96% u razlikovanju malignog ascitesa (18,75,105,106).

Koncentracija glukoze u peritonealnoj tekućini oponašaju one nađene u serumu. Upravo zato određivanje koncentracije glukoze u ascitesu nema izraziti klinički značaj, izuzev kod sumnje na prisutnost infekcije ili maligne bolesti (npr. kod tuberkuloznog peritonitisa, karcinomatoze ili SBP-a). Niska koncentracija glukoze u peritonealnom izljevu (npr. $< 2,8$ mmol/L) može ukazivati na njenu povećanu potrošnju u prisutnosti leukocita i bakterija (21,23,75,82).

Izlijevanje mokraće iz mokraćnog sustava u peritonealnu šupljinu obilježeno je prisutnošću transudata s visokim koncentracijama kreatinina i ureje, i niskim vrijednostima glukoze i pH. Određivanje ureje i kreatinina u peritonealnom izljevu korisno je u razlikovanju mokraće od peritonealne tekućine (tj. za dokazivanje primjesa mokraće u uzorku ascitesa). Koncentracije ureje i kreatinina u ascitesu veće od koncentracija tih parametara u istovremeno uzorkovanom uzorku seruma (s omjerom kreatinina u ascitesu i serumu > 1) ukazuju na rupturu mokraćnog mjehura (5,21,23).

Ukupni bilirubin treba određivati samo ako je uzorak ascitesa smeđe boje. Koncentracije bilirubina u peritonealnoj tekućini više od koncentracija nađenih u istovremeno uzorkovanom uzorku seruma ukazuju na izlijevanje žuči (npr. intrahepatička ili fistula žučnog mjehura, perforacija crijeva) (5,75,96).

Sekundarni bakterijski peritonitis koji se razvija nakon perforacije peptičkog ulkusa, ili u slučaju perinefričkog apscesa, je infekcija ascitesa obilježena pozitivnom bakterijskom kulturom i brojem neutrofila u ascitesu $< 250 \times 10^6/L$. Treba ga razlikovati od SBP-a kako bi se pravovremeno primijenila odgovarajuća terapija i smanjila smrtnost. Analiza ascitesa može pomoći u dijagnozi sekundarnog bakterijskog peritonitisa uz sljedeće kriterije (od kojih barem 2 moraju biti zadovoljena): ukupni proteini > 10 g/L, glukoza $< 2,8$ mmol/L i LD veći od GGRI za LD u serumu (18,96,103).

Vrijednosti pH i laktata u ascitesu su neosjetljive i nespecifične analize za prepoznavanje infekcije u ascitesu te ih ne treba određivati (96,103).

3.3.3 Poslijeanalitička faza

Preporuke za poslijeanalitičku fazu koje se odnose na analizu pleuralne tekućine trebaju se primijeniti i na poslijeanalitičku fazu analize peritonealne tekućine (Stupanj 1).

LITERATURA

1. Wians FH. To test or not to test? Opening Pandora's box. *Lab Medicine*. 2004;35:707. <https://doi.org/10.1309/3REBHJFAQVLXUQ5W>
2. Block DR, Ouverson LJ, Wittwer CA, Saenger AK, Baumann NA. An approach to analytical validation and testing of body fluid assays for the automated clinical laboratory. *Clin Biochem*. 2018;58:44-52. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2018.05.002>
3. Akgul M, Noguez J. Body fluid testing: what you should know before you hit go. Dostupno na: <https://www.aacc.org/publications/cln/articles/2015/october/body-fluid-testing-what-you-should-know-before-you-hit-go>. Datum pristupa: 4. studenog 2015.
4. Lippi G, Plebani M. Opportunities and drawbacks of nonstandard body fluid analysis. *Clin Chem Lab Med*. 2017;55:907-909. <https://doi.org/10.1515/cclm-2016-0862>
5. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Analysis of body fluids in clinical chemistry. Approved guideline. Document C49-A*. CLSI, Wayne, USA: 2007.
6. Kjeldsberg CR, Grenache DG, Couturier MR, Cohen MB. *Pleural and pericardial fluid*. U: Hussong JW, Kjeldsberg CR, eds. *Kjeldsberg's body fluid analysis*. Chicago: American Society for Clinical Pathologist Press;2015:p.89-105.
7. Nikolac N, Šupak-Smolčić V, Šimundić AM, Čelap I. Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine: national recommendations for venous blood sampling. *Biochem Med (Zagreb)*. 2013;23:242-54. <https://doi.org/10.11613/BM.2013.031>
8. Lenicek Krleza J, Dorotic A, Grzunov A, Maradin M. Capillary blood sampling: national recommendations on behalf of the Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine. *Biochem Med (Zagreb)*. 2015;25:335-58. <https://doi.org/10.11613/BM.2015.034>
9. Dukić L, Kopčinović LM, Dorotić A, Baršić I. Blood gas testing and related measurements: national recommendations on behalf of the Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine. *Biochem Med (Zagreb)*. 2016;26:318-36. <https://doi.org/10.11613/BM.2016.036>
10. Biljak VR, Honović L, Matica J, Krešić B, Vojak SŠ. The role of laboratory testing in detection and classification of chronic kidney disease: National recommendations. *Biochem Med (Zagreb)*. 2017;27:153-76. <https://doi.org/10.11613/BM.2017.019>
11. Čelap I, Vukasović I, Juričić G, Šimundić AM. Minimum requirements for the estimation of measurement uncertainty: Recommendations of the joint Working group for uncertainty of measurement of the CSMBLM and CCMB. *Biochem Med (Zagreb)*. 2017;27:030502. <https://doi.org/10.11613/BM.2017.030502>
12. Kopcinovic LM, Vogrinc Z, Kocijan I, Culej J, Aralica M, Jokic A, et al. Laboratory testing of extravascular body fluids in Croatia: a survey of the Working group for extravascular body fluids of the Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine. *Biochem Med (Zagreb)*. 2016;26:395-407. <https://doi.org/10.11613/BM.2016.042>
13. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Body fluid analysis for cellular composition: Approved guideline*. CLSI document H56-A. CLSI, Wayne, USA, 2006.
14. Tarn AC, Lapworth R. Biochemical analysis of pleural fluid: what should we measure? *Ann Clin Biochem*. 2011;38:311-22. <https://doi.org/10.1258/0004563011900812>
15. Sandhaus LM. Body fluid cell counts by automated methods. *Clin Lab Med*. 2015;35:93-103. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2014.10.003>
16. International organization for standardization (ISO). *Medical laboratories - requirements for quality and competence*. ISO 15189:2012. ISO; 2012.
17. College of American Pathologists (CAP) Accreditation Program. All common checklist. Dostupno na: <http://www.cap.org/ShowProperty?nodePath=/UCMCon/Contribution%20Folders/DctmContent/education/OnlineCourseContent/2016/LAP-TLTM/resources/AC-all-common.pdf>. Datum pristupa: 12. veljače 2018.
18. Block DR, Algeciras-Schimmich A. Body fluid analysis: clinical utility and applicability of published studies to guide interpretation of today's laboratory testing in serous fluids. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2013;50:107-24. <https://doi.org/10.3109/10408363.2013.844679>
19. Lo SY, Saifee NH, Mason BO, Greene DN. Filling in the gaps with non-standard body fluids. *Pract Lab Med*. 2016;5:24-31. <https://doi.org/10.1016/j.plabm.2016.03.003>
20. Cotten SW. Validating the performance of body fluid specimens. Dostupno na: <https://www.medlabmag.com/article/1291>. Datum pristupa: 1. srpnja 2016.
21. Karcher DS, McPherson RA. *Cerebrospinal, synovial, serous body fluids and alternate specimens*. U: McPherson RA, Pincus MR, ur. *Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods [Elektronska inačica]*. 23rd izd. Philadelphia: Elsevier/Saunders;2011.p.480-510. Dostupno na: <https://www.clinicalkey.com/#!/browse/book/3-s2.0-C20130143425>. Datum pristupa: 11. ožujka 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0974-2.00029-4>

22. Bourner G, De la Salle B, George T, Tabe Y, Baum H, Culp N, Keng TB. International Committee for Standardization in Hematology (ICSH). ICSH guidelines for the verification and performance of automated cell counters for body fluids. *Int J Lab Hematol*. 2014;36:598-612. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12196>
23. Burgess LJ. Biochemical analysis of pleural, pericardial and peritoneal effusions. *Clin Chim Acta*. 2004;343:61-84. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2004.02.002>
24. Sahn SA. The value of pleural fluid analysis. *Am J Med Sci*. 2008;335:7-15. <https://doi.org/10.1097/MAJ.0b013e31815d25e6>
25. Hrvatska komora medicinskih biokemičara. Sadržaj laboratorijskog nalaza. Dostupno na: <http://www.hkmb.hr/preporuke/aktualno/sadrzaj-laboratorijskog-nalaza.htm>. Datum pristupa: 25. ožujka 2016.
26. Calgary Laboratory Services. Body fluid collection guidelines. Dostupno na: <http://www.calgarylabservices.com/education-research/medical-professionals-education>. Datum pristupa: 4. studenog 2015.
27. Kopicinovic LM, Culej J. Pleural, peritoneal and pericardial effusions – a biochemical approach. *Biochem Med (Zagreb)*. 2014;24:123-37. <https://doi.org/10.11613/BM.2014.014>
28. Altoona Regional Laboratory Services. Specimen collection, preparation and handling: body fluids. Dostupno na: http://www.altoonaregional.org/lab/pdfs/8_SC_Body_fluids.pdf. Datum pristupa: 4. studenog 2015.
29. Alberta Health Laboratory Services. Specimen collection and handling of fluids (excluding CSF). Dostupno na: <http://www.albertahealthservices.ca/assets/wf/lab/wf-lab-collection-of-fluids-except-csf.pdf>. Datum pristupa: 4. studenog 2015
30. Jenkinson F, Murphy MJ. Biochemical analysis of pleural and ascetic fluid: effect of sample timing on interpretation of results. *Ann Clin Biochem*. 2007;44:471-3. <https://doi.org/10.1258/000456307781645978>
31. Lechtzin N. Thoracentesis. Dostupno na: <http://www.merckmanuals.com/professional/pulmonary-disorders/diagnostic-pulmonary-procedures/thoracentesis>. Datum pristupa: 4. studenog 2015.
32. Higgins C. Clinical aspects of pleural fluid pH. Dostupno na: <https://acute-care-testing.org/en/articles/clinical-aspects-of-pleural-fluid-ph>. Datum pristupa: 23. veljače 2019.
33. Cheng DS, Rodriguez RM, Rogers J, Wagster M; Starnes DL; Light RW. Comparison of pleural fluid pH values obtained using blood gas machine, pH meter, and pH indicator strip. *Chest*. 1988;114:1368-72. <https://doi.org/10.1378/chest.114.5.1368>
34. Light RW. Pleural effusions. *Med Clin N Am*. 2011;95:1055-70. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2011.08.005>
35. Light RW, MacGregor MI, Luchsinger PC, Ball WC. Pleural effusions: the diagnostic separation of transudates and exudates. *Ann Int Med*. 1972;77:507-13. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-77-4-507>
36. Light RW. The Light criteria: the beginning and why they are useful 40 years later. *Clin Chest Med*. 2013;34:21-6. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2012.11.006>
37. Heffner JE, Brown LK, Barbieri CA. Diagnostic value of test that discriminate between exudative and transudative pleural effusions. *Chest*. 1997;111:970-80. <https://doi.org/10.1378/chest.111.4.970>
38. Porcel JM. Pearls and myths in pleural fluid analysis. *Respirology*. 2011;16:44-52. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2010.01794.x>
39. Porcel JM. Identifying transudates misclassified by Light's criteria. *Curr Opin Pulm Med*. 2013;19:362-67. <https://doi.org/10.1097/MCP.0b013e32836022dc>
40. Roth BJ, O'Meara TF, Cragun WH. The serum-effusion albumin gradient in the evaluation of pleural effusions. *Chest*. 1990;98:546-49. <https://doi.org/10.1378/chest.98.3.546>
41. Bielsa S, Porcel JM, Castellote J, Mas E, Esquerda A, Light R. Solving the Light's criteria misclassification rate of cardiac and hepatic transudates. *Respirology*. 2012;17:721-26. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2012.02155.x>
42. Costa M, Quioga T, Cruz E. Measurement of pleural fluid cholesterol and lactate dehydrogenase. A simple and accurate set of indicators for separating exudates from transudates. *Chest*. 1995;108:1260-63. <https://doi.org/10.1378/chest.108.5.1260>
43. Porcel MJ, Martínez-Alonso M, Cao G, Bielsa S, Sopena A, Esquerda A. Biomarkers of heart failure in pleural fluid. *Chest*. 2009;136:671-77. <https://doi.org/10.1378/chest.09-0270>
44. Han ZJ, Wu XD, Cheng JJ, Zhao SD, Gao MZ, Huang HY et al. Diagnostic accuracy of natriuretic peptides for heart failure in patients with pleural effusion: a systematic review and updated meta-analysis. *PLoS ONE*. 2015;10:e0134376. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134376>
45. Hasan T, Al-Alawi M, Chotirmall SH, McElvaney NG. Pleural fluid analysis: standstill or a work in progress? *Pulm Med Hindawi*. 2012;716235. <https://doi.org/10.1155/2012/716235>
46. Porcel JM. Utilization of B-type natriuretic peptide and NT-proBNP in the diagnosis of pleural effusions due to heart failure. *Curr Opin Pulm Med*. 2011;17:215-9. <https://doi.org/10.1097/MCP.0b013e3283455cda>

47. Sahn S. Getting the most from pleural fluid analysis. *Respirology*. 2012;17:270-7. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2011.02100.x>
48. Fleming C, Russcher H, Lindemans J, de Jonge R. Clinical relevance and contemporary methods for counting blood cells in body fluids suspected of inflammatory disease. *Clin Chem Lab Med*. 2015;53:1683-1706. <https://doi.org/10.1515/cclm-2014-1247>
49. Huggins JT. Pleural fluid eosinophilia. Dostupno na: <https://www.uptodate.com/contents/pleural-fluid-eosinophilia>. Datum pristupa: 15. siječnja 2018.
50. Branca P, Rodriguez RM, Rogers JT, Ayo DS, Moyers JP, Light RW. Routine measurement of pleural fluid amylase is not indicated. *Arch Intern Med*. 2001;161:228-32. <https://doi.org/10.1001/archinte.161.2.228>
51. McGrath EE, Warriner D, Anderson PB. The use of non-routine pleural fluid analysis in the diagnosis of pleural effusion. *Resp Med*. 2010;104:1092-100. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2010.03.008>
52. Villena V, Perez V, Pozo F, Lopez-Encuentra A, Echaive-Sustaeta J, Arenas J, Escribano PM. Amylase levels in pleural effusions: a consecutive unselected series of 841 patients. *Chest*. 2002;121:470-4. <https://doi.org/10.1378/chest.121.2.470>
53. Gui X, Xiao H. Diagnosis of tuberculosis pleurisy with adenosine deaminase (ADA): a systematic review and meta analysis. *Int J Clin Exp Med*. 2014;7:3126-35.
54. Liang Q, Shi H, Wang K, Qin S, Qin X. Diagnostic accuracy of adenosine deaminase in tuberculous pleurisy: a meta analysis. *Resp Med*. 2008;102:744-54. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2007.12.007>
55. Krenke R, Korczynski P. Use of pleural fluid levels of adenosine deaminase and interferon gamma in the diagnosis of tuberculous pleuritis. *Curr Opin Pulm Med*. 2010;16:367-75. <https://doi.org/10.1097/MCP.0b013e32833a7154>
56. Skouras V, Kalomenidis I. Chylothorax: diagnostic approach. *Curr Opin Pulm Med*. 2010;16:387-393. <https://doi.org/10.1097/MCP.0b013e328338dde2>
57. Heffner JE. Clinical presentation and management of cholesterol effusions. Dostupno na: <https://www.uptodate.com/contents/clinical-presentation-diagnosis-and-management-of-cholesterol-effusions>. Datum pristupa: 15. siječnja 2018.
58. Heffner JE. Etiology, clinical presentation, and diagnosis of chylothorax. Dostupno na: <https://www.uptodate.com/contents/etiology-clinical-presentation-and-diagnosis-of-chylothorax>. Datum pristupa: 15. siječnja 2018.
59. Garcia-Pachon E, Romero S. Urinothorax: a new approach. *Curr Opin Pulm Med*. 2006;12:259-63. <https://doi.org/10.1097/01.mcp.0000230628.65515.86>
60. Light RW. The undiagnosed pleural effusion. *Clin Chest Med*. 2006;27:309-19. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2005.12.002>
61. Toubes ME, Lama A, Ferreiro L, Golpe A, Álvarez-Dobaño JM, González-Barcala FJ et al. Urinothorax: a systematic review. *J Thorac Dis*. 2017;9:1209-18. <https://doi.org/10.21037/jtd.2017.04.22>
62. Antonangelo L, Sales RK, Corá AP, Acencio MMP, Teixeira LR, Vargas FS. Pleural fluid tumour markers in malignant pleural effusion with inconclusive cytologic results. *Curr Oncol*. 2015;22:e336-41. <https://doi.org/10.3747/co.22.2563>
63. Tozzoli R, Basso SMM, D'Aurizio F, Metus P, Lumachi F. Evaluation of predictive value of pleural CEA in patients with pleural effusions and histological findings: A prospective study and literature review. *Clin Biochem*. 2016;49:1227-31. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2016.08.006>
64. Antonangelo L, Vargas FS, Acencio MMP, Carnevale GG, Cora AP, Teixeira LR et al. Pleural fluid: are temperature and storage time critical preanalytical errors factors in biochemical analyses? *Clin Chim Acta*. 2010;411:1275-78. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.05.015>
65. Kilpatrick E. Best Practice when providing interpretative comments on laboratory medicine reports. Dostupno na: <http://acb.org.uk/docs/default-source/committees/scientific/guidelines/acb/best-practice-when-providing-interpretative-comments-for-laboratory-medicine---final.pdf?sfvrsn=2>. Datum pristupa: 4. studenog 2015.
66. Plebani M. Interpretative commenting: a tool for improving the laboratory-clinical interface. *Clin Chim Acta*. 2009;404:46-51. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2009.03.012>
67. Antonangelo L, Vargas FS, Acencio MM, Corá AP, Teixeira LR, Genofre EH, Sales RK. Effect of temperature and storage time on cellular analysis of fresh pleural fluid samples. *Cytopathology*. 2012;23:103-7. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2303.2011.00863.x>
68. Hoit BD. Diagnosis and treatment of pericardial effusion. Dostupno na: <https://www.uptodate.com/contents/diagnosis-and-treatment-of-pericardial-effusion>. Datum pristupa: 15. siječnja 2018.
69. Ben-Horin S, Shinfeld A, Kachel E, Chetrit A, Livneh A. The composition of normal pericardial fluid and its implications for diagnosing pericardial effusions. *Am J Med*. 2005;119:636-40. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2005.01.066>
70. Meyers DG, Meyers RE, Prendergast TW. The usefulness of diagnostic tests on pericardial fluid. *Chest*. 1997;111:1213-21. <https://doi.org/10.1378/chest.111.5.1213>

71. Burgess LJ, Reuter H, Taljaard JJF, Doubell AF. Role of biochemical tests in the diagnosis of large pericardial effusions. *Chest*. 2002;121:495-99. <https://doi.org/10.1378/chest.121.2.495>
72. Ben-Horin S, Bank I, Shinfeld A, Kachel E, Guetta V, Livneh A. Diagnostic value of the biochemical composition of pericardial effusions in patients undergoing pericardiocentesis. *Am J Cardiol*. 2007;99:1294-97. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2006.12.048>
73. Reuter H, Burgess L, van Vuuren W, Doubell A. Diagnosing tuberculous pericarditis. *QJM*. 2006;99:827-39. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hcl123>
74. Brunzel NA, ur. *Fundamentals of urine and body fluid analysis*. 3rd ed. Elsevier Saunders: St. Louis, 2013.
75. Tarn AC, Lapworth R. Biochemical analysis of ascitic (peritoneal) fluid: what should we measure? *Ann Clin Biochem*. 2010;47:397-407. <https://doi.org/10.1258/acb.2010.010048>
76. Balfe A, Barry S, Blake O, Cannon D, Healy M, Kilbane M et al. *The biochemistry of body fluids*. Dostupno na: <http://www.biochemiran.com/files/site1/pages/guidelines-of-body-fluids.pdf>. Datum pristupa: 4. studenog 2015.
77. Huang LL, Xia HH, Zhu SL. Ascitic fluid analysis in the differential diagnosis of ascites: focus on cirrhotic ascites. *J Clin Transl Hepatol*. 2014;2:58-64. <https://doi.org/10.14218/JCTH.2013.00010>
78. Moore KP, Aithal GP. Guidelines on the management of ascites in cirrhosis. *Gut*. 2006;55:vi1-vi12. <https://doi.org/10.1136/gut.2006.099580>
79. Gines P, Angeli P, Lenz K, Moller S, Moore K, Moreau R et al. European Association for the Study of the Liver (EASL). *EASL clinical practice guidelines on the management of ascites, spontaneous bacterial peritonitis, and hepatorenal syndrome in cirrhosis*. *J Hepatol*. 2010;53:397-417. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.05.004>
80. Runyon BA, AASLD Practice guidelines committee. Management of adult patients with ascites due to cirrhosis: Update 2012. *Hepatology*. 2013;57:1-27. <https://doi.org/10.1002/hep.26359>
81. Rimola A, García-Tsao G, Navasa M, Piddock LJ, Planas R, Bernard B, Inadomi JM. Diagnosis, treatment and prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis: a consensus document. *International Ascites Club. J Hepatol*. 2000;32:142-53. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(00\)80201-9](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(00)80201-9)
82. Sood R. Ascites: Diagnosis and management. *J Indian Acad Clin Med*. 2000;5:80-9.
83. Uddin MS, Hoque MI, Islam MB, Uddin MK, Haq I, Mondol G, Tariquzzaman M. Serum ascites gradient in differential diagnosis of ascites. *Mymensingh Med J*. 2013;22:748-54
84. Runyon BA, Montano AA, Akriviadis EA, Antillon MR, Irving MA, McHutchison JG. The serum ascites albumin gradient is superior to the exudate-transudate concept in the differential diagnosis of ascites. *Ann Intern Med*. 1992;117:215-20. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-117-3-215>
85. Paramothayan NS, Barron J. New criteria for the differentiation between transudates and exudates. *J Clin Pathol*. 2002;55:69-71. <https://doi.org/10.1136/jcp.55.1.69>
86. Younas M, Sattar A, Hashim R, Ijaz A, Dilawar M, Manzoor SM et al. Role of serum - ascites albumin gradient in differential diagnosis of ascites. *J Ayub Med Coll Abbottabad*. 2012;24:97-9.
87. Hoefs JC. Globulin correction of the albumin gradient: correlation with measured serum to ascites colloid osmotic pressure gradients. *Hepatology*. 1992;16:396-403. <https://doi.org/10.1002/hep.1840160218>
88. Lima-Oliveira G, Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Manguera CL, Sumita NM, Picheth G, Guidi GC, Scartezini M. New ways to deal with known preanalytical issues: use of transluminator instead of tourniquet for easing vein access and eliminating stasis on clinical biochemistry. *Biochem Med (Zagreb)*. 2011;21:152-9. <https://doi.org/10.11613/BM.2011.024>
89. Koulaouzidis A, Bhat S, Karagiannidis A, Tan WC, Linaker BD. Spontaneous bacterial peritonitis. *Postgrad Med J*. 2007;83:379-83. <https://doi.org/10.1136/pgmj.2006.056168>
90. Kim DY, Kim JH, Chon CY, Han KH, Ahn SH, Kim JK, Paik YH, Lee KS, Moon YM. Usefulness of urine strip test in the rapid diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis. *Liver Int*. 2005;25:1197-201. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2005.01176.x>
91. Braga LL, Souza MH, Barbosa AM, Furtado FM, Campelo PA, Araujo Filho AH. Diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis in northeastern Brazil by use of rapid urine-screening test. *Sao Paulo Med J*. 2006;124:141-4. <https://doi.org/10.1590/S1516-31802006000300006>
92. Koulaouzidis A, Leontiadis G, Abdullah M, Moschos J, Gasem J, Tharakan J et al. Leucocyte esterase reagent strips for the diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis: a systematic review. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2008;20:1055-60. <https://doi.org/10.1097/MEG.0b013e328300a363>
93. Riggio O, Angeloni S. Ascitic fluid analysis for diagnosis and monitoring of spontaneous bacterial peritonitis. *World J Gastroenterol*. 2009;15:3845-50. <https://doi.org/10.3748/wjg.15.3845>

94. Nguyen-Khac E, Cadranel JF, Thevenot T, Nousbaum JB. Review article: the utility of reagent strips in the diagnosis of infected ascites in cirrhotic patients. *Aliment Pharmacol Ther.* 2008;28:282-8. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2008.03735.x>
95. Nousbaum J, Cadranel J, Nahon P, Nguyen-Khac E, Moreau R, Thevenot T et al. Diagnostic accuracy of the Multistix 8 SG reagent strip in diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology.* 2007;45:1275-81. <https://doi.org/10.1002/hep.21588>
96. Runyon BA. Spontaneous bacterial peritonitis in adults: diagnosis. Dostupno na: <https://www.uptodate.com/contents/spontaneous-bacterial-peritonitis-in-adults-diagnosis>. Datum pristupa: 15. siječnja 2018.
97. Fernandes SR, Santos P, Fatela P, Baldaia C, Tato Marinho R, Proenca H, et al. Ascitic calprotectin is a novel and accurate marker for spontaneous bacterial peritonitis. *J Clin Lab Anal.* 2016;30:1139-45. <https://doi.org/10.1002/jcla.21994>
98. Abdel-Razik A, Mousa N, Elhammady D, Elhelaly R, Elzehery R, Elbaz S, et al. Ascitic fluid calprotectin and serum procalcitonin as accurate diagnostic markers for spontaneous bacterial peritonitis. *Gut Liver.* 2016;10:624-31. <https://doi.org/10.5009/gnl15120>
99. Makhlof NA, Morsy KH, Mahmoud AA, Hassaballa AE. Diagnostic value of ascitic fluid lactoferrin, calprotectin, and calprotectin to albumin ratio in spontaneous bacterial peritonitis. *Int J Curr Microbiol App Sci* 2018;7:2618-31. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.702.319>
100. Cardenas A, Gelrud A, Chopra S. Chylous, bloody and pancreatic ascites. Dostupno na: <https://www.uptodate.com/contents/chylous-bloody-and-pancreatic-ascites>. Datum pristupa: 15. siječnja 2018.
101. Al-Busafi SA, Ghali P, Deschênes M, Wong P. Chylous ascites: Evaluation and management. *ISRN Hepatology.* 2014;2014:240473. <https://doi.org/10.1155/2014/240473>
102. van der Gaag NA, Verhaar AC, Haverkort EB, Busch OR, van Gulik TM, Gouma DJ. Chylous ascites after pancreaticoduodenectomy: introduction of a grading system. *J Am Coll Surg.* 2008;207:751-7. <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2008.07.007>
103. Runyon BA. Evaluation of adults with ascites. Dostupno na: <https://www.uptodate.com/contents/evaluation-of-adults-with-ascites>. Datum pristupa: 15. siječnja 2018.
104. Riquelme A, Calvo M, Salech F, Valderrama S, Pattillo A, Arellano M et al. Value of adenosine deaminase (ADA) in ascitic fluid for the diagnosis of tuberculosis peritonitis. A meta-analysis. *J Clin Gastroenterol.* 2006;40:705-10. <https://doi.org/10.1097/00004836-200609000-00009>
105. Koch TR. New tools for the diagnosis of peritoneal carcinomatosis? *Am J Gastroenterol.* 2002;97:2133-4. [https://doi.org/10.1016/S0002-9270\(02\)04314-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9270(02)04314-9)
106. Rana SV, Venkatesh Babu SG, Kocchar R. Usefulness of ascitic fluid cholesterol as a marker for malignant ascites. *Med Sci Monit.* 2005;11:CR136-42.
107. Fleming C, Brouwer R, Lindemans J, de Jonge R. Validation of the body fluid module on the new Sysmex XN-1000 for counting blood cells in cerebrospinal fluid and other body fluids. *Clin Chem Lab Med* 2012;50:1791-8. <https://doi.org/10.1515/cclm-2011-0927>
108. Fleming C, Russcher H, Brouwer R, Lindemans J, de Jonge R. Evaluation of Sysmex XN-1000 High-Sensitive Analysis (hsA) Research Mode for Counting and Differentiating Cells in Cerebrospinal Fluid. *Am J Clin Pathol* 2016;145:299-307. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqv093>
109. Cognialli RCR, Comar SR, de Souza AM, Singer GMB. Evaluation of pleural and ascitic fluid analysis on the Sysmex XE-5000 hematology analyser. *J Bras Patol Med Lab* 2017;53:150-8. <https://doi.org/10.5935/1676-2444.20170023>
110. Hod EA, Brugnara C, Pilichowska M, Sandhaus LM, Luu HS, Forest SK, et al. Automated cell counts on CSF samples: A multicentre performance evaluation of the GloCyte system. *Int J Lab Hem* 2018;40:56-65. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12728>
111. Buoro S, Appassiti ES, Vavassori M, Mecca T, Ottomano C, Dominoni P et al. Reflex testing rules for cell count and differentiation of nucleated elements in pleural and ascitic fluid on Sysmex XE-5000. *J Lab Autom* 2016;21:297-304. <https://doi.org/10.1177/2211068215593375>
112. Buoro S, Mecca T, Azzarà G, Seghezzi M, Dominoni P, Crippa A et al. Cell population data and reflex testing rules of cell analysis in pleural and ascitic fluids using body fluid mode on Sysmex XN-9000. *Clin Chim Acta* 2016;452:92-8. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.11.005>
113. Seghezzi M, Buoro S, Manenti B, Mecca T, Ferrari R, Zappalà G, et al. Optimization of Cellular analysis of Synovial Fluids by optical microscopy and automated count using the Sysmex XN Body Fluid Mode. *Clin Chim Acta* 2016;462:41-8. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2016.08.018>

DODATAK 1. BROJENJE STANICA U SEROZNIM TEKUĆINAMA

Stanice koje mogu biti prisutne u seroznim tekućinama su leukociti, eritrociti, eritroblasti, obložne (odnosno mezotelne) stanice i maligne stanice. Određivanje ukupnog broja stanica i njihovo diferenciranje u seroznim tekućinama je klinički važno u infekcijama, upalama, hemoragičnim i malignim procesima koji zahvaćaju tjelesne šupljine. Tradicionalno se brojenje stanica i njihova diferencijacija u seroznim tekućinama izvodila ručno koristeći hemocitometar (komoricu). Danas je ova tehnika zamijenjena automatiziranim brojenjem i diferenciranjem stanica. U ovom su poglavlju opisane dostupne metode brojenja stanica, kao i njihove najvažnije prednosti i ograničenja (13,15,48).

Ručno brojenje stanica

Svaki laboratorij treba imati dokumentirani operativni postupak za ručno brojenje stanica ovisno o hemocitometru (komorici) koji se koristi. Dvije se vrste komorica najčešće koriste: Fuchs-Rosenthal-ova i Neubauer-ova (poboljšana) komorica. Obje koriste isti princip brojenja stanica,

a razlikuju se po dimenzijama (dubina i površina brojenja), što treba uzeti u obzir pri izračunu konačnog broja stanica (Tablica A). Uzorak treba prije analize temeljito promiješati (okretanjem epruvete 10-15 puta), naročito ako se radi o zamućenom uzorku. Komorica se obično s obje strane puni jednom kapi suspenzije stanica, pažeći da ne dođe do prelijevanja, a da se potpuno pokrije čitava površina mrežice. Nakon punjenja komorice stanice se ostave stajati 5 minuta kako bi se slegle, a nakon toga se pristupa brojenju što je prije moguće. Ako se uzorak povlači s rubova komorice to znači da se osušio i treba pristupiti ponovnom punjenju komorice kako bi se izbjegli pogrešni rezultati (13,15). Komorica se stavi pod svjetlosni mikroskop i prvo se pregleda pod malim povećanjem (10x) kako bi se namjestio fokus i pregledalo područje koje se broji. Točnost rezultata je uvjetovana ravnomjernom raspodjelom stanica bez njihovog međusobnog preklapanja. Zatim se pod velikim povećanjem (40x) stanice broje. Veličina površine koja se broji ovisi o broju prisutnih stanica u uzorku i karakte-

TABLICA A. Glavne karakteristike Neubauer-ove i Fuchs-Rosenthal-ove komorice

	Naubauer-ova komorica	Fuchs-Rosenthal-ova komorica
Mrežica za brojenje	Čitava površina mrežice je veličine 3mm x 3mm (ukupne površine 9 mm ²). Podijeljena je u 9 kvadrata, od kojih je svaki širine 1mm i dodatno podijeljen u 16 kvadratića (površine 0.25 x 0.25 mm). Središnji kvadrat je podijeljen u 25 kvadratića (veličine 0.20 x 0.20 mm), dodatno podijeljenih u 16 manjih kvadratića (veličine 0.05 x 0.05 mm). Dubina komorice je 0.1 mm.	Čitava mrežica je veličine 4mm x 4mm (ukupna površina 16 mm ²). Podijeljena je u 16 kvadrata, svaki širine 1mm, od kojih je svaki dodatno podijeljen u 16 kvadratića (0.25 mm širine). Dubina je 0.2 mm.
Područje brojenja	Ako se procijeni da je u svih 9 kvadrata prisutno manje od 200 stanica, broje se stanice u svih devet kvadrata (površina = 9 mm ²). Ako se procijeni da je u svih 9 kvadrata prisutno više od 200 stanica, broje se stanice u četiri kvadrata u kutovima (površina = 4 mm ²). Ako se procijeni da je više od 200 stanica prisutno u jednom kvadratu, broje se stanice u pet središnjih kvadratića (površina = 0.2 mm ²).	Ako se procijeni da je u svih 16 kvadrata prisutno manje od 200 stanica, broje se stanice u svih 16 kvadrata (površina = 16 mm ²). Ako se procijeni da je u svih 16 kvadrata prisutno više od 200 stanica, broje se stanice u četiri kvadrata u kutovima (površina = 4 mm ²). Ako se procijeni da je više od 200 stanica prisutno u jednom kvadratu, broje se stanice u jednom od središnjih kvadrata (površina = 1 mm ²).
Izračuni	Broj stanica (x10 ⁶ /L) = (broj izbrojenih stanica x faktor razrjeđenja) / (broj mm ² površine brojenja x dubina komorice)	Broj stanica (x10 ⁶ /L) = (broj izbrojenih stanica x faktor razrjeđenja) / (broj mm ² površine brojenja x dubina komorice)

Prilagođeno iz (13,21).

ristikama korištene komorice (Tablica A). Eritrociti i stanice s jezgrom se obično broje u istoj komorici u nerazrijeđenim uzorcima. Međutim, krvavi i zamućeni uzorci zahtijevaju razrjeđivanje (od 1:10 do 1:200 ili više) izotoničnom fiziološkom otopinom (za razrjeđivanje eritrocita i leukocita) ili razrijeđenom octenom kiselinom i/ili hipotoničnom fiziološkom otopinom (kako bi se lizirali eritrociti i omogućilo brojenje leukocita). U razrijeđenim uzorcima treba izbrojiti minimalno 200 stanica. Svaki laboratorij treba u svom operativnom protokolu za ručno brojenje stanica definirati postupak razrjeđivanja stanica (13,15).

Konačni broj stanica predstavlja prosjek broja stanica izbrojenog u obje strane komorice. Laboratorij treba definirati dozvoljene granice odstupanja dvaju zasebnih brojenja (obično ne više od 20%) (13,15). Rezultati se iskazuju kao apsolutne vrijednosti stanica s jezgrom i eritrocita u konvencionalnim jedinicama ($\times 10^6/L$) (13,15).

Diferenciranje stanica u seroznim tekućinama izvodi se na obojenim preparatima pripremljenima pomoću citocentrifuge (21). Citocentrifugiranje omogućuje koncentriranje stanica uz njihovo minimalno deformiranje. Obzirom da serozne tekućine mogu sadržavati fibrin i druge proteine koji mogu začepiti filter citocentrifuge, takvi uzorci se mogu pripremiti na način da se alikvot uzorka centrifugira i stanice resuspendiraju u fiziološkoj otopini prije samog postupka citocentrifugiranja. Citopreparati se oboje po Pappenheim-u ili Wright-u, a diferenciranje izvodi na minimalno 100 stanica. Rezultati se izražavaju kao udio (izražen u %) pojedinih vrsta stanica s jezgrom (npr. neutrofili, eozinofili, limfociti, makrofagi, ostale stanice itd.). Ostale stanice (koje uključuju stanice mezotela, tumorske i atipične stanice) nađene pri diferenciranju treba opisati u komentaru nalaza (13,21).

Iako se ručne metode smatraju „zlatnim standardom“ u brojenju i diferenciranju stanica u seroznim tekućinama, one imaju i nekoliko ograničenja. Ručne mikroskopske tehnike su subjektivne i dugotrajne, zahtijevaju tehničko iskustvo, imaju

visoku inter- i intraindividualnu varijabilnost i slabu reproducibilnost. Nadalje, postupak citocentrifugiranja može utjecati na same stanice (odnosno osjetljive stanice se mogu razoriti ili morfološki promijeniti; makrofagi i mezotelne stanice mogu stvarati nakupine i pogrešno se uvrstiti u maligne stanice) (13,15,48).

Automatizirano brojenje stanica

Automatizirane metode za brojenje stanica ubrzano zamjenjuju one ručne u kliničkim laboratorijima prvenstveno zbog svoje brzine, ponovljivosti i pouzdanosti. Automatizirane metode trebaju biti metode izbora za brojenje i diferenciranje stanica u seroznim tekućinama. Ovisno o vrsti automatskog analizatora, raspoložive metode za brojenje i diferenciranje stanica uključuju impedanciju, protočnu citometriju i protočnu citometriju s digitalnim prikazom. Automatski analizatori sa zasebnim načinom rada za tjelesne tekućine osmišljeni su tako da uzimaju u obzir razlike u stanicama i matriksu između tjelesnih tekućina i pune krvi. Takvi su analizatori danas široko dostupni, a sve analize dostupne s automatskog analizatora (uključujući broj eritrocita, ukupni broj stanica s jezgrom (engl. *total nucleated cell count*, TNC), broj leukocita i diferencijalna slika) trebaju se izvještavati na nalazu. Automatiziranu analizu stanica u seroznim tekućinama treba provoditi u skladu s uputama proizvođača i isključivo na uzorcima koje je proizvođač odobrio (13,15,48,107).

Trenutno poznati nedostaci automatiziranih metoda za analize tjelesnih tekućina su nezadovoljavajuća preciznost u niskom mjernom području za leukocite, nemogućnost otkrivanja malignih stanica ili ne-staničnih interferencija (npr. bakterija, lipida ili kristala) i ograničena mogućnost isticanja opaski upozorenja. Svaki laboratorij treba uspostaviti alternativne verifikacijske postupke (uključujući ručno brojenje stanica) za uzorke s rezultatima ispod donje granice mjerenja. Slično tome, trebaju biti uspostavljena i pravila za refleksnu analizu rezultata dobivenih automatiziranom metodom koji su označeni nekom opaskom (107-113).

DODATAK 2. SAŽETAK KRITERIJA ZA ANALIZU SEROZNIH TEKUĆINA

Serozna tekućina	Kriterij	Tumačenje
Pleuralna tekućina	Light-ovi kriteriji: 1. omjer proteina u pleuralnoj tekućini i serumu > 0,5 ; 2. omjer LD u pleuralnoj tekućini i serumu > 0,6 ; 3. apsolutna aktivnost LD u pleuralnoj tekućini > 2/3 GGRI za LD u serumu	Ukoliko je najmanje jedan kriterij zadovoljen, radi se o eksudatu.
	gradijent albumina u serumu i pleuralnoj tekućini ≤ 12 g/L	Ukoliko klinički simptomi ukazuju na transudacijski pleuralni izljev, a Light-ovi kriteriji na eksudacijski (obično granično), gradijent albumina (izračunat iz razlike koncentracije albumina u pleuralnoj tekućini i koncentracije albumina u serumu) treba koristiti za potvrdu transudacijskog pleuralnog izljeva. Gradijent albumina > 12 g/L ukazuje na transudate, dok je u eksudatima gradijent albumina ≤ 12 g/L.
	kolesterol > 1,2 mmol/L	Granična vrijednost kolesterola u pleuralnoj tekućini > 1,2 mmol/L prihvaćena je za prepoznavanje eksudata.
	omjer kolesterola u pleuralnoj tekućini i serumu > 0,3	Eksudacijski izljev.
	LD > 0,45 GGRI LD za serum i kolesterol > 1,2 mmol/L	Istovremeno određivanje vrijednosti LD i kolesterola u pleuralnoj tekućini ima specifičnost od 98% i osjetljivost od 72% u prepoznavanju eksudata. Ukoliko su zadovoljena oba kriterija, radi se o eksudatu.
	proteini > 29 g/L, LD > 0,45 GGRI za serum i kolesterol > 1,2 mmol/L	Ova trostruka kombinacija analiza u pleuralnoj tekućini postigla je osjetljivost od 98% i specifičnost od 70% u razlikovanju eksudata i transudata. Ukoliko su zadovoljena sva tri kriterija, radi se o eksudatu.
	ukupni broj leukocita > 1000 x10 ⁶ /L uz prevladavanje neutrofila (≥ 50% ukupnog broja leukocita)	Akutna pleuralna upala, bakterijska pneumonija, pankreatitis, rana tuberkuloza.
	ukupni broj leukocita > 1000 x10 ⁶ /L uz prevladavanje limfocita (≥ 50% ukupnog broja leukocita)	Tuberkuloza, virusna infekcija, maligna bolest, hiltoraks, reumatski pleuritis.
	ukupni broj leukocita > 1000 x10 ⁶ /L s eozinofilijom (> 10% ukupnog broja leukocita)	Pneumotoraks, maligna bolest, hemotoraks, plućni infarkt, kongestivno zatajenje srca.
	omjer amilaze u pleuralnoj tekućini i serumu > 1	Pankreatitis, maligna bolest, ruptura jednjaka, pseudocista gušterače, ciroza jetre, zatajenje srca, parapneumonijski izljev, rupturirana ektopična trudnoća, trauma.
	ADA ≥ 40 U/L	Razlikovanje tuberkuloznog i malignog pleuritisa.
	pH < 7,20 (i LD u pleuralnoj tekućini > 3 GGRI za serum)	Komplicirani parapneumonijski izljev.
	trigliceridi ≥ 1,2 mmol/L i kolesterol < 5,2 mmol/L	Hilozni izljev.
omjer kreatinina u pleuralnoj tekućini i serumu > 1	Urinotoraks.	

Serozna tekućina	Kriterij	Tumačenje
Perikardijalna tekućina	Light-ovi kriteriji: 1. omjer proteina u perikardijalnoj tekućini i serumu > 0,5 ; 2. omjer LD u perikardijalnoj tekućini i serumu > 0,6 3. apsolutna aktivnost LD u perikardijalnoj tekućini > 2/3 GGRI za serum	Ukoliko je najmanje jedan kriterij zadovoljen, radi se o eksudatu.*
	gradijent albumina u serumu i perikardijalnoj tekućini ≤ 12 g/L	Eksudacijski izljev.*
	kolesterol > 1,2 mmol/L	Eksudacijski izljev.*
	ADA ≥ 40 U/L	Tuberkulozni perikarditis.
Peritonealna tekućina (ascites)	SAAG < 11 g/L	Izljev s niskim gradijentom albumina (odnosno eksudacijski).
	broj neutrofila ≥ 250 x10 ⁶ /L	Spontani bakterijski peritonitis.
	omjer triglicerida u peritonealnoj tekućini i serumu > 1	Hilozni ascites.
	omjer amilaze u peritonealnoj tekućini i serumu > 1	Pankreasni ascites, perforacija crijeva, ruptura pseudociste gušterače i mezenterijalna tromboza.
	ADA ≥ 39 U/L	Tuberkulozni peritonitis.

LD – laktat-dehidrogenaza. GGRI – gornja granica referentnog intervala. ADA - adenzin-deaminaza. SAAG – gradijent albumina u serumu i ascitesu. *Zbog ograničene snage dokaza, rezultate treba uvijek korelirati s kliničkim simptomima.

DODATAK 3.

Komentari pristigli tijekom javne rasprave radne verzije dokumenta Laboratorijska analiza ekstravaskularnih tjelesnih tekućina: Nacionalne preporuke Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu. Dio I. – Serozne tekućine

Komentar recenzenta	Odgovor autora
Recenzent 1	
Sve vrste seroznih tekućina i pretraga koje se na njima rade ne navode se u trenutnom šifrniku DTP postupaka	Šifrnici DTP postupaka namijenjeni su primarnoj zdravstvenoj zaštiti.

Komentari pristigli tijekom recenzije radne verzije dokumenta Laboratorijska analiza ekstravaskularnih tjelesnih tekućina: Nacionalne preporuke Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu. Dio I. – Serozne tekućine od strane Povjerenstva za stručna pitanja Hrvatske komore medicinskih biokemičara

Komentar recenzenta	Odgovor autora
Recenzent 1	
Najveća zamjerka smjernica je nedorečen, a opet dosta strogo propisan postupak validacije/verifikacije metoda. Kako komercijalni uzorci nisu komutabilni ekstravaskularnim tekućinama već se na prvu postavlja pitanje kojim materijalom provodimo ispitivanje preciznosti i točnosti ako nam je stabilnost uzorka nepoznata, a količina uzorka u većini laboratorija jako ograničena. Također, mislim da u ovom slučaju nije moguće određivanje niti provjera referentnih intervala jer referentna populacija ne postoji. Zvuči idealno da svaki laboratorij provjeri dijagnostičku osjetljivost i specifičnost analita, ali ne vjerujem da je to svakome izvedivo. Općenito, mislim da bi se trebalo osloniti na dostupne literaturne podatke radi lakše primjenjivosti smjernica.	Zahvaljujemo recenzentu na komentarima. Važno je na početku istaknuti da se prvo poglavlje (Validacija analitičkih specifikacija za ETT) odnosi na sve ETT, a ne isključivo na serozne tekućine. Sukladno akreditacijskim standardima HRN EN ISO 15189 Medicinski laboratoriji – Zahtjevi za kvalitetu i osposobljenost, medicinski su laboratoriji obavezni provesti verifikaciju/validaciju svih metoda koje se u laboratoriju koriste. Taj je činjenica pogotovo važna za ekstravaskularne tjelesne uzorke (ETT), jer se (u većini slučajeva) radi o modifikaciji metode (odnosno korištenju metoda izvan opsega propisanog od strane proizvođača). Stoga, kako bi se osigurala pouzdanost dobivenih rezultata nužno je provesti verifikaciju/validaciju svake metode na svakoj pojedinačnoj vrsti ETT. Kako je u preporuci na str. 5 navedeno, nema dostupnih uputa i protokola za analitičku verifikaciju/validaciju metoda koje se koriste u analizi ETT. Stoga se laboratorijima preporuča da se koriste postojećim uputama i protokolima koji vrijede za standardne tjelesne tekućine (serum). Kako su te upute (protokoli) dostupni i općeprihvaćeni, smatramo da nije nužno u ovom dokumentu navoditi svaki pojedinačni postupak, već se Preporuke ograničavaju na propisivanje opsega verifikacije/validacije pozivajući se na postojeće dokumente (CLSI) koji to detaljnije propisuju. Komercijalni (kontrolni) uzorci za provedbu verifikacije/validacije nisu (u većini slučajeva) dostupni. Zato postupak verifikacije/validacije ETT počiva na prikupljanju ostatnih uzoraka ETT nakon rutinske obrade (str. 8). Svjesni smo da se radi o zahtjevnom i dugotrajnom postupku, ali drugog izbora (trenutno) nema. U nedostatku pouzdanih podataka o stabilnosti ETT, potrebno je istu ispitati prije postupka validacije, kako je opisano na str. 8. Obzirom da smo svjesni kompleksnosti postupka, u pripremi je članak kojim će se ispitati stabilnost najvažnijih biokemijskih analita koji se određuju u seroznim tekućinama. Ta će publikacija poslužiti svim MBL-ovima. Provjera referentnih intervala je propisana u sklopu postupka verifikacije metode za ETT ovisno o mogućnostima laboratorija (kako je i navedeno na str. 8). To znači da je proizvođač naveo specifikaciju (temeljem provedene validacije za primjerice analite u likvoru ili mokraći), a na laboratoriju je da te navode i potvrdi (ukoliko je moguće). Ispitivanje dijagnostičke osjetljivosti i specifičnosti propisano je u sklopu postupka validacije, koji je znatno kompleksniji i opsežniji od verifikacije ETT. Jasno je istaknuto da se ti postupci provode „ako je potrebno“, dakle ako nema pouzdanih podataka iz literature.

<p>Za kriterije prihvatljivosti slažem se s autorima da je bolje preuzeti kriterije za serum jer su vrijednosti za serozne tekućine češće ipak sličnije serumu nego likvoru ili mokraći. Primjerice, za proteine u likvoru i mokraći koristimo i druge metode. Ali svakako se slažem sa sugestijom da bi trebalo navesti kriterije ili dati prikladnu referencu.</p>	<p>Zahvaljujemo recenzentu na komentarima. Na str. 8 je navedeno „Kriterije prihvatljivosti potrebno je preuzeti iz verifikacijskih postupaka za „standardne“ tekućine (serum/plazma).“ To znači da se, primjerice, u slučaju validacije metode za albumin u uzorku jedne od seroznih tekućina preporuča preuzeti kriterije za albumin koje se odnose na serum (od pojedinačnog proizvođača). Proteini u likvoru i mokraći se u ovom slučaju smatraju „standardnim“ uzorcima, i za njih su kriteriji za verifikaciju dostupni od proizvođača. Stoga jedinstvene kriterije u Preporuci nije moguće navesti, ali je rečenica pojašnjena i dodane su reference, kako je sugerirano (str. 8).</p>
<p>Čini mi se nepotrebno navoditi interferon gama u smjernicama jer se ne koristi u laboratorijima u Hrvatskoj.</p>	<p>Zahvaljujemo recenzentu na komentaru. Sukladno sugestiji recenzenta, određivanje interferona je uklonjeno iz Preporuka (str. 24).</p>
<p>Radi harmonizacije pH (kod pleuralnih izljeva) ne treba pisati s tri decimalne.</p>	<p>Zahvaljujemo recenzentu na komentaru. Izražavanje vrijednosti pH je usklađeno s harmonizacijom u cijelom dokumentu.</p>
<p>Kod ostalih analiza u peritonealnoj tekućini u dijagnozi SBP „odskače mi“ što je osim ukupnih proteina naveden laktoferin koji se ne koristi u laboratorijima u Hrvatskoj. Postoje istraživanja (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27184969, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26601826, 10.4103/ejim.ejim_41_17) i na kalprotektinu za tu klinički primjenu, a to je marker koji se koristi u laboratorijima. Štoviše, izgleda da ga je jedan proizvođač validirao (https://buhlmannlabs.ch/wp-content/uploads/2015/03/LF-ASC IFU CE 13-03-28.pfg).</p>	<p>Zahvaljujemo recenzentu na komentaru. Umjesto laktoferina u Preporukama je, sukladno sugestiji recenzenta, dodan kalprotektin koji se određuje u MBL-ovima u Hrvatskoj.</p>
<p>Kod automatiziranog broja stanica preporuča se izdavanje samo ukupnog broja stanica s jezgrom, a ne WBC? Navedena referenca 108 nije ispitivala TN cell count nego WBC. Referenca 46 odnosi se na NT-pro BNP (greška?). Referenca 15 samo navodi postojeće metode za brojanje stanica. Referenca 13 mi je nedostupna... Čini mi se da je taj parametar još nedovoljno istražen.</p>	<p>Zahvaljujemo recenzentu na komentarima. Na str. 46 se navodi: „Takvi su analizatori (mислеći na analizatore s modulom za tjelesne tekućine, op.a.) danas široko dostupni, a sve analize dostupne s automatskog analizatora (uključujući broj eritrocita, ukupni broj stanica s jezgrom (engl. total nucleated cell count, TNC), broj leukocita i diferencijalna slika) trebaju se izvještavati na nalazu.“ Dakle trebalo bi izvještavati i sve parametre dostupne s automatskog analizatora, uključujući i leukocite. Referenca 106 (u prethodnoj verziji 108) primjer je verifikacije (evaluacije) jednog od analizatora na tržištu s modulom za tjelesne tekućine. Uključuje ispitivanje eritrocita, leukocita i diferencijalne slike i njihove usporedbe s određivanjem stanica u komorici. Referenca je ispravno citirana. Referenca 46 je pogreška, radi se o referenci 48. Ispravljeno sukladno komentaru. Referenca 15 govori o prednostima i ograničenjima dostupnih metoda brojenja stanica, a to je upravo cilja ovog poglavlja. Naše je mišljenje da je ukupni broj stanica s jezgrom je vrlo koristan parametar, koji može ukazivati na prisutnost drugih stanica (mezotelne, maligne) ako se značajno razlikuje od broja leukocita, te ukazati na potrebu citološke analize. Stoga se na str. 22 navodi: „U slučaju nalaza atipičnih stanica (tumorske, atipične, reaktivne mezotelne stanice itd.) tijekom morfološke analize uzorka pleuralne tekućine (koristeći hemocitometar ili vidljive iz značajne razlike između ukupnog broja stanica s jezgrom (tj. svih stanica koje sadrže jezgru) i broja leukocita s automatskog brojača) treba odgovornog kliničara koji je analizu zatražio obavijestiti o nalazu i istaknuti potrebu za citološkom analizom.“</p>
<p>Recenzent 2</p>	
<p>Ono što nama u svakodnevnom radu nedostaje, a ovdje nije u potpunosti opisano jesu kriteriji razlikovanja različitih tjelesnih tekućina. Upravo je to pitanje koje se najčešće postavlja od strane liječnika. Osobito kod problematičnih kolorektalnih operacija kada treba dati podatak radi li se o mokraći ili peritonealnoj tekućini. Možda će to biti tema drugog dijela preporuka.</p>	<p>Zahvaljujemo recenzentu na komentarima. Kriteriji za razlikovanje tjelesnih tekućina, odnosno za razlikovanje primjesa mokraće i limfe u uzorcima seroznih tekućina opisani su na nekoliko mjesta u tekstu preporuka. Primjerice, određivanje kolesterola i triglicerida (str. 25 i str 40) i određivanje kreatinina (str. 25 i str. 42). Rečenice su pojašnjene sukladno komentaru recenzenta.</p>

<p>Ono što bih ja željela istaknuti je određivanje referentnih intervala i raznorazne verifikacije i validacije. Nama s nekoliko uzoraka mjesečno – nemoguće. Nekako mi se čini da opet sami sebi zadajemo previsoke kriterije. Svakako pozdravljam inicijativu i trud oko sastavljanja preporuka, iako smatram da bi ovu verziju trebalo još dosta urediti i jasnije definirati. U nastavku šaljem svoje komentare i prijedloge.</p>	<p>Zahvaljujemo recenzentu na komentarima. Sukladno akreditacijskim standardima HRN EN ISO 15189 Medicinski laboratoriji – Zahtjevi za kvalitetu i osposobljenost, medicinski su laboratoriji obavezni provesti verifikaciju/validaciju svih metoda koje se u laboratoriju koriste. Taj je činjenica pogotovo važna za ekstrasvaskularne tjelesne uzorke (ETT), jer se (u većini slučajeva) radi o modifikaciji metode (odnosno korištenju metoda izvan opsega propisanog od strane proizvođača). Stoga, kako bi se osigurala pouzdanost dobivenih rezultata nužno je provesti verifikaciju/validaciju svake metode na svakoj pojedinačnoj vrsti ETT. Provjera referentnih intervala je propisana u sklopu postupka verifikacije metode za ETT ovisno o mogućnostima laboratorija (kako je i navedeno na str. 8). To znači da je proizvođač naveo specifikaciju (temeljem provedene validacije za primjerice analite u likvoru ili mokraći), a na laboratoriju je da te navode i potvrdi (ukoliko je moguće).</p>
<p>1. Kako je skraćenica za naziv „ekstrasvaskularne tjelesne tekućine“ EVU? Ta se skraćenica pojavljuje u cijelom tekstu.</p>	<p>Zahvaljujemo recenzentu na komentaru. Kratica EVU potječe od ekstrasvaskularni uzorci. Kako bi se izbjegle nedoumice, a sukladno komentaru recenzenta, kratica EVU je u cijelom tekstu promijenjena u ETT (ekstrasvaskularne tjelesne tekućine).</p>
<p>2. VALIDACIJA METODA Ovaj odjeljak Preporuka mi se čini najmanje razrađen i definiran. Slažem se da za ekstrasvaskularne tekućine gotovo niti jedan proizvođač ne daje podatke o validaciji metode i da bi svaki laboratorij trebao provesti validaciju i analitičkih i kliničkih performansi. Međutim, navedeno je VRLO teško izvedivo u praksi, a Preporukama nedovoljno definirano. Nadalje: Preporuke uopće ne definiraju koje analite treba validirati za svaku pojedinu vrstu uzorka izljeva. Navedeno je da se retrospektivno pregleda LIS i vidi koje su pretrage tražene, što mi se čini potpuno besmislenim. Ako govorimo o nacionalnim Preporukama koje će nam omogućiti standardizaciju, tada bi bilo dobro da se za navedene tri vrste uzorka ekstrasvaskularnih tekućina napišu pretrage koje bi trebali validirati/verificirati te analizirati i izdavati rezultat. Bilo bi dobro da u algoritam analize uzoraka upisati sve pretrage koje se uvijek rade u analizi ekstrasvaskularnih tekućina (primjerice za peritonealnu tekućinu izgled, boja i SAAG), a potom ostale u slučaju da se radi o eksudata ovisno o kliničkoj potrebi. Nadalje u tekstu se navodi: „Pretrage koje nemaju kliničku korisnost u obradi bolesnika potrebno je ukinuti.“ Koje su to pretrage? Ako se misli na neke pretrage koje su bile u nekim prvotnim algoritmima, poput specifične težine po Rivalti, tada bi bilo dobro to jasno navesti. STABILNOST UZORKA i ANALITA – Za provedbu validacije Preporuke navode da se koriste ostatni uzorci nakon analize koje je tada potrebno zamrzavati, ali „kako je stabilnost analita u uzorcima ekstrasvaskularnih tekućina uglavnom nepoznata, potrebno je provesti ispitivanje stabilnosti prije validacije.“ (str. 8). Na str. 29 je opet navedeno „Uzorci pleuralne tekućine ne smiju se zamrzavati zbog nestabilnosti LDH.“ Pošto su navodi kontradiktorni, zbunjuju i čine preporuke potpuno nejasnima.</p>	<p>Zahvaljujemo recenzentu na komentarima. Važno je na početku istaknuti da se prvo poglavlje (Validacija analitičkih specifikacija za ETT) odnosi na sve ETT, a ne isključivo na serozne tekućine. Kako je u Preporuci na str. 5 navedeno, uputa i protokola za analitičku verifikaciju/validaciju metoda koje se koriste u analizi ETT nema. Stoga se laboratorijima preporuča da se oslone na postojeće upute i protokole koji vrijede za standardne tjelesne tekućine (serum). Kako su te upute (protokoli) dostupni i općeprihvaćeni, smatramo da nije nužno u ovom dokumentu navoditi svaki pojedinačni postupak, već se Preporuke ograničavaju na propisivanje opsega verifikacije/validacije pozivajući se na postojeće dokumente (CLSI) koji to detaljnije propisuju. A) Preporuka jasno navodi (str. 7): „Prvi korak u postupku verifikacije/validacije je odabir pretraga koje će se verificirati/validirati. Verifikacija/validacija trebala bi obuhvatiti najčešće vrste ETT i pretrage s potvrđenom kliničkom korisnosti, što je potrebno definirati u suradnji s kliničkim osobljem.“ Naše je mišljenje da se retrospektivnom analizom vrsta ETT i traženih pretraga iz pojedine vrste ETT (koja je vrlo lako dostupna iz laboratorijskog informacijskog sustava) može utvrditi koje se pretrage najčešće i iz kojih ETT izvode u pojedinom laboratoriju. Time se može značajno suziti broj analiza i vrste ETT koje se trebaju verificirati/validirati. Kako najčešće vrste ETT i analiza iz ETT ovise o specifičnostima ustanove i mogućnostima pojedinog laboratorija, nije ih moguće propisati za sve laboratorije jednako. Algoritmi analize za svaku pojedinu vrstu serozne tekućine koja je opisana u ovom dokumentu (s pripadajućim preporučenim pretragama) prikazani su na Slikama 1, 2 i 3. B) Pretrage koje nemaju kliničku korisnost nisu opisane u ovom dokumentu, stoga nisu preporučene. Pretrage s ograničenom kliničkom korisnošću nisu navedene kao preporučene, odnosno ne nalaze se u uokvirenom tekstu. Rečenica na str. 7 je pojašnjena sukladno komentaru recenzenta. C) Komercijalni (kontrolni) uzorci za provedbu verifikacije/validacije nisu (u većini slučajeva) dostupni. Zato postupak verifikacije/validacije ETT počiva na prikupljanju ostatnih uzoraka ETT nakon rutinske obrade (str. 8). Svjesni smo da se radi o zahtjevnom i dugotrajnom postupku, i upravo je zato u pripremi članak koji će ispitati stabilnost klinički važnih analita u uzorcima seroznih tekućina kako bi bio od koristi za sve MBL-ove u Hrvatskoj. Podaci na str. 28 (prije 29) odnose se isključivo na uzorke pleuralne tekućine, a preuzeti su iz publikacije Antonangelo L i sur. Pleural fluid: are temperature and storage time critical preanalytical errors factors in biochemical analyses? Clin Chim Acta. 2010;411:1275-78. i ostalih (navedenih) referenci. Izraženi su skupno za sve parametre koji se mjere u uzorku pleuralne tekućine, a za kraću stabilnost uzorka u hladnjaku odgovorna je nestabilnost LDH na +4°C. Mišljenja smo da se ti podaci ne mogu preporučiti jer nisu dovoljno ispitani (radi se o jednom istraživanju koje ima određena ograničenja).</p>

Korisnik bi trebao provesti validaciju analita u uzorku za koji se ne zna stabilnost, analita kojima se ne zna stabilnost pa da bi tu obavezu uspio izvršiti, prvo mora provesti test stabilnosti! Isto tako, na stranici 29 navedeno je „Uzorak pleuralne tekućine za potrebe laboratorijske analize može se pohraniti na sobnoj temperaturi (na 21–25°C) do najmanje 4 dana (uz izuzetak glukoze koja je stabilna 8 sati na sobnoj temperaturi) ili u hladnjaku (na 2–8°C) do 24 sata.“ Kako je uzorak stabilniji na sobnoj temperaturi nego u hladnjaku.

Može se pronaći dosta literaturnih izvora koji su opisali stabilnost analita u ekstravaskularnim tekućinama. Predlažem da se iz takve literature izdvoje potrebni podaci i upišu u tablicu kao preporuka, uz napomenu da se prate i preporuke proizvođača reagensa te navedeno verificira u slučaju sumnje na neslaganje.

Primjeri literature:

Antonangelo L, Vargas FS, Acencio MM i sur. Effect of temperature and storage time on cellular analysis of fresh pleural fluid samples. *Cytopathology*, 2012;23(82):103-7

Antonangelo L, Vargas FS, Acencio MM i sur. Pleural fluid: Are temperature and storage time on critical preanalytical error factors in biochemical analysis? *Clin Chim Acta*, 2010;411(17-18):1275-8

Kriteriji prihvatljivosti nisu nigdje navedeni. Navodi se da se preuzmu kriteriji za serum/plazmu bez da se navodi literaturni izvor koji to potvrđuje. Znam nema puno radova i preporuka o kriterijima prihvatljivosti za ekstravaskularne tekućine, ali bilo bi dobro kada bi Preporuke dale barem okvirne kriterije. Možda usporedive s kriterijima prihvatljivosti za uzorke urina i likvora koji su puno bolje opisani.

Literaturno je opisana validacija većeg broja najznačajnijih analita u analizi ekstravaskularnih tekućina za najzastupljenije biokemijske analizatore poput Beckman Coultera AU i Roche Cobas 8000 koji mogu pomoći u verifikaciji metoda i postavljanju kriterija. Članci:

Lin Mj, Hoke C, Dlott R i sur. Performance specifications of common chemistry analytes on the AU series of chemistry analyzers for miscellaneous body fluids. *Clin Chim Acta* 2013;426:121-6

Owen WE, Thatcher ML, Crabtree KJ i sur. Body fluid matrix evaluation on a Roche cobas 8000 system. *Clin Biochem* 2015;48:911-4.

3. VRSTA UZORKA

Za biokemijske pretrage preporuča se heparinizirana plazma, a „*alternativno uzorci pleuralne tekućine za brojanje i diferencijaciju stanica*“ isto uzorkuju u epruvetu bez aditiva. Ukoliko se analiza uzoraka izvodi uistinu 10-15 min nakon uzorkovanja, mogao bi se prihvatiti za brojanje stanica i uzorak bez antikoagulansa.

Međutim, sukladno komentaru recenzenta, odlomak na str. 28 je proširen i pojašnjen, te su uključeni i podaci za analizu stanica (prva predložena referenca).

D) Na str. 8 je navedeno „Kriterije prihvatljivosti potrebno je preuzeti iz verifikacijskih postupaka za „standardne“ tekućine (serum/plazma).“ To znači da se, primjerice, u slučaju validacije metode za albumin u uzorku jedne od seroznih tekućina preporuča preuzeti kriterije za albumin koje se odnose na serum (od pojedinačnog proizvođača). Proteini u likvoru i mokraći se u ovom slučaju smatraju „standardnim“ uzorcima, i za njih su kriteriji za verifikaciju dostupni od proizvođača. Rečenica je pojašnjena sukladno komentaru recenzenta.

E) Slažemo se s komentarom recenzenta da se mogu naći publikacije koje opisuju verifikaciju/validaciju ETT za različite analitičke sustave. Međutim, ta činjenica ne isključuje potrebu provođenja verifikacije/validacije u laboratoriju u kojem se analiziraju ETT.

Jedna od najrecentnijih i najbolje izvedenih publikacija je i citirana u Preporukama (Block DR, Ouverson LJ, Wittwer CA, Saenger AK, Baumann NA. An approach to analytical validation and testing of body fluid assays for the automated clinical laboratory. *Clin Biochem*. 2018;58:44-52., referenca 2).

Zahvaljujemo recenzentu na komentarima.

Na str. 14 je navedeno: „Za određivanje ukupnog i diferencijalnog broja stanica treba koristiti epruvete s etilendiamintetraoctenom kiselinom (EDTA), dok uzorke pleuralne tekućine za biokemijske analize treba uzorkovati u epruvete s heparinom.

Alternativno, uzorci pleuralne tekućine za brojanje i diferencijaciju stanica te biokemijske analize mogu se uzorkovati u obične epruvete, odnosno one bez aditiva.

<p>Međutim, transport uzoraka uglavnom nije pod kontrolom laboratorija, tako da smatram da se za analizu stanica treba odabrati uzorak koji je uzorkovan na EDTA. Preporuke bi tako mogle biti korisne svakom laboratoriju za medicinskog osoblja i kao pisani dokaz.</p> <p>Primjeri literature koji navode značajnije veću stabilnost stanica ekstravaskularnih tekućina u EDTA-epruveti:</p> <p>Antonangelo L, Vargas FS, Acencio MM i sur. Effect of temperature and storage time on cellular analysis of fresh pleural fluid samples. <i>Cytopathology</i>, 2012;23(2):103-7</p> <p>Conner BD, Lee YC, Branca P. Variations in pleural fluid WBC count and differential counts with different containers and different methods. <i>Chest</i>, 2003;123(4):1181-7</p>	<p>Uzorak pleuralne tekućine treba transportirati u laboratorij na sobnoj temperaturi odmah nakon uzorkovanja (unutar jednog sata za ukupni i diferencijalni broj stanica). Uzorak treba obraditi odmah po primitku.“</p> <p>To znači da je uzorak pleuralne tekućine uzet na EDTA uzorak prvog izbora (što je sukladno komentaru recenzenta), dok su uzorci uzeti u spremnike bez aditiva uzorci drugog izbora. Transport uzoraka do laboratorija jedan je od temeljnih predanalitičkih čimbenika koji može utjecati na pouzdanost rezultata analize. Iako nije pod izravnom kontrolom laboratorija, laboratorij je dužan upravljati tim segmentom kako bi mogao dobiti što kvalitetniji uzorak.</p> <p>U prvom predloženom istraživanju ispitana je stabilnost stanica u uzorcima s EDTA i različitim uvjetima pohrane, bez izravne usporedbe EDTA i spremnika bez antikoagulansa.</p> <p>Drugo istraživanje ima nekoliko ograničenja, a ono najvažnije je odmak od 4 sata do obrade (određivanja stanica) za sve ispitane vrste spremnika. Stoga smatramo da se analizom uzoraka pleuralne tekućine uzetih s EDTA i bez aditiva, uz uvjet da su zadovoljeni uvjeti transporta (temperatura i vrijeme), mogu dobiti usporedivi rezultati. Rečenica je pojašnjena sukladno komentaru recenzenta.</p>
<p>4. VOLUMEN UZORKA</p> <p>Iako kliničari u većini slučajeva mogu uzeti veliki volumen ekstravaskularne tekućine (posebno ako je evakuacija i terapijski postupak), trebamo uvijek razmišljati da se takav uzorak često šalje i u druge laboratorije (mikrobiološki i citološki laboratorij), a osim toga, ponekada je klinički značajno nakupljanje i manjeg volumena tekućine. Smatram da je puno korisnije navesti minimalni potreban volumen (što je za prošireni panel biokemijskih analiza 3-4 mL), nego ukupan potreban volumen. Odnosno, ovisno o organizaciji laboratorija, on sam treba definirati potreban volumen za izvedbu svih potrebnih analiza.</p>	<p>Zahvaljujemo recenzentu na komentaru.</p> <p>Rečenica na str. 15 je pojašnjena sukladno komentaru.</p>
<p>5. Predlažem da se u jednu tablicu popišu razlike hilloznih i pseudohilloznih izljeva, i etiološki i prema sastavu i biokemijskim analizama. (Poput primjerice u odličnoj knjizi Susan King Strasinger i Marjorie Schaub Di Lorenzo: <i>Urinalysis and Body Fluids</i>).</p>	<p>Zahvaljujemo recenzentu na komentaru.</p> <p>Na str. 25, u poglavlju Kolesterol i trigliceridi, u tekstu nakon uokvirene preporuke, opisani su hillozni i pseudohillozni pleuralni izljevi prema etiologiji i sastavu. Smatramo da uvođenje dodatne tablice s istim informacijama nije potrebno.</p>
<p>6. Smatram da tip i morfologija stanica u ekstravaskularnim tekućinama nije dovoljno opisana za jedan dokument koji bi se smatrao nacionalnim preporukama. Osim nama poznatih stanica koje nalazimo u perifernoj krvi, u ovim uzorcima moguće je uočiti i mezotelijske stanice, maligne stanice, lipofage, neutrofage i slično. Predlažem da se kratko opiše morfologija navedenih stanica (slike bi bile super) i svakako navede da se svaka sumnja na prisutnost malignih i drugih „neobičnih“ stanica javi liječniku i ovisno o potrebi preporučiti citološka analiza uzorka. Primjerice, mezotelijske stanice (čija se prisutnost ne smatra klinički značajnom) mogu se javljati u klasterima i važno ih je tada razlikovati od malignih stanica. Isto tako, prisutnost lipofaga u peritonealnoj tekućini smatra se benignom, ali potreban je oprez da ih se ne zamjeni za tumorske stanice koje mogu imati u citoplazmi vakuole pune mucina.</p>	<p>Zahvaljujemo recenzentu na komentarima.</p> <p>Cilj ovih Preporuka je harmonizacija postupaka u analizi ETT. Vrste i morfologija stanica u pleuralnim izljevimu su vrlo pregledno i opsežno opisane u nizu temeljnih udžbenika iz područja biokemije i hematologije (primjerice udžbenik naveden pod točkom 5.), stoga ih ovdje nije potrebno ponavljati.</p> <p>Na str. 44 u Dodatku 1 su opisane stanice koje se mogu naći u seroznim tekućinama. Nadalje, na str. 22 je navedeno: „U slučaju nalaza atipičnih stanica (tumorske, atipične, reaktivne mezotelne stanice itd.) tijekom morfološke analize uzorka pleuralne tekućine (koristeći hemocitometar ili vidljive iz značajne razlike između ukupnog broja stanica s jezgrom (tj. svih stanica koje sadrže jezgru) i broja leukocita s automatskog brojača) treba odgovornog kliničara koji je analizu zatražio obavijestiti o nalazu i istaknuti potrebu za citološkom analizom (vidi 3.1.3 Poslijeanalitička faza).“</p>

7. Jedno zapažanje za razmišljanje Nije li malo čudno diferenciranje stanica u ekstravaskularnim tekućinama zvati „diferencijalna krvna slika“?	Zahvaljujemo recenzentu na komentaru. Termin diferencijalna krvna slika je u cijelom tekstu zamijenjena diferencijacijom stanica.
8. LIGHTOVI KRITERIJI Literaturno je pokazano da Lightovi kriteriji čija je specifičnost oko 74% krivo kategoriziraju transudate u eksudate u slučaju terapije diureticima (što je navedeno u tekstu Preporuka), međutim isto vrijedi i za slučaj kongestivnog zatajenja srca, što je nedovoljno pisano u tekstu. Neki laboratoriji u tim slučajevima za razlikovanje pleuralnih punktata koji su krivo klasificirani koriste razliku koncentracije ukupnih proteina u serumu i izljevu > 31g/L kao pomoć pri definiranju transudata. Smatram da se navedeno treba detaljnije prikazati i dati preporuke za takve slučajeve. Literatura: Porcel JM. Identifying transudates miscallssified by Light's criteria. Curr Opin pulm Med, 2013;19(4):362-7 Bielsa S, Porcel JM, Catelotte J isur. Solving the Light's criteria misclassification rate of cardiac and hepatic transudates. Respiratory, 2012;17(4):721-6	Zahvaljujemo recenzentu na komentarima. Na str. 18 u uokvirenoj preporuci stoji: „U slučajevima kada su Light-ovi kriteriji neodređeni (npr. kod bolesnika koji primaju terapiju diureticima; ili kada klinički simptomi ukazuju na transudat, ali Light-ovi kriteriji na eksudacijski izljev), u razlikovanju transudata od eksudata mogu pomoći gradijent albumina u serumu i pleuralnoj tekućini, kolesterol u pleuralnoj tekućini, omjer kolesterola u pleuralnoj tekućini i serumu te kombinacija kolesterola u pleuralnoj tekućini, LD u pleuralnoj tekućini i proteina u pleuralnoj tekućini.“ U tekstu nakon preporuke su objašnjeni sve dodatne analize koje mogu pomoći u razlikovanju transudata i eksudata. Obje su predložene reference citirane u Preporukama (referenca 39 i 41). Gradijent proteina se više ne smatra testom izbora za otkrivanje pogrešno klasificiranih transudata. Zatajenje srca je najčešći uzrok transudacijskih izljeva. Jedan dio transudata se može Light'ovim krivo svrstati u eksudate, a u tom slučaju se valja poslužiti SEAG. To je sve navedeno u tekstu na str. 19.
9. SAAG Slično gore navedenom, u slučaju peritonealne tekućine literaturno je pokazano da izračun SAAG može rezultirati krivom klasifikacijom i u slučaju ascitesa uzrokovanog kongestivnim zatajenjem srca. Osim toga, u kasnoj fazi ciroze jetre serumski albumini su vrlo niski. Zbog toga neki laboratoriji isto koriste kao pomoć u definiciji transudata i eksudata određivanje ukupnih proteina. (Ukupni proteini > 25 g/L kod pacijenta sa SAAG >11 g/L i sumnje na kongestivno zatajenje srca ukazuju na eksudat). Primjer laboratorija za točku 8 i 9: Laboratorij klinike Mayo	Zahvaljujemo recenzentu na komentarima. Svi komentari recenzenta koji se tiču SAAG odgovoreni su u tekstu Preporuka na str. 37. Tamo je navedeno da peritonealne izljeve valja klasificirati kao one niskog (kod maligne bolesti, bilijarnog i pankreasnog ascitesa, tuberkuloznog peritonitisa, nefrotskog sindroma, opstrukcije crijeva) i visokog gradijenta albumina (kod ciroze, zatajenja srca, alkoholnog hepatitisa, metastaza u jetri, tromboze portalne vene i ascitesa miješanog porijekla), te da: „U usporedbi s ukupnim proteinima, SAAG postiže dijagnostičku točnost od 97% (uz osjetljivost od 95% i specifičnost od 95%) u prepoznavanju eksudacijskih ascitesa.“ Problemi s niskim albuminima u ascitesu i analitički izazovi povezani s tom činjenicom su opisani na str. 37. Nedostaci određivanja proteina kao parametra za razlikovanje ascitesa opisani su na str. 35-36.
10. Predlažem da se svakako navede moguće lažno povećane vrijednosti ukupnih proteina i albumina u slučaju traumatskog uzorkovanja i nepouzdanost u izračunu Lightovih kriterija i SAAG razlike. Bilo bi dobro da se preporukama predloži primjer komentara na nalazu.	Zahvaljujemo recenzentu na komentaru. Slažemo se s komentarom recenzenta da traumatska punkcija može uzrokovati lažno povećane koncentracije proteina i/ili albumina u uzorcima seroznih tekućina. Međutim, obzirom da je teško kvantificirati takav učinak na rezultat mjerenja proteina/albumina, smatramo da je dovoljno u komentaru navesti potvrdu identifikacije traumatske punkcije (kako je navedeno na str. 17/18 i 34/35). Primjer komentara je dodan u predlošku nalaza na str. 56. Predložak se može prilagoditi prema potrebama svakog pojedinog laboratorija.
11. pH u pleuralnoj tekućini Preporuka na stranici 29 – iako je rijetko, smatram da je potrebno naglasiti i da je pH pleuralne tekućine iznimno nizak (pH<6,0) u slučaju rupture ezofagusa što je hitno kliničko stanje.	Preporuka na str. 22 navodi: „Amilazu treba određivati u pleuralnom izljevu u slučaju sumnje na pankreatitis, malignu bolest, rupturu jednjaka, pseudocistu gušterače i cirozu jetre.“ Dakle, u slučaju sumnje na rupturu jednjaka, treba određivati amilazu u uzorku pleuralnog izljeva.
12. ANALITIČKE METODE Nigdje u preporukama nisu navedene metode, a dio preporuka su omjeri ili razlike koncentracija analita u serumu i ekstravaskularnoj tekućini. Predlažem da se navedeno ispravi i opišu glavne prednosti i nedostaci metoda.	Zahvaljujemo recenzentu na komentarima. Na str. 7 je navedeno: „Analiza ETT se najčešće provodi korištenjem metoda namijenjenih „standardnim“ uzorcima (serum, plazma, puna krv, mokraća) na automatskim analizatorima, što ih čini široko dostupnim i relativno jeftinim.“

<p>Primjerice – određivanje albumina bromcresol green, brocresol purple ili imunoturbidimetrijom. Postoje radovi koji pokazuju nedostatke pojedinih metoda i moguće krivu interpretaciju SAAG ovisno o korištenoj metodi.</p>	<p>Dodatno na str. 18 (i 19) je u preporuci navedeno: „Za potrebe izračuna omjera i gradijenata, analize u pleuralnoj tekućini i serumu trebaju biti provedene koristeći istu metodu.“ Što se tiče nedostataka pojedinih metoda za određivanje albumina, oni su opisani na str. 37 i 38.</p>
<p>Recenzent 3</p>	
<p>1. Na temelju snage i dostupnosti znanstvenih dokaza uokvirene preporuke su kategorizirane u dva stupanj: stupanj 1 (preporuka umjerene snage) i stupanj 2 (preporuka ograničene snage). Komentar: Samo početno se koristi stupanj a dalje idu razredi, treba se uskladiti</p>	<p>Zahvaljujemo recenzentu na komentarima. Kategorizacija preporuka sukladno znanstvenim dokazima usklađena je u cijelom tekstu Preporuka.</p>
<p>2. Iako analiza EVU osim kliničke kemije i hematologije uključuje i druge specijalnosti, u hrvatskim se medicinskim laboratorijima ne izvode citološke i mikrobiološke pretrage te su stoga izvan područja primjene ovog dokumenta. Komentar: medicinsko biokemijski laboratoriji, i ostali su laboratoriji medicinski (citološki, mikrobiološki)</p>	<p>Zahvaljujemo recenzentu na komentaru. Naziv medicinsko-biokemijski laboratoriji je ispravljen sukladno komentaru.</p>
<p>3. Ovaj dokument započinje poglavljem koji se osvrće na validaciju metoda koje se koriste u analizi EVU, a nastavlja specifičnim preporukama za analizu seroznih tekućina (uključujući pleuralnu, peritonealnu i perikardijalnu) obzirom da se te vrste EVU analiziraju u gotovo svim laboratorijima u Hrvatskoj. Ukoliko proizvođač nije naveo specifikacije, potrebno je provesti validaciju metode za svaku vrstu EVU za koju će se metoda koristiti. Postupak validacije metoda koje se koriste za EVU treba obuhvatiti ispitivanje preciznosti, točnosti, analitičke osjetljivosti, analitičke specifičnosti (interferencija), mjernog raspona (intervala izvještavanja), i, ukoliko je potrebno, prijenosa analita (engl. carry-over) te kliničku osjetljivost i specifičnost. Komentar: mislim da niti jedan proizvođač nema specifikacije za analizu seroznih tekućina (osim urina i CSF), tako da ako se ove vrste EVU analiziraju u gotovo svim labosima u Hrvatskoj bilo je poželjno detaljnije obraditi samu validaciju, odnosno kako je treba provesti, što bi bilo od značajne koristi za prvi korak samog procesa harmonizacije, u protivnom prema smjernicama proizlazi da dok se to ne napravi na nalazima tu činjenicu trebamo jasno istaknuti i objasniti kliničarima ograničenje metode</p>	<p>Zahvaljujemo recenzentu na komentarima. Važno je na početku istaknuti da se prvo poglavlje (Validacija analitičkih specifikacija za ETT, u prethodnoj verziji EVU) odnosi na sve ETT, a ne isključivo na serozne tekućine. Sukladno akreditacijskim standardima HRN EN ISO 15189 Medicinski laboratoriji – Zahtjevi za kvalitetu i osposobljenost, medicinski su laboratoriji obavezni provesti verifikaciju/validaciju svih metoda koje se u laboratoriju koriste. Taj je činjenica pogotovo važna za ekstrasvaskularne tjelesne uzorke (ETT), jer se (u većini slučajeva) radi o modifikaciji metode (odnosno korištenju metoda izvan opsega propisanog od strane proizvođača). Stoga, kako bi se osigurala pouzdanost dobivenih rezultata nužno je provesti verifikaciju/validaciju svake metode na svakoj pojedinačnoj vrsti ETT. Kako je u preporuci na str. 5 navedeno, nema dostupnih uputa i protokola za analitičku verifikaciju/validaciju metoda koje se koriste u analizi ETT. Stoga se laboratorijima preporuča da se koriste postojećim uputama i protokolima koji vrijede za standardne tjelesne tekućine (serum). Kako su te upute (protokoli) dostupni i općeprihvaćeni, smatramo da nije nužno u ovom dokumentu navoditi svaki pojedinačni postupak, već se Preporuke ograničavaju na propisivanje opsega verifikacije/validacije pozivajući se na postojeće dokumente (CLSI) koji to detaljnije propisuju. Ukoliko verifikacija/validacija nije provedena (iz bilo kojeg razloga) tu činjenicu treba istaknuti na nalazu kako bi se kliničara obavijestilo da nije moguće isključiti učinak nestandardnog matriksa na rezultate. To je neophodna informacija koja izravno utječe na tumačenje rezultata i neizravno na sigurnost bolesnika.</p>
<p>4. Za određivanje ukupnog i diferencijalnog broja stanica treba koristiti epruvete s etilendiamintetraoctenom kiselinom (EDTA), dok uzorke pleuralne tekućine za biokemijske analize treba uzorkovati u epruvete s heparinom. Alternativno, uzorci pleuralne tekućine za brojanje i diferencijaciju stanica te biokemijske analize mogu se uzorkovati u obične epruvete, odnosno one bez aditiva. Komentar: Mislim da alternativno ne može biti, osobito u tako neistraženom području, iako postoje reference</p>	<p>Zahvaljujemo recenzentu na komentarima. Na str. 14 je navedeno: „Za određivanje ukupnog i diferencijalnog broja stanica treba koristiti epruvete s etilendiamintetraoctenom kiselinom (EDTA), dok uzorke pleuralne tekućine za biokemijske analize treba uzorkovati u epruvete s heparinom. Alternativno, uzorci pleuralne tekućine za brojanje i diferencijaciju stanica te biokemijske analize mogu se uzorkovati u obične epruvete, odnosno one bez aditiva. Uzorak pleuralne tekućine treba transportirati u laboratorij na sobnoj temperaturi odmah nakon uzorkovanja (unutar jednog sata za ukupni i diferencijalni broj stanica). Uzorak treba obraditi odmah po primitku.“ To znači da je uzorak pleuralne tekućine uzet na EDTA uzorak prvog izbora, dok su uzorci uzeti u spremnike bez aditiva uzorci drugog izbora.</p>

	Stoga smatramo da se analizom uzoraka pleuralne tekućine uzetih s EDTA i bez aditiva, uz uvjet da su zadovoljeni uvjeti transporta (temperatura i vrijeme), mogu dobiti usporedivi rezultati. Rečenica je pojašnjena sukladno komentaru recenzenta.
5. Vrijednosti hematokrita > 50% upućuju na pravi hemotoraks koji je obično prisutan u slučaju traume prsnog koša. Komentar: Vrijednosti radi harmonizacije Htc>0,500	Zahvaljujemo recenzentu na komentaru. Ispravljeno sukladno komentaru.
6. Ukoliko je tražena biokemijska analiza, mutne, mliječne i/ili krvave uzorke treba centrifugirati. Komentar: svi se uzorci za biokemijsku analizu trebaju centrifugirati	Zahvaljujemo recenzentu na komentaru. Rečenica na str. 17 je pojašnjena sukladno komentaru.
7. Iako Leu ima ograničenu vrijednost i nije preporučen za razlikovanje transudata od eksudata, pokazano je da eksudacijski izljevi imaju Leu > 1000 x10 ⁶ /L (često ≥ 500 x10 ⁶ /L), dok transudacijski izljevi imaju Leu < 1000 x10 ⁶ /L (često < 300 x10 ⁶ /L). Komentar: ovo je sasvim nejasno	Zahvaljujemo recenzentu na komentaru. U uokvirenoj preporuci na str. 21 navedeno je: „Ukupan broj leukocita (Leu) ne treba određivati za razlikovanje pleuralnih transudata i eksudata.“ To je preporuka. Rečenica u nastavku je pojašnjena sukladno komentaru.
Recenzent 4	
Poštovano i drago povjerenstvo, dolje je moj prijedlog ocjene i mišljenja za smjernice o ekstravaskularnim tekućinama. Nepotrebna i opsežna laboratorijska ispitivanja eksudacijskih pleuralnih izljeva treba, u dogovoru s odgovornim kliničarima, obeshrabiliti. – što ovo točno znači i kako bi to u praksi trebalo provesti	Zahvaljujemo recenzentu na komentarima. U cijelom tekstu Preporuka se ponavlja sintagma - pretrage koje nemaju kliničku korisnost potrebno je ukinuti. To se radi isključivo u dogovoru s kliničarima. Spomenuta rečenica je uklonjena iz Preporuka sukladno komentaru recenzenta.
Koristi se izraz „verifikacijski postupak“ kako za verifikaciju karakteristike testa, tako i u nekim drugim kontekstima. Primjer: <i>Svaki laboratorij treba uspostaviti alternativne verifikacijske postupke (uključujući manualno brojanje stanica) za uzorke s rezultatima ispod donje granice mjerenja.</i>	Zahvaljujemo recenzentu na komentaru. Verifikacija je provjera (istinosti), stoga se (prema našem mišljenju) može koristiti u oba konteksta.
Validaciju je lako propisati, ali malo teže provesti – trebalo bi sakupljati navedene uzorke kroz duže vrijeme za validaciju jer rijetko dolaze, a nepoznata je stabilnost uzorka. Dakle, prvo treba napraviti ispitivanje stabilnosti. Pa kasnije u smjernicama navedeno koja je stabilnost analita za pleuralni ipak Kod validacije:..... ukoliko je potrebno, ispitati prijenos analita (engl. carry-over) te kliničku osjetljivost i specifičnost – na što se tu točno misli i kako bi to točno trebalo provesti?	Zahvaljujemo recenzentu na komentaru. U nedostatku pouzdanih podataka o stabilnosti ETT, potrebno je istu ispitati prije postupka validacije, kako je opisano na str. 8. Obzirom da smo svjesni kompleksnosti postupka, u pripremi je članak kojim će se ispitati stabilnost klinički važnih analita u seroznim tekućinama koji će biti od pomoći za sve MBL-ove. Podaci na str. 28 (prije 29) odnose se isključivo na uzorke pleuralne tekućine, a preuzeti su iz publikacije Antonangelo L i sur. Pleural fluid: are temperature and storage time critical preanalytical errors factors in biochemical analyses? Clin Chim Acta. 2010;411:1275-78. i ostalih (navedenih) referenci. Izraženi su skupno za sve parametre koji se mjere u uzorku pleuralne tekućine, a za kraću stabilnost uzorka u hladnjaku odgovorna je nestabilnost LDH na +4°C. Sukladno komentaru recenzenta, odlomak na str. 28 je proširen i pojašnjen, te su uključeni i podaci za analizu stanica. Ispitivanje kliničke (dijagnostičke) osjetljivosti i specifičnosti propisano je u sklopu postupka validacije, koji je znatno kompleksniji i opsežniji od verifikacije ETT. Jasno je istaknuto da se ti postupci provode „ako je potrebno“, dakle ako nema pouzdanih podataka iz literature. Provode se sukladno dostupnim postupcima za standardne uzorke.

<p>Ukoliko se broj i vrsta stanica u EVU određuju upotrebom automatiziranih metoda na brojačima, odgovarajuća UKK treba uključiti provjeru pozadine analizatora (engl. background check) - background check obično nije dio UKK nego automatizirane prethodne provjere funkcionalnosti analizatora u zadanom načinu rada</p>	<p>Zahvaljujemo recenzentu na komentaru. Slažemo se s komentarom recenzenta, ali taj postupak nije automatiziran kod svih analizatora, stoga smatramo da ga treba istaknuti (kao što je to učinjeno u CLSI smjernici).</p>
<p>Na zahtjevu moraju jasno biti naznačene tražene analize i sve klinički relevantne informacije (npr. terapija diureticima) kako bi se olakšalo tumačenje rezultata. Osim toga na uputnici treba jasno biti naveden postupak uzorkovanja (tj torakocenteza ili pleuralna punkcija), mjesto uzorkovanja i anatomsko podrijetlo uzorka (Stupanj 1 preporuka) – ovo je teško ostvarivo u praksi</p>	<p>Zahvaljujemo recenzentu na komentaru. Slažemo se, ali kako je navedeno na str. 13: "Optimiranje obrasca uputnice, kako bi uključivala samo klinički korisne analize s dostupnim informacijama o tumačenju, poboljšat će laboratorijsku analizu pleuralne tekućine i interpretaciju dobivenih rezultata." Obrazac uputnice se može optimirati i za sve ostale tražene stavke, a sve djelatnike educirati kako na prikladan način zatražiti pretrage.</p>
<p>Za određivanje ukupnog i diferencijalnog broja stanica treba koristiti epruvete s etilendiamintetraoctenom kiselinom (EDTA), dok uzorke pleuralne tekućine za biokemijske analize treba uzorkovati u epruvete s heparinom. Alternativno, uzorci pleuralne tekućine za brojanje i diferencijaciju stanica te biokemijske analize mogu se uzorkovati u obične epruvete, odnosno one bez aditiva. Mislim da riječ alternativno tu nikako ne stoji, jer mora postojati točna procedura u koje epruvete se vadi i zašto</p>	<p>Zahvaljujemo recenzentu na komentaru. Na str. 14 je navedeno: „Za određivanje ukupnog i diferencijalnog broja stanica treba koristiti epruvete s etilendiamintetraoctenom kiselinom (EDTA), dok uzorke pleuralne tekućine za biokemijske analize treba uzorkovati u epruvete s heparinom. Alternativno, uzorci pleuralne tekućine za brojanje i diferencijaciju stanica te biokemijske analize mogu se uzorkovati u obične epruvete, odnosno one bez aditiva. Uzorak pleuralne tekućine treba transportirati u laboratorij na sobnoj temperaturi odmah nakon uzorkovanja (unutar jednog sata za ukupni i diferencijalni broj stanica). Uzorak treba obraditi odmah po primitku.“ To znači da je uzorak pleuralne tekućine uzet na EDTA uzorak prvog izbora, dok su uzorci uzeti u spremnike bez aditiva uzorci drugog izbora. Stoga smatramo da se analizom uzoraka pleuralne tekućine uzetih s EDTA i bez aditiva, uz uvjet da su zadovoljeni uvjeti transporta (temperatura i vrijeme), mogu dobiti usporedivi rezultati. Rečenica je pojašnjena sukladno komentaru recenzenta.</p>
<p>Iako Leu ima ograničenu vrijednost i nije preporučen za razlikovanje transudata od eksudata, pokazano je da eksudacijski izljevi imaju $Leu > 1000 \times 10^6/L$ (često $\geq 500 \times 10^6/L$), dok transudacijski izljevi imaju $Leu < 1000 \times 10^6/L$ (često $< 300 \times 10^6/L$). Je li više od 500 ili 100 i je li manje od 1000 ili 300?</p>	<p>Zahvaljujemo recenzentu na komentaru. U uokvirenoj preporuci na str. 21 navedeno je: „Ukupan broj leukocita (Leu) ne treba određivati za razlikovanje pleuralnih transudata i eksudata.“ To je preporuka. Sporna rečenica u nastavku je pojašnjena sukladno komentaru recenzenta.</p>
<p>Laboratoriji se snažno potiču da rezultate dobivene iz uzorka pleuralne tekućine javljaju i komentiraju s odgovornim kliničarem koji je analize zatražio. Ne piše kritične, disepantne – što bi točno sve trebalo javiti?</p>	<p>Zahvaljujemo recenzentu na komentaru. Nedostatak referentnih intervala zahtjeva istaknutiji angažman laboratorijskih stručnjaka u tumačenju dobivenih rezultata analize ETT. Naša je uloga kao laboratorijskih stručnjaka ne samo osigurati pouzdane rezultate analize ETT, već i potaknuti njihovo primjereno tumačenje. Stoga je naša uloga savjetodavna za sve rezultate analize ETT.</p>
<p>Ako se LIS koristi za generiranje standardiziranih komentara za analizu pleuralne tekućine, na nalazu treba navesti relevantnu literaturu koja se koristila kao izvor za osmišljavanje komentara.</p>	<p>Zahvaljujemo recenzentu na komentaru. U tom smislu se može koristiti ova Preporuka ili izvorne publikacije korištene u njenoj izradi (a navedene u popisu referenci).</p>

Dragi članovi,

Hrvatsko društvo za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu definiralo je unaprjeđenje kvalitete laboratorijskog rada u Hrvatskoj kao jedan od svojih glavnih strateških ciljeva. U tu svrhu osnovan je velik broj Radnih grupa čiji je cilj promicanje harmonizacije i standardizacije laboratorijskih postupaka u svim fazama laboratorijskog rada.

Kao rezultat rada Radne grupe za ekstravaskularne uzorke HDMBLM-a nastale su ove preporuke, a još je nekoliko dokumenata u pripremi te će uskoro biti dostupne svim članovima Društva.

U nadolazećem razdoblju najavljujemo:

- Preporuke za postupanje s hemolitičnim, lipemičnim i ikteričnim uzorcima
- Preporuka za sjemenu tekućinu, znoj, dijalizat/dren, amnijsku tekućinu i BAL
- Preporuka za cerebrospinalnu tekućinu
- Preporuka za laboratorijsku dijagnostiku autoimunih bolesti
- Preporuke za pretrage uz bolesnika

ISBN: 978-953-57778-9-2