

Važnost dodatnih hematoloških parametara u dijagnozi infekcije COVID-19 i sepse

Brenčić, Tina

Postgraduate specialist thesis / Završni specijalistički

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:988687>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-21**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Tina Brenčić

**VAŽNOST DODATNIH HEMATOLOŠKIH PARAMETARA U DIJAGNOZI
INFEKCIJE COVID-19 I SEPSE**

Specijalistički rad

Zagreb, 2024.

Poslijediplomski specijalistički studij: Medicinska biokemija i laboratorijska medicina

Mentor rada: prof. dr. sc. Dunja Rogić, spec.med.biokem.

Specijalistički rad obranjen je dana 10. rujna 2024. godine na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, pred povjerenstvom u sastavu:

1. prof. dr. sc. Jozsef Petrik
2. prof. dr. sc. Dunja Rogić
3. izv. prof. dr. sc. Sandra Šupraha Goreta

Rad ima 54 lista.

Predgovor

Rad je izrađen u Odjelu za medicinsko biokemijsku djelatnost Opće bolnice Pula.

Zahvaljujem svojoj mentorici prof.dr.sc. Dunji Rogić na pomoći, iskustvu, izdvojenom vremenu i trudu prilikom izrade ovog rada. Hvala kolegicama i kolegama iz Odjela za medicinsku biokemijsku djelatnost Opće bolnice Pula koji su svojim savjetima pomagali kad god je trebalo te izv.prof.dr.sc. Loreni Honović na podršci.

Najveće hvala mom suprugu i životnom suputniku Fabiu koji je uvijek bio i ostao moja najveća potpora i podrška u ovom procesu cjeloživotnog učenja. Hvala našoj Viti na strpljenju i dječjem razumijevanju onog: "mama mora raditi".

Na kraju, posebna zahvala mami i tati bez kojih ne bih bila tu gdje danas jesam, a koji su i ovaj put bili neizmjerena podrška i pomoć.

SAŽETAK

Cilj istraživanja: Suvremeni hematološki analizatori imaju mogućnost precizne klasifikacije i kvantifikacije stanica koje se javljaju uslijed upalnih stanja, pri čemu se mjere brojni dodatni hematološki parametri. Cilj istraživanja bio je utvrditi utječe li imunološki odgovor na koronavirusnu infekciju uzrokovanu SARS-CoV-2 (COVID-19) i sepsu na dostupne hematološke parametre te mogu li oni imati dodanu vrijednost u ranoj dijagnostici tih stanja.

Ispitanici i metode: U istraživanje je uključeno 200 bolesnika podijeljenih u tri skupine; kontrolna skupina, bolesnici s COVID-19 i sepsom. Parametri koji su predmet ovog istraživanja su broj leukocita, neutrofilnih granulocita (NEUT), limfocita (LYMPH), monocita (MONO) i nezrelih granulocita (IG), parametri aktivacije neutrofila (NEUT-RI, NEUT-GI), reaktivni limfociti (RE-LYMP), limfociti koji sintetiziraju antitijela (AS-LYMP), reaktivni monociti (RE-MONO) te računski omjeri navedenog (NLR, MLR i IGLR). Ispitano je postoji li statistički značajna razlika u navedenim parametrima između različitih skupina te su izračunate mjere dijagnostičke točnosti.

Rezultati: Postoji statistički značajna razlika u NEUT %, LYMPH, RE-LYMP, CRP-u te računskim omjerima između COVID-19 bolesnika i kontrolne skupine ($P < 0,001$) uz dobru dijagnostičku točnost za navedene parametre ($AUC > 0,7$). U ranoj dijagnostici bolesnika sa sepsom korisni pokazatelji su $NEUT > 78,1$ %, $LYMPH < 16,8$ %, $IG > 0,6$ %, $NEUT-RI > 52,7$ FI, $NLR > 4,13$, $IGLR > 0,06$ i $CRP > 120$ mg/L te postoji statistički značajna razlika u ovim parametrima između kontrolne skupine i bolesnika sa sepsom ($P < 0,001$). Pojava RE-MONO pokazuje visoku specifičnost u ovoj skupini bolesnika.

Zaključak: COVID-19 dovodi do neutrofilije i limfopenije te porasta računskih omjera. Sepsa dovodi do značajne promjene gotovo svih parametara leukocitnih

subpopulacija uz porast NEUT-RI i pojavu RE-MONO kao ranih dijagnostičkih pokazatelja aktivacije imunološkog sustava.

SUMMARY

Objectives: Modern hematology analyzers offer a series of clinical parameters that provide precise classification and quantification of cells found in inflammatory conditions. The aim of this study was to determine whether the immune response to coronavirus infection caused by SARS-CoV-2 virus (COVID-19) and sepsis affects these hematological parameters and if they have added value in the early diagnosis of these conditions.

Patients and Methods: Two hundred patients divided into three groups; the control group, patients with COVID-19 and those with sepsis were included in this study. The following parameters of interest were evaluated: the number of leukocytes, neutrophil granulocytes (NEUT), lymphocytes (LYMPH), monocytes (MONO) and immature granulocytes (IG), parameters of neutrophil activation (NEUT-RI, NEUT-GI), reactive (RE-LYMP), antibody synthesizing lymphocytes (AS-LYMP), reactive monocytes (RE-MONO) and calculated ratios (NLR, MLR, IGLR). The difference in the evaluated parameters between different groups and their diagnostic accuracy has been assessed.

Results: There is statistically significant difference in NEUT %, LYMPH, RE-LYMP, CRP and calculated ratios between COVID-19 and control group ($P < 0.001$) with good diagnostic accuracy for these parameters ($AUC > 0.7$). In early diagnosis of sepsis, useful indicators are $NEUT > 78.1$ %, $LYMPH < 16.8$ %, $IG > 0.6$ %, $NEUT-RI > 52.7$ FI, $NLR > 4.13$, $IGLR > 0.06$ and $CRP > 120$ mg/L with significant difference in these parameters between control group and sepsis ($P < 0.001$). The appearance of RE-MONO indicates high specificity in this group of patients.

Conclusion: COVID-19 is characterised with neutrophilia, lymphopenia and increased calculated ratios. Sepsis leads to a significant change of almost all tested parameters with an increase of NEUT-RI and RE-MONO as early indicators of immune system activation.

SADRŽAJ

1. Uvod i pregled područja istraživanja	1
1.1. COVID-19	1
1.2. Sepsa	2
1.3. Dodatni hematološki parametri	3
2. Cilj istraživanja	8
3. Materijal i metode	9
3.1. Ispitanici	9
3.2. Metode	10
3.3. Statistička obrada podataka	12
4. Rezultati	13
5. Rasprava	30
6. Zaključci	36
7. Literatura	37
8. Popis skraćenica	42
9. Životopis	43

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1. COVID-19

Koronavirusna bolest 2019 (COVID-19) uzrokovana SARS-CoV-2 virusom dovela je do globalne pandemije 2020. godine (1). Do kolovoza 2022. godine u svijetu je potvrđeno 580 milijuna slučajeva COVID-19 bolesti i 6,4 milijuna potvrđenih smrtnih ishoda od ove bolesti što govori u prilog ozbiljnosti infekcije (2). Bolest karakterizira nespecifična klinička slika sa simptomima koji mogu varirati od asimptomatskih, preko simptoma sličnih prehladi do teške kliničke slike, respiratornog distresa i multiorganskog zatajanja zbog čega još uvijek predstavlja značajan javnozdravstveni problem u cijelom svijetu (1, 3). Starija životna dob, prisutstvo komorbiditeta i imunokompromitirani bolesnici su faktori rizika za lošiji klinički ishod u bolesnika (4). Diferencijalna krvna slika u tih bolesnika pokazuje jedinstvene karakteristike: neutrofiliju i limfopeniju obično prisutnu u bakterijskim infekcijama za razliku od limfocitoze koja karakterizira virusnu infekciju (5). Provode se brojna istraživanja s ciljem pronalaženja već dostupnih biomarkera koji bi bili korisni u dijagnostici ove bolesti, ranoj prognozi te prepoznavaju bolesnika koji će eventualno razviti teži oblik bolesti s obzirom da pravodobna dijagnoza može biti ključna za COVID-19 bolesnike (1, 3). Porast broja leukocita u korist neutrofilnih granulocita smatra se lošim prognostičkim pokazateljem razvoja komplikacija i teškog oblika bolesti (6). Također, povećan omjer neutrofilnih granulocita i limfocita (engl. *neutrophil-to-lymphocyte ratio*, NLR) u COVID-19 bolesnika se u više istraživanja pokazao kao koristan prognostički pokazatelj sa visokom dijagnostičkom specifičnošću i osjetljivošću za razvoj teškog oblika bolesti te kao značajan prediktor mortaliteta (6, 7, 8).

1. 2. Sepsa

Sepsa je životno ugrožavajuće, progresivno stanje koje karakterizira disfunkcija organa uslijed neodgovarajućeg odgovora organizma na infekciju (9). Prema Svjetskoj Zdravstvenoj organizaciji (SZO) tijekom 2020. godine zabilježeno je 48,9 milijuna slučajeva sepse, od toga 11 milijuna sa smrtnim ishodom (10). Dijagnoza, ali i praćenje sepse je kompleksno s obzirom da se disfunkcija organa definira preko SOFA (engl. *Sequential Organ Failure Assessment*) sustava bodovanja, koji obuhvaća respiratorni sustav, koagulaciju, jetrenu i bubrežnu funkciju, kardiovaskularni i središnji živčani sustav (9). Ovo u konačnici dovodi do potrebe za brzim i lako dostupnim biomarkerima za dijagnozu i praćenje ovog klinički zahtjevnog stanja. Sepsu karakterizira izrazito narušavanje homeostaze cijelog organizma te produkcija proupalnih citokina zbog čega dolazi do kvalitativnih i kvantitativnih promjena u hematološkim parametrima (11). Svaka infekcija u organizmu može dovesti do sepse pa tako uzročnici mogu biti bakterije, virusi i gljivice, ali u kliničkoj praksi ipak prevladava bakterijska sepsa (11). Trenutno se pozitivan nalaz hemokulture smatra zlatnim standardom za dijagnozu bakterijske sepse, međutim radi se o dugotrajnijoj pretrazi koja zahtjeva inkubacijski period (7, 12). C-reaktivni protein (CRP) i prokalcitonin (PCT) su često korišteni biokemijski biljezi sepse, međutim njihova dijagnostička specifičnost i osjetljivost varira ovisno o tipu infekcije i individualnosti samih bolesnika (13, 14). Sepsa dovodi do značajnih promjena u hematološkim pokazateljima, primarno porasta broja neutrofilnih granulocita te skretanje u lijevo uz migraciju nezrelih granulocita iz koštane srži prema periferiji (13, 14). Zbog svega navedenog, kompletna krvna slika (KKS) s dostupnim dodatnim parametrima mogla bi biti brzi i jednostavan dijagnostički alat za otkrivanje ranih promjena leukocita u sepsi. Biomarker koji je povišen u ranom stadiju bolesti bio bi

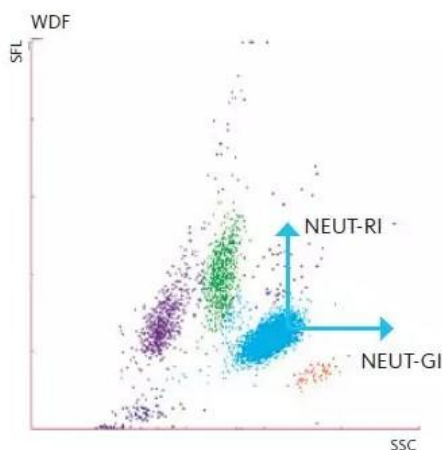
izuzetno vrijedan za klasifikaciju bolesnika ovisno o riziku za sepsu s obzirom da se pravodobna terapija pokazala najefikasnijom (15). NLR se pokazao kao koristan biljeg u diferencijalnoj dijagnozi akutnih bolesnika, a njegov porast se može koristiti kao rani pokazatelj sepse te pokazatelj povećanog rizika septičnog šoka već unutar 6 sati od početka infekcije (14). Pravodobna i točna dijagnoza sepse značajno smanjuje mortalitet i morbiditet te utječe na bolji klinički ishod bolesnika s obzirom da je prvih 12 sati ključno za dijagnozu, prognozu bolesti i početak adekvatne terapije (15, 16).

1. 3. Dodatni hematološki parametri

Kompletna krvna slika (KKS) jedna je od rutinski najtraženijih pretraga u laboratoriju za dijagnozu akutnih infekcija i sepse (15). Suvremeni hematološki analizatori, uz klasične parametre krvne slike nude brojne dodatne istraživačke parametre što povećava opseg dostupnih podataka koji se mogu dobiti iz jedne analize KKS-a (5, 17). Jedan od takvih analizatora je Sysmex analizator XN serije (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) koji koristi metodu protočne citometrije za dobivanje podataka o citoplazmatskoj aktivnosti i sastavnicama stanične membrane čime je omogućena klasifikacija i kvantifikacija neutrofila, limfocita i monocita s povećanom staničnom aktivnošću nastalih kao rezultat na upalni odgovor u organizmu (5, 17). Radi se o parametrima reaktivnosti (NEUT-RI) i granuliranosti (NEUT-GI) neutrofila, reaktivnim limfocitima (RE-LYMP), limfocitima koji sintetiziraju antitijela (AS-LYMP) te reaktivnim monocitima (RE-MONO) (18).

Uz monocite i makrofage, neutrofilni granulociti su glavne fagocitirajuće stanice ranog imunološkog odgovora organizma (19). Svaka upala dovodi do promjena u morfologiji i pokretljivosti neutrofila pa se kod reaktivnih neutrofila mogu uočiti

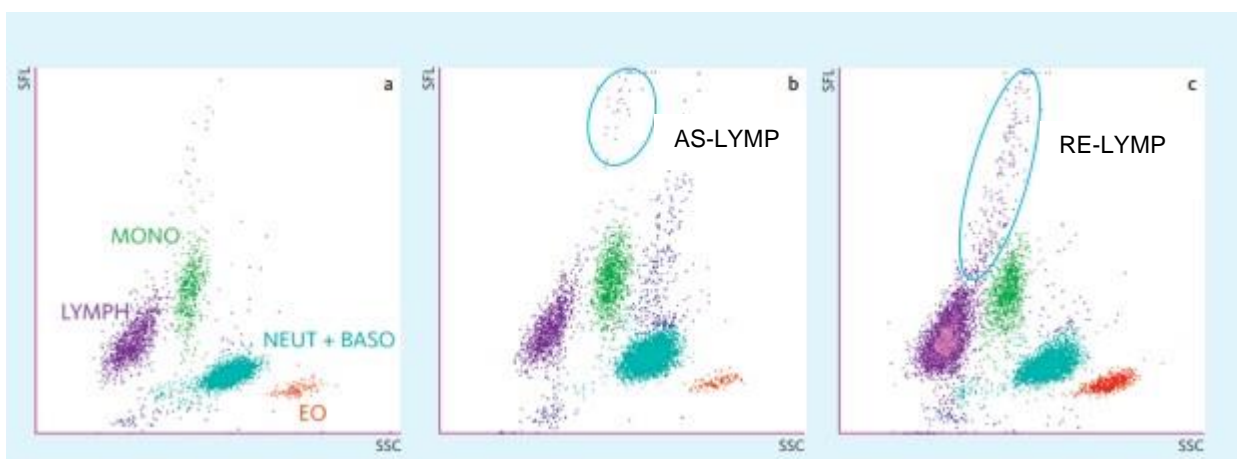
različite morfološke promjene koje uključuju toksičnu granulaciju, Dohleova tjelešca ili vakuolizaciju što nije uobičajena karakteristika neutrofila. NEUT-RI raste kod aktiviranih neutrofila jer oni imaju različiti sastav stanične membrane i veću aktivnost citoplazme zbog stvaranja citokina u odnosu na nepobuđene neutrofilne granulocite (18, 19). NEUT-GI raste s porastom unutrašnje složenosti neutrofila, koja je pak posljedica prisutnosti toksičnih granula ili vakuola te se povezuje s displazijom neutrofila (19, 20). Parametri aktivacije neutrofila upućuju na ranu aktivaciju imunološkog odgovora (19). Istraživanja su pokazala da su neutrofilni u bolesnika sa sepsom manji i slabije granulirani te pokazuju promjene u funkciji odnosno slabiju migraciju i kemotaksiju, što je također povezano s lošijim kliničkim ishodom bolesnika sa sepsom (21). Navedeno bi svakako trebalo utjecati na parametre aktivacije neutrofila. NEUT-RI je već prepoznat u ranijim istraživanjima kao važan parametar u dijagnostici infektivnih stanja i sepse (20). Slika 1. prikazuje parametre aktivacije neutrofila na leukocitnom citogramu.



Slika 1. Leukocitni citogram. Na x- osi je SSC signal koji je mjera granuliranosti i unutaršnje složenosti stanice. Na y- osi je SFL signal odnosno intenzitet fluorescencije koji odgovara sadržaju nukleinskih kiselina u stanici i ukazuje na

povećanu aktivnost ribonukleinskih kiselina. Preuzeto s: <https://www.sysmex-europe.com/academy/knowledge-centre/sysmex-parameters/neutrophil-activation/>

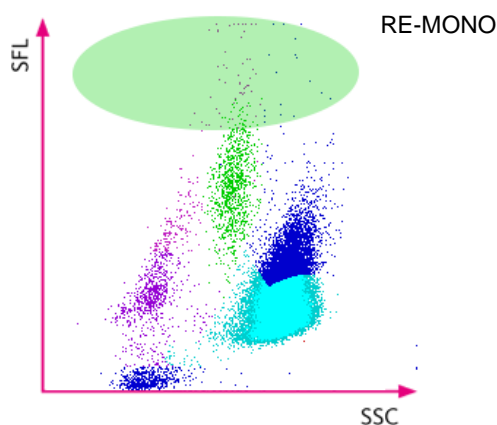
T- i B- limfociti su stanice koje kontroliraju stečeni imunološki odgovor organizma. RE-LYMP obuhvaćaju aktivirane CD4+ i CD8+ T-limfocite odnosno sve limfocite s većim signalima fluorescencije od normalnih limfocita koji su rezultat povećane stanične aktivnosti citoplazme (22). Te stanice imaju ulogu u ranom i stečenom, stanično posredovanom imunološkom odgovoru (23). AS-LYMP predstavljaju udio RE-LYMP koji obuhvaća isključivo aktivirane B-limfocite odnosno one stanice s najvećim signalima fluorescencije na leukocitnom citogramu (5, 19, 22). AS-LYMP ukazuju na prisutstvo plazma stanica koje imaju sposobnost proizvodnje antitijela, odnosno na stečeni humoralni imunološki odgovor organizma (18). Konačno, kombinacija RE-LYMP i AS-LYMP daje dodatnu informaciju o aktivaciji ranog i stečenog imunološkog odgovora (22). Slika 2. prikazuje leukocitne citograme s položajem AS-LYMP i RE-LYMP.



Slika 2. Leukocitni citogrami. a. Zdrave osobe, b. Bolesnici s prisutnim AS-LYMP, c. Bolesnici s prisutnim RE-LYMP. Na x-osi je SSC signal koji je mjera granularnosti i

unutarašnje složenosti stanice. Na y-osi je SFL signal odnosno intenzitet fluorescencije koji odgovara sadržaju nukleinskih kiselina u stanici i ukazuje na povećanu aktivnost ribonukleinskih kiselina. Preuzeto iz: Sysmex Educational Enhancement and Development Haematology: Looking deeper into inflammatory conditions from a laboratory and clinical perspective, 2018.

RE-MONO su reaktivni monociti prisutni u različitim infekcijama, a karakterizirani su heterogenošću veličine, morfologije i funkcije stanica te također imaju važnu ulogu u ranom imunološkom odgovoru (18). Slika 3. prikazuje leukocitni citogram s položajem RE-MONO.



Slika 3. Leukocitni citogram gdje zeleno zaokruženo područje predstavlja područje reaktivnih monocita. Na x-osi je SSC signal koji je mjera granuliranosti i unutrašnje složenosti stanice. Na y-osi je SFL signal odnosno intenzitet fluorescencije koji odgovara sadržaju nukleinskih kiselina u stanici i ukazuje na povećanu aktivnost ribonukleinskih kiselina. Preuzeto s: <https://www.sysmex-europe.com/academy/knowledge-centre/sysmex-parameters/reactive-monocytes-re-mono/>

Računski omjeri su jednostavni parametri za brzu procjenu upalnog sustava te pokazatelji sistemskog upalnog odgovora organizma (23, 24, 25). NLR se pokazao kao jednostavan i pouzdan parametar koji izvrsno odražava dinamičke promjena neutrofilnih granulocita i limfocita u upalnim stanjima odnosno stanični imunološki odgovor kao interakciju urođenog i stečenog imunološkog sustava (24). Vrijednosti NLR-a već iznad 2 ukazuju na blagi ili subklinički upalni stres u organizmu dok su više vrijednosti povezane s ozbiljnom upalom, sepsom, politraumom i terminalnim karcinomima (24). Također, NLR se pokazao korisnim u stratifikaciji mortaliteta kardioloških događaja, kao snažan prognostički faktor u nekoliko vrsta karcinoma, kao biljeg upalnih i infektivnih stanja te postoperativnih komplikacija (23, 25).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

COVID-19 bolest i sepsa karakterizirani su ranom aktivacijom imunološkog sustava te je za očekivati da će to dovesti do promjena različitih hematoloških pokazatelja.

Cilj ovog istraživanja je utvrditi dijagnostičku točnost dodatnih hematoloških parametara krvne slike dostupnih u rutinskoj dijagnostici za rano prepoznavanje infekcije COVID-19 i sepse. Dodatno, ispitali smo postoji li razlika u promatranim hematološkim parametrima između COVID-19 bolesnika i onih sa sepsom.

3. MATERIJAL I METODE

Istraživanje je provedeno u Odjelu za medicinsko biokemijsku djelatnost Opće bolnice Pula u razdoblju od studenog 2023. do svibnja 2024. godine. Svi potrebni podaci preuzeti su retrospektivno iz laboratorijskog informacijskog sustava BioNET LIS, ver.4.0.5.74. (In2 d.o.o., Zagreb, Hrvatska), stoga nije bilo potrebno dodatno uzorkovanje kod bolesnika i informirani pristanak bolesnika nije tražen. Istraživanje je provedeno tako da se osigura poštivanje temeljnih bioetičkih standarda te je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Opće bolnice Pula (klasa: 641-01/24-01/01; ubroj: 2168/01-59-79-112-24-9).

3.1. Ispitanici

U istraživanje je uključeno 200 bolesnika starijih od 18 godina čiji su uzorci krvi zaprimljeni u Odjelu za medicinsko biokemijsku djelatnost Opće bolnice Pula u navedenom razdoblju. Hematološki i onkološki bolesnici isključeni su iz istraživanja. Bolesnici su podijeljeni u tri skupine; kontrolna skupina i dvije skupine ovisno o etiologiji bolesti: bolesnici s dokazanom COVID-19 infekcijom te oni sa sepsom. Kriterij za podjelu bolesnika u skupine je pozitivan molekularni test na COVID-19 metodom lančane reakcije polimeraze za postavljanje dijagnoze COVID-19 bolesti odnosno postavljena dijagnoza sepse na temelju važećih kliničkih smjernica uz dodatan biokemijski pokazatelj, koncentraciju PCT-a veću od 2 µg/L. Kako bi bili uključeni u istraživanje, bolesnici su morali imati rezultate kompletne krvne slike odnosno hematoloških parametara od interesa te CRP-a i PCT-a u inicijalnim laboratorijskim nalazima prilikom prijema u bolnicu ili dolaska na objedinjeni hitni bolnički prijem. Kontrolnu skupinu čine bolesnici primarne zdravstvene zaštite,

upućeni na laboratorijsku obradu zbog različitih infektivnih stanja s izmjerenom koncentracijom CRP>5 mg/L.

Uzorci za navedene pretrage vađeni su u K₃EDTA epruvetu (3 mL, 13×75 mm; ref 454217, VACUETTE®, Greiner Bio One, Kremsmünster, Austrija) za hematološke parametre i serumsku epruvetu s aktivatorom zgrušavanja i gel separatorom (8 ml, 16x100 mm; ref 455071, VACUETTE®, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austrija) za određivanje koncentracije CRP-a i PCT-a. Prilikom uzorkovanja, poštovan je preporučeni redoslijed uzorkovanja epruveta te je s uzorcima postupano prema preporukama proizvođača. Svi uzorci analizirani su unutar jednog sata od uzorkovanja.

3.2. Metode

Kompletna krvna slika određena je na hematološkom analizatoru Sysmex XN-1500 (Sysmex Corporation, Kobe, Japan). Radi se o automatiziranim hematološkom analizatoru koji određuje krvnu sliku, 6-dijelnu diferencijalnu krvnu sliku i pritom nudi veliki broj dodatnih istraživačkih parametara. Analizator koristi spektrofotometrijsku metodu, metodu impedancije odnosno promjene otpora i protočnu citometriju, a dio parametara se izvodi računski.

Hematološki parametri koji su predmet ovog istraživanja prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. Hematološki parametri uključeni u istraživanje.

Hematološki parametar	Mjerna jedinica	
Lkc	$\times 10^9/L$	Broj leukocita
NEUT	$\times 10^9/L$	Apsolutni broj neutrofilnih granulocita
NEUT %	%	Relativni udio neutrofilnih granulocita
LYMPH	$\times 10^9/L$	Apsolutni broj limfocita
LYMPH %	%	Relativni udio limfocita
MONO	$\times 10^9/L$	Apsolutni broj monocita
MONO %	%	Relativni udio monocita
IG	$\times 10^9/L$	Apsolutni broj nezrelih granulocita unutar populacije neutrofilnih granulocita
IG %	%	Relativni udio nezrelih granulocita unutar populacije neutrofilnih granulocita
NEUT-RI	FI	Intenzitet reaktivnosti neutrofila
NEUT-GI	SI	Intenzitet granuliranosti neutrofila
RE-LYMP	$\times 10^9/L$	Apsolutni broj reaktivnih limfocita
RE-LYMP %	%	Relativni udio reaktivnih limfocita
RE-LYMP(L) %	% LYMPH	Udio reaktivnih limfocita unutar populacije limfocita
AS-LYMP	$\times 10^9/L$	Apsolutni broj limfocita koji sintetiziraju antitijela
AS-LYMP %	%	Relativni udio limfocita koji sintetiziraju antitijela
AS-LYMP(L) %	% LYMPH	Udio limfocita koji sintetiziraju antitijela unutar populacije limfocita
HFLC	$\times 10^9/L$	Apsolutni broj visokofluorescentnih limfoidnih stanica
HFLC %	%	Relativni udio visokofluorescentnih limfoidnih stanica
RE-MONO	$\times 10^9/L$	Apsolutni broj reaktivnih monocita
RE-MONO %	%	Relativni udio reaktivnih monocita
RE-MONO(M) %	% MONO	Udio reaktivnih monocita unutar populacije monocita
NLR		Omjer apsolutnog broja neutrofilnih granulocita i limfocita
MLR		Omjer apsolutnog broja monocita i limfocita
IGLR		Omjer apsolutnog broja nezrelih granulocita i limfocita

CRP je određen na biokemijskom analizatoru Cobas c503 (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka) imunoturbidimetrijskom metodom, a PCT elektrokemiluminescentnom metodom na imunokemijskom analizatoru Cobas e801 (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka) uporabom originalnih reagensa proizvođača.

3.3. Statistička obrada podataka

Normalnost razdiobe ispitana je Shapiro-Wilk testom te su rezultati prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom (IQR) s obzirom na njihovu nenormalnu razdiobu. Kako bi utvrdili statističku razliku promatranih parametara između COVID-19 bolesnika i kontrolne skupine, bolesnika sa sepsom i kontrolne skupine te COVID-19 bolesnika i bolesnika sa sepsom korišten je neparametrijski Mann-Whitney test. Dodatno, oni parametri kod kojih je dobivena statistička značajna razlika između promatranih skupina prikazani su grafikonom u obliku kutije i brkova (engl. *box and whisker plot*). Nadalje, izračunate su mjere dijagnostičke točnosti za ispitane parametre: površina ispod krivulje (AUC), osjetljivost (Sn), specifičnost (Sp) uz pripadajuće 95% intervale pouzdanosti (95%CI) i optimalna granična vrijednost pojedinih parametara za COVID-19 i sepsu. Navedene mjere dobivene su ROC analizom (engl. *Receiver Operating Characteristic analysis*). P-vrijednost $<0,05$ je smatrana statistički značajnom.

Prikupljeni podaci analizirani su u statističkom programu Medcalc®, verzija 20.104 (MedCalc Software, Ostend, Belgium).

4. REZULTATI

U ovo retrospektivno istraživanje uključeno je 200 bolesnika:102 muškarca i 98 žena s medijanom dobi od 67 (raspon: 18-96) godina.

U Tablici 2. prikazani su rezultati usporedbe ispitivanih parametara između promatranih skupina bolesnika: kontrolne skupine, bolesnika s COVID-19 infekcijom i bolesnika sa sepsom.

Tablica 2. Rezultati usporedbe ispitanih hematoloških i biokemijskih pokazatelja između skupina ispitanika.

Parametar (mjerna jedinica)	Kontrolna skupina (N=75)	COVID-19 (N=68)	P ^a	Sepsa (N=57)	P ^b	P ^c
Lkc (x10 ⁹ /L)	8,3 (6,0-12,5)	8,4 (6,6-11,8)	P=0,894	16,8 (10,0-22,2)	P<0,001*	P<0,001*
NEUT (x10 ⁹ /L)	5,10 (3,25 (8,99))	6,38 (4,29-10,48)	P=0,050	15,01 (8,62-19,19)	P<0,001*	P<0,001*
NEUT % (%)	61,8 (54,3-71,1)	80,2 (71,1-83,9)	P<0,001*	88,6 (83,7-91,7)	P<0,001*	P<0,001*
LYMPH (x10 ⁹ /L)	2,00 (1,36-2,62)	1,00 (0,71-1,72)	P<0,001*	0,83 (0,52-1,36)	P<0,001*	P=0,056
LYMPH % (%)	24,0 (17,8-32,3)	12,2 (8,4-17,2)	P<0,001*	5,5 (3,3-9,1)	P<0,001*	P<0,001*
MONO (x10 ⁹ /L)	0,75 (0,55-1,10)	0,70 (0,50-1,05)	P=0,283	0,75 (0,52-1,23)	P=0,860	P=0,459

Tablica 2. (nastavak) Rezultati usporedbe ispitanih hematoloških i biokemijskih pokazatelja između skupina ispitanika.

Parametar (mjerna jedinica)	Kontrolna skupina (N=75)	COVID-19 (N=68)	P ^a	Sepsa (N=57)	P ^b	P ^c
MONO % (%)	8,9 (7,1-11,5)	7,6 (6,3-11,1)	P=0,053	4,9 (3,5-7,4)	P<0,001*	P<0,001*
IG (x10 ⁹ /L)	0,04 (0,02-0,07)	0,04 (0,02-0,09)	P=0,217	0,17 (0,10-0,55)	P<0,001*	P<0,001*
IG % (%)	0,4 (0,3-0,6)	0,4 (0,4-0,8)	P=0,056	1,4 (0,7-3,8)	P<0,001*	P<0,001*
NEUT-RI (FI)	48,5 (46,0-51,4)	47,6 (45,6-50,1)	P=0,401	53,7 (48,7-60,8)	P<0,001*	P<0,001*
NEUT-GI (SI)	150,8 (147,6-153,3)	148,8 (145,9-152,2)	P=0,102	152,7 (147,7-156,5)	P=0,108	P=0,010*
RE-LYMP (x10 ⁹ /L)	0,14 (0,08-0,21)	0,06 (0,02-0,12)	P<0,001*	0,06 (0,05-0,12)	P<0,001*	P=0,331
RE-LYMP % (%)	1,7 (1,0-2,6)	0,9 (0,4-1,4)	P<0,001*	0,3 (0,2-0,7)	P<0,001*	P<0,001*
RE-LYMP(L) (%)	7,2 (4,5-9,8)	6,8 (3,4-12,0)	P=0,802	7,0 (4,0-11,7)	P=0,923	P=0,955
AS-LYMP (x10 ⁹ /L)	0,02 (0,01-0,04)	0,01 (0-0,04)	P=0,266	0,01 (0-0,02)	P=0,002*	P=0,036*
AS-LYMP % (%)	0,2 (0,1-0,6)	0,0 (0-0,1)	P=0,323	0,2 (0-0,4)	P<0,001*	P<0,001*

Tablica 2. (nastavak) Rezultati usporedbe ispitanih hematoloških i biokemijskih pokazatelja između skupina ispitanika.

Parametar (mjerna jedinica)	Kontrolna skupina (N=75)	COVID-19 (N=68)	P ^a	Sepsa (N=57)	P ^b	P ^c
AS-LYMP(L) (%)	1,1 (0,4-2,2)	1,5 (0-3,4)	P=0,308	0,6 (0-2,6)	P=0,338	P=0,124
HFLC (x10 ⁹ /L)	0,02 (0,01-0,04)	0,01 (0-0,04)	P=0,308	0,01 (0-0,01)	P=0,001*	P=0,021*
HFLC % (%)	0,2 (0,1-0,6)	0,2 (0,1-0,3)	P=0,270	0 (0-0,1)	P<0,001*	P=0,001*
RE-MONO (x10 ⁹ /L)	0,0 (0-0,01)	0 (0-0,01)	P=0,729	0,01 (0-0,03)	P<0,001*	P<0,001*
RE-MONO % (%)	0 (0-0,1)	0 (0-0,1)	P=0,964	0,1 (0-0,2)	P<0,001*	P<0,001*
RE-MONO(M) (%)	0 (0-0,9)	0 (0-0,9)	P=0,688	1,9 (0-4,7)	P<0,001*	P<0,001*
NLR	2,41 (1,78-4,09)	6,52 (4,27-9,35)	P<0,001*	16,49 (9,23-27,05)	P<0,001*	P<0,001*
MLR	0,37 (0,28-0,61)	0,63 (0,45-1,07)	P<0,001*	0,83 (0,56-1,34)	P<0,001*	P=0,016*
IGLR	0,02 (0,01-0,04)	0,04 (0,02-0,10)	P<0,001*	0,23 (0,11-0,63)	P<0,001*	P<0,001*
CRP (mg/L)	24,9 (10,1-70,8)	81,0 (18,9-134,5)	P=0,001*	213 (129,5-296,5)	P<0,001*	P<0,001*
PCT (µg/L)	/	/	/	9,60 (4,16-37,8)	/	/

Podaci su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom (IQR). $P < 0,05$ je smatrana statistički značajnom. ^a P-vrijednost dobivena ispitivanjem razlike između kontrolne skupine i bolesnika s COVID-19 infekcijom. ^b P-vrijednost dobivena ispitivanjem razlike između kontrolne skupine i bolesnika sa sepsom. ^c P-vrijednost dobivena ispitivanjem razlike između bolesnika s COVID-19 infekcijom i sepsom * statistički značajna P-vrijednost dobivena neparametrijskim Mann-Whitney testom.

COVID-19 – koronavirusna bolest 2019, Lkc – broj leukocita, NEUT – broj neutrofilnih granulocita, LYMPH – broj limfocita, MONO – broj monocita, IG – broj nezrelih granulocita, NEUT-RI – intenzitet reaktivnosti neutrofila, NEUT-GI – intenzitet granuliranosti neutrofila, RE-LYMP – reaktivni limfociti, AS-LYMP – limfociti koji sintetiziraju antitijela, HFLC – visokofluorescentne limfoidne stanice, RE-MONO – reaktivni monociti, NLR – omjer broja neutrofilnih granulocita i limfocita, MLR – omjer broja monocita i limfocita, IGLR – omjer broja nezrelih granulocita i limfocita, CRP – C-reaktivni protein, PCT – prokalcitonin. Parametri s % kao mjernom jedinicom pokazuju relativne udjele pojedinih hematoloških parametara.

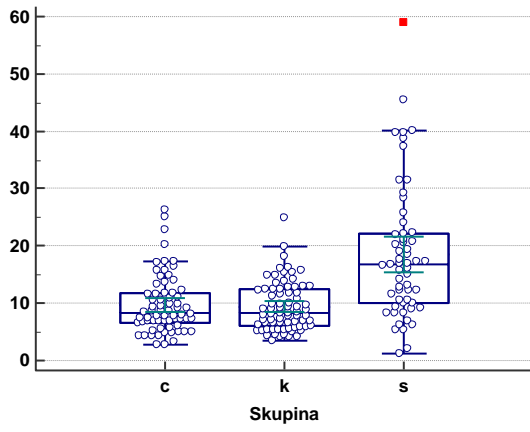
Dobiveni rezultati pokazali su da postoji statistički značajna razlika u relativnom udjelu neutrofilnih granulocita, broju limfocita i reaktivnih limfocita, računskim omjerima: NLR-u, MLR-u i IGLR-u te CRP-u između COVID-19 bolesnika i kontrolne skupine. Relativni udio neutrofilnih granulocita je statistički značajno viši u COVID-19 bolesnika uz posljedično statistički značajno niži broj limfocita te višu koncentraciju CRP-a. Nadalje, rezultati su pokazali statistički značajnu razliku u broju reaktivnih limfocita, međutim njihov je broj viši u kontrolnoj skupini u odnosu na skupinu COVID-19 bolesnika, ali uz izmjeren nizak broj reaktivnih limfocita općenito te preklapanje interkvartilnih raspona među promatranim skupinama. Što se tiče računskih omjera, rezultati su pokazali statistički značajno više vrijednosti sva tri omjera u COVID-19 bolesnika u odnosu na kontrolnu skupinu.

S druge strane, postoji statistički značajna razlika gotovo svih promatranih pokazatelja u bolesnika sa sepsom u odnosu na kontrolnu skupinu. U tih bolesnika prisutan je statistički značajno veći broj leukocita, neutrofilnih granulocita, nezrelih granulocita, NEUT-RI te CRP-a i računskih omjera; NLR-a, MLR-a i IGLR-a uz statistički značajno niži broj limfocita, reaktivnih limfocita i relativni udio monocita u odnosu na kontrolnu skupinu. Pojava reaktivnih monocita pokazala se kao jedinstvena karakteristika u ove skupine bolesnika.

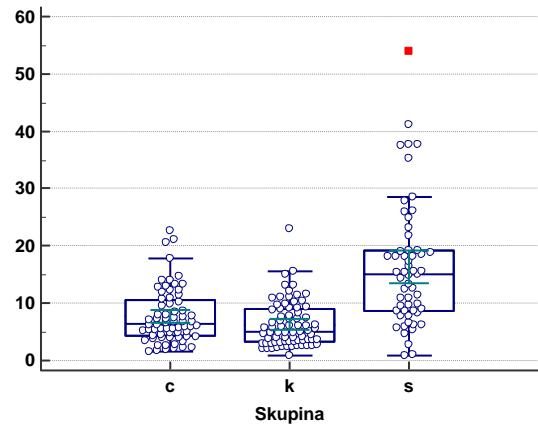
Konačno, dobiveni rezultati pokazali su statistički značajnu razliku za gotovo sve promatrane parametre između bolesnika s COVID-19 infekcijom i sepsom osim za AS-LYMP(L) i RE-LYMP(L) te apsolutni broj limfocita, monocita i reaktivnih limfocita. Sepsu karakterizira leukocitoza uz izraženiju neutrofiliju i limfopeniju, više vrijednosti CRP-a i računskih omjera te porast IG, NEUT-RI i RE-MONO u odnosu na COVID-19 bolesnike.

Rezultati onih parametara za koje je dobivena statistički značajna razlika, dodatno su prikazani i grafički na Slici 4.

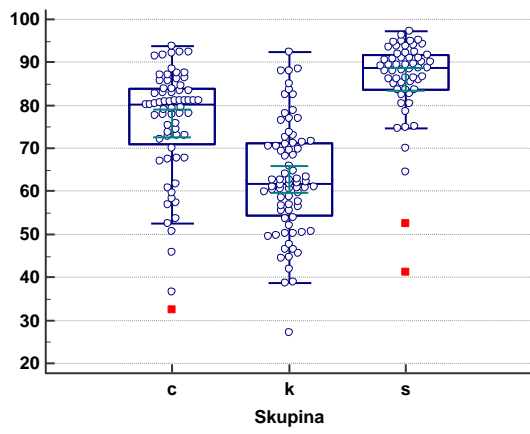
A



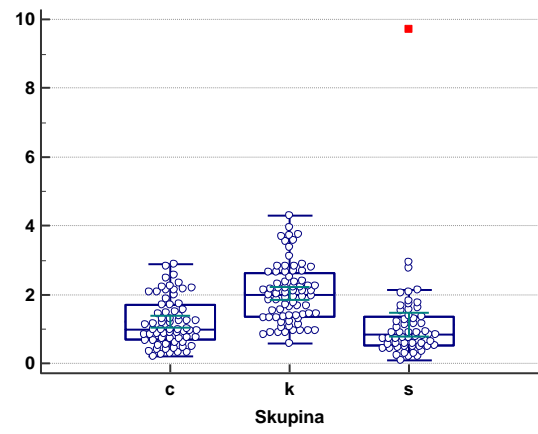
B



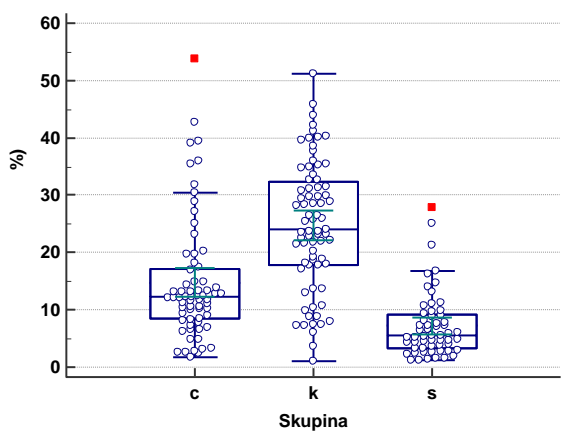
C



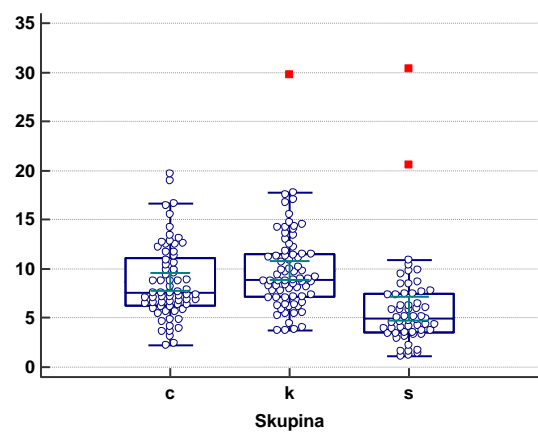
D

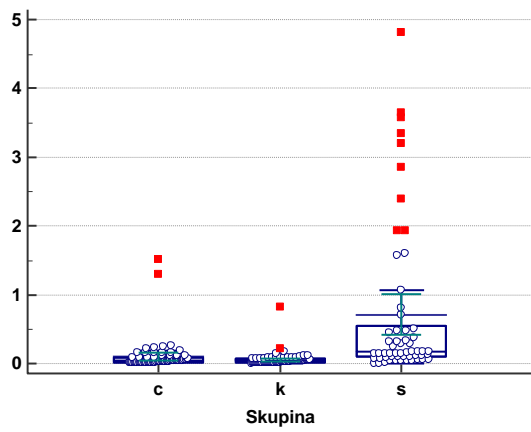
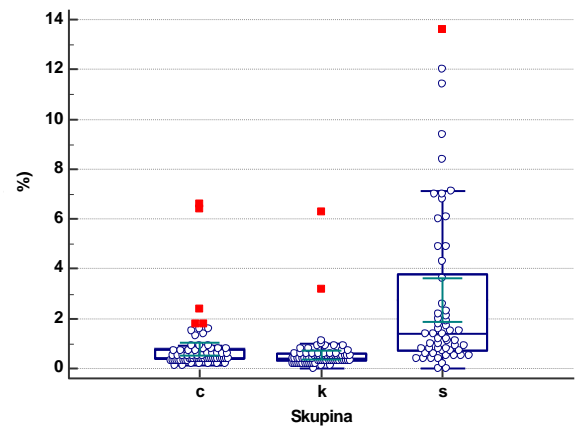
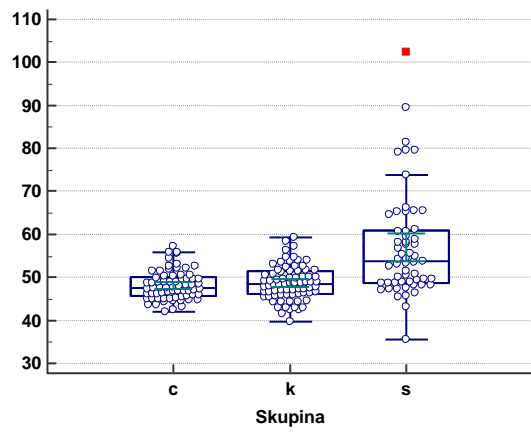
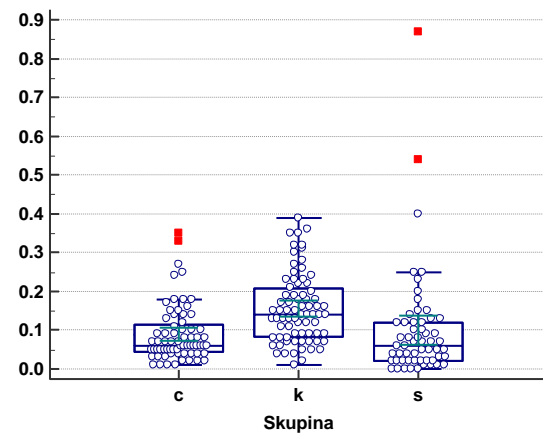
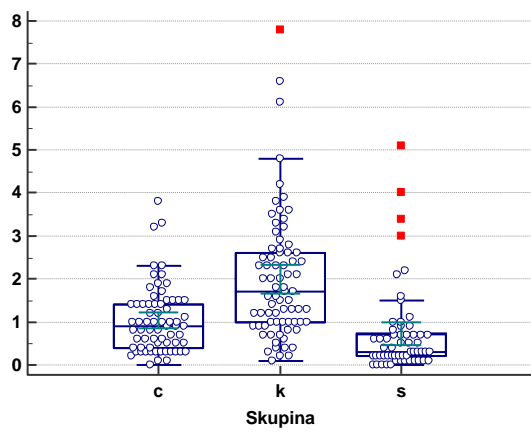
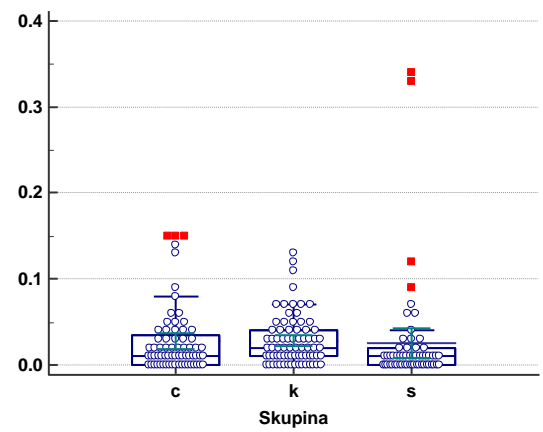


E

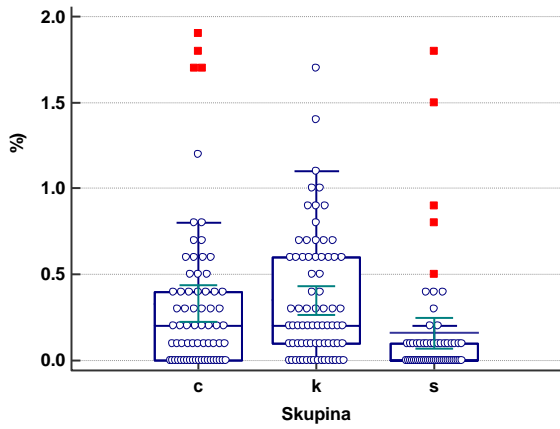


F

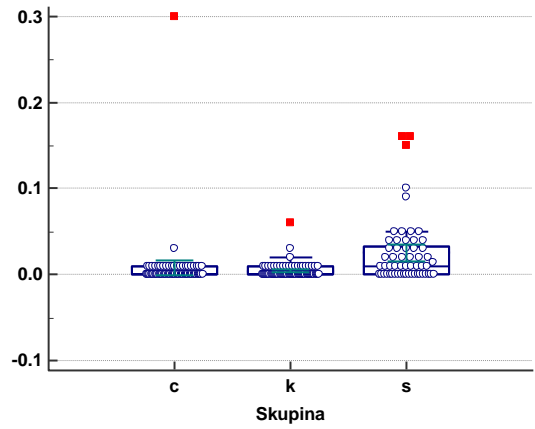


G**H****I****J****K****L**

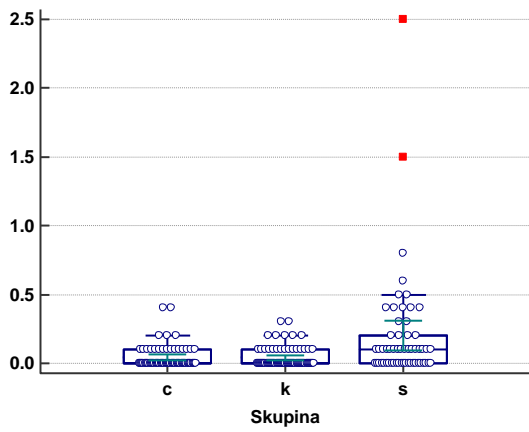
M



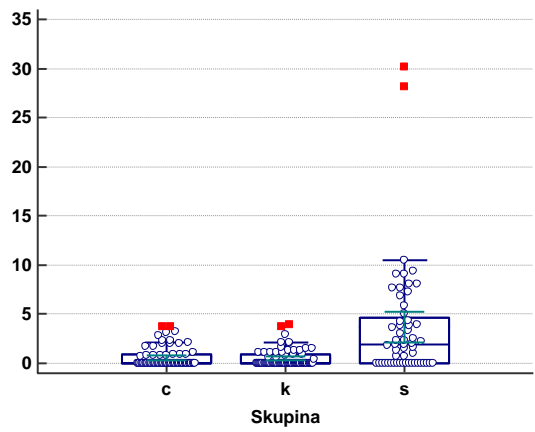
N



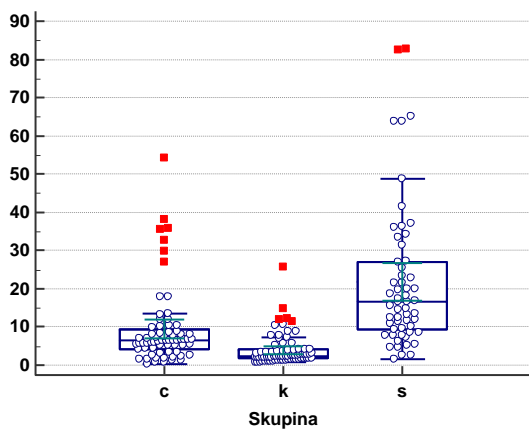
O



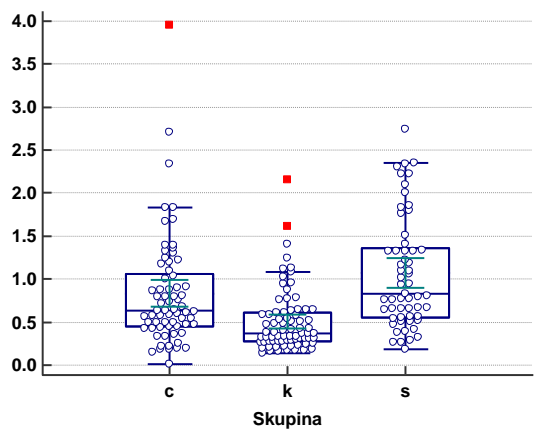
P



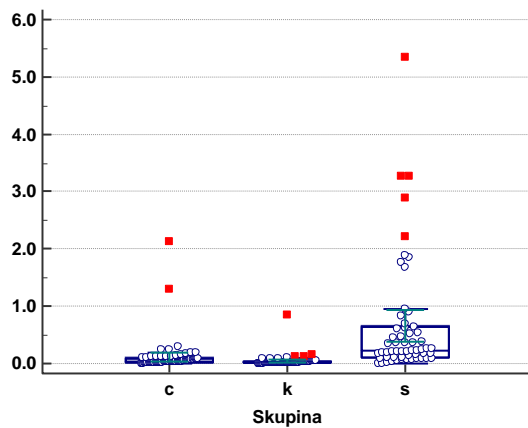
R



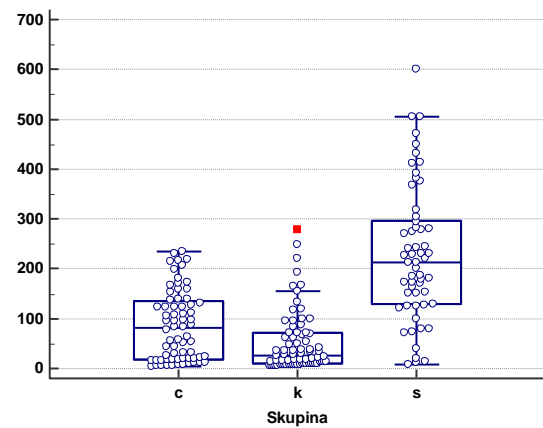
S



T



U



Slika 4. Usporedba hematoloških parametara i C-reaktivnog proteina između različitih skupina bolesnika.

c – bolesnici s COVID-19 infekcijom, k – kontrolna skupina, s – bolesnici sa sepsom. A – broj leukocita. B – apsolutni broj neutrofilnih granulocita (NEUT). C – relativni udio NEUT. D – apsolutni broj limfocita (LYMPH). E – relativni udio LYMPH. F – relativni udio monocita (MONO). G – apsolutni broj nezrelih granulocita (IG). H – relativni udio IG. I – intenzitet reaktivnosti neutrofila (NEUT-RI). J – apsolutni broj reaktivnih limfocita (RE-LYMP). K – relativni udio RE-LYMP. L – apsolutni broj limfocita koji sintetiziraju antitijela (AS-LYMP). M – relativni udio AS-LYMP. N – apsolutni broj reaktivnih monocita (RE-MONO). O – relativni udio RE-MONO. P – udio RE-MONO unutar populacije monocita. R – omjer apsolutnog broja neutrofilnih granulocita i limfocita (NLR). S – omjer apsolutnog broja monocita i limfocita (MLR). T – omjer apsolutnog broja nezrelih granulocita i limfocita (IGLR). U – koncentracija C-reaktivnog proteina (CRP). Rezultati su prikazani kao medijani s pripadajućim interkvartilnim rasponima. Crveno su označene vrijednosti koje odstupaju od interkvartilnog raspona.

U Tablici 3. i Tablici 4. prikazani su rezultati pokazatelja dijagnostičke točnosti hematoloških parametara i CRP-a u bolesnika s COVID-19 infekcijom odnosno sepsom.

Tablica 3. Dijagnostička točnost hematoloških pokazatelja i CRP-a u bolesnika s COVID-19 infekcijom.

COVID-19 infekcija					
Parametar	AUC (95% CI)	P- vrijednost	Optimalna granična vrijednost	Osjetljivost (95% CI)	Specifičnost (95% CI)
Lkc	0,506 (0,422-0,591)	P=0,895	>6,65 x10 ⁹ /L	75,0 (63,0-84,7)	33,3 (22,9-45,2)
NEUT	0,595 (0,510-0,676)	P=0,047	>5,13 x10 ⁹ /L	67,7 (55,2-78,5)	52,0 (40,2-63,7)
NEUT %	0,772 (0,694-0,838)	P<0,001*	>71,6 %	75,0 (63,0-84,7)	78,7 (67,7-87,3)
LYMPH	0,764 (0,686-0,831)	P<0,001*	≤1,29 x10 ⁹ /L	64,7 (52,2-75,9)	80,0 (69,2-88,4)
LYMPH %	0,750 (0,670-0,818)	P<0,001*	≤17,5 %	76,5 (64,6-85,9)	77,3 (66,2-86,2)
MONO	0,552 (0,467-0,635)	P=0,286	≤0,44 x10 ⁹ /L	19,1 (10,6-30,5)	93,3 (85,1-97,8)
MONO %	0,594 (0,509-0,675)	P=0,051	≤7,7 %	54,4 (41,9-66,5)	70,7 (59,0-80,6)
IG	0,560 (0,474-0,642)	P=0,216	>0,1 x10 ⁹ /L	23,5 (14,1-35,4)	92,0 (83,4-97,0)
IG %	0,592 (0,507-0,673)	P=0,052	>0,3 %	76,5 (64,6-85,9)	41,3 (30,1-53,3)

Tablica 3. (nastavak) Dijagnostička točnost hematoloških pokazatelja i CRP-a u bolesnika s COVID-19 infekcijom.

COVID-19 infekcija					
Parametar	AUC (95% CI)	P- vrijednost	Optimalna granična vrijednost	Osjetljivost (95% CI)	Specifičnost (95% CI)
NEUT-RI	0,541 (0,456-0,624)	P=0,401	≤49,8 FI	75,0 (63,0-84,7)	36,0 (25,2-47,9)
NEUT-GI	0,579 (0,494-0,661)	P=0,103	≤149,5 SI	55,9 (43,3-67,9)	66,7 (54,8-77,1)
RE-LYMP	0,745 (0,665-0,814)	P<0,001*	≤0,1 x10 ⁹ /L	73,5 (61,4-83,5)	68,0 (56,2-78,3)
RE-LYMP %	0,726 (0,645-0,797)	P<0,001*	≤1,5 %	82,4 (71,2-90,5)	53,3 (41,4-64,9)
RE- LYMP(L) %	0,512 (0,427-0,597)	P=0,806	≤4,3 % LYMPH	32,4 (21,5-44,8)	80,0 (69,2-88,4)
AS-LYMP	0,553 (0,468-0,636)	P=0,267	≤0,02 x10 ⁹ /L	67,7 (55,2-78,5)	44,0 (32,5-55,9)
AS-LYMP %	0,547 (0,462-0,631)	P=0,323	≤0,5 %	80,9 (69,5-89,4)	30,7 (20,5-42,4)
AS- LYMP(L) %	0,549 (0,464-0,632)	P=0,320	>3 % LYMPH	30,8 (20,2-43,3)	86,7 (76,8-93,4)
HFLC	0,549 (0,463-0,632)	P=0,309	≤0,02 x10 ⁹ /L	66,2 (53,7-77,2)	44,0 (32,5-55,9)

Tablica 3. (nastavak) Dijagnostička točnost hematoloških pokazatelja i CRP-a u bolesnika s COVID-19 infekcijom.

COVID-19 infekcija					
Parametar	AUC (95% CI)	P- vrijednost	Optimalna granična vrijednost	Osjetljivost (95% CI)	Specifičnost (95% CI)
HFLC %	0,553 (0,468-0,636)	P=0,269	≤0,5 %	80,9 (69,5-89,4)	30,7 (20,5-42,4)
RE-MONO	0,514 (0,429-0,598)	P=0,728	>0 x10 ⁹ /L	33,8 (22,8-46,3)	69,3 (57,6-79,5)
RE-MONO %	0,502 (0,417-0,586)	P=0,502	≤0,3 %	97,1 (89,8-99,6)	0,0 (0,0-4,8)
RE- MONO(M) %	0,516 (0,431-0,601)	P=0,688	>1,6 % MONO	19,4 (10,8-30,9)	91,9 (83,2-97,0)
NLR	0,744 (0,664-0,813)	P<0,001*	>4,13	76,5 (64,6-85,9)	78,7 (67,7-87,3)
MLR	0,696 (0,613-0,770)	P<0,001*	>0,42	80,9 (69,5-89,4)	56,0 (44,1-67,5)
IGLR	0,710 (0,628-0,783)	P<0,001*	>0,02	70,6 (58,3-81,0)	64,0 (52,1-74,8)
CRP (mg/L)	0,659 (0,575-0,736)	P<0,001*	>71,7 mg/L	51,5 (39,0-63,8)	78,7 (67,7-87,3)

AUC – površina ispod krivulje. 95% CI – interval pouzdanosti od 95%. Optimalna granična vrijednost je izabrana prema Youden-ovom indeksu. P-vrijednost $<0,05$ je smatrana statistički značajnom. * statistički značajna P-vrijednost.

COVID-19 – koronavirusna bolest 2019, Lkc – broj leukocita, NEUT – broj neutrofilnih granulocita, LYMPH – broj limfocita, MONO – broj monocita, IG – broj nezrelih granulocita, NEUT-RI – intenzitet reaktivnosti neutrofila, NEUT-GI – intenzitet granuliranosti neutrofila, RE-LYMP – reaktivni limfociti, AS-LYMP – limfociti koji sintetiziraju antitijela, HFLC – visokofluorescentne limfoidne stanice, RE-MONO – reaktivni monociti, NLR – omjer broja neutrofilnih granulocita i limfocita, MLR – omjer broja monocita i limfocita, IGLR – omjer broja nezrelih granulocita i limfocita, CRP – C-reaktivni protein.

Dobra dijagnostička točnost u COVID-19 infekciji uz AUC $>0,7$ dobivena je za relativni udio neutrofilnih granulocita, apsolutni i relativni udio limfocita, reaktivne limfocite, NLR i IGLR. Rezultati su pokazali da su RE-LYMP $\geq 1,5$ % odnosno AS-LYMP $\geq 0,5$ % prisutni u 82,4 % odnosno 80,9 % bolesnika s COVID-19 infekcijom.

Tablica 4. Dijagnostička točnost hematoloških pokazatelja i CRP-a u bolesnika sa sepsom.

Sepsa					
Parametar	AUC (95% CI)	P- vrijednost	Optimalna granična vrijednost	Osjetljivost (95%CI)	Specifičnost (95% CI)
Lkc	0,784 (0,704-0,851)	P<0,001*	>16,06x10 ⁹ /L	54,4 (40,7- 67,6)	94,7 (86,9-98,5)
NEUT	0,837 (0,763-0,895)	P<0,001*	>7,64 x10 ⁹ /L	80,7 (68,1-90,0)	70,7 (59,0-80,6)
NEUT %	0,921 (0,861-0,961)	P<0,001*	>78,1 %	87,7 (76,3-94,9)	88,0 (78,4-94,4)
LYMPH	0,841 (0,768-0,899)	P<0,001*	≤0,93 x10 ⁹ /L	61,4 (47,6-74,0)	93,3 (85,1-97,8)
LYMPH %	0,914 (0,853-0,956)	P<0,001*	≤16,8 %	94,7 (85,4 - 98,9)	78,8 (67,7-87,3)
MONO	0,509 (0,421-0,597)	P=0,865	≤0,33 x10 ⁹ /L	17,5 (8,7-29,9)	98,7 (92,8-100,0)
MONO %	0,821 (0,745-0,882)	P<0,001*	≤6,1 %	66,7 (52,9-78,6)	86,7 (76,8-93,4)
IG	0,870 (0,800-0,922)	P<0,001*	>0,09 x10 ⁹ /L	75,4 (62,2-85,9)	90,7 (81,7-96,2)
IG %	0,849 (0,776-0,905)	P<0,001*	>0,6 %	77,2 (64,2-87,3)	84,0 (73,7-91,4)

Tablica 4. (nastavak) Dijagnostička točnost hematoloških pokazatelja i CRP-a u bolesnika sa sepsom.

Sepsa					
Parametar	AUC (95% CI)	P- vrijednost	Optimalna granična vrijednost	Osjetljivost (95%CI)	Specifičnost (95% CI)
NEUT-RI	0,758 (0,676-0,828)	P<0,001*	>52,7 FI	56,1 (42,4-69,3)	85,3 (75,3-92,4)
NEUT-GI	0,582 (0,493-0,667)	P=0,118	>153,3 SI	47,4 (34,0-61,0)	80,0 (69,2-88,4)
RE-LYMP	0,747 (0,664-0,819)	P<0,001*	≤0,12 x10 ⁹ /L	77,2 (64,2-87,3)	61,3 (49,4-72,4)
RE-LYMP %	0,835 (0,761-0,894)	P<0,001*	≤0,7 %	75,4 (62,2-85,9)	84,0 (73,7-91,4)
RE- LYMP(L) %	0,505 (0,417-0,593)	P=0,927	≤3,4 % LYMPH	28,1 (17,0-41,5)	88,0 (78,4-94,4)
AS-LYMP	0,658 (0,570-0,738)	P=0,001*	≤0,01 x10 ⁹ /L	73,7 (60,3-84,5)	57,3 (45,4-68,7)
AS-LYMP %	0,717 (0,632-0,792)	P<0,001*	≤0,1 %	80,7 (68,1-90,0)	61,3 (49,4-72,4)
AS- LYMP(L) %	0,549 (0,460-0,635)	P=0,358	≤0,3 % LYMPH	43,9 (30,7-57,6)	77,3 (66,2-86,2)
HFLC	0,665 (0,578-0,745)	P<0,001*	≤0,01 x10 ⁹ /L	75,4 (62,2-85,9)	57,3 (45,4-68,7)

Tablica 4. (nastavak) Dijagnostička točnost hematoloških pokazatelja i CRP-a u bolesnika sa sepsom.

Sepsa					
Parametar	AUC (95% CI)	P- vrijednost	Optimalna granična vrijednost	Osjetljivost (95%CI)	Specifičnost (95% CI)
HFLC %	0,717 (0,632-0,792)	P<0,001*	≤0,1 %	80,7 (68,1-90,0)	61,3 (49,4-72,4)
RE-MONO	0,721 (0,636-0,795)	P<0,001*	>0,01 x10 ⁹ /L	45,6 (32,4-59,3)	96,0 (88,8-99,2)
RE-MONO %	0,669 (0,582-0,748)	P<0,001*	>0 %	57,9 (44,1-70,9)	70,7 (59,0-80,6)
RE- MONO(M) %	0,736 (0,651-0,809)	P<0,001*	>1,5 % MONO	55,4 (41,5-68,7)	90,5 (81,5-96,1)
NLR	0,923 (0,863-0,962)	P<0,001*	>4,13	94,7 (85,4-98,9)	78,7 (67,7-87,3)
MLR	0,802 (0,724-0,866)	P<0,001*	>0,64	70,2 (56,6-81,6)	81,3 (70,7-89,4)
IGLR	0,926 (0,867-0,964)	P<0,001*	>0,06	91,2 (80,7-97,1)	89,3 (80,1-95,3)
CRP	0,900 (0,835-0,945)	P<0,001*	>120 mg/L	82,5 (70,1-91,3)	89,3 (80,1-95,3)

AUC – površina ispod krivulje. 95% CI – interval pouzdanosti od 95%. Optimalna granična vrijednost je izabrana prema Youden-ovom indeksu. P-vrijednost $<0,05$ je smatrana statistički značajnom. * statistički značajna P-vrijednost.

COVID-19 – koronavirusna bolest 2019, Lkc – broj leukocita, NEUT – broj neutrofilnih granulocita, LYMPH – broj limfocita, MONO – broj monocita, IG – broj nezrelih granulocita, NEUT-RI – intenzitet reaktivnosti neutrofila, NEUT-GI – intenzitet granuliranosti neutrofila, RE-LYMP – reaktivni limfociti, AS-LYMP – limfociti koji sintetiziraju antitijela, HFLC – visokofluorescentne limfoidne stanice, RE-MONO – reaktivni monociti, NLR – omjer broja neutrofilnih granulocita i limfocita, MLR – omjer broja monocita i limfocita, IGLR – omjer broja nezrelih granulocita i limfocita, CRP – C-reaktivni protein.

Neutrofilija, s relativnim udjelom neutrofila $>78,1$ % te limfopenija, s relativnim udjelom limfocita $<16,8$ %, NLR $>4,13$, IGLR $>0,06$ te CRP >120 mg/L pokazuju visoku osjetljivost čime se ističu kao korisni pokazatelji u ranoj dijagnostici bolesnika sa sepsom. Navedeni parametri pokazali su izvrsnu dijagnostičku točnost s AUC $>0,9$ dobivenu ROC analizom. Vrlo dobru dijagnostičku točnost s AUC $>0,8$ pokazali su broj nezrelih granulocita s visokom dijagnostičkom specifičnošću te RE-LYMP % i MLR. Konačno, broj leukocita i NEUT-RI pokazali su dobru dijagnostičku točnost za dijagnozu sepse s AUC $>0,7$ uz specifičnost od 94,7 % za broj leukocita odnosno 85,3 % za NEUT-RI. Također, pojava reaktivnih monocita pokazuje dobru dijagnostičku točnost odnosno visoku specifičnost u ovoj skupini bolesnika.

5. RASPRAVA

COVID-19 infekciju karakteriziraju promjene u hematološkim parametrima koje uključuju neutrofiliju, limfopeniju uz povišenje ukupnog broja leukocita, NLR-a te porast koncentracije CRP-a kao pozitivnog reaktanta akutne faze (26, 27). Navedeni parametri povezani su s progresijom bolesti i lošijim kliničkim ishodom (26). Jedinstvene karakteristike ovih hematoloških parametara u ovoj specifičnoj virusnoj infekciji potvrđene su i rezultatima ovog istraživanja.

Već 2020. godine tijekom prvog vala pandemije COVID-19, Osman i sur. ukazali su na karakterističan izgled leukocitnog citograma koji ukazuje na prisutstvo plazmacitoidnih limfocita, dodatno potvrđenih mikroskopskim pregledom razmaza periferne krvi (28). U bolesnika s COVID-19 bolesti dobivena je osjetljivost od 85,9 % i specifičnost od 83,9 % što ukazuje da bi nalaz KKS mogao biti vrijedan za ranu kategorizaciju bolesnika s vjerojatnom COVID-19 infekcijom (28). Općenito, COVID-19 karakterizira povišenje parametara aktivacije neutrofila (NEUT-RI i NEUT-GI), pojava IG, RE-LYMP i AS-LYMP (22). Nadalje, u istraživanju koje su proveli Lapić i sur. parametri aktivacije neutrofila bili su viši u COVID-19 bolesnika u usporedbi s bolesnicima s ostalim respiratornim infekcijama (17). Ipak, zbog preklapanja vrijednosti u skupinama zaključili su da je aktivacija neutrofila u ranoj fazi bolesti tek počela i nije značajno utjecala na navedene parametre te su u svrhu pouzdanijeg razumijevanja dobivenih rezultata predložili njihovo longitudinalno praćenje (17). Također, u navedenom je istraživanju utvrđena povezanost prisutnosti nezrelih granulocita s nespecifičnom aktivacijom imunološkog sustava koja je prisutna u različitim infekcijama i stanjima, dok se NLR nije pokazao korisnim biljegom u ranom stadiju COVID-19 infekcije (17). Kao najveći stručni doprinos svog istraživanja, ističu

povišene vrijednosti RE-LYMP i AS-LYMP što govori u prilog aktivaciji stanične imunosti i proizvodnji antitijela odmah nakon pojave simptoma bolesti (17). Pojava AS-LYMP u bolesnika s respiratornim infekcijama može navesti kliničara da posumnja upravo na infekciju COVID-19 (17). U skladu s time su i rezultati iz istraživanja Urrechaga i sur. koji su dodatno predložili graničnu vrijednost veću od 6% RE-LYMP i $NLR >3.3$ kao karakteristiku COVID-19 infekcije u usporedbi s infekcijama druge etiologije (5). Zanimljivo, niže vrijednosti AS-LYMP pri prijemu u bolnicu pokazale su se nezavisnim prediktorom mortaliteta u kritičnih COVID-19 bolesnika, vjerojatno zbog slabijeg odgovora humoralne imunosti posredovane B-limfocitima što je konačno rezultiralo smrtnim ishoda u tih bolesnika (22). S druge strane, AS-LYMP kao udio unutar populacije limfocita $>1,6\%$ pokazali su dijagnostičku osjetljivost i specifičnost od 75 % odnosno 67 % uz AUC od 0,71 za predviđanje teškog oblika COVID-19 bolesti (4). U nekih kritičnih bolesnika opažen je i porast AS-LYMP netom prije oporavka što pokazuje značajnu ulogu antitijela u imunopatogenezi COVID-19 infekcije te povezanost višeg titra antitijela i težeg oblika bolesti (4). Iznenađujuće, rezultati našeg istraživanja nisu izdvojili RE-LYMP i AS-LYMP kao jedinstvene pokazatelje COVID-19 infekcije, bilo da se radi o ukupnim vrijednostima ili njihovom udjelu unutar populacije limfocita. Navedeni parametri pokazali su specifičnost od oko 80 % u bolesnika s COVID-19 infekcijom dok su tijekom 2020. Lapić i sur. izdvojili AS-LYMP kao pokazatelj COVID-19 infekcije s izvrsnom dijagnostičkom specifičnosti od 96,3 % (17). To je moguće objasniti puno blažom kliničkom slikom u COVID-19 bolesnika tijekom 2023. i 2024. godine te procjepljenošću i/ili preboljenjem infekcije kod dijela populacije, a samim time i slabijom aktivacijom imunološkog sustava uzrokovanom ovom virusnom infekcijom.

Monociti kao tkivni makrofagi su stanice koje imaju ulogu kao antigen prezentirajuće stanice limfocitima te proizvode proupalne citokine kako bi eliminirali patogene infekcije i pospješili oporavak tkiva (11, 29). Kod COVID-19 infekcije, opažene su niže koncentracije apsolutnog broja monocita, vjerojatno kao rezultat migracije monocita u zahvaćena tkiva te pojava i porast reaktivnih monocita (RE-MONO) (11, 29). Nadalje, udio reaktivnih monocita unutar populacije monocita pokazao se korisniji pokazatelj u ne-COVID bolesnika u usporedbi s onima s COVID-19 infekcijom (3). Analizom podataka o staničnoj kompleksnosti i intenzitetu fluorescencije, Harte i Mykytiv su također prepoznali reaktivnost monocita kao karakteristiku COVID-19 sa skretanjem u lijevo prema nezrelim monocitima (30). U ovom istraživanju u COVID-19 bolesnika nije opažena značajna prisutnost RE-MONO kao ni niži broj monocita što također ukazuje na slabiju aktivaciju imunološkog sustava od strane SARS-CoV-2 virusa danas u odnosu na prethodne godine kada je pandemija bila u punom zamahu.

Sepsu karakteriziraju kvalitativne i kvantitativne promjene hematoloških parametara odnosno porast broja leukocita u korist neutrofilnih granulocita te skretanje ulijevo prema nesegmentiranim granulocitima uz pojavu nezrelih granulocita, limfopenija odnosno snižen broj limfocita te promjene u funkciji monocita (11). Navedene promjene u parametrima krvne slike potvrdili su i rezultati ovog istraživanja ističući sepsu kao stanje koje dovodi do značajnih promjena hematoloških parametara vezanih uz leukocitne subpopulacije u krvi bolesnika. Pojavom sepse, dolazi do aktivacije neutrofila u perifernoj krvi kao rezultat obrane od patogena što dovodi do njihovih morfoloških promjena (7). Također, dolazi do aktivacije monocita što se očituje porastom staničnog volumena i sadržaja nukleinskih kiselina u stanici (7). Upravo iz tih razloga, za očekivati je povišenje

parametara aktivacije neutrofila i pojavu reaktivnih monocita. Dostupna istraživanja vezana uz sepsu uglavnom se temelje na podacima vezanim uz stanične populacije odnosno brojnim parametrima dobivenih iz optičkih signala tijekom određivanja diferencijalne krvne slike, a koji odražavaju morfološke i funkcionalne karakteristike stanica (engl. *Cell Population Data (CPD)*) (7, 31, 32). U istraživanju koje je uspoređivalo razliku hematoloških parametara između bakterijske sepse nakon pneumonije i sepse kao posljedice COVID-19 infekcije pokazano je da je PCT još uvijek najbolji biomarker za razlikovanje ovih stanja dok su broj leukocita, neutrofila i monocita također korisni pokazatelji s površinom ispod krivulje od 0,76 do 0,78 (11). Istraživanje koje su proveli Fong i sur. obuhvatilo je 30 bolesnika sa sepsom te su upravo parametri aktivacije leukocita bili glavni fokus njihovog istraživanja (13). Njihovi rezultati pokazali su značajno više vrijednosti broja neutrofilnih granulocita, NEUT-RI, IG, RE-MONO te AS-LYMP i RE-LYMP u septičnih bolesnika dok je s druge strane, u skupini neseptičnih bolesnika povišen broj monocita i limfocita te NEUT-GI (13). Zaključak istraživanja je da parametri aktivacije stanica definitivno mogu pomoći u diferencijalnoj dijagnozi sepse, ali su potrebna istraživanja na većem broju ispitanika kako bi se potvrdila klinička korist i prognostička vrijednost navedenih parametara (13). Rezultati dobiveni u ovom istraživanju izdvojili su NEUT-RI kao parametar reaktivnosti neutrofila korisnim pokazateljem u septičnih bolesnika s dijagnostičkom specifičnošću od 85,3 % što je i očekivano s obzirom da će sepsa dovesti do reaktivne neutrofilije, a samim time utjecati na promjenu morfoloških pokazatelja neutrofila. Slično kao i u prethodno spomenutom istraživanju, dobiveni rezultati nisu istaknuli NEUT-GI kao značajan parametar u ranoj dijagnostici sepse. Nadalje, pojava reaktivnih monocita je karakteristika bolesnika sa sepsom. Definitivno su potrebna daljnja istraživanja u ovom smjeru kako bi se dodatno

istaknuli ovi lako dostupni hematološki parametri u praćenju i prognozi ovog zahtjevnog i teškog kliničkog stanja zbog čega bi bilo korisno longitudinalno pratiti hematološke pokazatelje u različitim fazama bolesti.

NLR je već ranije prepoznat kao vrijedan i lako dostupan biljeg procjene upalnog statusa kod različitih bolesti i stanja (5). Brojna istraživanja pokazala su značajan porast vrijednosti u COVID-19 bolesnika kao nezavisnog pokazatelja progresije bolesti i lošijeg kliničkog ishoda te kao prognostičkog parametra u septičnih bolesnika (5, 26). Prema jednom istraživanju normalne vrijednosti NLR-a u odraslih iznose između 0,78 i 3,53 te su povišene vrijednosti očekivane u različitim infektivnim stanjima (23). Granična vrijednost NLR-a od 3,3 pokazala se optimalnom kao prognostički pokazatelj kod COVID-19 infekcije (25). Isto istraživanje ispitalo je i potencijalnu dijagnostičku ulogu omjera monocita i limfocita u COVID-19 infekciji, međutim dobivena AUC vrijednost je bila ispod 0,5 zbog čega se u ovom slučaju navedeni računski omjer nije pokazao korisnim u ovoj infekciji (24). S druge strane, naši rezultati pokazali su statistički značajnu razliku u MLR-u između COVID-19 bolesnika i kontrolne skupine te AUC od 0,696 za vrijednosti veće od 0,42. Također, rezultati su potvrdili kliničku korist i ostalih računskih omjera u COVID-19 bolesnika i bolesnika sa sepsom uz bolje mjere dijagnostičke točnosti u bolesnika sa sepsom. To je i očekivano s obzirom da sva tri omjera uzimaju u izračun broj limfocita, a limfopenija je karakteristika oba stanja, uz daleko izraženiji pad limfocita u bolesnika sa sepsom.

Glavno ograničenje ovog istraživanja je što su u istraživanje uzeti rezultati jednog mjerenja hematoloških parametara prilikom prijema u bolnicu te je pretpostavka da su bolesnici tada bili u ranoj fazi bolesti. Praćenje ovih pokazatelja u različitim fazama

bolesti i kliničkog tijeka je svakako potrebno kako bi se ispitala njihova značajnost i klinička primjena u praćenju i prognozi ovih stanja.

6. ZAKLJUČCI

- COVID-19 bolest dovodi do neutrofilije i limfopenije te posljedično porasta računskih omjera: NLR-a i IGLR-a.
- Sepsa dovodi do promjena gotovo svih ispitanih parametara krvne slike vezanih uz leukocitne subpopulacije uz porast NEUT-RI, računskih omjera: NLR-a, MLR-a i IGLR-a te pojavu reaktivnih monocita kao ranih dijagnostičkih pokazatelja aktivacije imunološkog sustava.
- Prema dosadašnjim istraživanjima i rezultatima ovog rada, SARS-CoV-2 virus danas dovodi do slabije izražene aktivacije imunološkog sustava nego prethodnih godina što možemo kvantificirati slabijom pojavom RE-LYMP, AS-LYMP i RE-MONO u COVID-19 bolesnika.
- Dodatni hematološki parametri krvne slike definitivno imaju dijagnostičku vrijednost u ovim, ali i drugim bolestima i stanjima te je njihove prognostičke mogućnosti potrebno dodatno istražiti na većem broju ispitanika.

7. LITERATURA

1. Naoum FA, Ruiz ALZ, Martin FH, Brito THG, Hassem V, Oliveira MG. Diagnostic and prognostic utility of WBC counts and cell population data in patients with COVID-19. *Int J Lab Hematol* 2021;43(Suppl.1):124-128.
2. Xie N, Zhang W, Chen J, Tian F, Song J. Clinical characteristics, diagnosis, and therapeutics of COVID-19: A review. *Curr Med Sci* 2023;43(6):1066-1074.
3. Jha B, Goel S, Singh MK i sur. Value of new advanced hematological parameters in early prediction of severity of COVID-19. *Int J Lab Hematol* 2023;45(3):282-288.
4. Yip CYC, Yap ES, De Mel i sur. Temporal changes in immune blood cell parameters in COVID-19 infection and recovery from severe infection. *Br J Haematol* 2020;190(1):33-39.
5. Urrechaga E, Mugertza G, Fernandez M, Espana PP, Aguirre U. Leukocyte differential and reactive lymphocyte counts from Sysmex XN analyzer in the evaluation of SARS-CoV-2 infection. *Scand J Clin Lab* 2021;81(5):394-400.
6. Gashi Z, Kadrija M. Pathological changes of biochemical, hematological and coagulation analyses in patients with COVID-19 disease. *Ital J Med* 2024;18:1723.
7. Zhang W, Zhang Z, Pan S i sur. The clinical value of hematological neutrophil and monocyte parameters in the diagnosis and identification of sepsis. *Ann Transl Med* 2021;9(22):1680.

8. Kuizon BA, Damian K, Villanueva E. Baseline Complete Blood Count and Cell Population Data as Prognostic Markers for In-Hospital Mortality among COVID-19 Patients admitted at the Philippine General Hospital from March 2020 to January 2022. *Philipp Phytopathol* 2023;8(1):13-20.
9. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016;315(8):801-810.
10. World health organisation. Preuzeto s: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/sepsis> (pristupljeno 15.5.2024.)
11. Moisa E, Datu M, Corneci D, Grintescu IM, Negoita S. Hematological parameters and procalcitonin as discriminants between bacterial pneumonia-induced sepsis and viral sepsis secondary to COVID-19: a retrospective single-center analysis. *Int J Mol Sci* 2023;24,5146.
12. Lemkus L, Lawrie D, Vaughan J. The utility of extended differential parameters as a biomarker of bacteremia at a tertiary academic hospital in person with and without HIV infection in South Africa. *Plos One* 2022;17(2):e0262938.
13. Fong Ho S, Jin TS, Mazlan MZ, Iberahim S, Lee YX, Hassan R. Exploring Extended White Blood Cell Parameters for the Evaluation of Sepsis among Patients Admitted to Intensive Care Units. *Diagnostics* 2023;13(14):2445.
14. Honda T, Uehara T, Matsumoto G, Arai S, Sugano M. Neutrophil left shift and white blood cell count as markers of bacterial infection. *Clin Chim Acta* 2016;457:46-53.

15. Urrechaga E, Boveda O, Aguirre U. Improvement in detecting sepsis using leukocyte cell population data (CPD). Clin Chem Lab Med 2019;57(6):918-926.
16. Shalini P, Purnima SR, Sneha Rao AR, Manjula A, Athira B, Sandhya I. Diagnostic Utility of Cell Population Data (CPD) In Sepsis Using Automated Hematology Analysers. Annals Pathol Lab Med 2019;6(5):A284-288.
17. Lapić I, Brenčić T, Rogić D, Pozaić P, Juričić G, Honović L. The value of extended inflammatory parameters obtained on Sysmex XN-1000 haematology analyser as early laboratory indicators of COVID-19. Scand J Clin Lab Invest 2022;82(3):257-259.
18. Sysmex parameters. Preuzeto s: <https://www.sysmex-europe.com/academy/knowledge-centre/sysmex-parameters/> (pristupljeno 15.1.2024.)
19. Sysmex Educational Enhancement and Development. Looking deeper into inflammatory conditions from a laboratory and clinical perspective, 2018. Preuzeto s: <https://www.sysmex-europe.com/academy/library/documents/detail/seed-looking-deeper-into-inflammatory-conditions-from-a-laboratory-and-clinical-perspective/> (pristupljeno 15.5.2024.)
20. Cornet E, Boubaya M, Troussard X. Contribution of the new XN-1000 parameters NEUT-RI and NEUT-WY for managing patients with immature granulocytes. Int Jnl Lab Hem 2015;37:e123-e126.
21. Zonneveld R, Molema G, Plötz FB. Analyzing Neutrophil Morphology, Mechanics and Motility in Sepsis: Options and Challenges for Novel Bedside Technologies. Crit Care Med 2016;44(1):218-228.

22. Rolla R, Vidali M, Puricelli C i sur. Reduced activity of B lymphocytes, recognised by Sysmex XN-2000™ haematology analyser, predicts mortality in patients with coronavirus disease 2019. *Int J Lab Hematol* 2021;43:e5-e8.
23. Forget P, Khalifa C, Defour JP, Latinne D, Van Pel MC, De Kock M. What is the normal value of the neutrophil-to-lymphocyte ratio? *BMC Res Notes* 2017;10:12.
24. Zahorec R. Neutrophil-to-lymphocyte ratio, past, present and future perspectives. *Bratisl Med J* 2021;122(7):474:488.
25. Yang AP, Liu J, Tap W, Li H. The diagnostic and predictive role of NLR, d-NLR and PLR in COVID-19 patients. *Int Immunopharmacol* 2020;84:106504.
26. Lippi G, Plebani M. Laboratory abnormalities in patients with COVID-2019 infection. *Clin Chem Lab Med* 2020;58(7):111-1134.
27. Palladino M. Complete blood count alterations in COVID-19 patients: A narrative review. *Biochem Med* 2021;31(3):030501.
28. Osman J, Lambert J, Temple M i sur. Rapid screening of COVID-19 patients using white blood cell scattergrams, a study on 381 patients. *Br J Haematol* 2020;190(5):718-722.
29. Martens RJH, Adrichem AJ, Mattheij NJA i sur. Hemocytometric characteristics of COVID-19 patients with and without cytokine storm syndrome on the Sysmex XN-10 hematology analyser. *Clin Chem Lab Med* 2021;59(4):783-793.
30. Harte JV, Mykytiv V. A panhaemocytometric approach to COVID-19: a retrospective study on the importance of monocyte and neutrophil

population data on Sysmex XN-series analysers. Clin Chem Lab Med 2022;61(3):e43-e47.

31. Lapić I, Brenčić T, Rogić D i sur. Cell population data: could a routine hematology analyser aid in the differential diagnosis of COVID-19? Int J Lab Hematol 2021;43:e64-e67.

32. Park SH, Park CJ, Lee BR i sur. Sepsis affects most routine and cell population data (CPD) obtained using the Sysmex XN-2000 blood cell analyser: neutrophil-related CPD NE_SFL and NE-WY provide useful information for detecting sepsis. Int Jnl Lab Hem 2015;37:190-198.

8. POPIS SKRAĆENICA

AS-LYMP – limfociti koji sintetiziraju antitijela

AUC – površina ispod krivulje

CI – interval pouzdanosti

COVID-19 – koronavirusna bolest 2019

CRP – C-reaktivni protein

HFLC – visokofluorescentne limfoidne stanice

IG – broj nezrelih granulocita

IGLR – omjer apsolutnog broja nezrelih granulocita i limfocita

LYMPH – broj limfocita

Lkc – broj leukocita

NEUT – broj neutrofilnih granulocira

NEUT-GI – intenzitet granuliranosti neutrofila

NEUT-RI – intenzitet reaktivnosti neutrofila

NLR – omjer apsolutnog broja neutrofilnih granulocita i limfocita

MLR – omjer apsolutnog broja monocita i limfocita

MONO – broj monocita

PCT – prokalcitonin

RE-LYMP – reaktivni limfociti

RE-MONO – reaktivni monociti