

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAJA ZUPANC

DIPLOMSKA NALOGA

VISOKOŠOLSKI STROKOVNI ŠTUDIJ, LABORATORIJSKA
BIOMEDICINA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAJA ZUPANC

**PRIMERJAVA REZULTATOV SEDIMENTA NA ANALIZATORJIH
ZA KVANTITATIVNO URINSKO ANALIZO**

**COMPARISON OF RESULTS FOR QUANTITATIVE URINE
SEDIMENT ANALYSIS**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo (Klinični center Ljubljana, SOE Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo) pod mentorstvom izr. prof. dr. Milana Skitka, spec. med. biokem. in svetnika, ter somentorice mag. Mateje Šter, spec. med. biokem. Meritve pretočne citometrije in avtomatskega mikroskopiranja so bile izvedene v laboratoriju za analitiko urina in spremljanje koncentracije zdravil v Kliničnem centru Ljubljana, Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo.

Zahvala

Za strokovno pomoč in prijaznost pri nastajanju diplomske naloge se zahvaljujem mentorju dr. Milanu Skitku spec. med. biokem. in mag. Mateji Šter spec. med. biok.

Iskrena zahvala tudi moji družini in partnerju ter prijateljem, ki so me spodbujali in mi ves čas študija in nastajanja diplomske naloge stali ob strani.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Milana Skitka in somentorice mag. Mateje Šter.

Študentov lastnoročni podpis

Predsednica diplomske komisije: izr. prof. dr. Lucija Peterlin Mašič

Mentor: izr. prof. dr. Milan Skitek

Somentorica: mag. Mateja Šter

Član diplomske komisije: doc. dr. Jurij Trontelj

KAZALO

SEZNAM OKRAJŠAV	VII
1 UVOD	1
1.1 TVORBA URINA	1
1.1.1 Ledvice in njihove naloge	1
1.1.2 Sestava urina.....	2
1.2 ODVZEM URINA	2
1.3 OSNOVNA URINSKA ANALIZA	3
1.3.1 Makroskopski pregled urina	3
1.3.2 Osnovna kvalitativna kemijska urinska analiza	3
1.3.3 Mikroskopska analiza celic urina ali urinskega sedimenta	4
1.4 AVTOMATIZIRAN MIKROSKOPSKI ANALIZATOR URINA IRIS iQ-200	5
1.4.1 Opis sistema.....	5
1.4.2 Princip in način delovanja	5
1.4.3 Avtomatsko razvrščanje delcev	7
1.4.3.1 Kategorije za samorazvrščanje	7
1.4.4 Opis posameznih delcev v sedimentu urina	8
1.4.4.1 Eritrociti.....	8
1.4.4.2 Levkociti.....	8
1.4.4.3 Epitelijske celice.....	9
1.4.4.4 Bakterije, glivice, paraziti, glive.....	9
1.4.4.6 Cilindri.....	10
1.4.4.7 Sluz, sperma, lipidi	10
1.5 PRETOČNI CITOMETER SYSMEX UF-100	10
1.5.1 Opis pretočnega citometra	10
1.5.2 Način in princip delovanja.....	11
1.5.2.1 Barvila	11
1.5.2.2 Princip delovanja	11
1.5.3 Specifikacije analizatorja in razvrščanje delcev	12
1.5.4 Prikaz in opis točkovnih diagramov	12
1.5.5.1 Porazdelitev različnih delcev v točkovnih diagramih.....	12
2 NAMEN NALOGE.....	15

3 MATERIALI IN METODE DELA	16
3.1 VZORCI	16
3.2 OPREMA	16
3.2.1 Svetlobni mikroskop.....	16
3.2.3 Vrednotenje formiranih elementov v urinskem sedimentu	18
3.3 AVTOMATIZIRAN MIKROSKOPSKI ANALIZATOR IRIS iQ-200.....	19
3.3.1 Osnovne karakteristike analizatorja IRIS iQ-200.....	19
3.3.2 Komponente sistema in pogoji meritev	19
3.3.3 Kontrola kvalitete dela	21
3.3.4 Potek analiziranja vzorcev	23
3.3.5 Vrednotenje rezultatov in enote pri analizatorju IRIS iQ-200	24
3.3.6 Referenčne vrednosti	25
3.4 KARAKTERISTIKE PRETOČNEGA CITOMETRA SYSMEX UF-100	26
3.4.1 Princip merjenja na pretočnem citometru.....	26
3.4.2 Notranja kontrola kvalitete	28
3.4.3 Vrednotenje rezultatov in enote pri citometru	28
3.4.4 Referenčne vrednosti	29
3.5 STATISTIČNA OBDELAVA SKUPINSKIH REZULTATOV	29
4 REZULTATI.....	30
4.1 PORAZDELITEV REZULTATOV IN VREDNOSTI, DOBLJENE Z WILCOXONOVIM TESTOM.....	30
4.1.1 Primerjava statistično obdelanih rezultatov levkocitov in eritrocitov, dobljenih z avtomatskim mikroskopom iQ-200 in pretočnim citometrom UF-100.....	31
4.1.2 Primerjava ostalih statističnih rezultatov levkocitov in eritrocitov, dobljenih z avtomatskim mikroskopom iQ-200 in pretočnim citometrom UF-100.....	31
4.1.3 Primerjava med eritrociti in levkociti pri obeh analizatorjih.....	32
4.1.3.1 Prikaz števila levkocitov in eritrocitov med Iris iQ 200 in Sysmex UF 100 z Bland Altmanovima grafoma (na vidno polje pri 400-kratni povečavi)	34
4.1.4 Primerjava vrednosti rezultatov eritrocitov na analizatorju UF-100 in avtomatskem mikroskopu IRIS iQ-200.....	35
4.1.5 Primerjava vrednosti rezultatov levkocitov na analizatorju UF-100 in avtomatskem mikroskopu IRIS iQ-200.....	36
5 RAZPRAVA.....	38

6 SKLEP	41
7 LITERATURA	42
8 PRILOGE.....	44

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Povprečje levkocitov med Iris iQ 200 in UF 100.....	34
Graf 2: Povprečje eritrocitov med Iris iQ 200 in UF 100.....	34
Graf 3: Primerjava štetja števila eritrocitov z avtomatskim mikroskopom IRIS iQ-200 in analizatorjem UF-100.....	35
Graf 4: Primerjava štetja števila eritrocitov z analizatorjem UF-100 in števila štetja eritrocitov na avtomatskem mikroskopu IRIS iQ-200.	36
Graf 5: Primerjava štetja števila levkocitov z avtomatskim mikroskopom IRIS iQ-200 in analizatorjem UF-100.....	36
Graf 6: Primerjava štetja števila levkocitov z analizatorjem UF-100 in števila štetja levkocitov na avtomatskem mikroskopu IRIS iQ-200.....	37

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Poenoteno vrednotenje bakterij pri analizi z avtomatskim mikroskopom IRIS iQ-200 na vidno polje (HPF) pri 400-kratni povečavi glede na UF-100.....	25
Preglednica 2: Vrednotenje bakterij pri analizi s pretočnim citometrom UF-100.	29
Preglednica 3: Rezultati, dobljeni z Wilcoxonovim testom.	30
Preglednica 4: Primerjava pomembnejših statističnih parametrov za avtomatski mikroskop iQ-200 in pretočni citometer UF-100 za levkocite in eritrocite.....	31
Preglednica 5: Primerjava ostalih statističnih parametrov za avtomatski mikroskop iQ-200 in pretočni citometer UF-100 za levkocite in eritrocite.	31
Preglednica 6: Porazdelitev vrednosti levkocitov v sedimentu urina na aparatu Iris iQ-200 pri (HPF) glede na percentile.....	32

Preglednica 7: Porazdelitev vrednosti levkocitov v sedimentu urina na aparatu UF-100 pri (HPF) glede na percentile.	32
Preglednica 8: Porazdelitev vrednosti eritrocitov v sedimentu urina na aparatu Iris iQ-200 pri (HPF) glede na percentile.	33
Preglednica 9: Porazdelitev vrednosti eritrocitov v sedimentu urina na aparatu UF-100 pri (HPF) glede na percentile.	33

KAZALO SLIK

Slika 1: Avtomatiziran mikroskopski analizator IRIS iQ-200 z mikroskopsko in kemijsko enoto (AX4280) (8).....	5
Slika 2: Prikaz rezultatov za posamezen parameter (9)	6
Slika 3: Kategorije za samorazvrščanje delcev pri iQ Iris 200 (7).....	7
Slika 4: Pretočni citometer UF-100 (16)	11

POVZETEK

Diplomska naloga vsebuje teoretični in praktični del. V teoretičnem delu diplomske naloge smo najprej opisali bistvene značilnosti urina ter postopek odvzema urina, pri tem smo se osredotočili na čas in način odvzema vzorca. Osnovna urinska analiza je rutinska diagnostična preiskava. Osnovna kvalitativna kemijska urinska analiza je način ugotavljanja prisotnosti spojin in s tem določanja zdravstvenega stanja ljudi. Posebej smo se osredotočili na način analize urina.

V diplomski nalogi smo primerjali dva modernejša analizatorja, ki ju uporabljajo v številnih laboratorijih, in sicer pretočni citometer UF-100 in avtomatizirani mikroskopski analizator urina IRIS iQ-200.

V praktičnem delu pa smo primerjali analizo urinskih vzorcev za prisotnost dveh vrst celic, in sicer za eritrocite ter levkocite, pridobljene pri obeh analizatorjih. Rezultati analize so pokazali, da ima pretočni citometer UF-100 Sysmex pri levkocitih manjša odstopanja od avtomatskega mikroskopa Iris iQ-200 in je zato bolj primeren za analizo levkocitov. Avtomatski mikroskop Iris iQ-200 pa je bolj priporočljiv pri analizi eritrocitov, zaradi manjših odstopanj.

Ključne besede: mikroskopska analiza, levkociti, eritrociti, pretočni citometer UF-100 Sysmex, mikroskopski analizator urina IRIS iQ-200.

ABSTRACT

The diploma thesis contains on theoretical and practical part. In the theoretical part of the diploma thesis, we first describe the main characteristics of urine, and the process of collection of urine, while we focus on the time and method of specimen collection. Basic urine analysis is routine tests. The basic qualitative chemical urine analysis is a method of determining the presence of the compounds, thereby determining the health status of the people. Specifically, we focused of the way urinalysis.

In diploma thesis, we compared two more modern analyzer, which are used in many laboratories, namely Flow citometer Sysmex UF-100 automated urine microscopy analyzer Iris iQ-200.

In practical part, we compared the analysis of urine samples for the presence of two types of cells, namely, the red blood cells and white blood cells obtained from two analyzers. Results of the analysis, showed that the stream citometer Sysmex UF-100 in leukocytes minor deviations from the automatic microscope Iris iQ-200, is therefore more suitable for the analysis of leukocytes. Automatic microscope Iris iQ-200 is preferable in the analysis of erythrocytes cells due to minor discrepancies.

Keywords: microscopic analysis, leukocytes, erythrocytes, citometer Sysmex Flow UF-100 Microscopic urine analyzer IRIS iQ-200.

SEZNAM OKRAJŠAV

AP	procesor analize (analysis procesor)
APR	avtomatsko prepoznavanje delcev (auto particle recognition)
CaOxm	kalcijev oksalat monohidrat
CAST	cilindri (cast)
CCD	naprava za polnjenje (charge coupled device)
EC	epitelne celice (epithelial cells)
FI	intenziteta fluorescence (fluorescence intensity)
Flw	širina pulza fluorescence (fluorescence pulse width)
Fsc	jakost sipanja svetlobe (Forward Scattered light ntensity)
Fscw	sipanje svetlobe (Forward Scattered light pulse width)
HPF	vidno polje mikroskopa pri večji povečavi (400x)
HYA	hialini cilindri (hyaline casts)
LPF	vidno polje mikroskopa pri manjši povečavi (100X)
NSE	neploščati epitelij (non squamous epithelium)
PATH CAST	patološki cilindri- cilindri z vključki (pathological casts)
RBC, ERCi	rdeče krvne celice, eritrociti (red blood cells, erythrocytes)
RBCC	eritrociti v skupinah (red blood cells clusters)
SQEP	ploščati epitelij, skvamozni epitelij (squamous epithelium)
SRC	majhne okrogle epitelne celice (small round epithelial cells)
TRI	triple fosfat (magnezijev, amonijev fosfat)
UNCC	neklasificirani cilindri (unclassified casts)
URI	sečna kislina (uric acid)
WBC, LKCi	bele krvne celice, levkociti (white blood cells)
WBCC	levkociti v skupinah (white blood cells clusters)
X'TAL, CRY	kristali (crystals)
YST, YLC	glivice <i>Funghi</i> , kvasovke (yeasts, yeasts cells)
RNK	ribonukleinska kislina
DNK	deoksiribonukleinska kislina
FAT	maščobne kapljice (fatty droplets)
OVFB	ovalna maščobna telesca (oval fat bodies)

1 UVOD

Urin ali seč je biološka tekočina, ki jo tvorijo ledvice. Za klinično diagnostiko je urinski vzorec pomemben pokazatelj splošnega in patološkega stanja ledvic ter celotnega organizma. Urin je tudi pomemben pokazatelj elektrolitskega, vodnega in kislinsko-bazičnega ravnotežja v organizmu, pa tudi pokazatelj presnovnih procesov. Urin je tako najprimernejša biološka snov za oceno delovanja ledvic in sečil. Osnovna analiza urina je širok pojem, ki zajema več preiskav: organoleptične in fizikalne, kvalitativne kemijske ter mikroskopske kvalitativne (sediment) in kvantitativne (določanje številčne koncentracije celic) analize urina (1, 2, 3, 4).

1.1 TVORBA URINA

1.1.1 Ledvice in njihove naloge

Urin nastaja v ledvicah. Ledvice so parni organ fižolaste oblike. Nefron je funkcionalna enota ledvice, ki jo sestavljajo glomerul, proksimalni tubul, Henleyeva zanka, distalni tubul in zbirni vod (1, 2).

Pri tvorbi urina sodelujejo trije mehanizmi:

- glomerulna filtracija – ultrafiltracija krvne plazme,
- tubulna reabsorpcija ultrafiltrata v proksimalnem tubulu,
- tubulna sekrecija – poteka v distalnem tubulu.

Pomembnejše naloge, ki jih vršijo ledvice:

- uravnavajo koncentracijo snovi v telesnih tekočinah, vodo in elektrolite,
- izločajo odpadne presnovne snovi (sečnina, kreatinin) ter za telo tuje snovi (toksine, zdravila),
- vzpostavljajo kislinsko-bazično ravnovesje,
- imajo endokrino funkcijo (tvorba renina, eritropoetina, vitamina D, prostaglandinov) (1, 2).

1.1.2 Sestava urina

Urin je ultrafiltrat plazme in ga tvorijo ledvice. Kot ultrafiltrat plazme je odličen pokazatelj homeostaze organizma v celoti in presnovnih procesov. Urin je raztopina **sol** (NaCl, KCl) in **sečnine**, ki je primarni produkt metabolizma proteinov. Pomembni sestavini urina sta še **kreatinin** in **sečna kislina**. V urinu se prav tako nahajajo **neraztopljene sestavine**, to je lahko manjše število levkocitov, eritrocitov, hialinih cilindrov, nekaterih kristalov in bakterij (1, 2, 3, 4).

1.2 ODVZEM URINA

Za zanesljivo urinsko analizo je bistvenega pomena pravilen odvzem ter neokrnjenost in kakovost vzorca na visoki ravni. Odvzem, zbiranje, hranjenje, stabiliziranje in transport urina so najpomembnejši elementi predanalitske faze. Zaradi teh dejavnikov je potrebno spremljati koncentriranost urina z določanjem *relativne gostote, osmolalnosti, koncentracije kreatinina, pH-ja*, kar omogoča izračun relativnega deleža analitov glede na koncentriranost in klinični pomen nekega rezultata (4).

Idealni urinski vzorec je dovolj koncentriran, da lahko zaznamo diagnostično pomembne analite in formirane elemente. Najpogosteje uporabljan je primarni zbiralnik za urin. Ločimo primarni zbiralnik za enkratni odvzem urina in primarni zbiralnik za zbirni urin. Poznamo še sekundarne zbiralnike za osnovno urinsko analizo (običajno prosojne epruvete, v katere prelijemo urin za analizo) in sterilne zbiralnike za bakteriološko analizo (4). Za natančno analizo sestavin je zelo pomembno, da je vzorec seča oddan na pravilen način in ob pravem času.

Prvi jutranji vzorec urina je, ker je bil urin v sečnem mehurju od 4 do 8 ur in je zato bolj koncentriran in bolj kisel, celične sestavine (levkociti, eritrociti) pa se bolj ohranijo, najbolj primeren za mikrobiološke preiskave. Drugi jutranji vzorec urina je zbran od 2 do 4 ure po prvem jutranjem uriniranju. Naključni vzorec urina je vzorec, zbran v katerem koli času dneva. Ta vzorec se največkrat uporablja za presejalno analizo pri ambulantnih

preiskovancih. 24-urni zbirni vzorec urina se zbira v določeno posodo ves dan, 24 ur (5). Rutinski odvzem urina ne zahteva predhodne priprave bolnika in ta navadno urinira v primeren zbiralnik. Urinski vzorci glede na način odvzema so: srednji ali čisti curek urina, prvi curek urina (4).

1.3 OSNOVNA URINSKA ANALIZA

Najpogosteje zdravnik naroči osnovne preiskave seča ali urina. Osnovna urinska analiza zajema 3 sklope glavnih preiskav:

- opis organoleptičnih in fizikalno-kemijskih lastnosti urina,
- kvalitativne kemijske preiskave,
- mikroskopske kvalitativne (sediment) in kvantitativne (določanje številčne koncentracije celic) analize urina (3, 5, 6).

1.3.1 Makroskopski pregled urina

Med organoleptične lastnosti urina prištevamo:

- izgled urina: normalno je bister,
- barva urina: normalno je jantarno rumene barve zaradi barvila urohrom, to je odvisno od njegove koncentracije,
- vonj urina: normalno spominja na vonj goveje juhe.

Med fizikalno-kemijske lastnosti urina prištevamo:

- relativno gostoto urina: normalna relativna gostota urina je od 1,005 do 1,040,
- pH: normalen je od 4,5 do 8,0 (4).

1.3.2 Osnovna kvalitativna kemijska urinska analiza

Kvalitativno urinsko preiskavo danes izvajamo s pomočjo reagentnih trakov na principu suhe kemije. To so plastični trakovi, ki vsebujejo kemijsko reaktivna polja (reagente v suhi obliki). Z osnovno analizo urina ugotavljamo prisotnost spojin, ki jih v zdravem urinu ni: beljakovin (proteinov), glukoze, ketonskih spojin, žolčnih barvil (bilirubina,

urobilinogena), eritrocitov oziroma hemoglobina, levkocitov, nitritov. Če pokaže osnovna analiza urina pozitiven rezultat katere koli spojine, se priporoča tudi analiza urinske usedline (sedimenta) (3, 5, 6).

1.3.3 Mikroskopska analiza celic urina ali urinskega sedimenta

Z analizo urinskega sedimenta ugotavljamo število formiranih elementov sečne usedline, različne poškodbe in bolezni ledvic ter različne celice v sečni usedlini (7). Med mikroskopsko analizo sodita:

- kvantitativno določanje številčne koncentracije celic v komorici (SW),
- urinski sediment: z njegovo mikroskopsko preiskavo lahko preštejemo veliko število formiranih elementov (3).

1.3.4. Postopek priprave urinskega sedimenta

Najhitrejši in najboljši način priprave urinskega sedimenta za mikroskopski pregled dobimo s centrifugiranjem svežega in dobro premešanega urina. Priprava urinskega sedimenta za mikroskopiranje zahteva posebne graduirane epruvete koničaste oblike. V te epruvete iz urinskega lončka prelijemo 12 mL svežega urina. Epruvete postavimo v centrifugo, kjer centrifugiramo urinske vzorce od 5 do 10 minut pri 1500–2000 obratih/minuto. Nato odlijemo supernatant. Epruveto obrnemo nad papirno podlago, da iztečejo zadnje kapljice supernatanta. S Pasteurjevo pipeto premešamo sediment in ga prenesemo na predmetno stekelce, nato ga prekrijemo s pokrovnim stekelcem ali pa prenesemo sediment v odprtino merilne komore. Sediment se pregleda pod mikroskopom najprej pri 100-kratni in nato pri 400-kratni povečavi (2). Pod veliko povečavo pregledamo 10-20 vidnih polj. Priporočeno je semikvantitativno izražanje: **redki, številni, zelo številni** (3, 5, 6).

1.4 AVTOMATIZIRAN MIKROSKOPSKI ANALIZATOR URINA IRIS iQ-200

1.4.1 Opis sistema

Glavne komponente celotnega avtomatiziranega sistema zajemajo:

- iQ-200 mikroskopski analizator,
- računalnik z monitorjem oz. procesor za analizo, miško in tipkovnico,
- procesor za prikaz rezultatov, tiskalnik,
- AX-4280 kemijski modul.



Slika 1: Avtomatiziran mikroskopski analizator IRIS iQ-200 z mikroskopsko in kemijsko enoto (AX4280) (8).

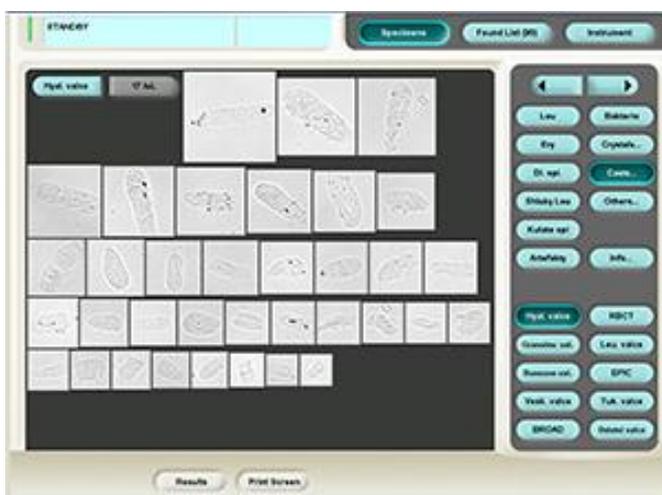
1.4.2 Princip in način delovanja

iQ-200 je popolnoma avtomatiziran mikroskopski analizator ameriškega podjetja IRIS, ki za analizo uporablja necentrifugiran in neobarvan urin. iQ-200 se lahko uporabi kot neodvisna enota za mikroskopsko analizo sedimenta v urinu ali v kombinaciji s kemijskim modulom AX-4280 (Slika 1). Ta sistem sestoji iz avtomatiziranega pretočnega mikroskopa in CCD (charge-coupled device) video kamere resolucije 0,68 μm ter pretočne celice. Edini reagent, ki ga koristi aparat, je raztopina iQ Lamina, katere glavna naloga je ustvarjanje laminarnega pretoka. Dobljene slike se digitalizirajo in prenesejo v računalnik za analizo (AP – analysis processor). Preden se slike shranijo, se predhodno shranjena

prazna ozadja pretočne celice odštejejo od vsakega vidnega polja. S tem se izboljša morfologija slikanih delcev (7).

Program za avtomatsko prepoznavanje delcev (APR – auto particle recognition) deluje na osnovi neuralne mreže. Ta s pomočjo **velikosti, oblike, kontrasta in strukture razvrsti** delce v 12 kategorij: **eritrociti, levkociti, levkociti v skupinah, hialini cilindri, neklasificirani cilindri, ploščati epitelij, bakterije, glivice, kristali, sluz, sperma**. Dodatno jih je možno razvrstiti ročno v 26 vnaprej določenih podkategorij. Te podkategorije so: neklasificirani kristali (kalcijev oksalat, kristali tirozina, fosfatni kristali, kristali levcina, amorfni kristali, kristali sečne kisline, kalcijev karbonat, kristali cistina), neklasificirane cilindre (granulirani, celični, voščeni, široki, eritrocitni, levkocitni, epitelni, maščobni cilindri), glivice (glivice z Pseudohyphae), ostalo (*Trichomonas*, maščobe, eritrociti v skupinah, maščobne kapljice), neploščati epitelij (ledvični, prehodni epitelij), neklasificirani delci (amorfni eritrociti), artefakti. Koncentracija delcev se izračunava z uporabo **števila slik in volumna vzorca**. Program procesorja za analizo sestavljajo trije glavni prikazi:

- glavni prikaz instrumenta - Nameščen na zgornji strani zaslona omogoča uporabniku pristop k naslednjim prikazom s pritiskom na želeni gumb: prikaz z vzorcem (Specimens), prikaz delovne liste (Work list) in glavni prikaz instrumenta (Instrument) (Slika 2) (7),
- prikaz z vzorcem,
- prikaz delovne liste.



Slika 2: Prikaz rezultatov za posamezen parameter (9).

1.4.3 Avtomatsko razvrščanje delcev

Delci se razvrščajo z uporabo poznanih oblik v neuralni mreži z APR programom. Za vzorce z veliko abnormalnimi ali patološkimi delci lahko izkušen uporabnik vizualno potrdi identifikacijo delcev na osnovi morfoloških detajlov, prikazanih na zaslonu. Kadar se pregleda rezultat, so vse slike delcev sortirane in prikazane v kategorijah za avtomatsko klasifikacijo, kar pospešuje proces **ponovnega razvrščanja**. Posamezne slike, ki jih sistem ne prepozna, se razvrstijo kot ART (artefakti) (7, 10).

1.4.3.1 Kategorije za samorazvrščanje

APR bo razvrstil delce v naslednje kategorije (Slika 3).

Kategorija	Kratice	Slika (primer)
Eritrociti	RBC	
Levkociti	WBC	
Levkociti v skupinah	WBCC	
Ploščati epitelij	SQEP	
Neploščati epitelij	NSE	
Bakterije	BACT	
Kristali	CRYS	
Hialini cilindri	HYA	
Neklasificirani cilindri	UNCC	
Glivice	YST	
Sperma	SPRM	
Sluz	MUC	

Slika 3: Kategorije za samorazvrščanje delcev pri iQ Iris 200 (7).

1.4.4 Opis posameznih delcev v sedimentu urina

1.4.4.1 Eritrociti

So majhne bikonkavne celice, brez jedra. V premeru merijo 6–8 μm . Če so *izomorfni eritrociti*, je krvavitev neglomerularnega izvora (npr. okužba spodnjih sečil). Drugače je pri *dismorfnih* (deformirani z izrastki – brsti ali vezikuli in različnih velikosti) eritrocitih, pri katerih je krvavitev glomerularnega izvora. Eritrocite lahko po pomoti zamenjamo za levkocite, ker imajo na površini in membrani zrnca ali gube. Vendar so te celice manjše kot levkociti.

Mikroskopski posnetek eritrocitov, posnet na iQ-200: vidimo eritrocite (RBC), ki so na splošno veliko manjše celice kot levkociti. **Opomba** pri diagnosticiranju je pomembna, saj že pozitiven rezultat krvi na reagentnem traku kemijske enote AX-4280 pokaže prisotnost eritrocitov. Pri analizi z mikroskopsko enoto iQ-200 je rezultat prisotnosti eritrocitov podan kot kri. Aparat razvrsti druge vrste eritrocitov, npr. eritrocite v skupinah (RBCC) pod ostalo (other) (10, 11).

1.4.4.2 Levkociti

To so največkrat nevtrofilni **granulociti**. V premeru merijo od 10 do 14 μm . V urinu se lahko pojavijo še eozinofilni granulociti in limfociti. Mikroskopsko so približno dvakrat večji od eritrocitov. Pri opazovanju svežih levkocitov lahko vidimo drobne citoplazemske granulacije in pravilno lobulirano jedro. Levkocite, še posebej **limfocite**, najpogosteje zamenjamo z eritrociti in ledvičnimi epiteljskimi celicami. Ledvične epiteljske celice se težko ločijo od levkocitov. Končna odločitev je zato lahko odvisna od ostalih sestavin sedimenta. Ledvične epiteljske celice so na splošno večje, imajo manjše in temnejše jedro ter obilnejšo citoplazmo. Prepoznavanje **eozinofilcev** v urinu je pomembno zato, da spremenimo morebitno neustrezno terapijo z zdravili. **Limfociti** so po velikosti zelo podobni eritrocitom. V urinu jih je normalno prisotno nekaj (6).

Mikroskopski posnetek levkocitov na iQ-200: v urinu so levkociti (WBC) prisotni najpogosteje kot nevtrofilci. Od eritrocitov se razlikujejo predvsem po svoji velikosti in

strukturah v notranjosti, predvsem po lobuliranem jedru. Levkociti v skupinah (WBCC) se nahajajo v vzorcih, ki vsebujejo velike količine levkocitov v skupinah in na splošno kažejo na akutni infekcijski proces. Tukaj moramo biti pozorni tudi na prisotnost bakterij (10).

1.4.4.3 Epitelijske celice

Epitelijske celice so večje od levkocitov. Opisujemo jih, kadar so številne in zelo številne. Pri prepoznavi jih lahko zamenjamo za levkocite (zlasti z razpadlimi jedri) in majhne prehodne epitelijske celice (3, 6, 12). **Mikroskopski posnetek epitelijskih celic na iQ-200:** ploščate epitelijske celice (SQEP) so zelo velike in izredno tanke (11).

1.4.4.4 Bakterije, glivice, paraziti, glive

Najpogostejši povzročitelji okužb sečil so bakterije, redke glive (*Candida spp.*), virusi ali paraziti. Bakterije so različnih vrst (koki, bacili, verige, skupki, pritrjeni na celice) in migetajo. V več kot 95 % je okužba povzročena z eno vrsto bakterije. Diagnostično pomembna je najdba številnih bakterij v vidnem polju (več kot 20 kolonij bakterij v vidnem polju), okuženost potrdimo z mikrobiološko analizo seča (urinokulturo). Glive so podobne eritrocitom, vendar manjše (3 do 5 μm), tako jih lahko zamenjamo z eritrociti. Najpogostejši je *Trichomonas vaginalis*, ki je protozoa. Lahko je prisoten v urinu obeh spolov. Pri parazitih navajamo samo ime parazita, npr. *Trichomonas vaginalis* (3, 6, 12).

Mikroskopski pregled bakterij, posnetih z iQ-200: velikokrat so identificirane bakterije v obliki palčk. Kot dodatek k tem posnetkom se je smiselno ozreti tudi k rezultatom kemijske analize *nitritov in levkocitov*.

Mikroskopski posnetek gliv, posnetih z iQ-200: glive (YST) lahko predstavljajo pravo infekcijo ali so kontaminat urinskih vzorcev. Te mikroorganizme lahko zamenjamo z eritrociti ali amorfnimi kristali (11).

1.4.4.5 Kristali

Ločimo normalno in patološko prisotne kristale. Opisujemo tiste, ki so lahko sestavine sečnih kamnov (sečna kislina, kalcijev oksalat, kalcijev fosfat, magnezijev amonijev fosfat, kalcijev karbonat, kalcijev sulfat, amonijev urat) in kristale snovi, ki nastanejo endogeno

kot posledica nekaterih bolezni (tirozin, cistin, levcin in holesterol). Opišemo tudi prisotnost amorfnih soli (amorfní urat, amorfní fosfat). Ne navajamo kristalov zdravil (3, 6, 13).

1.4.4.6 Cilindri

Sestavljeni so iz Tamm-Horsfallove beljakovine, ki jo izločajo uroepitelne celice. Osnova je *hialini cilindri*. Vanj se lahko vključi katera koli prisotna komponenta, kemijska ali formirani elementi. So odlitki zbirnih tubulov ledvic. Kadar so v času nastajanja cilindrov prisotni v lumnu nefrona različni elementi, lahko nastanejo levkocitni, eritrocitni, bakterijski, maščobni, pigmentni, voščeni, epitelni, granulirani in mešani cilindri. V urinskem sedimentu sta normalno prisotna do dva hialina cilindra, to označimo z »nekaj«, večje število ali prisotnost granuliranih in drugih vrst cilindrov pa dokazuje patološko stanje (3, 6, 12, 13).

1.4.4.7 Sluz, sperma, lipidi

Prisotnost sluzi v urinu nima bistvenega kliničnega pomena. Sperma je lahko prisotna v urinu moških in žensk in ni klinično pomembna (11). Lipidi (OVFB) v urinu so lahko prisotni v obliki maščobnih kapljic (FAT) (3,6, 11,12).

1.5 PRETOČNI CITOMETER SYSMEX UF-100

1.5.1 Opis pretočnega citometra

Pretočni citometer serije Sysmex UF-100 je popolnoma avtomatiziran analizator (prikazan na Sliki 4). Namenjen je izključno urinski analizi za identifikacijo ter štetje celic in ostalih delcev v svežem urinu (6, 14, 15).



Slika 4: Pretočni citometer UF-100 (16).

1.5.2 Način in princip delovanja

1.5.2.1 Barvila

Posamezni delci se v urinu samodejno obarvajo z dvema fluorescentnima barviloma, fenantidrinom in karbocianidom. Barvilo fenantidrin obarva nukleinske kisline (DNK in RNK). Barvilo karbocianid obarva negativno nabite membranske strukture in mitohondrije. Fluorescenca obeh barvil v kombinaciji z meritvami sipane svetlobe in impedance omogoča identifikacijo, razvrščanje in štetje različnih vrst celic v urinu.

1.5.2.2 Princip delovanja

Obe barvili se specifično vežeta z nukleinskimi kislinami in celičnimi membranami posameznih delcev. Ob prehodu skozi pretočno celico so delci hidro-dinamično fokusirani. Tu prečkajo argonski laserski žarek. Delci (celice) sipajo svetlobo in oddajajo fluorescenčno svetlobo. Sipana svetloba, fluorescenca in impedance (razmerje med izmenično napetostjo in tokom v električnem krogu) se detektirajo posebej in pretvorijo v električne signale. Pri tej metodi lahko izvajamo dva sklopa meritev, saj med celicami in svetlobo obstajata vsaj dve vrsti meritev (npr. sipanje svetlobe in fluorescenca) (6, 15, 17).

1.5.3 Specifikacije analizatorja in razvrščanje delcev

Pretočni citometer serije Sysmex UF-100 prešteje iz 9 μ L vzorca urina glavne delce kot so: število eritrocitov (RBC), levkocitov (WBC), epitelnih celic (EC), cilindrov (CAST) in bakterij. To funkcijo določajo trije parametri:

1. povprečna velikost bakterij (Fsc 2 meritev),
2. število bakterij in
3. štetje levkocitov.

Analizator poda tudi štetje dodatnih delcev v obliki opozoril. Znak za opozorilo je zastavica, ki je prisotna pri patoloških delcih kot so: število cilindrov z vključki – patološki cilindri (PATH. CASTS), majhne okrogle epitelne celice (SRC), glivice (YLC), kristali (X'TAL), spermiji, ostalo – neopredeljeni delci in eritrociti – mikrociti. Kadar so izpisana opozorila, se vzorce pogleda pod mikroskopom (6, 14, 15, 18).

1.5.4 Prikaz in opis točkovnih diagramov

Pretočni citometer serije Sysmex UF-100 prikaže dva glavna točkovna diagrama (scattergram):

- graf jakosti sipane svetlobe (Fsc – Forward Scattered Light Intensity) in jakosti fluorescence (Fl – Fluorescence Intensity), ki prikaže sposobnost barvanja delcev in njihovo velikost;
- graf širine pulza sipane svetlobe (Fscw – Forward Scattered Light Pulse Width) in širine pulza fluorescence (Flw – Fluorescence Pulse Width), ki prikaže dolžino delcev in dolžino pobarvanega območja.

1.5.5.1 Porazdelitev različnih delcev v točkovnih diagramih

Delci kot so eritrociti, levkociti in epitelne celice ter bakterije so v grobem porazdeljeni na grafu jakosti sipane svetlobe in jakosti fluorescence (Fsc/Fl). Epitelne celice so porazdeljene na grafu širine pulza sipane svetlobe in širine pulza fluorescence (Flw/Fscw). Cilindri so porazdeljeni na osnovi diagrama širine pulza sipane svetlobe in širine pulza fluorescence (Flw/Fsc) ter upornosti.

Eritrociti:

nahajajo se na točkovnem diagramu (Fsc/Fl2) in sicer na prvem zaslonu, kjer so porazdeljeni na območju, označenem z RBC. Njihova porazdeljenost se zato spreminja glede na sipanje svetlobe. Kadar je prisotno veliko število majhnih eritrocitov, kot so glomerularni, se porazdelijo v območju, kjer je nižje sipanje svetlobe. Majhni ali hemolitični eritrociti se v takšnem primeru porazdelijo na točkovnem diagramu (Flw/Fscw) na drugem zaslonu, na območju, označenem z RBC.

Levkociti:

nahajajo se na točkovnem diagramu (Fsc/Fl2) in sicer na prvem zaslonu, kjer so porazdeljeni na območju, označenem z WBC. Čeprav so v urinu levkociti najpogosteje prisotni kot nevtrofilci, lahko oblikujejo karakteristični populaciji na dveh diagramih: ena je oblikovana v regiji z visoko jakostjo sipanja svetlobe, druga v regiji z nizko jakostjo sipanja svetlobe. Poškodovani levkociti imajo spremenjeno gostoto (specifično težo) in spremenjen volumen, zato imajo težnjo po porazdeljevanju na območju z nizkim sipanjem svetlobe ter z višjo fluorescenco na točkovnem diagramu. V nasprotnem primeru imajo aktivni levkociti določeno gostoto (specifično težo) in volumen ter se nahajajo v območju z močnim sipanjem svetlobe in nizko intenziteto fluorescence.

Epitelne celice:

nahajajo se na točkovnem diagramu (Flw/Fscw) na prvem zaslonu, kjer so porazdeljene na območju, označenem z EC.

Bakterije:

na točkovnem diagramu niso prikazane. Analizator določa bakterije z 10-krat višjo občutljivostjo kot pri ostalih parametrih in rezultate podaja samo številčno.

Cilindri in sluz:

nahajajo se na točkovnem diagramu (Flw/Fscw) na prvem zaslonu, kjer so porazdeljeni na območju, označenem s CAST ali PATH. CAST.

Glivice (*funghi*) in sperma lahko tvorijo karakteristične populacije na točkovnem diagramu.

Odstranitev amorfnih soli:

pri nadaljnjem mikroskopiranju patoloških vzorcev urinskega sedimenta so včasih prisotne moteče substance kot so amorfne soli. V pretočni citometriji velja omejitev glede največjega števila analiziranih delcev, prisotnost soli v visokih koncentracijah v urinu poveča število delcev in zmanjša natančnost meritev. Patološki vzorci prikažejo na točkovnih diagramih lastnosti patološko prisotnih celičnih sestavin, ki jih vsebujejo (6, 14, 17).

2 NAMEN NALOGE

V diplomski nalogi bomo primerjali rezultate urinskega sedimenta med dvema aparatoma: pretočnim citometrom Sysmex UF-100 in avtomatiziranim mikroskopom IRIS iQ-200. Bistvo primerjave obeh analizatorjev različnih proizvajalcev bo ocena principa določanja urinskih parametrov za statistično ovrednotenje rezultatov urinskega sedimenta.

Analizirane urinske vzorce preiskovancev in dobljene vrednosti urinskih analiz bomo statistično ovrednotili. Poglavitni namen urinskih analiz bodo ugotovitve:

- ali so dobljeni rezultati urinskih parametrov, pridobljeni z dvema analizatorjema, popolnoma primerljivi,
- kakšne so prednosti in slabosti obeh aparatov glede na parametre in princip določanja analize metode pri posameznem aparatu.

Pri primerjavi rezultatov se bomo osredotočili predvsem na določanje pomembnejših parametrov, kot so eritrociti in levkociti, dobljeni kot številčne vrednosti. Dobljene rezultate eritrocitov in levkocitov bomo statistično ovrednotili. Mikroskop bomo le opisali. Rezultati urinskega sedimenta, pregledani pod mikroskopom s 400-kratno povečavo, so v Prilogi 2.

3 MATERIALI IN METODE DE LA

3.1 VZORCI

Analizirali smo 108 urinskih vzorcev. Analize smo opravili v Laboratoriju za analitiko urina in spremljanje koncentracije zdravil na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo na Polikliniki v Ljubljani. Statistično smo ovrednotili eritrocite in levkocite. Urinski vzorci so bili odvzeti od preiskovancev iz ambulant in različnih oddelkov Kliničnega centra. Analizirani vzorci urina so bili povsem naključni.

3.2 OPREMA

- Avtomatiziran mikroskopski analizator IRIS iQ-200;
- pretočni citometer Sysmex UF-100;
- centrifuga Centric 322 A TEHTNICA;
- sistem URISED (Burnik) za urinski sediment (komorice, urised barvilo, pipete);
- stojalo za epruvete (kovinsko, plastično);
- klasične epruvete, epruvete s koničastim dnom;
- svetlobni mikroskop (OLYMPUS, TIPA CHS-2).

3.2.1 Svetlobni mikroskop

Mikroskop sestavljajo mehanski in optični deli. Vir svetlobe v stativu je 6 V, 10 W žarnica. Ima majhno povečavo (100x) in večjo povečavo (400x). Elemente sedimenta opazujemo najprej pod majhno in nato pod večjo povečavo. Mehanski deli svetlobnega mikroskopa so: stativ, tubus, revolver, križna miza ter mikrometrski in makrometrski vijak. Stativ je osnovna plošča, na katero so pritrjeni vsi deli mikroskopa. Revolver je plošča, ki se vrti in s katero menjujemo in pritrjujemo objektivne. Ti so različnih povečav. Tubus je cev, ki je premakljiva in vanjo vstavimo okularja v zgornjem delu in revolver z objektivni v spodnjem delu. Mikrometrski in makrometrski vijak sta pomembna pri oceni hitre in nato

natančnejše izostritve vidnih polj. Križna miza omogoča premikanje vzorca na tej mizici v smeri x in y.

Optični deli mikroskopa:

- okularji povečajo osnovno sliko iz objektivna. Sestavlja jih sistem dvojnih leč;
- objektivni povečajo predmete in dajejo realno sliko. Sestavljata jih zadnja korekcijska in sprednja frontalna leča;
- slepica je zaslonka, ki odmerja količino vpadne svetlobe in z njo dosežemo najboljši kontrast;
- kondenzor je sistem leč, ki omogoča, da se žarki iz vira svetlobe zberejo točno na opazovanem predmetu. Z vijakom kondenzor spuščamo pri malih povečavah, pri velikih pa dvigamo.

3.2.2 Mikroskopska analiza celic urinskega sedimenta

Mikroskopska analiza urinskega sedimenta je kvalitativna analiza formiranih in s centrifugiranjem pridobljenih sestavin urina. Med te prištevamo: eritrocite, levkocite, cilindre, bakterije, epiteljske celice, glive in parazite. Urised je pribor proizvajalca Burnik, ki se uporablja za standardno mikroskopsko analizo urinskega sedimenta.

Komplet za mikroskopiranje vsebuje:

- graduirane koničaste epruvete,
- Pasteurjeve pipete ali kapalke za prenos sedimenta,
- mikroskopsko ploščico za določeno količino sedimenta,
- barvila.

Mikroskopiranje poteka takole:

1. Priprava urinskega sedimenta za mikroskopiranje zahteva posebne graduirane epruvete koničaste oblike. V te epruvete iz urinskega lončka prelijemo 12 mL svežega urina. Količina urina mora biti vedno enaka, saj mora ustrezati standardiziranim postopkom.
2. Epruvete postavimo v centrifugo, kjer centrifugiramo urinske vzorce 5–10 minut pri 1500–2000 obratih/minuto s centrifugalno močjo 500 x g.

3. Nato odlijemo supernatant. Epruveto obrnemo nad papirno podlago, da iztečejo zadnje kapljice supernatanta. Najbolje je, da supernatant aspiriramo.
4. S Pasteurjevo pipeto premešamo sediment in ga prenesemo na predmetno stekelce, nato ga prekrijemo s pokrovnim stekelcem ali pa prenesemo sediment v odprtino merilne komore. Sediment se pregleda pod mikroskopom najprej pri 100-kratni in nato pri 400-kratni povečavi (2).

Z resuspenzijo sedimenta preprečimo neenakomerno porazdelitev delcev v preparatu. Resuspenzija pomeni ponovno mešanje.

Barvanje celic urinskega sedimenta je supravitalno barvanje po Sternheimer-Malbinovi metodi ali po Sternheim Alcian modro. Barvanje po Sternheimer-Malbinu poudari notranjo strukturo celic, predvsem levkocitov, epiteljskih celic in cilindrov. Značilno se obarvajo eritrociti, sluz ter nekateri elementi. To barvanje je bolj v uporabi pri svetlobni mikroskopiji.

3.2.3 Vrednotenje formiranih elementov v urinskem sedimentu

Eritrociti in levkociti

V desetih vidnih poljih preštejemo celice pri 400-kratni povečavi. Če je število celic v vidnem polju nad 50, jih označimo kot **številni**, pri več kot 100 celicah na vidno polje pa kot **zelo številni**. Eritrociti so lahko **izluženi** ali **sveži**. Levkociti so lahko razpadli ali vsebujejo maščobo.

Bakterije, paraziti, glive

Bakterije izrazimo kot malo, številne in zelo številne. Opis bakterij pri 400-kratni povečavi sta obliki paličastih (nitastih) in okroglih bakterij. V vidnem polju je diagnostično pomembno več kot 20 kolonij bakterij. Najpogostejša gliva je *Candida albicans*, parazit pa *Trichomonas vaginalis*.

Cilindri

Ves preparat se gleda pri 100-kratni povečavi za cilindre, ki jih preštejemo in opišemo vsebovane cilindre. Glavne vrste cilindrov so hialini, granulirani ter eritrocitni.

Kristali

Najpogosteje opišemo kristale sečnih kamnov, amorfnih soli ter kristale bolezenskih stanj, kot so tirozin, levcin, cistin, holesterol, bilirubin.

3.3 AVTOMATIZIRAN MIKROSKOPSKI ANALIZATOR IRIS iQ-200

3.3.1 Osnovne karakteristike analizatorja IRIS iQ-200

iQ-200 je popolnoma avtomatiziran mikroskopski analizator. Ima program za avtomatsko prepoznavanje delcev (APR – auto particle recognition) na podlagi neuralne mreže, ki s pomočjo oblike, velikosti, kontrasta in strukture razdeli delce v 12 glavnih urinskih elementov: eritrocite, levkocite, skupine levkocitov, celice ploščatega epitela, celice neploščatega epitela, male okrogle celice, hialine cilindre, nehialine oz. nerazvrščene cilindre, bakterije, glivice, sluz, spermo. Metoda analize je digitalna analiza slike v pretočni celici.

3.3.2 Komponente sistema in pogoji meritev

Avtomatski sistem za analizo urina sestoji iz treh modulov, med sabo povezanih s kabli:

- iQ-200 modul za mikroskopiranje,
- procesor za analizo z monitorjem, tipkovnico in miško,
- delovna celica, tiskalnik.

iQ-200 lahko deluje kot samostojna enota ali v kombinaciji z drugimi rezultati kemijske analize. Identifikacija elementov urinskih vzorcev poteka z informacijsko tehnologijo, ki temelji na umetni neuronski mreži (APR – auto particle recognition). Obdelava vzorcev je avtomatizirana preko avtomatskega čitalnika. Naenkrat lahko sprejme stojala z 10-imi vdolbinicami za vzorce. Kontinuirano lahko meri do 55 vzorcev. Čitalnik črtnih kod je nameščen znotraj samega sistema, nasproti igle za pipetiranje. Čitalnik skenira barkodo nalepke na epruveti in pošlje podatke o identifikaciji v LIS (laboratorijski informacijski sistem) informacijski sistem preko procesorja za analizo. Igla za vsrkanje vzorca je

nameščena na sprednji strani iQ-200 instrumenta. Ko sprejme navodila iz procesorja, pipeta premeša vzorec in nato vsrka 1 ml vzorca za analizo.

Sestava tekočine za prenos vzorca: sistem tekočin sestavljajo iQ Lamina in tri peristaltične črpalke. Črpalke vsrkavajo in mešajo vzorec, ki je obkrožen z Lamino, ki teče skozi instrument v pretočno celico in nato v odpad. iQ Lamina je puferirana izotonična raztopina, brez prisotnosti celic, ki vsebuje stabilizatorje pretoka, bakteriostatske sestavine, fungicide in stabilizatorje. Uporablja se za razporeditev pretoka vzorca znotraj globinske ostrine mikroskopa. Omogoča tudi enakomeren pretok s spiranjem in vlaženjem vseh pretočnih komponent. Ta izdelek se lahko shranjuje na sobni temperaturi.

Optični sistem je sestavljen iz naslednjih komponent:

- stroboskopske žarnice,
- mikroskopa,
- CCD kamere,
- pretočne celice.

Stroboskopska žarnica je pritrjena na mikroskop, ki je postavljen vodoravno. Bliski stroboskopske žarnice so zedinjeni s CCD kamero. Kolimator fokusira svetlobo. Vsak posnetek, posnet s CCD kamero, predstavlja sliko majhne količine vzorca, kadar stroboskopska žarnica osvetli vidno polje. Vsak od teh posnetkov predstavlja natančno izmerjen volumen necentrifugiranega vzorca urina v pretočni celici pod povečavo. Črpalka za odpad odstranjuje tekočine za prenos vzorcev v odpadno ali odvodno posodo.

Priprava vzorcev:

urin zberemo v čiste in sterilne posodice. Če vzorci niso analizirani v roku ene ure, posodice z urinom čvrsto zapremo s pokrovom. Shranimo jih pri temperaturi 2–8 °C. Pred analizo pustimo vzorec na sobni temperaturi. V vzorce ne dodajamo nobenih dezinficiensov ali detergentov. Pred analizo vzorcev ne centrifugiramo. Paziti moramo, da vzorci niso izpostavljeni sončni svetlobi.

Temperatura:

analiza urinskih vzorcev mora biti vedno opravljena na sobni temperaturi. Kadar je temperatura izven razpona, je lahko netočno definirana specifična teža vzorcev urina. Pred analiziranjem omogočimo vsem vzorcem, ki so bili predhodno hranjeni v hladilniku, da se segrejejo na sobno temperaturo.

Vzorci urina:

uporabljamo samo sveže necentrifugirane in neobarvane vzorce urina. Vzorci so označeni s črnimi kodami. Če je napačna identifikacija vzorca in napačna črna koda, se podatki vpišejo ročno (Correct specimen ID). Nesprijemljivi so vzorci z veliko sluzi, vzorci z veliko eritrocitov in ekstremno amorfni (iz zamrzovalnika). Vsi nesprijemljivi vzorci se rešujejo s pomočjo redčitve z iQ redčilom.

Razredčitev:

z iQ redčilom razredčimo ali povečamo volumen vzorca. Analizator lahko s pomočjo spiranja obdeluje tudi vzorce, ki so že originalno manjšega volumna. Za razredčitev vzorca uporabljamo dodatno črtno kodo (zapis 128), ki jo nalepimo na epruveto.

Volumen vzorca:

minimalen volumen tekočega vzorca za testiranje za AX-4280 in iQ-200 je 4 mL. iQ-200 rabi 3 mL, AX-4280 pa 2 mL vzorcev urina. Skupen volumen vzorca ne bi smel biti večji od 6 mL. Aspiracijski volumen je 0,9 mL. Epruvete morajo biti steklene, velikosti 16x100 mm. Dno je ovalno, da ne bi prišlo do uničenja injektorske igle. Epruvete opremimo s črtno kodo. Prenesemo 3–6 mL premešanega urina v epruvete (4–6 mL primeru, če je vzorec analiziran na AX-4280 in iQ). Epruvete z nalepkami postavimo v stojalo za vzorce. Analiza vzorcev lahko poteka normalno s priključenim AX-4280 ali s samostojno opcijo iQ-200.

3.3.3 Kontrola kvalitete dela

Program za kontrolo kvalitete se uporablja za zbiranje podatkov o kontroli kvalitete, prikaz rezultatov in statistike. Podatki o kontroli kvalitete se prikažejo kot izračun in grafični prikaz (Levey Jenningsova karta), kot aritmetična sredina, kot standardna deviacija ali kot minimalna in maksimalna vrednost. Podatki o kontroli so vidni na zaslonu, lahko se

izpišejo na tiskalniku. Te funkcije so potrebne za potrditev in kontrolo, da sistem deluje brezhibno.

Kontrolni material in njegova sestava:

iQ set za kontrolo in iQ fokus (raztopina za čiščenje leč) se uporabljajo za izostritev leč in kontrolo instrumenta. Kot kontrolni material uporabljamo iQ pozitivno in negativno kontrolo in iQ fokus. *iQ pozitivna kontrola* se uporablja kot abnormalna ali patološka kontrola za potrditev točnega štetja instrumenta. *iQ negativna kontrola* se uporablja kot normalna kontrola za potrditev točnega štetja instrumenta. Črtne kode, na katerih je zapisana številka LOT-a, rok uporabe in pričakovan razpon so priloženi za vsak material.

Sestava *iQ pozitivne kontrole* in *iQ Focusa (raztopine za čiščenje leč)* so suspenzije fiksiranih človeških eritrocitov v periferni, izotonični balansirani raztopini brez delcev. Ti izdelki morajo biti hranjeni v hladilniku pri temperaturi 2–8 °C. Pred uporabo morajo biti hranjeni na sobni temperaturi. Steklениčke pred uporabo dobro pretresemo, da zagotovimo stalno koncentracijo delcev. Pozitivna kontrola ima koncentracijo delcev 800–1200 celic/ μL , odvisno od številke barkode kontrolnega vzorca.

iQ negativna kontrola je raztopina brez delcev. Hranjena mora biti na sobni temperaturi. Pred uporabo je ni treba premešati. Negativna kontrola ima koncentracijo 0–20 celic/ μL . Pogostost izvedbe kontrole je vsakodnevna. *iQ pozitivna* in *iQ negativna kontrola* naj bi se analizirali vsaj enkrat dnevno ali glede na specifikacije laboratorijskih navodil o postopku kontrole kvalitete. *iQ Focus* raztopina naj bi se analizirala vsaj enkrat dnevno in to pred izvedbo testiranja obeh kontrol. Vsakodnevno je nujna analiza pozitivne, negativne kontrole in *iQ Focus* raztopine v predvidenem nosilcu epruvet (iQ Control rack) z označenimi položaji za vsak reagent. Epruvete označimo z značilnimi črtnimi kodami, nato jih obrnemo proti čitalcu črtnih kod in zaženemo analizator. Kadar imamo veliko količino vzorcev ali kadar opazimo, da so slike motne ali niso dobro izostrene, ponovimo postopek z iQ fokus raztopino.

Kalibracija instrumenta:

kalibracijo moramo na instrumentu iQ-200 narediti enkrat mesečno. Za avtomatsko kalibracijo instrumenta se uporablja *iQ kalibrator*. To je suspenzija fiksiranih humanih

eritrocitov v raztopini brez delcev. iQ kalibrator shranjujemo v hladilniku na temperaturi 2–8 °C. Pred uporabo mora biti dobro premešan in nekaj časa na sobni temperaturi. Vsaka steklenička kalibratorja je namenjena za eno kalibracijo. Za vsak material so priložene črtne kode, na katerih je zapisana številka LOT-a, rok uporabe in pričakovan razpon.

Čiščenje instrumenta:

čiščenje notranjih delov aparata izvršimo na začetku vsake delovne izmene ali na 100 vzorcev. Tako se prepreči akumulacija nečistoč in ostankov iz prejšnjih vzorcev in testiranj. V procesu čiščenja pretočnih delov uporabljamo IRIS System Cleanser. Površine instrumenta čistimo s papirnato brisačo, namočeno v IRIS System Cleanser, razredčen v razmerju 1:10, ter z destilirano vodo in posušimo. Detektor epruvet in čitalec črtnih kod čistimo z izopropilnim alkoholom in staničevino. Optične senzorje na nosilcu očistimo tudi z izopropilnim alkoholom in vatiranimi palčkami (7).

3.3.4 Potek analiziranja vzorcev

Analiziranje vzorcev poteka po naslednjih postopkih:

- identifikacija vzorcev preko avtomatskega čitalca, stojalo sprejme 10 vzorcev, poteka kontinuirano merjenje do 55 vzorcev;
- snemanje digitalne slike – stroboskopska žarnica osvetli vzorec štiriindvajsetkrat v sekundi, vzorec je obkrožen z raztopino iQ Lamine, ki prehaja skozi pretočno celico. CCD digitalna kamera snema 500 slik na vzorec;
- detekcija celic: vsaka slika se analizira ob prisotnosti celic in vsaka celica se izolira;
- vrednotenje celic: posamezna izolirana celica se analizira glede na velikost, kontrast, obliko in teksturo. Vse zabeleženo se analizira s serijo algoritmov in vsi podatki se pretvorijo v številčne vrednosti;
- sledi klasifikacija celic: številčna vrednost vsake celice se prenese v neuralno mrežo APR, ki klasificira celice v 12 glavnih kategorij;
- kvantitativno podan rezultat.

Obdelava podatkov:

- računalnik shranjuje do 10 000 rezultatov vzorcev,

- izpis analize rezultatov je avtomatski,
- avtomatsko označevanje patoloških rezultatov in rezultatov izven meje linearnosti,
- izpis rezultatov v μL ali na vidno polje (400x povečava) (7, 10, 12).

3.3.5 Vrednotenje rezultatov in enote pri analizatorju IRIS iQ-200

iQ-200 omogoča konstanten pretok vzorca pred objektivom mikroskopa. S pomočjo kalibratorja, v katerem sta znana koncentracija delcev in število delcev v vsakem vidnem polju, se dobi točen volumen. Volumen po vidnem polju daje znana koncentracija delcev, deljena s številom delcev po vidnem polju. Ker je volumen po vidnem polju za vsako sliko konsistenten in vedno poznan, je merjenje delcev natančno izmerjeno kot ŠTEVILO DELCEV/ μL . Glede na želje operaterja lahko instrument prikaže rezultat analize kot število celic/ μL ali kot ŠTEVILO CELIC/HPF. HPF je vidno polje mikroskopa pri povečavi 400. LPF je vidno polje mikroskopa pri povečavi 100.

V odnosih med HPF/LPF/ μL :

(HPF – povečava x 400);

(LPF – povečava x 100) – povečava = 10 (okular) x (objektiv)

Pretvorniki med HPF/LPF/ μL : **5,5 HPF = μL 16 HPF = LPF 2,9 μL = LPF**

Kot že zgoraj omenjeno, se rezultati mikroskopskih delcev prikazujejo tudi kot število delcev v vidnem polju. Volumen urina v vidnem polju pod mikroskopom je določen eksperimentalno z merjenjem povprečnega volumna kapljice normalnega urina, pipetiranega s Pasteurjevo pipeto. Ta volumen se razširi pod krovnim stekelcem in deljen s površino krovnega stekelca določa debelino, v kateri so nameščeni delci, preden jih pogledamo na stekelcu. Numerična odprtina objektivna leče določa površino, ki je vidna. Ta površina, pomnožena s povprečno debelino sloja, je efektivni opazovani volumen, ki se vidi v enem vidnem polju.

Enote so podane tudi glede na zahteve proizvajalcev ter različno za posamezne delce v urinu. V diplomski nalogi smo se odločili za poenoten prikaz in izračun rezultatov analize pri obeh analizatorjih v enotah število celic oz. delcev/HPF za vse celice oz. delce urina.

Prikaz je pri 40-kratni povečavi. Določeni delci so lahko podani tudi kot število delcev/LPF, kot npr. cilindri.

Preglednica 1: Poenoteno vrednotenje bakterij pri analizi z avtomatskim mikroskopom IRIS iQ-200 na vidno polje (HPF) pri 400-kratni povečavi glede na UF-100.

Število bakterij	Vrednotenje	Vrednotenje pri avtomatskem mikroskopu glede na citometer UF-100
<1000	0	Malo = 0
1000–3000	Malo	Nekaj, dosti = 1
3000–5000	Številno	Mnogo oz. številno = 2
> 10000	Zelo številno	Masa = 3

Opomba: a = za avtomatski mikroskop Iris iQ-200: malo; nekaj, dosti; mnogo oz. številno; masa

b = za citometer UF-100: 0, 1, 2, 3.

Diagnostično pomembna je najdba številnih bakterij v vidnem polju, okuženost potrdimo z mikrobiološko analizo seča (urinokulturo). Vsebnost bakterij označimo: malo, številne in zelo številne (Preglednica 1).

3.3.6 Referenčne vrednosti

Referenčne vrednosti za posamezne celice se razlikujejo od laboratorija do laboratorija. Vsak laboratorij določi in predpiše svoje referenčne vrednosti za vsako celico in analizator. Pri IRIS iQ-200 so referenčne vrednosti za eritrocite do 5 celic/HPF, za levkocite tudi do 5 celic/HPF. V urinskem sedimentu sta normalno prisotna do dva hialina cilindra, kar označimo z »nekaj«, večje število ali prisotnost granuliranih in drugih vrst cilindrov pa dokazuje patološko stanje, kar določimo kot »masa«. Če je cilindrov do 0, so redki. Za neklasificirane cilindre je normalno prisoten en cilinder na vidno polje. Ostale celice oz. parametre vrednotimo glede na posamezne dovoljene referenčne vrednosti kot redko oz. malo, nekaj, dosti oz. številno, mnogo in masa ter glede na to, ali je npr. kristal prisoten ali ne.

3.4 KARAKTERISTIKE PRETOČNEGA CITOMETRA SYSMEX UF-100

Pretočni citometer japonskega proizvajalca Sysmex UF-100 je popolnoma avtomatiziran aparat. Analizira lahko 100 vzorcev na uro. Pretočni citometer ima možnost, da ima večjo bazo podatkov s 1000 prostimi mesti za zbirke z vsemi grafičnimi podatki. Sveže urinske vzorce analizator vsrka iz epruвет ali direktno iz posodice za urinski vzorec. Operater postavi stojalo z epruветami v analizator, nato pa aparat sam nadaljuje s procesiranjem vzorcev. Glavni kvantitativni parametri oz. delci, ki jih zazna pretočni citometer, so:

- eritrociti,
- levkociti,
- epiteljske celice,
- cilindri,
- bakterije.

Dodatno kot opozorila aparat z znakom zastavice zazna:

- glivice,
- kristale,
- cilindre z vključki (patološke cilindre),
- majhne okrogle epiteljske celice,
- spermije,
- ostalo kot neopredeljene delce,
- eritrocite – mikrocite.

Kadar so izpisana ta opozorila oz. patološke vrednosti, pod fazno-kontrastnim mikroskopom pogledamo še urinski sediment. Nato lahko primerjamo rezultate. Po posameznih parametrih se rezultati analize prikažejo na izvidu grafično ali kot številčne vrednosti.

3.4.1 Princip merjenja na pretočnem citometru

9 μL razredčenega vzorca potuje v toku izotonične tekočine skozi pretočno celico, kjer prečka argonski laserski žarek. Delci (celice) sipajo svetlobo in oddajajo fluorescenco.

Sipana svetloba, fluorescenca in impedanca se zaznajo posebej in pretvorijo v električne signale.

Potek analize vzorca in načela meritev potekajo po naslednjih korakih:

1. Približna količina svežega urinskega vzorca v epruveti za analizo s pretočnim citometrom UF-100 je 800 μL . Pred začetkom analize na aparatu laboratorijski tehnik ročno nalije urinski vzorec v epruveto ter jo lastnoročno vstavi v stojalo. Aparat nato odpipetira 9 μL vzorca ter premeša sveži urin. Najprej se vzorcem izmeri prevodnost kot upornost med dvema električnima elektrodama.
2. Analizator najprej segreje vzorec, da raztopi amorfne soli. Raztopiti jih mora zato, ker amorfne soli motijo analizo. Naknadno se vzorec razredči z določenim redčilom.
3. Po razredčitvi se vzorec obarva z dvema različnima fluorescentnima barviloma, fenantidrinom in karbocianidom. Kot že omenjeno zgoraj, karbocianid obarva negativno nabite membranske strukture in mitohondrije. Fenantidrin obarva nukleinske kisline (DNK, RNK). Membrane in membranske strukture, kot je endoplazmatski retikulum, pa fenantidrin obarva slabše. Barvilo karbocianid ima absorbanco pri $\lambda = 488 \text{ nm}$, emisijo pri $\lambda = 505 \text{ nm}$. Barvilo fenantidrin ima emisijo pri $\lambda = 610 \text{ nm}$. Absorbanca pri valovni dolžini $\lambda = 488 \text{ nm}$ je torej za obe barvili enaka.
4. Obarvani vzorci potujejo preko pretočne celice s pomočjo brizge za vzorec, ki ustvarja značilen tekočinski pretok. Pretok vzorca skozi izotonično raztopino prečka argonski laserski žarek. Tu se že lahko določi jakost sipane svetlobe in fluorescence.
5. Vzorci pripotujejo do detektorjev, ki prepoznajo signale. Signala za jakost sipane svetlobe in fluorescence, ki ju predhodno zaznajo detektorji, analizator pretvori v štiri parametre oz. točkovne diagrame: graf jakosti sipane svetlobe (Fsc – Forward Scattered Light Intensity), graf širine pulza sipanja svetlobe (Fscw – Forward Scattered Light Pulse Width), graf jakosti fluorescence (Fl – Fluorescence Intensity) ter graf širine pulza fluorescence (Flw – Fluorescence Pulse Width). Podatki teh parametrov se skupaj z impedanco prenesejo do mikroračunalnika. V glavnem detektorji zaznajo fluorescenco, sipano svetlobo in impedanco. Obe valovni dolžini detektira isti detektor.

6. Detektirani signali sipane svetlobe, fluorescence in impedance se detektirajo posebej. Pretvorijo se v električne signale. Signali omogočajo identifikacijo delcev.
7. Rezultati se podajajo v obliki grafov in števil. Grafične podatke lahko tudi natisnemo (6, 12).

3.4.2 Notranja kontrola kvalitete

Kontrola kvalitete se imenuje tudi UF CHECK. Pred začetkom dela se dnevno naredi kontrola kvalitete z uporabo UF CHECK kontrolnega materiala. Analizo kontrole kvalitete naredimo kar ročno. Predhodno 1 mL kontrolnega materiala prenesemo v epruveto. Vsak kontrolni material je označen z ustrezno črtno kodo in lot številko proizvajalca. Črtno kodo kontrolnega materiala prepozna pretočni citometer. Rezultati kontrole morajo biti v predpisanem območju.

Sestava kontrole: UF CHECK je kontrolni material, narejen za serije pretočnih citometrov (UF-100, UF-50 ter UF-1000). Aktivne sestavine kontrolnega materiala so: kontrolni 0,8 % (umetni – lateksni delci); 9,5 % etanola in 0,5 % solne kisline. Kontrolni material UF CHECK ne vsebuje bioloških materialov. Življenjska doba kontrole v steklenički je eno leto na sobni temperaturi (2–35 °C) in je obstojna oz. stabilna še 30 dni po odprtju, tudi na sobni temperaturi. Analizator čistimo z mehko krpico in blagim detergentom. Aparat čistimo vedno, ko končamo z delom.

3.4.3 Vrednotenje rezultatov in enote pri citometru

UF-100 poda vse rezultate analize v dveh enotah in sicer kot število delcev ali celic/ μL oziroma št. celic $\times 10^6 / \text{L}$ in kot število delcev ali celic/HPF. Cilindre lahko poda tudi kot število cilindrov/LPF. HPF pomeni high power field oz. vidno polje pri večji povečavi (400x). LPF pomeni low power field ali vidno polje pri manjši povečavi mikroskopa (100x). Citometer ima že določen volumen za veliko povečavo 0,18 μL in za malo povečavo 2,9 μL . Rezultate izdajamo na vidno polje s povečavo 400x. Analizator obdela rezultate s faktorjem pretvorbe 5,55 ter jih preračuna na vidno polje mikroskopa (LPF, HPF). Preostale parametre oz. delce prikaže kot dodatno opombo kot rdeč (+). Eden izmed

preostalih parametrov so na primer bakterije. Vrednotenje bakterij pri pretočnem citometru prikazuje preglednica 2.

Preglednica 2: Vrednotenje bakterij pri analizi s pretočnim citometrom UF-100.

Število bakterij	Vrednotenje	Vrednotenje pri citometriji
< 1000	0	0
1000–2999	Malo	1
3000–6999	Številno	2
> 7000	Zelo številno	3

3.4.4 Referenčne vrednosti

Referenčne vrednosti pretočnega citometra UF-100 so za eritrocite do 3/HPF in za levkocite do 5/HPF. Kot je bilo že omenjeno pri avtomatskem mikroskopu IRIS iQ-200, smo se v diplomski nalogi odločili za prikaz in izračun rezultatov urinske analize v enotah števila delcev/HPF.

3.5 STATISTIČNA OBDELAVA SKUPINSKIH REZULTATOV

Vse rezultate smo statistično obdelali in ovrednotili z medicinskim statističnim programom MedCalc za Windows, kjer smo primerjali dobljene rezultate eritrocitov in levkocitov na obeh aparataturah oz. pri obeh različnih metodah delovanja. Testirali smo normalno/nenormalno porazdelitev in sicer z Wilcoxonovim testom za eritrocite in levkocite. Porazdelitev rezultatov smo prikazali s pomočjo percentilov. Primerjave rezultatov smo podali z regresijsko premico s 95-% mejo zaupanja in 95-% mejo napovedane vrednosti (verjetnostjo) ter s korelacijo rangov po Spearmanu. Analizo rezultatov eritrocitov in levkocitov smo prikazali z Bland-Altmanovimi grafi.

4 REZULTATI

4.1 PORAZDELITEV REZULTATOV IN VREDNOSTI, DOBLJENE Z WILCOXONOVIM TESTOM

Distribucija oz. porazdelitev rezultatov je neparametrična (ni normalna) pri obeh analizatorjih, zato smo vzeli Wilcoxonov test. D'Agostino-Pearsonov test za normalno porazdelitev je zavrnil normalno distribucijo ($p < 0,0001$).

Preglednica 3: Rezultati, dobljeni z Wilcoxonovim testom.

Primerjava	z	p
Lkci-iQ/Lkci-UF	-1,45	0,15
Erci-iQ/Erci-UF	-5,76	<0,0001

Porazdelitev rezultatov je neparametrična: $p < 0,05$. Rezultati so bili dobljeni s pretočnim citometrom UF-100 in avtomatskim mikroskopom iQ-200 za levkocite in eritrocite na HPF oz. na vidno polje pri povečavi 400x in s korelacijo. Tukaj je faktor pretvorbe 5,55 (Preglednica 3).

Levkociti: glede na Wilcoxonov test lahko sklepamo, da ne prihaja do statistično značilnih razlik med meritvami levkocitov, izmerjenih po metodi pretočne citometrije na analizatorju UF-100 in po metodi mikroskopiranja na analizatorju IRIS iQ 200 ($z = -1,45$; $p = 0,15$), kjer vrednost mediane za levkocite na vidno polje pri aparatu IRIS iQ 200 znaša 5, vrednost mediane za levkocite pri aparatu UF-100 pa 6.

Eritrociti: z uporabo Wilcoxonovega testa lahko sklepamo, da prihaja do statistično značilnih razlik pri rezultatih meritev z metodo pretočne citometrije (UF-100) in rezultatih meritev po metodi mikroskopiranja z aparatom IRIS iQ 200 ($z = -5,76$, $p < 0,0001$), pri čemer mediana za eritrocite na analizatorju IRIS znaša 2, vrednost mediane za eritrocite pri aparatu UF-100 pa 5.

4.1.1 Primerjava statistično obdelanih rezultatov levkocitov in eritrocitov, dobljenih z avtomatskim mikroskopom iQ-200 in pretočnim citometrom UF-100

Preglednica 4: Primerjava pomembnejših statističnih parametrov za avtomatski mikroskop iQ-200 in pretočni citometer UF-100 za levkocite in eritrocite.

Določani parametri	Levkociti iQ-200	Levkociti UF-100	Eritrociti iQ-200	Eritrociti UF-100
Število vzorcev	107	107	108	108
Najnižja vrednost	1,00	0,00	0,00	0,00
Najvišja vrednost	2309,00	1145,00	1450,00	1949,00
Mediana	5,00	6,00	2,00	6,00

Najnižja vrednost za levkocite na analizatorju iQ 200 je bila 1, medtem ko je bila za levkocite najnižja vrednost 0 na analizatorju UF-100. Pri eritrocitih je bila najnižja vrednost v primeru obeh analizatorjev 0. Najvišja vrednost za levkocite na analizatorju iQ 200 je bila 2309, na aparatu UF-100 pa je bila 1145. Pri eritrocitih znaša najvišja vrednost na analizatorju iQ-200 1450 in na UF-100 1949. Mediana je bila za levkocite in eritrocite na analizatorju UF-100 6. Razlika v mediani pa je bila pri aparatu iQ-200 in sicer za levkocite 5 ter za eritrocite 2 (Preglednica 4).

4.1.2 Primerjava ostalih statističnih rezultatov levkocitov in eritrocitov, dobljenih z avtomatskim mikroskopom iQ-200 in pretočnim citometrom UF-100

Preglednica 5: Primerjava ostalih statističnih parametrov za avtomatski mikroskop iQ-200 in pretočni citometer UF-100 za levkocite in eritrocite.

Določani parametri	Varianca	Standardna deviacija	Relativni standardni odklon (%)	Standardna napaka aritmetične sredine
Levkociti-iQ-200	56710,59	238,14	457,22	23,02
Levkociti-UF-100	15482,36	124,43	352,06	11,97
Eritrociti-iQ-200	29250,04	171,03	462,47	16,46
Eritrociti-UF-100	50556,29	224,85	429,87	21,64

Statistične parametre kot so varianca, standardna deviacija, relativni standardni odklon (%) ter standardna napaka aritmetične sredine smo podali za levkocite in eritrocite kot število delcev na vidno polje pri povečavi 400x za oba analizatorja (Preglednica 5).

4.1.3 Primerjava med eritrociti in levkociti pri obeh analizatorjih

Pretočni citometer Sysmex UF-100 ima pri levkocitih manjša odstopanja od avtomatskega mikroskopa Iris iQ-200. Iz dobljenih rezultatov sklepamo, da bi za eritrocite uporabili raje avtomatski mikroskop iQ-200, zaradi manjših odstopanj. Za levkocite bi uporabili pretočni citometer UF-100, pri katerem so vrednosti bolj primerljive in je manj odstopanj med rezultati. Večina rezultatov vzorcev je zelo primerljivih. Seveda prihaja tudi do razlik, ki so razvidne iz grafov (povišane vrednosti eritrocitov na UF-100 in levkocitov na iQ-200).

Preglednica 6: Porazdelitev vrednosti levkocitov v sedimentu urina na aparatu Iris iQ-200 pri (HPF) glede na percentile.

Percentili	Vrednost število	95-% interval zaupanja
25	2,00	1,00 do 3,00
75	18,25	10,76 do 28,79

Četrtnina vzorcev ima pri aparatu Iris iQ-200 pri HPF vrednosti levkocitov manjše ali enako 2, pri čemer lahko s 95-% gotovostjo trdimo, da se bo prvi populacijski kvartil nahajal nekje na intervalu med 1 in 3 (Preglednica 7). Tri četrtine vzorcev imajo pri aparatu Iris iQ-200 pri HPF vrednosti levkocitov manjše ali enako 18.25, pri čemer lahko s 95-% gotovostjo trdimo, da se bo tretji populacijski kvartil nahajal nekje na intervalu med 10,76 in 28,79 (Preglednica 6).

Preglednica 7: Porazdelitev vrednosti levkocitov v sedimentu urina na aparatu UF-100 pri (HPF) glede na percentile.

Percentili	Vrednost število	95-% interval zaupanja
25	2,00	2,00 do 3,00
75	16,00	11,00 do 35,05

Četrtnina vzorcev ima vrednosti levkocitov na aparatu UF-100 manjše ali enako 2, pri čemer lahko s 95-% gotovostjo trdimo, da se bo prvi populacijski kvartil nahajal nekje na intervalu med 2 in 3. Tri četrtine vzorcev imajo vrednosti levkocitov na aparatu UF-100 manjše ali enako 16, pri čemer lahko s 95-% gotovostjo trdimo, da se bo tretji populacijski kvartil nahajal nekje na intervalu med 11 in 35,05 (Preglednica 7).

Preglednica 8: Porazdelitev vrednosti eritrocitov v sedimentu urina na aparatu Iris iQ-200 pri (HPF) glede na percentile.

Percentili	Vrednost Število	95-% interval zaupanja
25	1,00	1,00 do 1,00
75	9,00	5,00 do 14,05

Četrtnina vzorcev ima vrednosti eritrocitov na aparatu Iris iQ-200 manjše ali enako 1, pri čemer lahko s 95-% gotovostjo trdimo, da bo prvi populacijski kvartil zavzel vrednost 1 (Preglednica 9). Tri četrtine vzorcev imajo vrednosti eritrocitov na aparatu Iris iQ-200 manjše ali enako 9, pri čemer lahko s 95-% gotovostjo trdimo, da se bo tretji populacijski kvartil nahajal nekje na intervalu med 5 in 14,05 (Preglednica 8).

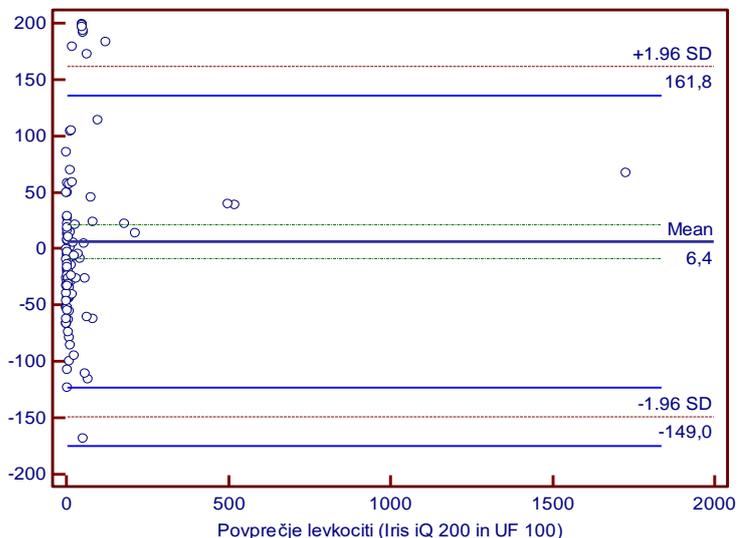
Preglednica 9: Porazdelitev vrednosti eritrocitov v sedimentu urina na aparatu UF-100 pri (HPF) glede na percentile.

Percentili	Vrednost število	95-% interval zaupanja
25	2,00	1,00 do 3,00
75	22,50	16,47 do 40,32

Četrtnina vzorcev ima vrednosti eritrocitov na aparatu UF-100 manjše ali enako 2, pri čemer lahko s 95-% gotovostjo trdimo, da se bo prvi populacijski kvartil nahajal nekje na intervalu med 1 in 3. Tri četrtine vzorcev imajo vrednosti levkocitov na aparatu UF-100 manjše ali enako 22,50, pri čemer lahko s 95-% gotovostjo trdimo, da se bo tretji populacijski kvartil nahajal nekje na intervalu med 16,47 in 40,32 (Preglednica 9).

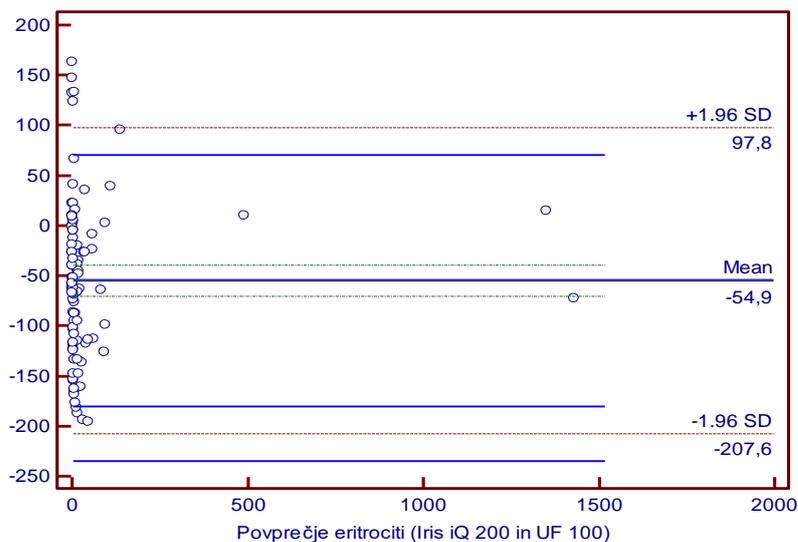
4.1.3.1 Prikaz števila levkocitov in eritrocitov med Iris iQ 200 in Sysmex UF 100 z Bland Altmanovima grafoma (na vidno polje pri 400-kratni povečavi)

Graf 1: Povprečje levkocitov med Iris iQ 200 in UF 100.



V Grafu 1 je večina rezultatov povprečja levkocitov v dovoljenem mejnem območju. To pomeni, da je povprečje rezultatov razporejeno okoli aritmetične sredine. Nekaj rezultatov levkocitov je v zgornji meji dovoljenega intervala, nekaj rezultatov pa izven dovoljenega standardnega odklona. Proti dovoljenemu spodnjemu intervalu gre le en rezultat levkocitov. Za oba analizatorja veljajo enote na vidno polje pri 400-kratni povečavi.

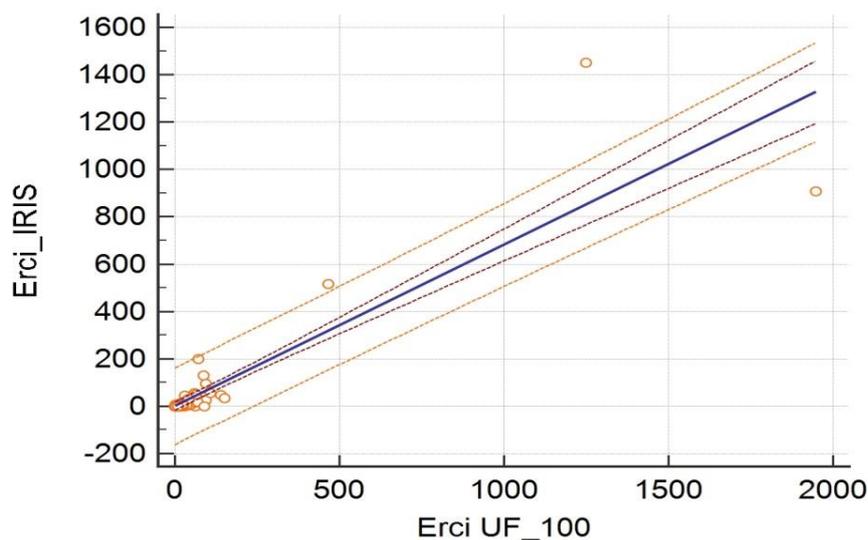
Graf 2: Povprečje eritrocitov med Iris iQ 200 in UF 100.



Povprečje rezultatov eritrocitov se nahaja okoli aritmetične sredine. Tukaj je večina vseh rezultatov. Enakomerno in približno so razporejeni v obeh smereh proti dovoljenima mejnima intervaloma. Nad zgornjo dovoljeno mejo standardnega odklona so kar trije rezultati. Eden od rezultatov je ravno na zgornji meji. Obratno je glede spodnje dovoljene meje, kjer je noben rezultat ne presega (Graf 2). Za oba analizatorja veljajo enote na vidno polje pri 400-kratni povečavi.

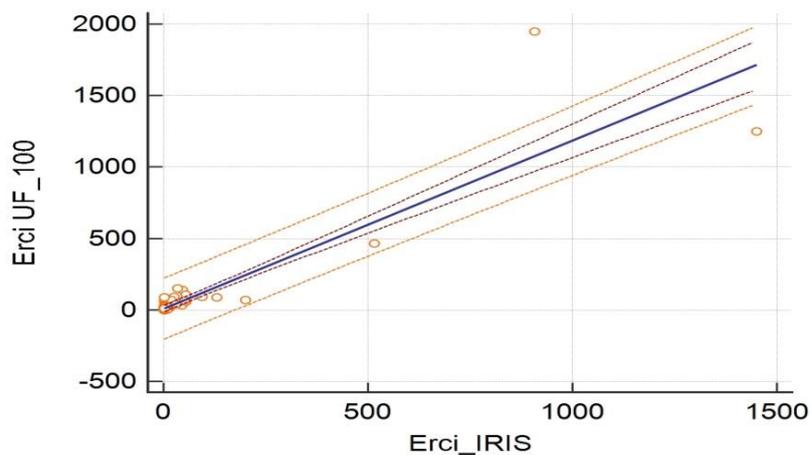
4.1.4 Primerjava vrednosti rezultatov eritrocitov na analizatorju UF-100 in avtomatskem mikroskopu IRIS iQ-200

Graf 3: Primerjava štetja števila eritrocitov z avtomatskim mikroskopom IRIS iQ-200 in analizatorjem UF-100.



Pri primerjavi štetja števila eritrocitov z avtomatskim mikroskopom IRIS iQ 200 in analizatorjem UF-100 (pri obeh je število eritrocitov/HPF s povečavo 400x) z regresijsko premico, 95-% mejo zaupanja in 95-% mejo napovedne vrednosti smo dobili enačbo regresijske premice: $Y = 1,7554 + 0,6806 X$ (Graf 3).

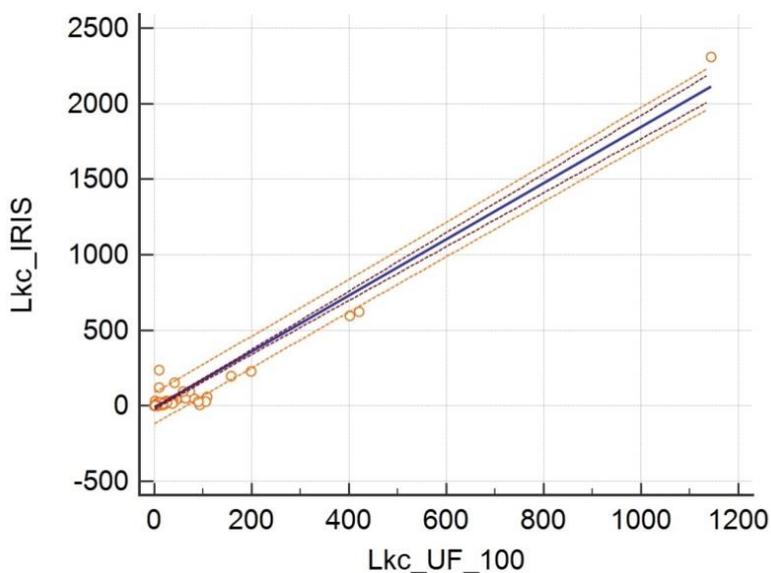
Graf 4: Primerjava štetja števila eritrocitov z analizatorjem UF-100 in števila štetja eritrocitov na avtomatskem mikroskopu IRIS iQ-200.



Pri primerjavi štetja števila eritrocitov z analizatorjem UF-100 in avtomatskim mikroskopom iQ 200 (pri obeh je število eritrocitov/HPF s povečavo 400x) s premico regresije, 95-% mejo zaupanja in 95-% mejo napovedne vrednosti smo dobili enačbo regresijske premice: $Y = 9,6362 + 1,757 X$; $R^2 = 0,8002$, $P < 0,0001$ (Graf 4).

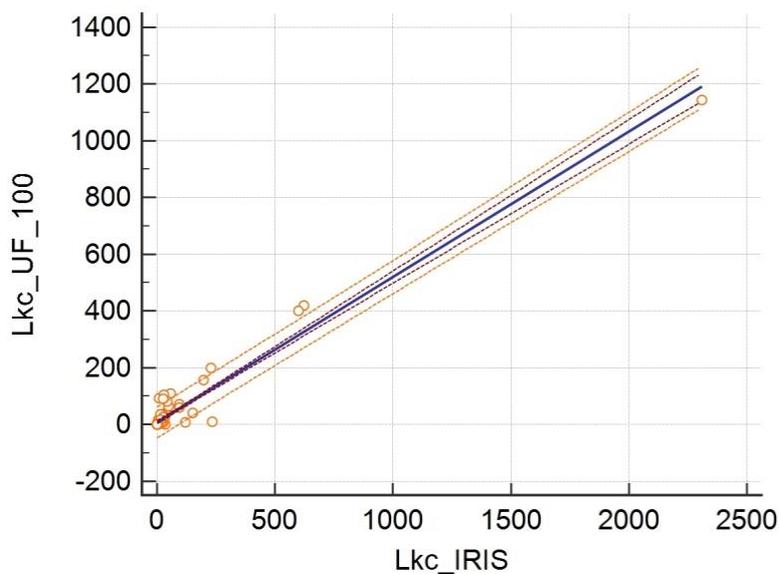
4.1.5 Primerjava vrednosti rezultatov levkocitov na analizatorju UF-100 in avtomatskem mikroskopu IRIS iQ-200

Graf 5: Primerjava štetja števila levkocitov z avtomatskim mikroskopom IRIS iQ-200 in analizatorjem UF-100.



Pri primerjavi štetja števila levkocitov z avtomatskim mikroskopom Iris iQ in analizatorjem UF-100 (pri obeh je število levkocitov/HPF s povečavo 400x) s premico regresije, 95-% mejo zaupanja in 95-% mejo napovedne vrednosti, smo dobili enačbo regresijske premice: $Y = -14,1301 + 1,8605 X$ (Graf 5).

Graf 6: Primerjava štetja števila levkocitov z analizatorjem UF-100 in števila štetja levkocitov na avtomatskem mikroskopu IRIS iQ-200.



Pri primerjavi štetja števila levkocitov z analizatorjem UF-100 in avtomatskim mikroskopom Iris iQ-200 (pri obeh je število levkocitov/HPF s povečavo 400x) s premico regresije, 95-% mejo zaupanja in 95-% mejo napovedne vrednosti, smo dobili enačbo regresijske premice: $Y = 8,9225 + 0,5120 X$; $R^2 = 0,9526$, $p < 0,0001$ (Graf 6).

5 RAZPRAVA

Primerjali smo rezultate urinskega sedimenta, pridobljene s pretočnim citometrom Sysmex UF-100 in z avtomatiziranim mikroskopom IRIS iQ-200. Zanimala nas je predvsem ocena principa določanja urinskih parametrov in statistično ovrednotenje rezultatov urinskega sedimenta. UF-100 sprejme večje število vzorcev naenkrat v primerjavi z IRIS iQ-200 in sicer kar 45 vzorcev več. Izražanje rezultatov pri UF-100 je v dveh enotah in sicer kot število delcev ali celic/ μL oziroma št. celic $\times 10^6/\text{L}$ in kot število delcev ali celic/HPF. Pri IRIS iQ-200 pa so izpisani rezultati v μL ali na vidno polje. Pretvornik za preračun iz μL pri avtomatskem mikroskopu je 5,5 HPF. HPF je vidno polje mikroskopa pri povečavi 400x. Prikaz razpršenosti rezultatov z Bland Altmanovima grafoma nakazuje na dejstvo, da je povprečje rezultatov eritrocitov in levkocitov na obeh analizatorjih v večini primerov v dovoljenem območju intervalov in sicer od + 1,96 standardnega odklona do - 1,96. Vrednosti rezultatov obeh parametrov so natančnejše v območju $\pm 2\text{SD}$, kar je v redu.

Vsekakor obstajajo tudi odstopanja, kar je razvidno iz grafa 1 in 2. Pri prvem grafu so trije rezultati levkocitov tik ob zgornji meji + 1,96, medtem ko trije padejo izven mejnih vrednosti (outlayer). En rezultat za levkocite se zelo približa spodnji mejni vrednosti standardnega odklona. Pri eritrocitih je zadeva takšna, da je en rezultat čisto na zgornji meji dovoljenega intervala +1,96 SD, medtem ko trije izstopajo iz zgornjega dovoljenega območja. Proti spodnjemu območju (-1,96 SD) za rezultate eritrocitov nobeden od rezultatov ne odstopa ekstremno. Rezultati so pri obeh parametrih, eritrocitih in levkocitih v istem sklopu regresijske premice. Se pa najdejo tudi izjeme rezultatov vzorcev na grafih, ki odstopajo od povprečja. To je razvidno iz grafov 3 in 4. Iz tega lahko sklepamo, da je prišlo že pri samem analiziranju eritrocitov pri obeh analizatorjih do vidnih sprememb. Takšne rezultate bi morali izločiti že na samem začetku analize na obeh aparatih. Tako bi bili rezultati za eritrocite tudi bolj primerljivi. Nekateri rezultati levkocitov prav tako vidno odstopajo od regresijske premice, toda vseeno manj kot eritrociti. Vzorci, ki izstopajo, so patološki.

Glede na zgornje ugotovitve grafov pri rezultatih parametrov, ki vidno odstopajo od dovoljenih mejnih vrednosti, predvidevam, da je vzrok tem odstopanjem v bolj gostem oziroma patološkem urinskem vzorcu. Tudi takim vzorcem je potrebno v prihodnje

nameniti pozornost, saj nam povedo veliko o pomembnosti analize. Pri patoloških vzorcih prihaja do veliko večjih razlik v korelaciji kot pri normalnih vzorcih. Tudi razponi med razredi so podobni in sicer razlikujeta se zadnja dva razreda, kjer je pri UF-100 zgornja meja za številne do 6999, nad 7000 pa so zelo številni. Pri IRIS iQ-200 so celice številne do meje 5000, nad njo pa zelo številne. Tako lahko potrdimo, da so dobljeni rezultati urinskih parametrov, pridobljeni z obema analizatorjema, primerljivi.

Pri praktičnem delu diplomske naloge smo analizirali 107 vzorcev za oceno številčne vrednosti levkocitov ter 108 vzorcev za oceno številčne vrednosti eritrocitov. Pri levkocitih in eritrocitih je prihajalo do večjih razlik med rezultati, predvsem pri višjih vrednostih. Šele pri statistični obdelavi rezultatov eritrocitov in levkocitov je razvidno, da so bistvene razlike med rezultati obeh analizatorjev. Pri oceni levkocitov je bila pri Iris IQ-200 (23,02) standardna napaka aritmetične sredine kar dvakrat večja kot pri Sysmex UF-100 (11,97). Pri eritrocitih pa je bila situacija ravno obratna. Populacijski kvartil pri Iris IQ-200 je bil med vrednostma 1 in 3, pri Sysmex UF-100 pa med vrednostma 2 in 3. Glede na to, da ima pretočni citometer Sysmex UF-100 pri levkocitih manjša odstopanja od avtomatskega mikroskopa Iris iQ-200, je slednji bolj primeren za analizo levkocitov. Avtomatski mikroskop Iris iQ-200 je zaradi manjših odstopanj bolj priporočljiv pri analizi eritrocitov.

Prednosti pretočnega citometra Sysmex UF-100 so:

- z njim lahko hitro analiziramo večje število vzorcev,
- je popolnoma avtomatiziran in ima prednost v primerjavi z mikroskopom, da lažje odkrije nekatere elemente, ki jih težje določimo pri mikroskopiranju s svetlobnim mikroskopom,
- boljša je ponovljivost rezultatov,
- je visoko občutljiv, odkrije tiste elemente, ki jih težje določimo pri mikroskopiranju s svetlobnim mikroskopom,
- podaja rezultate grafično in številčno ter poda opozorila.

Prednosti avtomatskega mikroskopa Iris iQ-200 so:

- je avtomatiziran mikroskopski analizator, torej nima več ročnega vnašanja v računalnik,

- poda podatke tudi v obliki slik, saj ima tudi monitor, razdeli sliko v več manjših slik in omogoča hitrejši in natančnejši pregled vseh parametrov,
- lahko deluje kot samostojna enota ali v kombinaciji z drugimi rezultati kemijske analize,
- podaja rezultate v slikovni obliki in številčno,
- opozori na dodatne celice.

Ne glede na rezultate je treba poudariti, da sta oba analizatorja vrhunska, saj imata dovršeno opremo. Postopka pa sta kljub temu popolnoma različna. Kadar so izpisana opozorila pri obeh analizatorjih, se vzorec pogleda z mikroskopom. Pri mikroskopu je treba upoštevati še človeški faktor, saj je potrebno tudi z očesom odčitati nekatere podatke, po drugi strani pa gre za cenejšo investicijo. Pri manualnih tehnikah predstavlja svetlobni mikroskop še vedno zlati standard pri vrednotenju urinskega sedimenta, kjer je poudarek predvsem na izkušenem laboratorijskem osebju. Dolgoletne izkušnje in strokovnost laboratorijskega osebja je še en pomemben človeški faktor, ki je bolj zanesljiv in zakrije morebitne slabosti obeh analizatorjev. Citometer Sysmex UF-100 je bolj občutljiv za celice, medtem ko je avtomatski mikroskop IRIS iQ- 200 bolj robusten. Oba analizatorja pa lahko denimo zamenjata eritrocite za prisotnost glivic. Tu je torej še dodaten dokaz za to, da sta svetlobni mikroskop in izkušnost laboratorijskega osebja kljub dovršenosti obeh analizatorjev še vedno najboljša in najbolj zanesljiva tehnika pri določevanju celic urinskega sedimenta.

6 SKLEP

Urinska diagnostika se nenehno razvija. Posledično se je z njenim hitrim razvojem povečala potreba po avtomatizaciji urinskih analizatorjev. V laboratoriju za analitiko urina in spremljanje koncentracije zdravil je uporaba pretočnega citometra in avtomatiziranega pretočnega mikroskopskega analizatorja pripomogla k večjemu obsegu in učinkovitosti urinske analize. Poleg sodobne avtomatizacije, ki predstavlja izziv klasični mikroskopiji, moramo poudariti, da je mikroskopija predhodnica sodobnih tehnik in še vedno osnovni temelj analize urinskega sedimenta.

V diplomski nalogi smo primerjali dva različna analizatorja urina in sicer pretočni citometer Sysmex UF-100 in avtomatiziran mikroskopski analizator urina IRIS iQ-200. Najprej smo oba analizatorja opisali in ovrednotili glede na njune tehnične lastnosti in posebnosti ter opisali oba postopka pridobivanja rezultatov pri obeh analizatorjih.

Potem smo v praktičnem delu naloge opravili raziskavo s 107-imi oziroma 108-imi vzorci urina in jih primerjali glede na dobljene vrednosti za eritrocite in levkocite. Sicer gre le za dve vrsti celic, a rezultati so vseeno pokazali razlike. Pri eritrocitih se je bolje odrezal avtomatski mikroskop Iris iQ-200, ki je podal bolj natančne rezultate z manjšimi odstopanji. Pri levkocitih pa je bolj priporočljiv pretočni citometer Sysmex UF-100, ta analizator je tudi bolj občutljiv. Natančneje zazna določeno vrsto celic, obenem pa tudi natančneje opredeli morebitne patološke celice. Če ocenjujemo oba analizatorja le glede na sposobnost pridobivanja podatkov iz vzorca urina za eritrocite in levkocite, vidimo, da sta izenačena in tako bi lahko zaključili, da za dobro in natančno delo laboratorij potrebuje oba.

Tudi širši pogled na prednosti in slabosti obeh analizatorjev nam ne da bolj natančnega odgovora, oba imata prednosti in slabosti, ki so primerljive in nobeden posebej ne izstopa. Zato bi bila priporočljiva širša raziskava ali pa povečana baza podatkov v smislu večjega števila vzorcev urina, na podlagi česar bi lahko prišli do morebitnih večjih razlik, lahko pa tudi do popolnoma primerljivih rezultatov.

7 LITERATURA

1. Krivec Š., Kramberger M., Korman-Frangeš M.: Zbornik predavanj/ Seminar za tehnike laboratorijske medicine, Ljubljana, Maribor, Topolšica; 2001, 3-6.
2. Skitek M.: Osnovna urinska analiza, Zbornik predavanj, SZKK, kemijo, Jesenice, Ljubljana, Maribor, Murska Sobota; 2003; 1-12.
3. Plazar N., Pahor V., Berce K.: Priporočeni postopki za osnovno analizo urina, SZKK, Ljubljana, 2004, 3-7.
4. Skitek M. in Trampuš Bakija A.: Priporočeni postopek za odvzem, zbiranje, hranjenje, stabiliziranje in transport urina, SZKK, Ljubljana, 2001, 1-7.
5. Modrica Kobe J.: Osnovne laboratorijske preiskave krvi, seča, blata. Vita strokovno zdravstveno vzgojna revija, laboratorijska diagnostika, št. 69, junij 2009, letnik XV. Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo, UKC Ljubljana; 5-7.
6. Poljašević Plavša V.: Proučevanje pretočne citometrije v osnovni urinski analizi, diplomska naloga, Ljubljana, 2007, 54; 9-38.
7. IQ Series operators manual (navodilo z uporabo mikroskopskega analizatorja), English A4 rev (03/2007); 300-4427.
10. Čabarkapa V., Đerić M., Stošić Z.: Testing of iQ™ 200 automated urine analyzer analytical performances in comparison with manual techniques. Ispitivanje analitičkih karakteristika iQ™ 200 automatskog analizatora za urine u poređenju sa manuelnim tehnikama, Center of laboratory medicine, Clinical center of Vojvodina, Novi Sad, Serbia JMB; 2009, 28: 122-128.
11. iQ™ 200 Automatizirani mikroskopski analizator (Atlas mikroskopskih snimaka). Lalić N., Ilić M.: Klinički značaj analize urina: Atlas sedimenta urina, Beograd: Društvo medicinskih biohemičara Srbije i Crne Gore; 2005:5 pp. (Novo analitica); 2-23.
12. Sikirica M., Bobetić-Vranić T.: Analitička procjena automatskog mikroskopskog analizatora Iris iQ™ 200 u kvalitativnoj analizi mokraće. Zavod za kliničku kemiju, Klinička bolnica "Merkur", Zagreb, Stručni članak, Biochemia medica, časopis hrvatskog društva biomedicinskih biokemičara broj: 3-4, Zagreb, srpanj-prosinac 2004, godište 14; 83-89.
13. Žnidaršič J.: Orientacijske vrednosti sestavin urinskega sedimenta, Diplomska naloga, Ljubljana, 2004, 53; 7-23.

14. Performance of the Sysmex UF 100™, Fully automated urine cell analyzer Sysmex Journal international Vol.6 No.1, Medical electronics co.ltd. scientific c, Kobe, Japan: 1996, str. 36-40.
15. De Keijzer M. H, Brandts R. W., Flow cytometry and urine laboratory. Field evaluation of the Sysmex UF-100™ , Sysmex Journal international, 7 (2); 1994, str. 117-122.
17. Operator's manual fully automated urine cell analyzer UF 100(TM), UF 50™ (Navodilo za uporabo pretočnega citometra), first edition May 7, Sysmex Corporation, Scientific division, Kobe, Clinical ase study 2, Clinical interpretations of patient examination results; 2001, 4-48.
18. Proposed cell count normal limits for urines processed on the Sysmex UF 100™, Determination by retrospective analysis of "normalised" urine data, Joanne Duval (Sysmex J. int.; 2004, 14: 23-29.

INTERNETNI VIRI

8. <http://www.medwow.com/med/urine-analyzer-automated/iris-diagnostics/iq-elite-automated-urinalysis-workcell/33133.model-spec>
9. https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/lf/js15/mikroskop/web/pages/valce_en.html
16. <http://www.medwow.com/med/urine-analyzer-automated/sysmex/uf-100i/33140.model-spec>

8 PRILOGE

Priloga 1: Rezultati eritrocitov in levkocitov na vidno polje pri 400-kratni povečavi in v mikrolitrih za Iris iQ 200 in Sysmex UF-100.....	45
Priloga 2: Rezultati pregleda urinskega sedimenta pod mikroskopom	49

Priloga 1: Rezultati eritrocitov in levkocitov na vidno polje pri 400-kratni povečavi in v mikrolitrih za Iris iQ 200 in Sysmex UF-100.

IRIS		UF 100			
Erci/HPF	Lkci/HPF	Erci/ μ L	Erci/HPF	Lkci/ μ L	Lkci/HPF
2,00	4,00	55,6	10,00	42,5	7,70
1,00	6,00	8,3	1,50	52,2	9,40
515,00	34,00	2583,10	465,40	10,8	1,90
2,00	9,00	19,6	3,50	66,7	12,00
1,00	4,00	4,2	0,80	27,1	4,90
95,00	57,00	513,1	92,50	604,2	108,90
14,00	56,00	111,1	20,00	297	53,50
1,00	2,00	5,4	1,00	11,1	2,00
1,00	5,00	7,1	1,30	36,7	6,60
44,00	4,00	170,9	30,80	19,5	3,50
15,00	41,00	160,4	28,90	248,9	44,80
0,99	1,00	1,1	0,20	2,4	0,40
1,00	0,99	21,9	3,90	5	0,90
1,00	8,00	167,6	30,20	520	93,70
1,00	2,00	341,3	61,50	6,9	1,20
1,00	5,00	113	20,40	43,3	7,80
3,00	9,00	46,7	8,40	62,5	11,30
3,00	3,00	37,2	6,70	15,5	2,80
1,00	1,00	42,7	7,70	9,6	1,70
12,00	28,00	105,3	19,00	584,1	105,20
0,99	1,00	13,6	2,50	23,4	4,20
5,00	11,00	22,0	4,00	60,4	10,90
47,00	2,00	769,2	138,60	6	1,10
3,00	4,00	4,1	0,70	20,8	3,70
3,00	5,00	18,6	3,40	63,9	11,50
	1,00	1,1	0,20	7	1,30
5,00	198,00	253,4	45,70	877,4	158,10
1,00	36,00	9,2	1,70	209,5	37,70
3,00	5,00	16,0	2,90	21	3,80

IRIS		UF 100			
Erci/HPF	Lkci/HPF	Erci/ μ L	Erci/HPF	Lkci/ μ L	Lkci/HPF
0,99	3,00	21,1	3,80	13,3	2,40
9,00	22,00	265,3	47,80	131	23,60
55,00	8,00	332,5	59,90	40,2	7,20
0,99	2,00	5,8	1,00	13,2	2,40
2,00	3,00	1,6	0,30	35,8	6,50
4,00	13,00	21,0	3,80	40,1	7,20
2,00	49,00	11,9	2,10	355,5	64,10
0,99	2,00	17,3	3,10	15,1	2,70
13,00	93,00	87,7	15,80	406,2	73,20
13,00	3,00	106,8	19,20	17,7	3,20
4,00	6,00	43,5	7,80	40,4	7,30
16,00	6,00	342,6	61,70	29,3	5,30
5,00	44,00	18,3	3,30	455,1	82,00
1,00	1,00	90,6	16,30	9,2	1,70
26,00	14,00	515,8	92,90	89,9	16,20
2,00	3,00	11,9	2,10	26,1	4,70
200,00	622,00	392,7	70,80	2334,4	420,60
0,99	1,00	6,9	1,20	11,2	2,00
1,00	1,00	10,4	1,90	5,3	1,00
2,00	10,00	24	4,30	47,1	8,50
1,00	6,00	42,3	7,60	36,4	6,60
1,00	22,00	7,4	1,30	116,2	20,90
1,00	7,00	58,1	10,50	59,6	10,70
13,00	16,00	113,7	20,50	42,5	7,70
30,00	12,00	216,8	39,10	89,6	16,10
34,00	19,00	831,7	149,90	33,5	6,00
1,00	5,00	8,1	1,50	83,2	15,00
5,00	4,00	70,3	12,70	28,2	5,10
14,00	26,00	126,7	22,80	501,8	90,40
3,00	3,00	43	7,70	28,2	5,10
	12,00	94,9	17,10	57,9	10,40
9,00	7,00	100,5	18,10	54,9	9,90
9,00	2,00	42,9	7,70	9,5	1,70

IRIS		UF 100			
Erci/HPF	Lkci/HPF	Erci/ μ L	Erci/HPF	Lkci/ μ L	Lkci/HPF
	1,00	5,7	1,00	11,2	2,00
55,00	152,00	593,5	106,90	230,1	41,50
	4,00	4,5	0,80	28,9	5,20
6,00	15,00	122,7	22,10	126	22,70
1,00	0,99	23,4	4,20	11,9	2,10
5,00	27,00	56,5	10,20	195,5	35,20
130,00	598,00	484,6	87,30	2229,7	401,70
0,99	2,00	23,2	4,20	11,9	2,10
11,00	10,00	121,4	21,90	58,3	10,50
2,00	1,00	18,7	3,40	8,2	1,50
0,99	0,99	36,4	6,60	1,3	0,20
0,99	5,00	4,8	0,90	24,9	4,50
19,00	6,00	384	69,20	58,7	10,60
0,99	0,99	10,2	1,80	2,6	0,50
1,00	0,99	21,1	3,80	8,8	1,60
3,00	7,00	34	6,10	97	17,50
5,00	13,00	185,2	33,40	201,8	36,40
1,00	2,00	4,9	0,90	8,3	1,50
3,00	3,00	23,4	4,20	17,2	3,10
	4,00	2,2	0,40	18,3	3,30
1,00	94,00	494,6	89,10	328,9	59,30
	1,00	3,2	0,60	11,1	2,00
0,99	1,00	10,6	1,90	18,3	3,30
2,00	4,00	21,2	3,80	30,7	5,50
		6,5	1,20	2,1	0,40
51,00	25,00	358,1	64,50	43,3	7,80
	2,00	30,2	5,40	19,7	3,50
0,99	1,00	5	0,90	7,5	1,40
2,00	23,00	33,9	6,10	69,3	12,50
	2,00	10,6	1,90	15,3	2,80
3,00	1,00	55,5	10,00	3,3	0,60
	0,99	13,5	2,40	2,4	0,40
	0,99	1,7	0,30	2,6	0,50

IRIS		UF 100			
Erci/HPF	Lkci/HPF	Erci/ μ L	Erci/HPF	Lkci/ μ L	Lkci/HPF
0,99	1,00	0,8	0,10	6,2	1,10
	0,99	4,6	0,80	4,4	0,80
31,00	2,00	224,3	40,40	12,5	2,30
1,00	1,00	10	1,80	8,8	1,60
5,00	31,00	139,2	25,10	138,6	25,00
1,00	25,00	64,5	11,60	148,2	26,70
9,00	2309,00	10,1	1,80	6351,8	1144,50
8,00	228,00	125,7	22,60	1105,5	199,20
8,00	14,00	22,4	4,00	98,9	17,80
1,00	4,00	11,2	2,00	25,9	4,70
908,00	235,00	10814,8	1948,60	56,8	10,20
1450,00	121,00	6933,2	1249,20	49,8	9,00
1,00	1,00	53,3	9,60	10,3	1,90

MIKROSKOP (SEDIMENT)	
Erci/HPF	Lkci/HPF
0	0
0	3
0	0
0	0
0	0
3	0
0	0
3	0
0	0
3	0
4	0
0	0
0	0
0	0
	0
0	0
0	0
0	0
3	4
0	0

MIKROSKOP (SEDIMENT)	
Erci/HPF	Lkci/HPF
3	0
0	0
0	0
4	4
0	0
0	0
0	0
0	
0	0
3	0
0	
0	0
0	0
0	0
0	0
0	0
0	0
0	0
0	4
0	0
0	0
0	0
0	0
3	4
0	3
0	0
0	
	0
	0
4	4
0	0
0	0

MIKROSKOP (SEDIMENT)	
Erci/HPF	Lkci/HPF
0	0
0	
4	
	4
0	0
	0
0	0
0	0
0	3
	0
4	
0	0
4	0
	0
3	4
0	4
0	0
	0
4	0
0	0
3	3