

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŠPELA DRAVINEC

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI PROGRAM
LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŠPELA DRAVINEC

OVREDNOTENJE UPORABNOSTI PARAMETRA

»NEZRELI GRANULOCITI«

USABILITY EVALUATION OF THE PARAMETER

»IMMATURE GRANULOCYTES«

MAGISTRSKI PROGRAM
LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2017

Magistrsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Helene Podgornik, univ. dipl. inž. kem. inž., spec. med. biokem., spec. lab. med. gen.. Praktični del magistrske naloge sem opravila v Laboratoriju za klinično kemijo Zdravstvenega doma Celje pod somentorstvom Mojce Kozmelj, univ. dipl. kem., spec. med. biokem..

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorici izr. prof. dr. Heleni Podgornik, univ. dipl. inž. kem. inž., spec. med. biokem., spec. lab. med. gen. za vso pomoč, usmerjanje in strokovne nasvete pri izdelavi magistrske naloge in somentorici Mojci Kozmelj, univ. dipl. kem., spec. med. biokem. za pomoč pri zbiranju in analizi vzorcev.

Posebna zahvala gre tudi staršem ter omi, ki so med študijem verjeli vame, mi stali ob strani in me vzpodbujali. Za vso podporo se zahvaljujem tudi mojemu fantu Leonu.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice izr. prof. dr. Helene Podgornik, univ. dipl. inž. kem. inž., spec. med. biokem. in somentorstvom Mojce Kozmelj, univ. dipl. .kem., spec. med. biokem..

Špela Dravinec

Predsednik komisije: izr. prof. dr. Simon Žakelj

Mentorica: izr. prof. dr. Helena Podgornik

Somentorica: spec. Mojca Kozmelj

Član komisije: izr. prof. dr. Janez Mravljak

VSEBINA

1	UVOD	1
1.1	Levkocitna krvna slika	2
1.1.1	Razvojne stopnje granulocitov	3
1.2	Naloge in značilnosti granulocitov	4
1.3	Nezreli granulociti v periferni krvi	5
1.3.1	Vzroki za pojav IG v periferni krvi	5
1.3.2	Vloga IG pri prepoznavanju okužb	7
1.3.3	Vloga IG pri prepoznavanju sepse.....	7
1.3.4	IG pri novotvorbah krvi in drugih organov	9
1.4	Nezreli granulociti in mikroskopski pregled krvnega razmaza	10
2	NAMEN DELA	12
3	MATERIALI IN METODE.....	13
3.1	Obravnavani vzorci.....	13
3.1.1	Analiza vzorcev	14
3.2	Analizne metode za določitev IG.....	14
3.2.1	Hemogram z diferencialno krvno sliko na analizatorju Sysmex XN-1000... 14	
3.2.2	Reagenti in kontrole	14
3.2.3	Mikroskopski pregled krvnega razmaza.....	18
3.2.4	Določanje vnetnega parametra CRP na biokemijskem analizatorju	21
3.3	Statistične metode	21
4	REZULTATI.....	23
4.1	Primerjava določanja IG s hematološkim analizatorjem in MPKR.....	23
4.1.1	Primerjava deleža IG pri predšolski populaciji in starejših pacientih	26

4.2	Določitev mejne vrednosti IG	28
4.3	Vrednotenje opozoril	29
4.4	Vloga parametra IG pri prepoznavanju okužb.....	30
4.4.1	Povezava parametrov IG in CRP	30
4.4.2	Povezava parametra IG% in diagnoze.....	31
4.4.3	Predšolska populacija	39
5	RAZPRAVA	43
5.1	Primerjava določanja IG% med hematološkim analizatorjem Sysmex XN-1000 in MPKR	43
5.2	Določitev mejne vrednosti IG% na hematološkem analizatorju.....	44
5.3	Povezava parametra IG % z diagnozo	46
5.3.1	Odrasla populacija	47
5.3.2	Pediatrična populacija.....	48
5.4	Določitev klinične uporabnosti parametra IG na primarni zdravstveni ravni.....	48
6	SKLEP	50
7	LITERATURA.....	51

KAZALO TABEL

Preglednica I: Vzroki za pojav IG v krvi (18).	6
Preglednica II: Kriteriji za SIRS (9).	8
Preglednica III: Reagenti hematološkega analizatorja Sysmex XN-1000.....	15
Preglednica IV: Kriteriji Laboratorija ZD Celje za pregled krvnega razmaza pri odstopanju številčnih vrednosti v hemogramu.	18
Preglednica V: Osnovna statistična analiza dveh različnih načinov določanja IG (N = 152).	23
Preglednica VI: Statistični podatki za vrednosti IG in levkocitov po starostni skupini.	27
Preglednica VII: Vrednotenje opozoril analizatorja na prisotnost IG.	30
Preglednica VIII: Podatki o številu in mediana osnovnih parametrov pacientov z znanimi diagnozami.	32
Preglednica IX: Mediane parametrov za posamezno skupino vzrokov.	35
Preglednica X: Vrednosti AUC.	37
Preglednica XI: Primerjava mediane IG analizatorja in MPKR, levkocitov in CRP med skupinami.	40

KAZALO SLIK

Slika 1: Vrste levkocitov (prirejeno po 11).	2
Slika 2: Število vzorcev po starostnih skupinah.	13
Slika 3: Prikaz metode fluorescenčne pretočne citometrije (prirejeno po 38).	16
Slika 4: Razsevni diagram kanala WDF (prirejeno po 39).	17
Slika 5: Izdelava krvnega razmaza.	20
Slika 6: Razporeditev vrednosti deleža IG.	23
Slika 7: Porazdelitev števila vzorcev glede na vrednosti IG analizatorja.	24
Slika 8: Povezave parametra IG% analizatorja in MPKR.	25
Slika 9: Bland-Altmanov diagram primerjave razlik vrednosti deleža IG med analizatorjem in MPKR.	26
Slika 10: Prikaz porazdelitve deležev IG pridobljenih iz analizatorja med skupinama odraslih in predšolskih otrok.	28
Slika 11: ROC krivulja za določitev lastnosti parametra IG na hematološkem analizatorju Sysmex XN-1000.	29
Slika 12: ROC krivulji za vrednosti IG analizatorja ob kriteriju CRP > 5 mg/L.	31
Slika 13: Vzroki za zvišan delež IG v krvi.	32
Slika 14: ROC krivulji vrednosti IG analizatorja pacientov z znanimi diagnozami za zaznavo okužb.	33
Slika 15: Vzroki za zvišan delež IG v krvi pri odraslih.	34
Slika 16: Grafični prikaz porazdelitve deležev IG na hematološkem analizatorju.	36
Slika 17: analiza ROC za zaznavanje okužb za parametre IG, Lkc in CRP.	38
Slika 18: Vzroki za pojav zvišanega IG% v krvi pri predšolskih otrocih.	39
Slika 19: Prikaz razporeditve deležev IG pridobljenega s hematološkim analizatorjem. ...	41

POVZETEK

Parameter, ki smo ga preučevali v magistrskem delu, se je uvedel v hematološko laboratorijsko diagnostiko z nastopom zmogljivejših hematoloških analizatorjev, ki imajo možnost poleg diferencialne krvne slike opredeliti tudi delež nezrelih celic mieloične vrste pod imenom nezreli granulociti (IG), ki predstavljajo skupen delež promielocitov, mielocitov in metamielocitov, najdenih v periferni krvi. Pojavijo se predvsem zaradi reaktivnih vzrokov in malignih obolenj, njihov pojav v krvi pa je lahko tudi fiziološki. Z izboljšanjem možnosti natančnejšega določanja ter podajanja IG kot del krvne slike, so se pojavile nove priložnosti preučevanja parametra ter njegovega potenciala v laboratorijski diagnostiki. Naloga raziskave je bila ovrednotiti parameter IG, njegovo zanesljivost v primerjavi z mikroskopskim pregledom krvnega razmaza ter njegovo diagnostično uporabnost raziskati na primarni zdravstveni ravni oziroma v zdravstvenem domu.

Rezultati, ki smo jih dobili, kažejo na omejeno diagnostično uporabnost parametra IG. Ujemanje rezultatov IG, pridobljenih s hematološkim analizatorjem in mikroskopskim pregledom, je bilo srednje/dobro z vrednostjo Spearmanovega koeficienta 0,598. Vrednosti IG analizatorja v primerjavi s standardnim mikroskopskim pregledom so bile v povprečju višje za 2,43%. Popolna zamenjava mikroskopskega pregleda s parametrom IG hematološkega analizatorja ni sprejemljiva, lahko pa se prestavi meja deleža IG, pri kateri bi bilo priporočljivo opraviti pregled in diferenciacijo pod mikroskopom. V naši raziskavi smo predstavili mejo deleža IG, pri kateri je treba opraviti mikroskopski pregled krvnega razmaza iz prednastavljene vrednosti $> 1\%$ na $> 2\%$, pri tem pa bi se obseg dela in število krvnih razmazov zmanjšal za 56%.

Pridobili smo podatke o diagnozah pacientov, jih primerjali z dodatnimi parametri in ovrednotili povezavo parametra IG s klinično informacijo. Ugotovili smo, da so vrednosti IG izmerjene pri odraslih višje kot pri predšolskih otrocih. Poleg tega se obe populaciji razlikujeta ne le po deležu IG, ampak tudi po vzrokih za pojav IG. Pri odraslih sta bila vzroka za pojav IG v krvi predvsem maligne bolezni in okužbe, pri otrocih pa so poleg drugih vzrokov prevladovali neopredeljene okužbe. Z ROC analizo smo za vse paciente z znanimi diagnozami za parameter IG določili 85% občutljivost in 52% specifičnost za zaznavo okužb, pri mejni vrednosti analizatorja $> 1\%$. Pri pogoju IG $> 2\%$, pa smo pri skoraj enaki občutljivosti 81% dosegli višjo 67% specifičnost. Primerjava ROC krivulj

odrasle populacije za parametre IG, levkociti in CRP je pokazala največjo diagnostično uporabnost (AUC = 0,873) za parameter CRP z 88% občutljivostjo in 79% specifičnostjo. Pri primerjavi pacientov z deleži IG > 2% pa je imel parameter IG največjo diagnostično uporabnost za zaznavo okužb (AUC = 0,808) z 83% občutljivostjo in 63% specifičnostjo.

V naši raziskavi se je pokazalo, da parameter IG na primarni zdravstveni ravni bistveno bolj pomaga pri laboratorijskih odločitvah za pregled krvnega razmaza, kot pa pri kliničnih odločitvah. Vendar je treba poudariti, da je bilo število bolnikov z močno povečanim deležem IG majhno. Pretežni del zbranih vzorcev je bil v območju do 2%. Zato lahko parameter IG služi kot dodatna informacija, ki v kombinaciji z drugimi diagnostičnimi parametri pomaga pri postavitvi pravilne diagnoze.

ABSTRACT

The parameter that was studied in this thesis was introduced in the hematology laboratory diagnostics with the onset of more powerful hematology analyzers with the addition to differential blood count to identify the proportion of immature cells called immature granulocytes (IG). IG represent the total count of promyelocytes, myelocytes and metamyelocytes found in peripheral blood. They are found in the blood stream mainly due to reactive causes and malignancies and their occurrence in the blood can also be physiological. By improving the ability to better determine and deliver IG results as a proportion of cells, new opportunities have emerged to study the parameter and its potential in laboratory diagnostics. The task of the research was to evaluate the parameter IG, its reliability in comparison with the microscopic examination of blood smears and its diagnostic usefulness investigated at the level of primary health care.

The results that we have obtained indicate a limited diagnostic use of the IG parameter. The matching of the results of IG obtained by the hematologic analyzer and microscopic examination was medium/well with a Spearman coefficient of 0.598. The IG values obtained by the hematologic analyzer compared to the standard microscopic examination were on average 2.43% higher. Replacing microscopic examination with the haematological analyser only is not recommended and is better to set a limit of the IG result, at which values would be recommended to inspect the blood smear under a microscope. In our study, we moved the IG limit for the need for a blood smear from an existing set of values $> 1\%$ to $> 2\%$, where the extent of work and the number of blood smears fell by 56%.

We also acquired patient diagnosis data, compared them with additional parameters, and evaluated the connection of the IG parameter with clinical information. We found that the IG values obtained by hematological analyser and microscopic examination were higher in adults than in pre-school children. In addition, both populations differ not only by the proportion of IG, but also by the causes of the presence of immature granulocytes in the blood. In adults, the causes of IG were primarily malignant diseases and infections, and in children, most of them were undefined infections. ROC analysis of the parameter IG was also done for patients with known diagnoses. We received 85% sensitivity and 52% specificity for the detection of infections. For the same group of measurements, under the

condition $IG > 2\%$, we received 81% sensitivity and 67% specificity. For the adult population we could also compare the ROC curves for the parameters IG, leukocytes and CRP. Comparison of ROC curves showed the highest diagnostic use for the CRP parameter ($AUC = 0.873$) with a 88% sensitivity and 79% specificity. In the analysis of patients with $IG > 2\%$, however, the IG parameter had the highest diagnostic use for detecting infection ($AUC = 0.808$) with a 83% sensitivity and 63% specificity.

In our study, it was shown that the IG parameter at primary healthcare significantly helps in laboratory decisions for the examination of blood smear, than in clinical decisions. However, it should be emphasized that the number of patients with a significantly increased proportion of IGs was low. Most of the collected samples were in the range of up to 2%. Therefore, the IG parameter can serve as additional information, which in combination with other diagnostic parameters helps to set the correct diagnosis.

KLJUČNE BESEDE

Nezreli granulociti, diferencialna krvna slika, mikroskopski pregled krvnega razmaza, okužba

KEYWORDS

Immature granulocytes, differential blood count, microscopic blood smear examination, infection

SEZNAM OKRAJŠAV

KRATICA	POMEN
ANC	Absolutno število nevtrofilcev (ang. Absolute neutrophil count)
CRP	C-reaktivni protein
DKS	Diferencialna krvna slika
EOS	Zgodnji nastop sepse (ang. Early onset sepsis)
FSC	Prednje sipanje svetlobe (ang. Forward scattered light)
G-CSF	Granulocitne kolonije stimulirajoči faktor (ang. Granulocyte colony-stimulating factor)
GM-CSF	Granulocitno-makrofagne kolonije stimulirajoči faktor (ang. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)
IG	Nezreli granulociti (ang. Immature granulocytes)
IL	Interlevkin
KLL	Kronična limfocitna levkemija
KML	Kronična mieloična levkemija
MDS	Mielodisplastični sindrom
MPKR	Mikroskopski pregled krvnega razmaza
NRBC	Eritroblast (ang. Nucleated red blood cells)
PMF	Primarna mielofibroza

PRV	Policitemija rubra vera
SFL	Stransko sipanje fluorescenčne svetlobe (ang. Side fluorescent light)
SIRS	Sistemiški vnetni odgovor (ang. Systemic inflammatory response syndrome)
SOFA	Točkovnik za dokazovanje disfunkcije organov (ang. Sequential organ failure assesment)
SSC	Stransko sipanje svetlobe (ang. Side scattered light)
TNF	Dejavnik tumorske nekroze (ang. Tumor necrosis factor)

1 UVOD

Nezreli granulociti oziroma IG (ang. Immature granulocytes) je parameter, ki ga kot relativni delež in absolutno številčno koncentracijo podaja že večina hematoloških analizatorjev. Analizator poda skupno število oziroma delež IG, jih pa ne razvrsti v posamezne razvojne stopnje granulocitov, ki sodijo med IG: promielociti, mielociti in metamielociti (1).

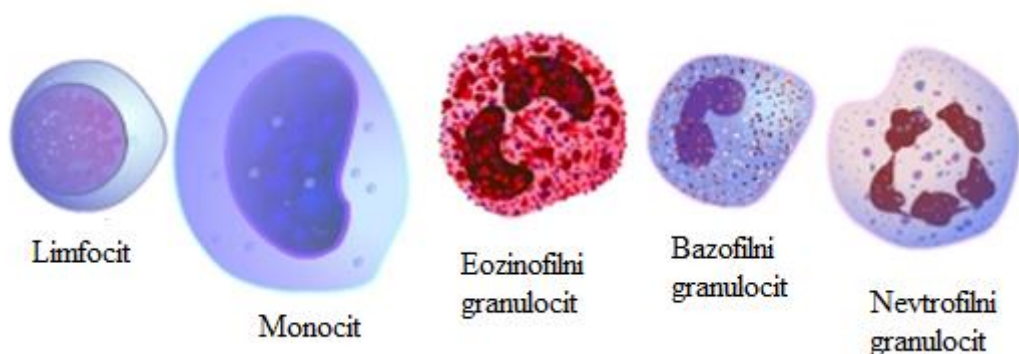
Odkar je na voljo možnost določanja IG na hematoloških analizatorjih, so potekale različne študije, ki so preučevale njegov diagnostični pomen in uporabnost (2–5).

Parameter IG se povezuje in raziskuje predvsem kot kazalec okužbe, tako sam kot v kombinaciji z drugimi parametri. Pri odkrivanju bakterijskih okužb se neprestano iščejo novi kazalci, ki bi lahko opozarjali na infekcijo ter na bolj nevarna stanja kot je sepsa. Zato se kljub že obstoječim še vedno iščejo novi načini, ki bi lahko imeli diagnostičen pomen (3). Delež IG je namreč višji pri pacientih z okužbo, zato bi bil lahko uporabljen kot eden izmed pokazateljev okužbe (4,6,7). Ker je odstotek IG že sedaj del avtomatske diferencialne krvne slike na hematoloških analizatorjih, njegova uveljavitev kot del rutinske preiskave ter posledično klinična uporaba ne bi predstavljala dodatnih stroškov ter nepotrebnih odvzemov krvi (4). Vendar pa klinično uporabo avtomatskega določanja IG omejuje slabša občutljivost metode, kar ga naredi neprimerne kot presejalni test (3,8).

1.1 Levkocitna krvna slika

Levkocitno krvno sliko sestavljajo celice pod skupnim imenom levkociti (Slika 1). Le-ti se naprej delijo v podvrste glede na morfologijo in funkcijo na osnovne skupine granulocitov, limfocitov in monocitov. Parameter IG sestavljajo celice, ki sodijo v skupino granulocitov, ime pa so dobile po granulah, ki se nahajajo v njihovi citoplazmi. Granule so značilne strukture v citoplazmi celic, ki se po barvanju krvnih razmazov po Pappenheimu značilno obarvajo. Tako najdemo v krvnih razmazih periferne krvi tri vrste različno obarvanih granulocitov. To so nevtrofilni, bazofilni in eozinofilni granulociti (9).

Pri zdravih ljudeh so v periferni krvi najštevilčnejši nevtrofilni granulociti, ki igrajo pomembno vlogo pri obrambi pred mikroorganizmi. Bazofilni in eozinofilni granulociti so pomembnejši pri obrambi pred paraziti ter pri reakcijah preobčutljivosti (10). Vsi granulociti so sposobni fagocitoze, s pomočjo katere uničijo tujek. Pri povečani aktivnosti nevtrofilnih granulocitov lahko zaradi sproščanj različnih snovi in molekul pride do poškodbe tkiv. Pri zdravi neokuženi osebi se v periferni krvi vzdržuje stalna koncentracija nevtrofilnih granulocitov. Pri okužbi se zaradi sproščanj kemotaktičnih snovi njihovo število poveča, ob tem pa se ob specifičnih signalih aktivirajo, množično delijo in sproščajo iz kostnega mozga (10).



Slika 1: Vrste levkocitov (prirejeno po 11).

1.1.1 Razvojne stopnje granulocitov

Razvoj granulocitov je proces, ki z dozorevanjem hematopoetskih matičnih celic poteka v kostnem mozgu. Na proces vpliva več različnih dejavnikov. Izhodiščna matična celica je pluripotentna in je sposobna delitve ter nadaljnega razvoja v multipotentno matično celico mieloične ali limfatične vrste. Granulociti izhajajo iz matične celice, usmerjene v mieloično vrsto, ki nato z dozorevanjem preidejo do končne oblike zrelih granulocitov (9).

Stopnje dozorevanja granulocitov obsegajo pet stopenj (9):

Mieloblast: je prva stopnja ter najmanjša celica v dozorevanju nevtrofilnih granulocitov (9). Velika je od 12 do 20 μm , z rahlo mrežasto kromatinsko strukturo. Jedro je rahlo ovalno ali nakazano ovalno ter vsebuje 2 do 5 manjših jedrc. Citoplazme v celici je zaradi večje velikosti jedra manj, je značilno modre barve in običajno brez zrn (12).

Promielocit: je največja celica velikosti od 15 do 25 μm . Kromatin je rahel ter že ima vidne začetne zgostitve. Jedro je upognjeno ali rahlo zažeto in nepravilne oblike z vidnimi jedrci. Citoplazma je modra ter je v primerjavi z mieloblastom svetlejša in zavzema večji volumen celice (12). V citoplazmi so vidna azurofilna zrnca (9,12).

Mielocit: pri tej stopnji dozorevanja se že začno oblikovati za granulocite značilne granulacije, jedra v jedru niso več vidna. Prav tako je citoplazma že nakazano rožnata. S pomočjo barvanja že lahko določimo, v katero vrsto granulocitov bo celica v nadaljevanju dozorela. Jedro je manjše in bolj okroglo (9). To je zadnja stopnja v kateri se celica še lahko deli, naslednje stopnje obsegajo le še dozorevanje. Pri manj zrelih mielocitih je citoplazma še modrikasta (12).

Metamielocit: je velik 10 do 12 μm (12). Imajo bolj obilno rožnato citoplazmo s številnimi granulacijami ter zrnca, ki obsega večji del celice. Jedro je upognjeno v obliki podkve (9). Kromatin je kondenziran s prisotnimi nevtrofilnimi granulacijami (12).

Paličasti nevtrofilni granulocit: med paličaste nevtrofilne granulocite prištevamo celice, ki že imajo značilno rožnato obarvano citoplazmo s specifičnimi zrnca ter so po velikosti že enaki zrelim nevtrofilnim granulocitom. Jedro je v tej razvojni stopnji še brez zažetkov, v obliki podkve. To stopnjo v dozorevanju granulocitov že štejemo med zrele granulocite (9).

Segmentirani nevtrofilni granulocit: je zrela celica, ki je normalno prisotna v perifernem krvnem obtoku. Jedro je razdeljeno na 3-5 segmentov, ki so med seboj povezani s kromatinsko nitko. Citoplazma je značilne rožnate barve s številnimi nevtrofilnimi granulacijami (13).

Bazofilni granulocit: je okrogle oblike ter značilne temnejše barve zaradi svojih večjih temno vijoličastih zrn. Jedro je običajno razdeljeno na le dva segmenta, ki sta zaradi izrazitih temnejših granul slabše vidna. Citoplazma je prav tako izrazito temno vijolična, polna specifičnih granulacij. Povečano število bazofilcev se lahko pojavi v nosečnosti ter pri boleznih kot so vodene koze, norice, hipotiroza in ciroza jeter (12).

Eozofilni granulocit: je celica velikosti od 12 do 17 μm z izrazito značilnimi eozinofilnimi zrci ki so oranžne barve. Jedro običajno ni segmentirano na več segmentov, ampak sta samo dva. Povečano število eozinofilcev v krvi oziroma eozinofilija se pojavi predvsem pri alergijskih reakcijah, okužbah s paraziti, kožnih boleznih, boleznih žlez z notranjim izločanjem in Hodgkinovi bolezni (12).

1.2 Naloge in značilnosti granulocitov

Granulociti so celice, ki igrajo pomembno vlogo pri telesni obrambi pred okužbami. So celice, ki se odzovejo na vnetni odziv in na podlagi signalnih molekul migrirajo na mesto vnetja, kjer s svojimi funkcijami okužbo omejijo. Pri bakterijskih okužbah se najštevilčnejše odzovejo nevtrofilni granulociti, ki imajo sposobnost fagocitoze tujkov (14). Število celic je zelo odvisno od številnih dejavnikov, ki določajo hitrost hematopoeze v kostnem mozgu ter njihovo skladiščenje in sproščanje v krvni obtok. V organizmu, kjer ni prisotnih patoloških procesov, je proces sinteze in odstranjevanje nevtrofilcev skrbno nadzorovan (10). Pojav, kjer je število levkocitov prehodno ter za krajši čas povečano v krvnem obtoku (to je lahko znak druge bolezni), se imenuje reaktivna sprememba levkocitne krvne slike (9).

Nevtrofilni granulociti se lahko odzovejo na zaznano vnetje ter migrirajo proti vnetnemu dogajanju samo, če so v stiku s površjem. Zato se ob zaznavi vnetja adherirajo ob žilno steno, od koder se lahko premikajo proti vnetnem dogajanju. Na svoji površini izražajo številne receptorje, ki se odzivajo na različne molekule, ki nakazujejo na vnetje ali prisotnost bakterij. Obstaja več faktorjev in citokinov, ki nadzorujejo tvorbo nevtrofilcev v

kostnem mozgu ter njihovo aktivacijo. Dva od teh, ki spodbujata tvorbo, sta kolonije stimulirajoča faktorja, in sicer G-CSF in GM-CSF. Citokini, kot so dejavnik tumorske nekroze (TNF) α ter interlevkini (IL) 6, 8 in 1, pa pripomorejo k njihovi aktivaciji (10).

Paličasti nevtrofilni granulociti se lahko v manjšem številu pojavijo tudi v krvi zdravih ljudi. Pri različnih stanjih, ki so povezana z okužbami, patološkimi procesi ter malignimi boleznimi, se lahko pojavijo nezrele oblike granulocitov v krvnem obtoku zgolj zaradi odziva telesa na trenutno stanje (12).

1.3 Nezreli granulociti v periferni krvi

Odziv kostnega mozga na okužbo se lahko zelo razlikuje. Odvisen je od razširjenosti, trajanja in vrste okužbe. Pomembno je tudi, v katerem starostnem obdobju se zgodi. Pojav nezrelih granulocitov v krvi in odziv kostnega mozga pa nista specifična le za okužbe, ampak se lahko pojavita tudi pri drugih stanjih, ki aktivirajo kostni mozeg (15). Nezrele celice, ki se pojavijo v krvi, so lahko različnih zrelostnih stopenj, običajno pa število posameznih celic raste s stopnjo dozorevanja. Številčno je največ zrelih segmentiranih granulocitov, manj paličastih ter posamezni metamielociti, mielociti ter promielociti (16).

1.3.1 Vzroki za pojav IG v periferni krvi

Vzroki za pojav IG so lahko različni. IG so lahko prisotni zaradi fizioloških vzrokov pri nosečnicah in dojenčkih ali ob večjih naporih. V periferni krvi se pojavijo tudi ob številnih patoloških procesih, kot so okužba in maligna obolenja, ki povzročijo odziv kostnega mozga ter pojav IG v periferni krvi. Pri zdravih posameznikih IG najdemo le naključno. S študijo, ki je vključila 2400 vzorcev, so določili okvirno referenčno območje za IG določene s hematološkim analizatorjem. Za otroke starosti pod 10 let je bila zgornja referenčna vrednost 0,3%, za osebe nad 10 let pa 0,9%. Ugotovili so tudi, da je najpogostejši vzrok za pojav IG v krvi pri populaciji pod 10 let okužba (spodnja in zgornja dihala in gastroenteritisi), medtem ko so v populaciji nad 10 let najpogostejši vzrok pojava IG v krvi hematološke maligne bolezni, kot so kronična mieloična levkemija (KML), kronična limfatična levkemija (KLL) in mielodisplastični sindrom (MDS), farmakološka terapija (glukokortikoidi, kemoterapija), obsežne okužbe in nosečnost (17).

Poleg povečanega števila celic ter pomika v levo pri okužbah s pomočjo mikroskopskega pregleda krvnega razmaza v granulocitih opazimo tudi toksične granulacije, Döhlejeva telesca ter vakuolizacijo (15).

Pri hujših okužbah, še posebej pri sepsi, šoku ali hipoksiji, se lahko v krvi pojavijo tudi nezrele oblike eritrocitov – eritroblasti (NRBC, ang. Nucleated red blood cells) (15).

Nezreli granulociti se pojavijo običajno skupaj s povečano številčno koncentracijo nevtrofilnih granulocitov (ang. Absolute neutrophil count – ANC). V študiji, kjer so vrednotili parameter IG pri bolnišničnih pacientih, so izbrali paciente, ki so imeli v krvi > 2% IG ter normalno število ANC. 28,6% pacientov je imelo povišane IG kot posledica akutne infekcije. Drugi vzroki so bili še: akutni patološki procesi, kot npr. pooperativno obdobje ter akutna in kronična izguba krvi ali odpoved ledvic. Vsa ta stanja so povezana z reakcijo akutne faze, pri kateri se sprostijo kemotaktični dejavniki ter citokini, ki stimulirajo kostni mozeg, kar povzroči prisotnost manj zrelih celic v krvnem obtoku. 84% vzorcev je imelo povišan C-reaktivni protein (CRP) (2).

Vzroki v študiji se delno prekrivajo z vzroki, ki so zajeti v preglednici spodaj (18).

Preglednica I: Vzroki za pojav IG v krvi (18).

Fiziološki in farmakološki

Neonatalno obdobje, nosečnost, po porodu

Mobilizacija granulocitov kot posledica fizičnega napora, epileptičnega napada

Zdravljenje z ravnimi dejavniki (G-CSF, GM-CSF)

Reaktivni

Bakterijska okužba

Tkivni infarkt

Obsežnejše poškodbe tkiv (nesreče, operacije, opekline)

Akutno vnetje

Akutna krvavitev, hipoksija

Neoplastične spremembe

Mieloproliferativne bolezni

Mielodisplastični sindrom

Mielofibroza

1.3.2 Vloga IG pri prepoznavanju okužb

Pri hujših bakterijskih okužbah se torej v krvi pojavijo tudi manj zrele celice granulocitov, kot so paličasti granulociti ter njihove predhodne razvojne stopnje. Pri pojavu IG v periferni krvi govorimo o pomiku v levo, kar je značilno za hujše oblike okužb, ki lahko vodijo tudi do sepse. Pri okužbah pa se lahko zaradi izčrpanja zalog nevtrofilnih granulocitov pojavi tudi nevtropenija (9).

Pri hematoloških kazalcih imajo diagnostičen pomen za prepoznavo okužb skupno število levkocitov, ANC in delež IG. Levkociti, nevtrofilni granulociti ter IG so pri pacientih s sepsa in septičnim šokom značilno višji kot pri zdravih (19). Delež IG je boljši napovedni kazalec infekcije kot levkociti (7) ter podoben kot ANC (2). V kombinaciji z levkociti so IG enako učinkovit napovedni dejavnik kot kombinacija levkocitov s CRP. Predlagana je bila tudi možnost nadomestitve IG s CRP pri kritično bolnih pacientih. Napovedna vrednost IG ter CRP kot samostojna pokazatelja infekcije je bila podobna. Dodatek kazalca IG k levkocitom ter CRP je povečal napovedno vrednost za okužbo. Povezava parametrov bi bila primerna že na začetku pri zgodnji izključitvi infekcije, kot tudi po 72-ih urah za napoved ali ponovno izključitev okužbe (7).

Parameter IG je bil proučevan kot napovedni dejavnik tudi pri prepoznavanju sepse. Delež IG je bil značilno višji pri okuženih kot pri neokuženih pacientih (3,5,6), vendar pa občutljivost in specifičnost parametra za ločevanje okuženih ter neokuženih pacientov in za prepoznavo pacientov s pozitivnimi hemokulturami ni bila zadostna (3).

1.3.3 Vloga IG pri prepoznavanju sepse

Sepsa je stanje, pri katerem se vnetje, ki je posledica okužbe, ne odvija samo lokalno, ampak na ravni celotnega organizma ter postane sistemsko. Kaže se kot vazodilatacija, povečana prepustnost žilne stene ter aktivacija levkocitov, vendar v širšem okolju zato

prizadene celotno telo. Zaradi sistemskega odziva na vnetje lahko pride do okvare delovanja različnih organov. Takšno stanje se imenuje sistemski vnetni odgovor – SIRS (ang. Systemic inflammatory response syndrome) (9).

Leta 1992 so bili oblikovani kriteriji, od katerih morata biti izpolnjena dva od štirih, da lahko stanje opredelimo kot SIRS:

Preglednica II: Kriteriji za SIRS (9).

Telesna temperatura > **38 °C** ali < **36 °C**

Tahipneja > **20 min⁻¹** ali hiperventilacija CO₂ < **4,27 kPa** (32 mmHg)

Srčni utrip: < **90 /min**

Levkocitoza > **12 × 10⁹ /L**, levkopenija < **4 × 10⁹ /L** ali več kot **10%** paličastih nevtrofilcev v periferni krvi

Prav tako so takrat bili tudi definirani izrazi, kot so sepsa, SIRS, huda sepsa in septični šok (20).

Leta 2016 pa so bile uvedene nove smernice, ki definirajo področje prepoznavne in klasifikacije sepse in septičnega šoka. Termina SIRS in huda sepsa v prenovljeni definiciji sepse nista več potrebna in ju zato ne uporabljamo več (21).

Sepsa je definirana kot nenadzorovan sistemski vnetni odziv, s pridruženim odpovedovanjem organov, ki je posledica okužbe. Odpovedovanje organov se razvrsti s pomočjo vrednotenja SOFA kriterijev (ang. Sequential [Sepsis-related] organ failure assesment). Rezultat SOFA ni namenjen spremljanju stanja pacienta, ampak se uporablja le za klinično opredelitev prisotnosti sepse. Disfunkcijo organa lahko prepoznamo kot akutno spremembo v skupnem seštevku SOFA ≥ 2 točki in je povezan z več kot 10% bolnišnično smrtnostjo (21).

Septični šok je posledica sepse, ki jo kljub ustreznemu nadomeščanju tekočin spremlja nizek krvni tlak (< 90 mmHg), vrednost laktata > 2 mmol/L z odsotnostjo hipovolemije ter s prisotno odpovedjo organov. Ob nastopu septičnega šoka se smrtnost poveča na 40% (21).

Približno 30% pacientov v intenzivnih enotah s sepsa nima pozitivnega mikrobiološkega rezultata, ki bi okužbo potrdil (22). Del lažno negativnih rezultatov hemokultur lahko pripišemo predhodni uporabi antibiotikov (23). IG so bili kljub temu višji pri pacientih, ki so imeli pozitivne hemokulture, kot pa pri tistih z negativnimi (3,4). 43% pacientov s pozitivnimi hemokulturami je imelo v krvnem obtoku $\geq 1\%$ IG, pri pacientih z negativnimi hemokulturami pa je bil delež IG $\geq 1\%$ prisoten le pri 24% (3). V prvih 48 urah po pojavu kliničnih znakov zvečani IG dobro ločijo med okuženimi in neokuženimi pacienti z občutljivostjo 89,2% in specifičnostjo 76,4%, kar kaže na njegovo diagnostično vrednost predvsem kot zgodnji označevalec sepse (6). Za odraslo populacijo pacientov je bila mejna vrednost IG za zaznavanje sepse določena pri 3,2%. Premik meje med 4% in 5% pa bi vodil v preveč zgrešenih primerov (24).

Pri pacientih na intenzivnih enotah so ugotovili, da so tisti, ki so umrli v roku enega tedna, imeli v krvi višje vrednosti mielocitov in metamielocitov (5).

Tudi na populaciji novorojenčkov v neonatalnih enotah so prepoznali pomen IG kot označevalca za sepsa (8,25,26). Delež IG se je razlikoval pri pacientih z zgodnjim nastopom sepse (ang. early onset sepsis - EOS), ki je bil 1,3%, v primerjavi s kontrolno skupino, ki je imela vrednost 0,5% (26). Pri populaciji novorojenčkov je bilo dokazano, da je delež IG boljši napovedni dejavnik infekcije kot skupno število levkocitov (25). Kljub slabi občutljivosti je bila ugotovljena povezava med višjimi vrednostmi IG ter pozitivnimi hemokulturami hospitaliziranih nedonošenih novorojenčkov, ki so starejši od 7 dni. Ti novorojenčki imajo 3-krat večjo verjetnost za pozitivno hemokulturo, če so bili pri mikroskopskem pregledu krvnega razmaza prisotni IG, ali če je bil na hematološkem analizatorju izmerjen delež IG $> 0,5\%$ (8).

1.3.4 IG pri novotvorbah krvi in drugih organov

Med pogostejše vzroke za prisotnost nezrelih granulocitov v venski krvi pri odraslih osebah so maligne krvne bolezni (17). Najpogostejše maligne bolezni, pri katerih se v krvnem obtoku pojavijo IG, so kronične mieloproliferativne bolezni (KML, prava policitemija (PRV), primarna mielofibroza (PMF)) in MDS (9).

Kronične mieloproliferativne bolezni so klonske bolezni, pri katerih je zvečano nastajanje krvnih celic z znaki dozorevanja. Pri KML so prisotne vse stopnje dozorevanja, ki

vključujejo tudi IG, kljub temu pa prevladujejo v krvi zreli nevtrofilni granulociti. Pri PRV je povečano nastajanje celic rdeče vrste, za PMF pa je značilno razraščanje vezivnega tkiva v kostnem mozgu, pojav nezrelih celic granulocitne vrste v periferni krvi pa vpliva na neugodno napoved poteka bolezni (9).

Levkocitoza je lahko posledica in kazalec razvoja malignega tumorja, pojav nezrelih granulocitov v krvi pa bolj občutljiv zgodnji kazalec mieloične proliferacije, ki je posledica tumorja. Pojav IG se pri teh bolnikih povezuje z imunosupresivnim učinkom, ki posledično pripomore k tumorski angiogenezi in njegovemu razvoju (27). Zaradi tega se iščejo nove tarčne terapije, ki bi preprečile levkocitozo ter pojav IG v krvnem obtoku. Čeprav so IG povezani z razvojem tumorja, pa nima vsak pacient z maligno boleznijo tudi povišanih IG (28).

1.4 Nezreli granulociti in mikroskopski pregled krvnega razmaza

Mikroskopski pregled krvnega razmaza (MPKR) je preiskava, ki se izvaja na vseh ravneh zdravstvene dejavnosti ter ima pomembno vlogo pri odkrivanju krvnih bolezni ter drugih patoloških stanj in okužb (12).

Je preiskava, pri kateri je zelo pomembno preiskovalčevo znanje ter sposobnost presoje, saj so rezultati odvisni od več dejavnikov. Zato bi bila izvedba MPKR natančnejša, če bi preparat pregledalo več različnih oseb z ustreznim znanjem. Vsak laboratorij ima izdelana merila, na podlagi katerih se naredi mikroskopska diferencialna krvna slika. Ta merila so sestavljena iz vrednosti parametrov ali opozoril hematološkega analizatorja. Njihovo izpolnjevanje nakazuje na možnost bolezenskega procesa ali nezanesljivosti rezultatov ter na potrebo po pregledu krvnega razmaza (13).

Pomemben vidik pri določanju IG s hematološkim analizatorjem je tudi ujemanje rezultatov deleža IG z MPKR. Predstavljeno je bilo, da je zaradi večjega števila diferenciranih celic določanje IG natančnejše s hematološkim analizatorjem, kot pa s pomočjo mikroskopskega pregleda (29). Zaradi različnih načinov delovanja analizatorjev, ki določajo delež IG, je za vsakega posebej treba preveriti ujemanje deležev IG z MPKR. Pri primerjavi deleža IG med dvema modeloma hematoloških analizatorjev istega proizvajalca in MPKR so določili koeficient korelacije ki znaša 0,83 oziroma 0,80 (29, 30).

Predlagali so delno zamenjavo ročne metode s hematološkim analizatorjem predvsem zaradi podcenjevanja števila IG pri MPKR (29). Primerjava vrednosti IG določenih s hematološkim analizatorjem Sysmex XN-3000 ter MPKR je pokazala, da je bila v povprečju izmerjena vrednosti IG na hematološkem analizatorju 2,5% višja, kot pa pri MPKR (30). Druga študija je določila za 35% večji delež IG izmerjenih z analizatorjem Sysmex XE-5000, kot pa pri mikroskopskem pregledu (31).

2 NAMEN DELA

Namen raziskave bo najprej analitično celovito ovrednotiti diagnostični parameter IG. Določili bomo povezavo med vrednostmi določenimi s hematološkim analizatorjem Sysmex XN-1000 ter MPKR ter določili mejno vrednost IG in smiselnost njene vključitve v kriterije za MPKR. To bomo storili s primerjavo deleža nezrelih IG, ki ga izda hematološki analizator, z deležem nezrelih granulocitov, ugotovljenih z MPKR. Določili bomo korelacijo med metodama pri zaznavanju IG ter določili analitično občutljivost in specifičnost parametra IG.

Določili bomo tudi mejno vrednost IG na hematološkem analizatorju, ki bi lahko nadomestila obstoječo prednastavljeno mejno vrednost $> 1\%$ IG za MPKR. Pri tem bomo ovrednotili, kako bi vplivala sprememba mejne vrednosti pri kriterijih za MPKR na obseg dela ter število MPKR. Pomemben podatek pri spreminjanju kriterijev za MPKR je število pacientov, ki bi bili zaradi spremenjenih vrednosti spregledani.

Drugi del naloge pa bo ovrednotenje parametra IG s stališča njegove uporabnosti pri obravnavi bolnika na primarni zdravstveni ravni. To želimo doseči predvsem s celovitim pogledom na zanesljivost parametra:

- kaj bi njegova uvedba kot del izvida spremenila pri obravnavi bolnika,
- kakšna je njegova diagnostična vrednost ter predvsem,
- ali bi parameter pomagal zdravnikom pri razločevanju med okužbo in drugo boleznijo.

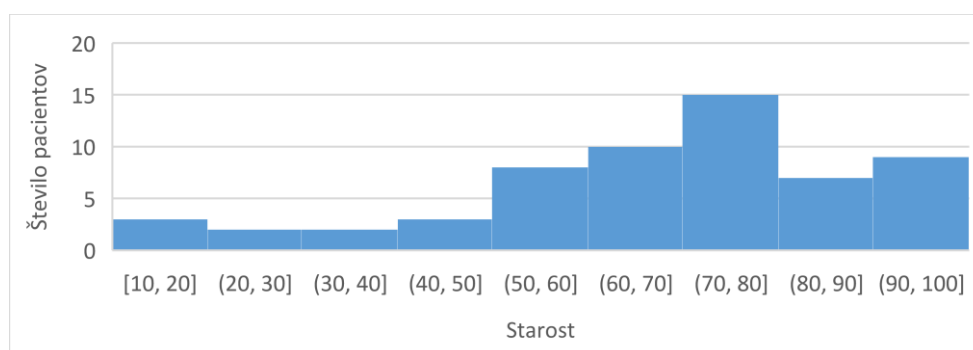
Ovrednotili bomo diagnostični pomen IG pri sprejemanju kliničnih odločitev, predvsem pri prepoznavi okužb. Za to bomo poleg izvida od napotenega zdravnika pridobili klinično informacijo o pacientu, oziroma če je bila pri pacientu s povečanim deležem IG okužba tudi klinično potrjena.

Izbrali bomo paciente s povečanim deležem IG $> 1\%$ ter pridobili še podatke o CRP pri vseh, kjer je bila preiskava naročena. Delež IG bomo primerjali tako z rezultati o številu levkocitov kot tudi z vrednostjo CRP, kjer je bila le-ta določena.

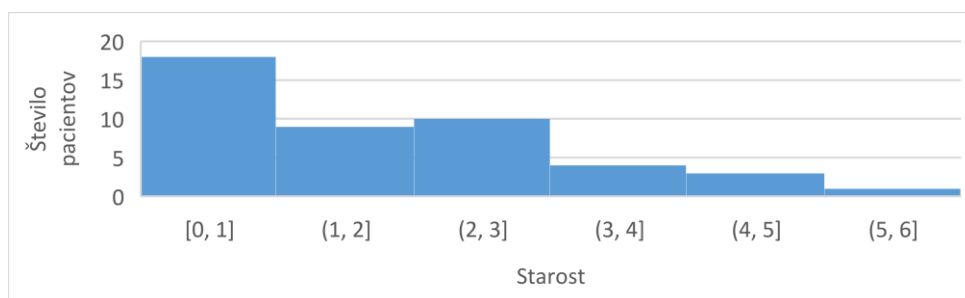
3 MATERIALI IN METODE

3.1 Obravnavani vzorci

V raziskavo smo vključili 152 vzorcev pacientov, ki so prišli k osebnemu zdravniku od marca 2016 do aprila 2017 zaradi najrazličnejših težav. Na podlagi klinične slike so bile s strani zdravnikov naročene preiskave, med njimi tudi kompletna krvna slika z diferencialno krvno sliko ter pri 91 pacientih tudi določitev CRP. Ker smo zbrali večino podatkov pacientov, ki spadajo v predšolsko populacijo (do 6 let), ali pacientov, ki so že odrasli in spadajo v enoto družinske medicine, smo se odločili skupino vseh pacientov razdeliti v dve skupini: pacienti, ki so stari ≤ 6 let ter pacienti, ki so starejši od 6 let (Slika 2). 47 vključenih pacientov je bilo mlajših otrok (≤ 6 let), 105 pacientov pa je bilo starejših od 6 let (do 94 let). 58 jih je bilo moškega spola, 94 pa ženskega. Vsi vzorci so bili odvzeti v enoti za odvzem krvi in analizirani še isti dan v Laboratoriju za klinično kemijo Zdravstvenega doma Celje.



A



B

Slika 2: Število vzorcev po starostnih skupinah.

A) Starostne skupine odraslih pacientov; B) Starostne skupine predšolskih otrok.

3.1.1 Analiza vzorcev

Vse rutinske vzorce venske ali kapilarne krvi, ki so bili odvzeti v epruveti z dodatkom antikoagulant K_3 -EDTA ali K_2 -EDTA, smo najprej analizirali na hematološkem analizatorju Sysmex XN-1000 ter nato na podlagi predhodno postavljenih kriterijev za izdelavo in pregled krvnega razmaza izbrali vse vzorce $> 1\%$ IG. Vsem vzorcem, ki so vsebovali po analizi na hematološkem analizatorju $> 1\%$ IG, smo izdelali in pobarvali krvni razmaz s panoptičnim barvanjem po Pappenheimu in jih pregledali pod mikroskopom.

Skoraj vsi narejeni krvni razmazi so bili zaradi različnih subjektivnih dejavnikov ter različnih sposobnosti presoje pregledani in ovrednoteni pod mikroskopom s strani dveh laboratorijskih delavcev.

Vrednost CRP smo pridobili le v primeru, če je bil naročen rutinsko skupaj s diferencialno krvno sliko s strani zdravnika ter sta bili preiskavi na isti napotnici. Kri je bila odvzeta v epruvete brez dodanega antikoagulant, koagulirana kri je bila centrifugirana ter pridobljeni serum pripravljen za analizo. CRP je bil določen na biokemijskem analizatorju Modular P800 (Roche Diagnostics) v Laboratoriju za klinično kemijo Zdravstvenega doma Celje.

Vsi vzorci polne krvi za preiskavo diferencialne krvne slike so bili analizirani ter njihov krvni razmaz pripravljen v roku štirih ur od odvzema. Serumski vzorci za biokemijske preiskave so bili analizirani na dan odvzema.

3.2 Analizne metode za določitev IG

3.2.1 Hemogram z diferencialno krvno sliko na analizatorju Sysmex XN-1000

3.2.2 Reagenti in kontrole

Za ustrezno delovanje hematološkega analizatorja je treba vsak dan pred začetkom dela najprej analizirati kontrole, ki so že komercialno pripravljene. Z njimi preverimo ustreznost delovanja aparata. V primeru odstopanj, ki so določena za vsak parameter posebej, je treba po standardnih operacijskih postopkih ustrezno ukrepati. Kontrole za analizator Sysmex XN-1000 so na voljo na treh ravneh. Treba jih je hraniti v hladilniku na

temperaturi od 2 °C do 8 °C, pred uporabo pa jih je treba segreti na sobno temperaturo ter dobro in previdno premešati.

Reagenti se lahko uporabljajo pri temperaturi od 15 °C do 30 °C, shranjujejo pa jih pri 2 °C do 35 °C, le SULFOLYSER se hrani pri 1 °C do 30 °C ter CELLCLEAN AUTO pri 1 °C do 25 °C. Porabiti jih je treba v okviru opredeljenega predvidenega roka uporabe in uporabljati skladno s pisnimi navodili. Z reagenti je treba ravnati previdno, da se prepreči nastanek zračnih mehurčkov (32).

Seznam reagentov za hematološki analizator Sysmex-XN 1000, ki se uporabljajo v Laboratoriju za klinično kemijo ZD Celje je naveden v preglednici V (32).

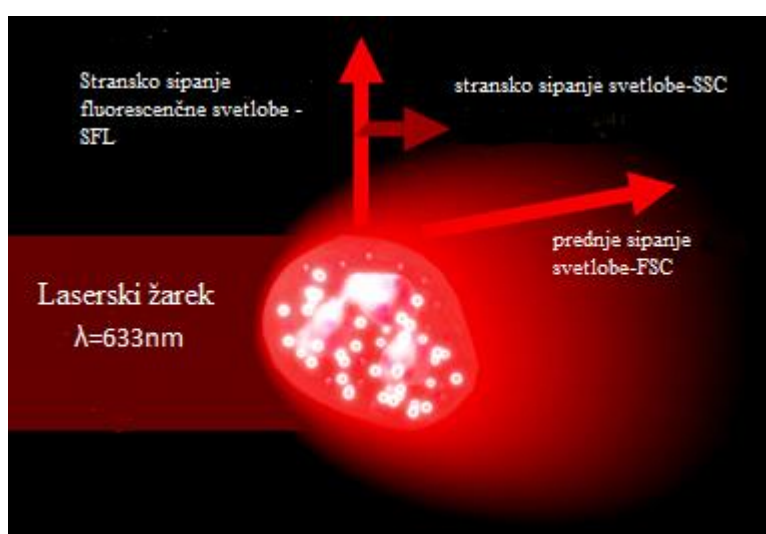
Preglednica III: Reagenti hematološkega analizatorja Sysmex XN-1000.

Reagent	Uporaba
CELLPACK DCL	Merjenje števila in velikosti eritrocitov ter trombocitov, določanje koncentracije hemoglobina, nosilna tekočina za detektor FCM
CELLPACK DFL	Uporablja v kombinaciji z reagentom Fluorocell RET ali Fluorocell PLT
SULFOLYSER	Določanje koncentracije hemoglobina
Lysercell WNR	liza eritrocitov, določanje levkocitov, bazofilcev, eritroblastov
Lysercell WDF	liza eritrocitov, določanje nevtrofilcev, limfocitov, monocitov in eozinofilcev
Lysercell WPC	liza eritrocitov, zazna nenormalne ali nezrele celice
Fluorocell WNR	barvanje celic z jedrom, določanje levkocitov, bazofilcev in NRBC
Fluorocell WDF	liza eritrocitov, določanje nevtrofilcev, limfocitov, monocitov in eozinofilcev
Fluorocell RET	barvanje retikulocitov, določanje trombocitov
CELLCLEAN AUTO	močno alkalno čistilo za čiščenje

Analiza vzorcev

Sysmex XN-1000 je hematološki analizator, katerega delovanje temelji na hidrodinamičnem fokusiranju, pretočni citometriji s z laserjem in določanju hemoglobina z metodo natrijevega lavrilsulfata (32). Principi določanja celic in merjenja se razlikujejo ter potekajo v sedmih različnih kanalih, ki so: WNR, WDF, RET, PLT-F, WPC, HGB, RBC/PLT. V vsakem kanalu se določajo posamezni parametri, ki se združijo v končen rezultat (33). Za analizo je potrebnih 88 μL vzorca (34).

Vzorec se na začetku alikvotira ter razdeli v različne kanale, kjer potekajo analize. Za zaznavo levkocitov, retikulocitov, NRBC in diferencialne krvne slike se uporablja metoda fluorescenčne pretočne citometrije (35). Ta je ključna tudi pri določanju deleža IG. Glavni princip metode je potovanje vzorca skozi ozko pretočno celico. Pred tem se vzorec razredči ter označi s specifičnim fluorescenčnim barvilom, ki se veže na nukleinsko kislino. Krvne celice potujejo mimo rdečega diodnega laserja z valovno dolžino 633 nm, kjer pride do sipanja svetlobe. Prednje sipanje svetlobe-FSC (ang. Forward-scattered light) ujame fotodioda, stransko sipanje svetlobe-SSC (ang. Side-scattered light) in stransko sipanje fluorescenčne svetlobe-SFL (ang. Side-fluorescence light) pa sprejmeta fotopomnoževalki (Slika 3). Intenziteta FSC določa velikost krvne celice, SSC podaja informacijo o notranji strukturi, SFL pa prikaže stopnjo obarvanosti ter s tem količino prisotne DNA in RNA v celici (32,36).

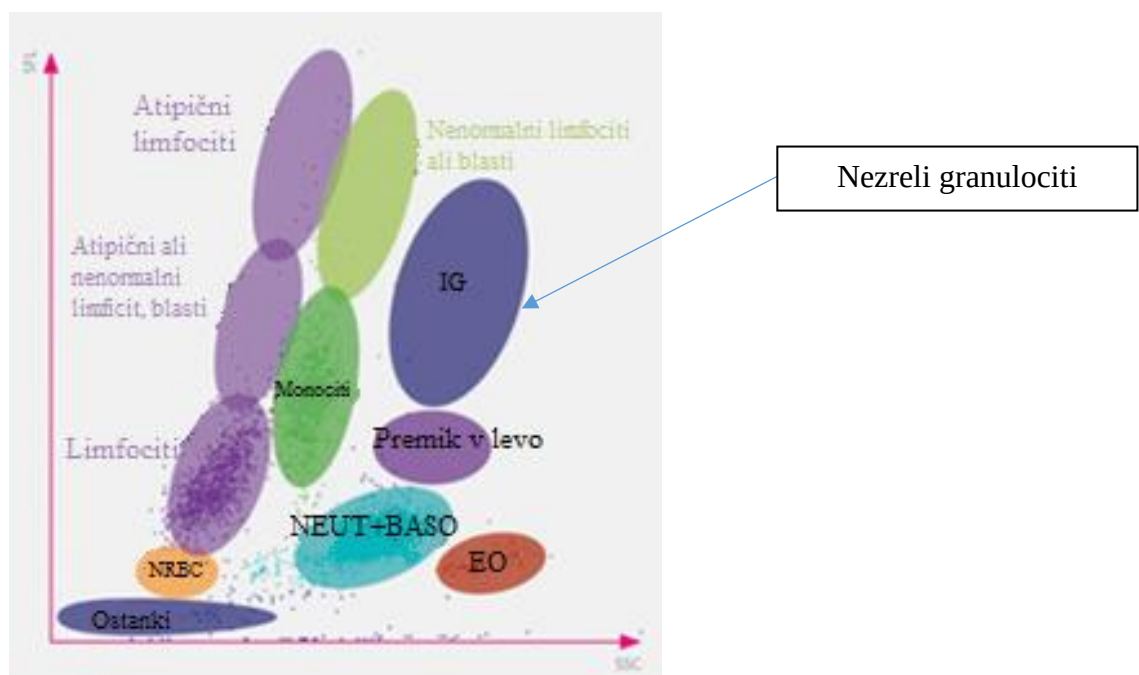


Slika 3: Prikaz metode fluorescenčne pretočne citometrije (prirejeno po 38).

Določitev vrednosti nezrelih granulocitov

Kanal WDF se uporablja za razvrščanje levkocitov v posamezne skupine celic ter s tem poleg 5-delne diferencialne krvne slike omogoča tudi določitev parametra IG na podlagi SSC in SFL sipanja. Za potek analize je treba najprej dodati reagent, ki lizira celice (Lysercell WDF), ter reagent, ki se veže ter obarva DNA in RNA (Fluorocell WDF). Diferenciacija se izvede na podlagi granulacije (SSC) ter vsebnosti nukleinskih kislin (SFL). Izriše se dvodimenzionalni razsevni diagram, na katerem predstavlja X os granuliranost ter Y os vsebnost nukleinskih kislin. Višjo intenziteto fluorescence se zazna pri celicah, ki so manj zrele zaradi njihove visoke vsebnosti RNA (32,33).

Področje, ki je prikazano kot delež IG, leži na desni zgornji polovici razsevnega diagrama. Njegov položaj prikazuje večjo granuliranost in višjo fluorescenco, ki sta posledici nezrelosti celic (Slika 4).



Slika 4: Razsevni diagram kanala WDF (prirejeno po 39).

3.2.3 Mikroskopski pregled krvnega razmaza

Kriteriji za mikroskopsko določitev diferencialne krvne slike

Mikroskopski pregled krvnega razmaza se naredi ter ovrednoti pod mikroskopom v primeru odstopanj od določenih vrednosti ali prisotnih opozoril. Standardov, ki bi določali posamezne vrednosti še ni, obstajajo pa priporočila, na podlagi katerih si lahko laboratoriji postavijo svoje kriterije za MPKR (13).

Preglednica IV: Kriteriji Laboratorija ZD Celje za pregled krvnega razmaza pri odstopanju številčnih vrednosti v hemogramu.

Analit	Spodnja meja	Zgornja meja
Trombociti (10^9 /L)	< 100	> 1000
Levkociti (10^9 /L)	< 3,0	> 30,0
Nevtrofilci (10^9 /L)	< 1	> 20
Limfociti (10^9 /L)	-	> 5
Monociti (10^9 /L)	-	> 1,5
Eozinofilci (10^9 /L)	-	> 1,5
Bazofilci (10^9 /L)	-	> 0,3
IG (%)	-	> 1%

MPKR naredimo tudi na osnovi določenih opozoril, ki jih izda hematološki analizator. Upoštevati je treba tudi znano zgodovino podatkov za posameznega pacienta ter na podlagi teh ustrezno ovrednotiti potrebo po MPKR (13).

Pripomočki za pripravo krvnega razmaza

- Kadičke za barvanje
- Predmetna stekla
- Krovna stekla
- Nosilci za barvanje preparatov
- Ura

- Števec za štetje celic
- Imerzijsko olje
- Svetlobni mikroskop
- Plastični nastavek za oblikovanje kapljice

Reagenti za barvanje krvnih razmazov

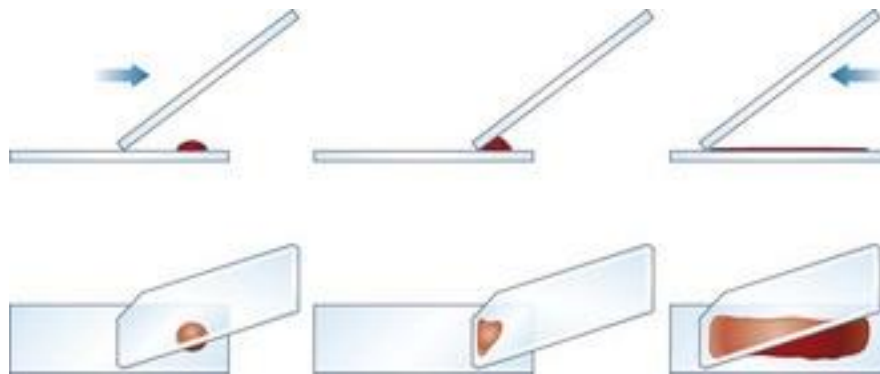
- Raztopina May-Grünwald (Merck) (eozin in metilensko modrilo v metanolu)
- Raztopina Giemsa (Merck) (eozin in dva derivata metilenskega modrila - azur I in azur II v metanolu)
- Fosfatni pufer s pH = 6,8
- Destilirana voda

Fosfatni pufer je pripravljen iz matične raztopine, ki jo dopolnimo z destilirano vodo. Matična raztopina je sestavljena iz dveh raztopin. Prva raztopina vsebuje 9,1 g KH_2PO_4 raztopljenega v destilirani vodi, druga raztopina pa vsebuje 9,5 g Na_2HPO_4 , ki je prav tako raztopljen v destilirani vodi. Matična raztopina se pripravi iz dveh zgoraj omenjenih raztopin tako, da vzamemo 630 mL prve raztopine ter 370 mL druge. Delovno raztopino pa pripravimo iz matične tako, da v 1000 mL bučki razredčimo 50 mL matične raztopine in dopolnimo z 950 mL destilirane vode (13).

Izdelava in barvanje krvnih razmazov

Krvni razmaz pripravimo iz krvi, odvzete z antikoagulantom K_3 -EDTA ali K_2 -EDTA, v roku štirih ur od odvzema. Izdelamo ga tako, da kapljo krvi kanemo na konec predmetnega stekelca ter se dotaknemo kaplje krvi s pomočjo krovnega stekelca, da se razpotegne ter razporedi po vsej širini stekelca (Slika 5). Pod kotom $30-45^\circ$ potegnemo v nasprotni smeri vzdolž predmetnega stekelca. Ob potegu krovnega stekelca čez površino objektnega stekelca se kaplja krvi enakomerno razporedi ter se na koncu rahlo zaokroženo zaključi. Skupna dolžina krvnega razmaza naj bi bila 3-4 cm (13).

Pravilno narejen krvni razmaz ima velik pomen pri nadaljnjem mikroskopskem diferenciranju krvnih celic, saj je pomembno, da so celice enakomerno razporejene po površini. Krvne razmaze gledamo v delu, kjer se celice ne prekrivajo ter niso preveč narazen. Narejene krvne razmaze pred fiksacijo in barvanjem označimo ter posušimo na zraku (13,16).



Slika 5: Izdelava krvnega razmaza.

Ko se krvni razmazi posušijo na zraku, so pripravljeni za barvanje. Za barvanje hematoloških krvnih razmazov se najpogosteje uporablja panoptično barvanje po Pappenheimu, ki vključuje fiksacijo ter barvanje celic. Pri tem uporabljamo dve raztopini, May-Grünwald in Giemsa (13).

Po sušenju na zraku se krvni razmazi v nosilcu v kadički s pokrovom potopijo v May-Grünwaldovo raztopino za 5 minut. Sledi prenos razmazov v drugo kadičko, kjer je mešanica May-Grünwaldove raztopine in fosfatnega pufru v razmerju 1:1. Po 1 min v drugi kadički pa je kot zadnji korak fiksacije in barvanja še prenos nosilca v raztopino Giemse v fosfatnem pufru (1:10), kjer jih pustimo barvati še 20 min. Na koncu se fiksirani in pobarvani razmazi sperejo s fosfatnim pufrom ter posušijo na zraku (13).

Pregled in vrednotenje krvnih razmazov

Izdelani in pobarvani krvni razmazi se po sušenju pogledajo pod mikroskopom. Prvi korak je makroskopska ocena, šele nato jih pogledamo pod mikroskopom najprej pri mali ($100\times$) ter potem pri veliki povečavi ($1000\times$). Z menjavanjem povečav najprej ocenimo pripravo razmaza ter porazdelitev celic, nato pa jih diferenciramo.

Po oceni na mali povečavi, pregledamo razmaze s pomočjo imerzijskega olja še pri veliki povečavi. Pri tem si izberemo primerno mesto v repu razmaza, kjer se eritrociti ne prekrivajo ter niso preveč narazen. V primernem območju začnemo diferencirati levkocite po sistemu »cik-cak«. Za ovrednotenje krvnega razmaza je treba pogledati vsaj 100 levkocitov. Pri MPKR je treba preveriti vrednosti celic iz izpisa iz hematološkega

analizatorja ter pogledati prisotnost opozoril. Rezultate mikroskopskega krvnega razmaza izražamo v relativnih (%) vrednostih glede na 100 prešteti levkocitov (13).

3.2.4 Določanje vnetnega parametra CRP na biokemijskem analizatorju

Pri zbiranju pacientov z $IG > 1\%$ je imelo med 152 zbranimi vzorci 91 pacientov naročen CRP. Tega smo določili na avtomatskem biokemijskem analizatorju Modular P800 (Roche Diagnostics). Koncentracijo CRP smo določili z imunoturbidimetrično metodo. Anti-CRP monoklonska protitelesa, vezana na mikrodelce lateksa, reagirajo z antigenom v vzorcu. Nastane kompleks antigen-protitelo, pri čemer pride do aglutinacije, ki jo vrednotimo turbidimetrično.

Reagent

Tq® CRP L3 (Roche Diagnostics), shranjevanje na 2-8 °C

Standard

C.f.a.s. Proteins (Roche Diagnostics)

Kontrole

- PreciControlClinChem Multi 1 (Roche Diagnostics)
- PreciControlClinChem Multi 2 (Roche Diagnostics)

3.3 Statistične metode

Za obdelavo rezultatov smo uporabili statistični program MedCalc (v. 14.8.1). Podatke smo zbirali s pomočjo laboratorijskega informacijskega sistema (LIS) ter pridobili klinično informacijo o posameznem pacientu preko osebne komunikacije s pacientovim osebnim zdravnikom.

Za vrednotenje statističnih testov smo izbrali 5-odstotno stopnjo tveganja ($\alpha = 0,05$). Pri vrednosti signifikance, ki je večja od 0,05 ($P > 0,05$), smo privzeli ničelno hipotezo ter zavrnili alternativno hipotezo, ki pravi, da med parametroma obstaja statistična razlika. S prevzetjem ničelne hipoteze se sprejme, da med preiskovanimi parametri ni statistične razlike.

Prvi korak, ki smo ga naredili, je bil osnovno statistično ovrednotenje parametra IG, in sicer tako, da smo za vrednosti analizatorja in MPKR izračunali mediano, interval

zaupanja, standardni odklon ter najmanjšo in najvišjo vrednost za IG pri obeh metodah. Porazdelitev podatkov IG smo preverili s pomočjo testa Kolmogorov-Smirnov.

Oba načina določanja IG smo nato primerjali s pomočjo Bland-Altmanovega diagrama, kjer smo primerjali povprečje razlik med obema metodama ter njuno ujemanje. Ker smo že preverili razporeditev podatkov IG ter zavrnil normalno razporeditev podatkov, smo za izračun korelacije med metodama uporabili Spearmanov koeficient korelacije. Z Wilcoxonovim testom za odvisne vzorce pa smo statistično primerjali obe metodi določanja IG. Neparametrični test Mann-Whitney smo uporabili za določitev statističnih razlik med skupinama odraslih in predšolskih otrok v deležih IG, pridobljenih na hematološkem analizatorju.

Ovrednotili smo opozorilo, ki je povezano s prisotnostjo IG na hematološkem analizatorju – IG Present. Določili smo specifičnost, občutljivost, pozitivno napovedno vrednost in negativno napovedno vrednost.

Določili smo optimalno vrednost IG analizatorja, pri kateri je najboljša diagnostična uporabnost testa ter sta občutljivost in specifičnost v najboljšem razmerju. To smo določili s pomočjo ROC krivulje (ang. Receiver operating characteristic). Za določanje IG analizatorja smo s pomočjo ROC krivulj proučevali, kakšen pomen ima predstavitev mejne vrednosti za laboratorijsko delo ter v kolikšni meri bi lahko zmanjšali obseg dela, ob tem pa preučili, koliko pacientov bi zaradi tega lahko spregledali.

Podatke o kliničnih diagnozah posameznih pacientov smo ovrednotili s pomočjo osnovne statistične analize ter jih razvrstili v posamezne skupine. Za vsako skupino smo nato določili mediano IG, WBC in CRP. Razporeditev podatkov IG smo tudi primerjali med skupinami pacientov ter preverili, če se med seboj statistično razlikujejo.

S pomočjo ROC krivulj smo ovrednotili klinične diagnoze odraslih pacientov. Primerjali smo, kateri parameter ima najboljšo diagnostično uporabnost za potrditev ali izključitev bolezni ter primerjali ROC krivulje ter AUC preučevanih parametrov IG, WBC in CRP med seboj.

4 REZULTATI

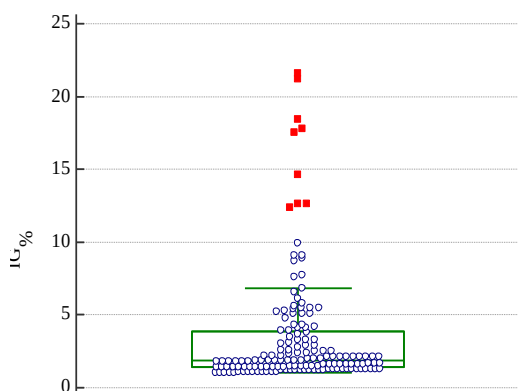
4.1 Primerjava določanja IG s hematološkim analizatorjem in MPKR

Zbrali smo 152 meritev krvnih vzorcev. Za zbiranje vzorcev je bil ključni kriterij delež IG določen s hematološkim analizatorjem 1% ali več. Porazdelitev vrednosti deležev IG kaže slika 7.

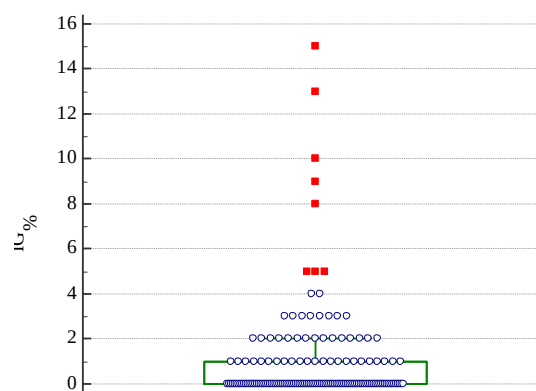
Za zbrane vzorce smo določili osnovne statistične parametre za rezultate IG, pridobljene iz analizatorja ter pod mikroskopom. S pomočjo statističnega programa MedCalc smo določili mediano, 95% interval zaupanja (CI), standardni odklon (SD) ter najnižjo in najvišjo vrednost (Preglednica V).

Preglednica V: Osnovna statistična analiza dveh različnih načinov določanja IG (N = 152).

		Mediana	95% CI	SD	najnižja vrednost	najvišja vrednost
IG analizator (%)		1,9	1,70-2,10	3,89	1,0	21,6
IG MPKR (%)		0,0	0,00-0,00	4,92	0,0	15,0



A

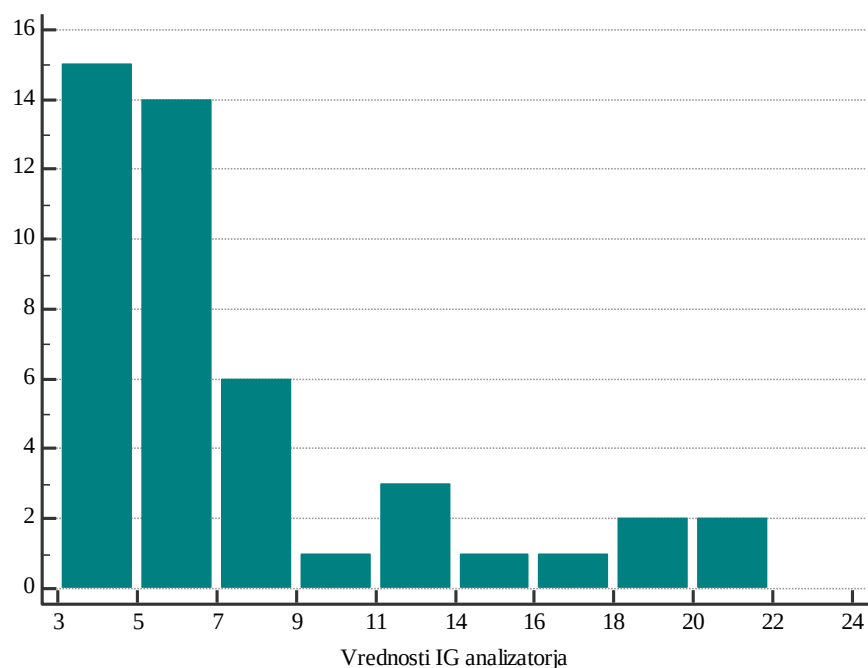
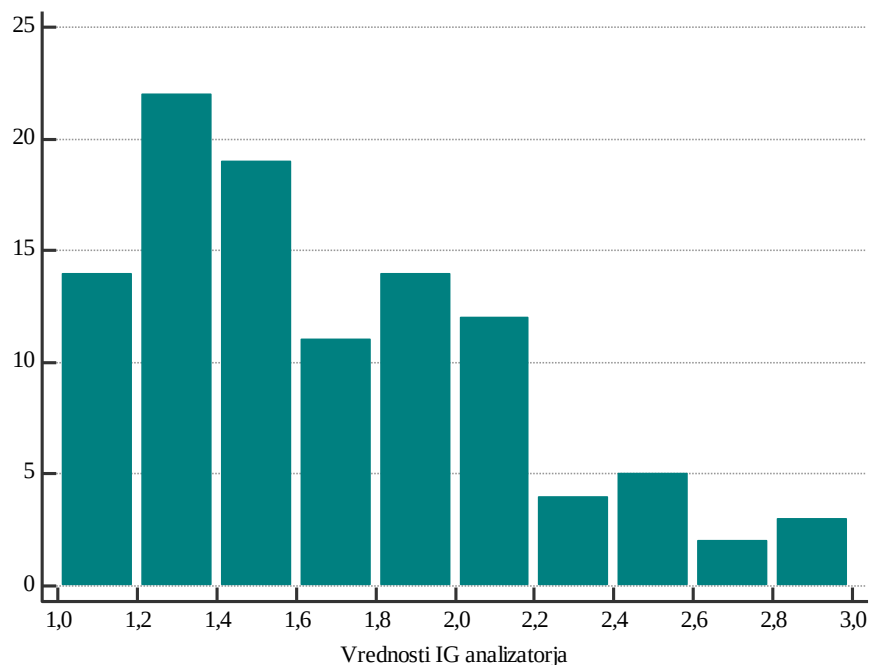


B

Slika 6: Razporeditev vrednosti deleža IG.

A) Razporeditev vrednosti deleža IG za hematološki analizator; B) Razporeditev vrednosti deleža IG MPKR.

Iz slike 6 je razvidno, da so podatki pridobljeni s hematološkim analizatorjem razporejeni drugače kot deleži IG pri MPKR, vrednosti IG hematološkega analizatorja višje. Mediana IG, ki je bila pridobljena z analizatorjem, je višja od mediane IG pridobljene z MPKR.

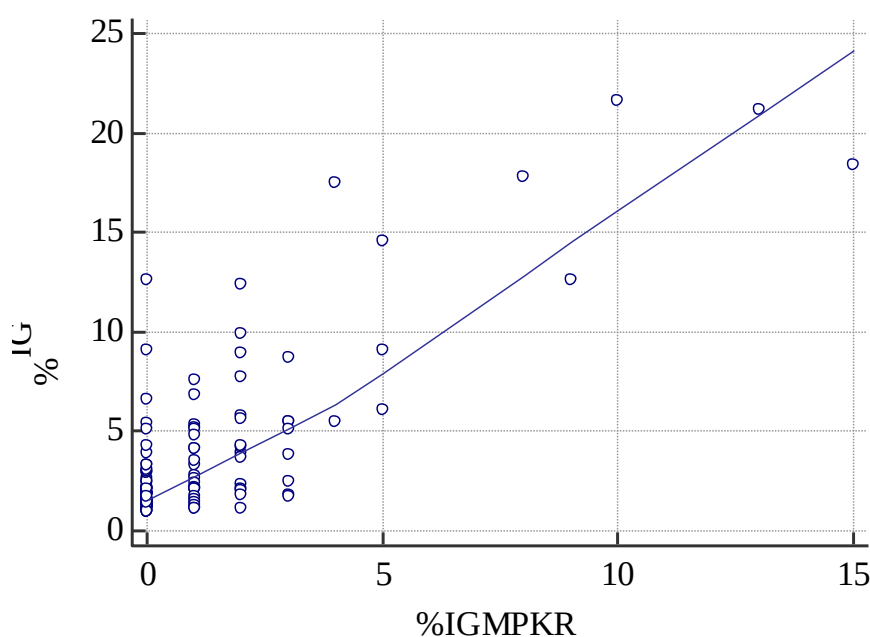


Slika 7: Porazdelitev števila vzorcev glede na vrednosti IG analizatorja.

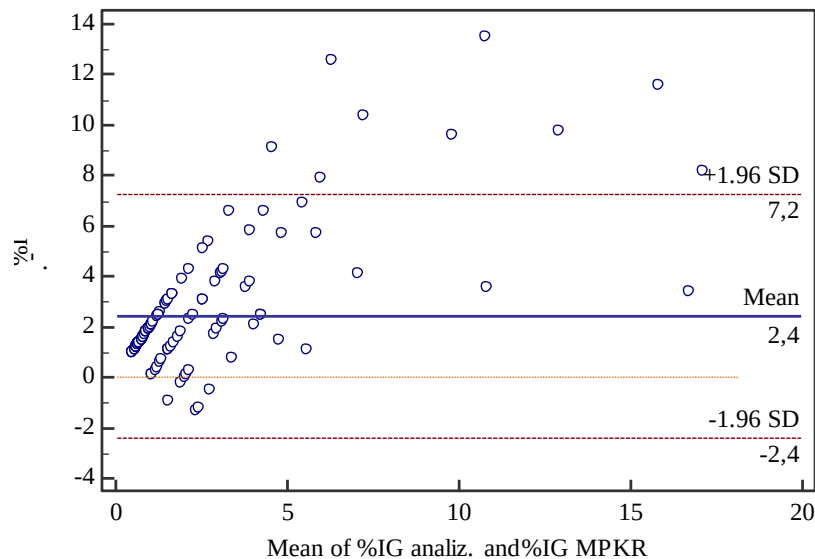
A) IG: 1,0-3,0%; B) IG: > 3,0%.

Slika 7 prikazuje razporeditev vrednosti IG analizatorja po številu pacientov. Razvidno je, da je bil pretežni del zbranih vzorcev v območju do 2%. Teh vzorcev je skupaj 83, kar znaša 54,6% vseh zbranih vzorcev. Delež vzorcev vrednosti IG analizatorja $> 3\%$ pa predstavlja le 29,6%.

Porazdeljevanje spremenljivk smo preverili s pomočjo testa Kolmogorov-Smirnov za normalno porazdelitev parametra v populaciji. Normalno razporeditev rezultatov smo zavrnili tako pri deležu IG analizatorja kot pri MPKR. Spearmanov koeficient prikazuje povezanost dveh spremenljivk. Pri izračunu Spearmanovega koeficienta korelacije (r) med metodama določanja IG s hematološkim analizatorjem in MPKR smo dobili rezultat 0,598 ($P < 0,0001$), kar predstavlja srednje/dobro povezavo med rezultati IG pridobljenimi z mikroskopom ter vrednostjo IG na hematološkem analizatorju. Slika 8 prikazuje povezavo med obema parametroma.



Slika 8: Povezave parametra IG% analizatorja in MPKR.



Slika 9: Bland-Altmanov diagram primerjave razlik vrednosti deleža IG med analizatorjem in MPKR.

Povprečje razlik med rezultati IG analizatorja in IG DKS smo pridobili s pomočjo Bland-Altmanovega diagrama (Slika 9). Vključili smo podatke, o vrednostih deleža IG analizatorja in MPKR, vseh 152 pacientov. Povprečje razlik med rezultati IG analizatorja in IG MPKR je 2,43%, torej so bile vrednosti IG hematološkega analizatorja v povprečju za 2,43% višje kot pa vrednosti IG dobljene z MPKR. Študija, ki je prav tako primerjala deleže IG, določene s hematološkim analizatorjem Sysmex in MPKR, je prikazala podobne rezultate, saj so bile vrednosti IG analizatorja v povprečju za 2,5% višje od vrednosti določene pod mikroskopom (30). S pomočjo Wilcoxonovega testa za odvisne vzorce smo statistično primerjali načine določanja IG z analizatorjem in MPKR. Test je prikazal obstoj statistično značilne razlike med določanjem IG s hematološkim analizatorjem ter MPKR ($P < 0,0001$).

4.1.1 Primerjava deleža IG pri predšolski populaciji in starejših pacientih

Pri zbiranju podatkov smo vključili vse paciente, ki so bili napoteni v laboratorij, tako predšolsko populacijo, kot tudi šolsko in odraslo populacijo (Slika 2). Ker literatura navaja, da tudi starost vpliva na pojav IG v periferni krvi, smo se odločili med seboj primerjati dve populaciji in sicer predšolske otroke stare do 6 let ter paciente, ki so stari več kot 6 let. Tudi pri pediatrični populaciji so pokazali, da so imeli pacienti s potrjeno okužbo višje vrednosti IG kot pa skupina zdravih (39).

Število pacientov, ki so bili stari 6 let ali manj (predšolski otroci) je 47, število pacientov starih nad 6 let pa je 105. Razliko med skupinama prikazuje Preglednica VI.

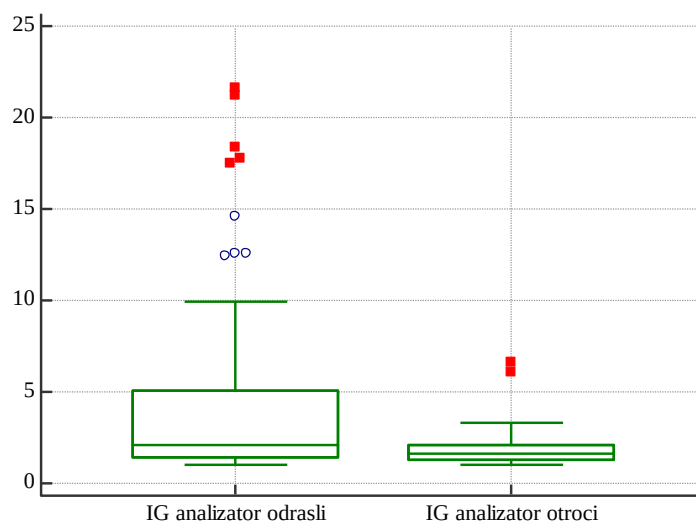
Preglednica VI: Statistični podatki za vrednosti IG in levkocitov po starostni skupini.

Pacienti > 6 let	Mediana	Min	Max
WBC 10^9 /L	7,59	1,30	29,9
IG% Analizator	2,1	1,0	21,6
IG% MPKR	1,0	0,0	15,0
Pacienti $\leq$ 6 let			
WBC 10^9 /L	9,51	1,98	27,03
IG% Analizator	1,6	1,0	6,6
IG% MPKR	0,0	0,0	5,0

Pri primerjavi med predšolsko populacijo (≤ 6 let) ter ostalo populacijo (> 6 let) so se kazale razlike pri vseh opazovanih parametrih. Mediana levkocitov je bila višja pri predšolski populaciji in je znašala $9,51 (\times 10^9 /L)$, medtem ko je pri odrasli populaciji znašala $7,59 (\times 10^9 /L)$. Vrednosti deleža IG pri starejših so bile višje z obema načinoma njihovega določanja, tako z analizatorjem kot z MPKR. Vrednosti mediane pridobljene z analizatorjem so bile pri odraslih 2,1%, medtem ko je bila pri predšolskih otrocih vrednost nižja in je znašala 1,6%. Podobno velja tudi za MPKR.

Tako so bile izmerjene višje vrednosti IG analizatorja pri odraslih, kjer je bila najvišja vrednost 21,6%, medtem ko je bila pri predšolski populaciji najvišja izmerjena vrednost 6,6%. Pri rezultatih MPKR so pri obeh populacijah nižje vrednosti v primerjavi z analizatorjem, vendar so vrednosti IG odraslih tudi tukaj višje kot pri predšolski populaciji. Najvišja vrednost IG pri odraslih je bila 15%, pri predšolskih otrocih pa 5%. Slika 10 prikazuje porazdelitev deležev IG pridobljenih iz analizatorja med skupinama odraslih in predšolskih otrok.

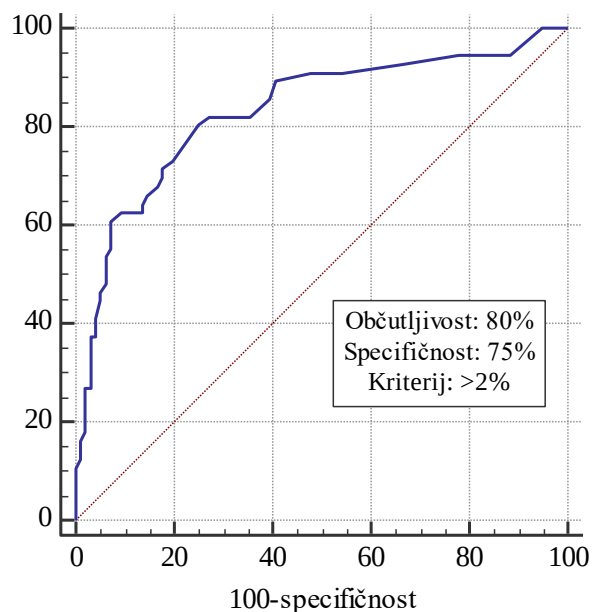
Za primerjavo rezultatov deležev IG pridobljenih s hematološkim analizatorjem med obema skupinama smo uporabili Mann-Whitneyev neparametrični test za dve neodvisni spremenljivki. Rezultati so pokazali statistično značilno razliko v vrednostih deleža IG med populacijo odraslih in predšolskih otrok ($P = 0,0025$).



Slika 10: Prikaz porazdelitve deležev IG pridobljenih iz analizatorja med skupinama odraslih in predšolskih otrok.

4.2 Določitev mejne vrednosti IG

Za parameter delež IG analizatorja smo uporabili analizo ROC, ki določi optimalno razmerje občutljivosti in specifičnosti za določen test. Kot merilo pravilnosti rezultata je veljala najdba IG pri MPKR. Vključili smo vseh 152 vzorcev preiskovancev ter določili optimalno mejno vrednost $> 2\%$, ki daje najboljše razmerje med občutljivostjo in specifičnostjo za zaznavo nezrelih granulocitov v krvnem razmazu. Pri tej vrednosti je občutljivost 80%, specifičnost pa je 75% (Slika 11). Površina pod krivuljo (AUC) je 0,833. AUC, ki dosega najvišje vrednosti, se povezuje z visoko natančnostjo, vrednosti nad 0,5 s srednjo, vrednost 0,5 pa predstavlja naključen rezultat (40).



Slika 11: ROC krivulja za določitev lastnosti parametra IG na hematološkem analizatorju Sysmex XN-1000.

Pri mejni vrednosti $> 3\%$ smo dobili bistveno manjšo občutljivost 62,5% občutljivost in 89,6% specifičnost. Pri postavitvi meje $> 4,1\%$ pa bi bila občutljivost 50% in specifičnost 93,8%.

4.3 Vrednotenje opozoril

Pri vsaki analizi na hematološkem analizatorju se poleg številčnih rezultatov lahko pojavijo tudi opozorila, ki se aktivirajo ob vnaprej določenih izpolnjenih pogojih. Opozorilo »IG Present«, ki ga poda analizator v povezavi z IG, smo ovrednotili ter določili njegovo občutljivost, specifičnost, pozitivno napovedno vrednost (PNV) ter negativno napovedno vrednost (NNV) za zaznavo nezrelih granulocitov v krvnem razmazu krvi. V analizo smo vključili vseh 152 meritev vzorcev.

Preglednica VII: Vrednotenje opozoril analizatorja na prisotnost IG.

Opozorilo	IG % (MPKR)		
	prisotni	odstotni	
prisotno	51	65	116
odsotno	5	31	36
	56	96	152

Občutljivost: **91%**

Specifičnost: **32%**

PNV: **44%**

NNV: **86%**

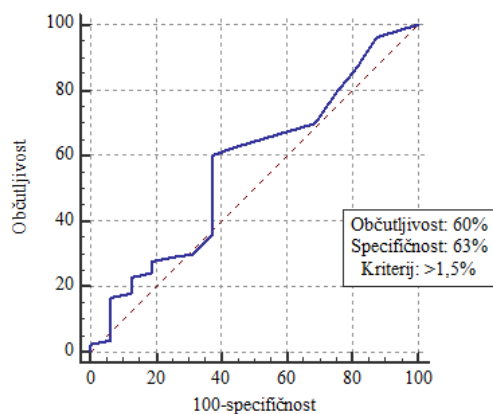
Iz podatkov je razvidno, da ima opozorilo 91% občutljivost na prisotnost nezrelih granulocitov v krvnem razmazu, specifičnost pa je le 32%. To vodi v nizek delež lažno negativnih rezultatov (5 od 56), nizka specifičnost pa prikazuje visok delež lažno pozitivnih rezultatov (65 od 96).

4.4 Vloga parametra IG pri prepoznavanju okužb

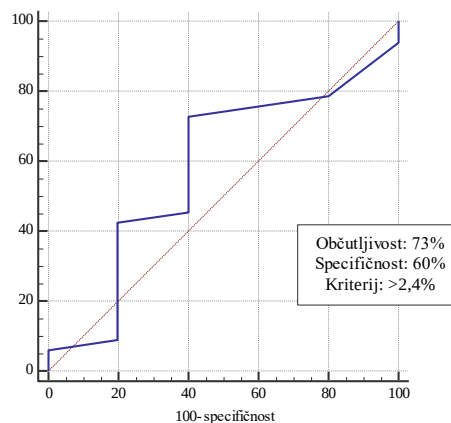
4.4.1 Povezava parametrov IG in CRP

Najprej smo ugotavljali povezavo med parametroma za vse bolnike, kjer smo imeli oba podatka, delež IG ter CRP. Za to smo se odločili, ker je CRP ključen kazalec okužbe ter bi s pomočjo njegove povezave z IG določili tudi pomen IG pri prepoznavi okužb.

ROC krivuljo smo izdelali za 91 podatkov pacientov, ki so imeli vrednosti analizatorja IG > 1% ter rutinsko določen tudi CRP, ki je bil višji od 5 mg/L. Nato smo izdelali tudi ROC krivuljo za paciente, ki so imeli vrednosti analizatorja IG > 2% in CRP višji od 5 mg/L. ROC krivulja prikazuje vrednosti IG pridobljene iz analizatorja, kot kriterij pa smo določili CRP > 5 mg/L.



A



B

Slika 12: ROC krivulji za vrednosti IG analizatorja ob kriteriju CRP > 5 mg/L.

A) Vrednosti IG > 1%; B) Vrednosti IG > 2%.

Slika 12 prikazuje povezavo med parametroma IG in CRP. Pri primerjavi pacientov z deležem IG > 1% in IG > 2% smo sicer določili večjo diagnostično uporabnost parametra IG > 2% s 73% občutljivostjo in 60% specifičnostjo vendar ne gre za bistveno izboljšanje uporabnosti parametra.

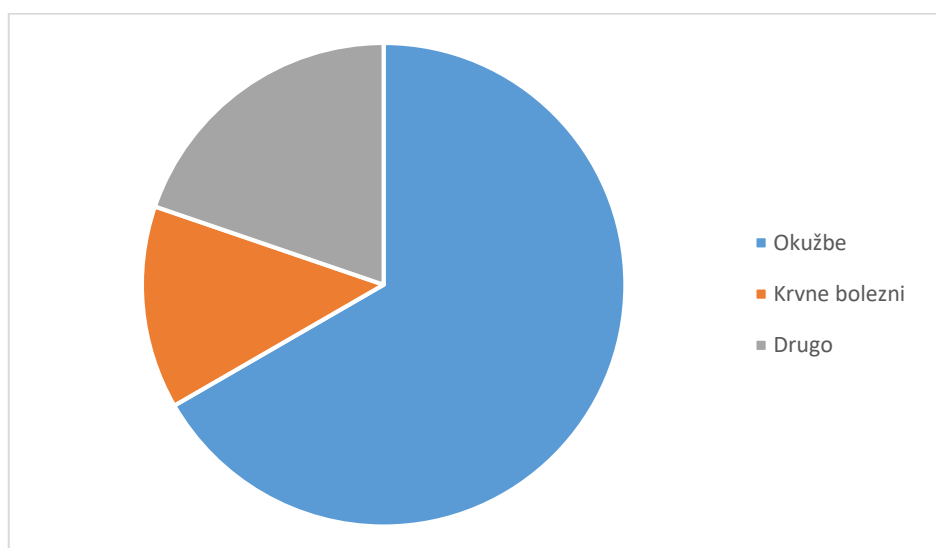
4.4.2 Povezava parametra IG% in diagnoze

Med skupno 152 zbranih rezultatov 102-eh preiskovancev smo za 81 pacientov pridobili tudi klinično informacijo o bolezenskem stanju, kar znaša ob večkratnih kontrolah določenih pacientov 121 meritev vzorcev. Skupaj z diferencialno krvno sliko smo pridobili informacijo o CRP pri 75-ih vzorcih. S tem smo lahko prikazali, kakšen pomen ima določanje deleža IG na hematološkem analizatorju Sysmex XN-1000 za postavitev oziroma potrditev diagnoze.

Preglednica VIII: Podatki o številu in mediana osnovnih parametrov pacientov z znanimi diagnozami.

Pacienti	Število vzorcev	Število vzorcev CRP	Mediana		
			IG%	Levkociti ($10^9/L$)	CRP (mg/L)
81	121	75	1,9%	7,84	16

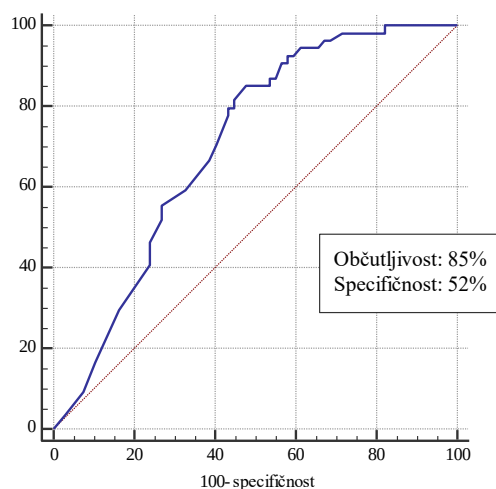
Infekcija je bila s 67% najpogostejši vzrok za zvečan delež IG > 1% na hematološkem analizatorju, na drugem mestu so bili drugi vzroki (20%) ter na tretjem mestu krvne bolezni (14%) kar prikazuje slika 13.



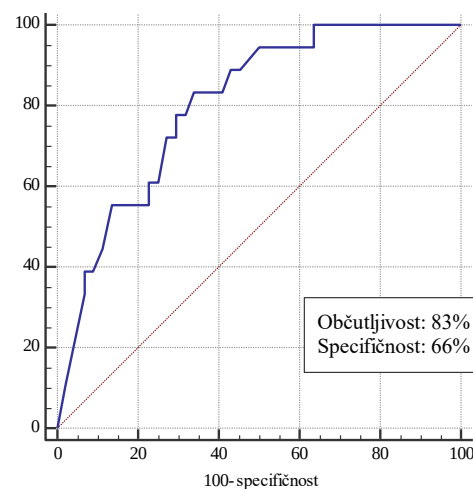
Slika 13: Vzroki za zvišan delež IG v krvi.

S pomočjo pridobljenih kliničnih diagnoz smo lahko za vseh 81 pacientov ovrednotili, kakšen pomen imajo posamezne vrednosti IG analizatorja v povezavi z diagnozo ter, ali obstajajo statistične povezave med parametrom ter postavljenimi diagnozami. Slika 14 prikazuje ROC krivulji za določitev pomena deleža IG analizatorja za zaznavo okužb. Ker smo predhodno s pomočjo ROC krivulje določili mejno vrednost za delež IG analizatorja

> 2% (Slika 11), smo poleg bolnikov z znano diagnozo in vrednosti IG > 1%, vključili v ROC analizo tudi bolnike z znano diagnozo in IG > 2% (N = 62).



B



A

Slika 14: ROC krivulji vrednosti IG analizatorja pacientov z znanimi diagnozami za zaznavo okužb.

A) Pacienti z vrednostmi IG > 1%; B) Pacienti z vrednostmi IG > 2%.

S pomočjo analize ROC krivulj smo določili diagnostično občutljivost in specifičnost za delež IG, ki je bil določen na hematološkem analizatorju. V prvi analizi ROC smo uporabili 121 podatkov ter jih klasificirali glede na potrjeno prisotnost okužbe. Dobili smo 85% občutljivost in 52% specifičnost. Pri drugi analizi ROC pa smo uporabili podatke, kjer je bil delež IG > 2%. Pri izbiri pogoja IG > 2% smo dobili pri skoraj enaki občutljivosti (83%) boljšo specifičnost (66%).

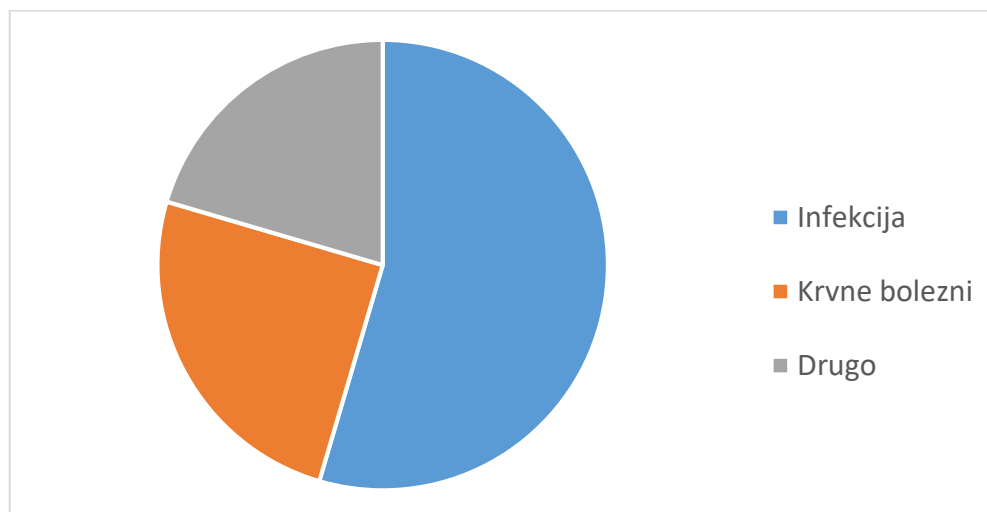
Paciente smo nato ločili še glede na starost, in sicer na predšolsko populacijo ter odraslo populacijo.

4.4.2.1 Odrasla populacija

Preučili smo povezavo med posameznimi diagnozami ter med deležem IG, ki je bil določen s hematološkim analizatorjem Sysmex XN-1000. Vsi pacienti, ki so bili analizirani, so imeli delež IG > 1%. Skupno smo pridobili klinično diagnozo za 44 pacientov, ki so obiskali osebnega zdravnika. Paciente smo po vzroku razdelili v tri

skupine: krvne bolezni, okužbe in drugi vzroki (Slika 15). V skupini s krvnimi boleznimi je bilo 6 pacientov z limfomom, od katerih smo podatke zbrali večkrat, saj so hodili na kontrole za spremljanje bolezni (skupno 41 obiskov). Poleg limfomov so bile diagnosticirane krvne bolezni tudi 1 MDS in 3 anemije. Od infekcijskih vzrokov je bilo diagnosticiranih 13 akutnih respiratornih infektov (ARI), 4 pljučnice, 3 uroinfekti, 2 okužbi preležanin, 1 angina in 1 akutni bronhitis. V tretjo skupino je bilo razvrščenih 10 pacientov, ki so bili obravnavani zaradi slabega počutja, raka prostate, raka ledvic, revmatoidnega artritisa, putika, trombofilije gigantsko celičnega arteritisa in vrtoglavice.

Infekcija je bila s 54,5% največkrat vzrok za zvečan delež IG > 1%, na drugem mestu so bile krvne bolezni (25%), na tretjem mestu pa drugi vzroki (20,5% pacientov) (Slika 15).



Slika 15: Vzroki za zvišan delež IG v krvi pri odraslih.

Povezava parametrov IG%, CRP in levkociti z diagnozo

Za vse tri skupine odraslih pacientov smo naredili osnovno statistično analizo ter mediane posameznega parametra primerjali med seboj.

Preglednica IX: Mediane parametrov za posamezno skupino vzrokov.

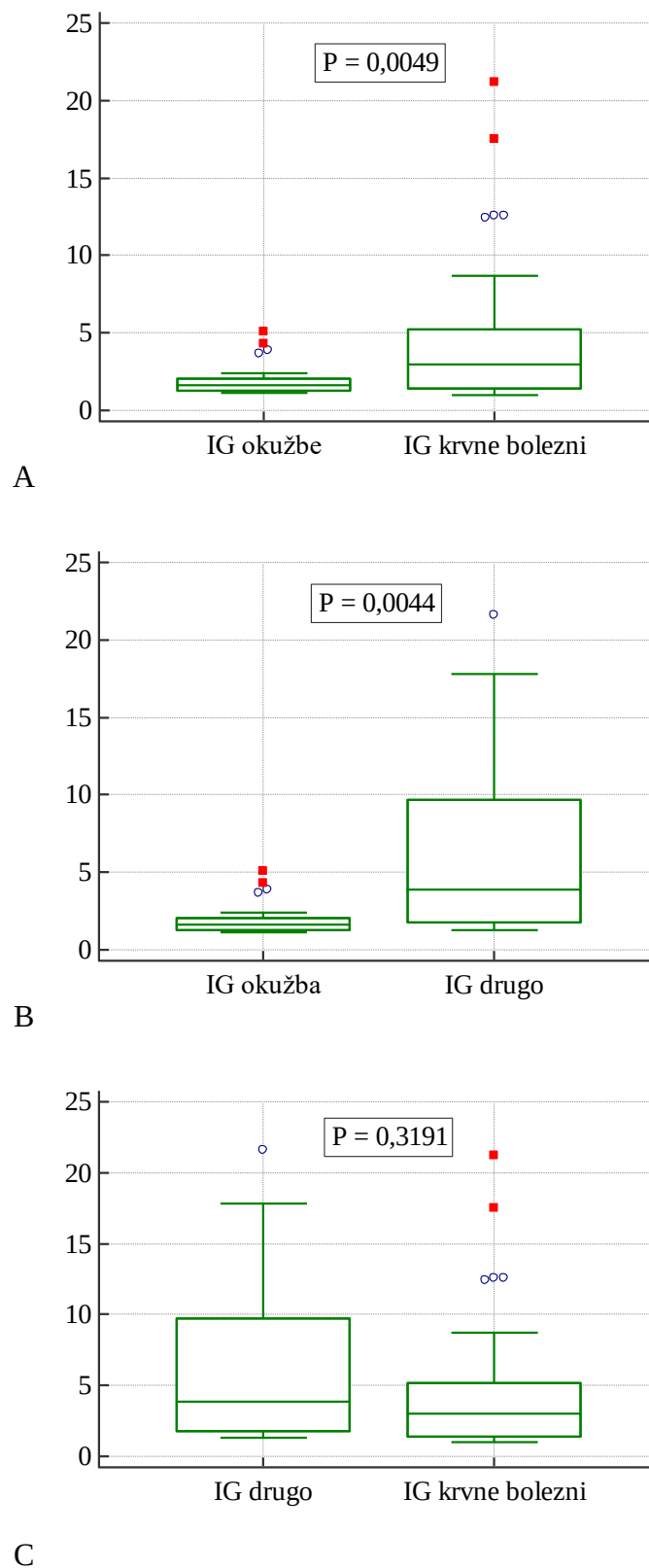
Mediana					
Vzrok	N	IG% analizator	IG% MPKR	Levkociti (10 ⁹ /L)	CRP (mg/L)
Infekcija	24	1,6	0	10,49	45,6
Krvne bolezni	11	3,0	1	5,39	7,2
Drugo	9	3,9	1	7,40	6,7

Iz preglednice je razvidno, da so vrednosti IG pridobljene z analizatorjem višje predvsem pri skupini krvnih bolezni ter skupini drugih vzrokov, medtem ko vrednosti IG dosegajo nižje vrednosti pri infekcijah. Med skupinami smo naredili tudi analizo vrednosti IG ter preverili, če obstaja statistično pomembna razlika med njimi. Pri tem smo uporabili neparametrični Mann-Whitneyjev test za dve neodvisni spremenljivki (Slika 16)

4.4.2.1.1 Razlike v deležu IG glede na bolezenski vzrok

Pri odrasli populaciji smo preverili, če obstaja statistično pomembna razlika v deležu IG med različnimi bolezenskimi vzroki za pojav IG v krvi. Pri tem smo uporabili neparametrični Mann-Whitneyjev test za dve neodvisni spremenljivki (Slika 16).

Rezultati so pokazali statistično značilno razliko v določitvi deleža IG med skupino pacientov z infekcijo ter skupino pacientov, ki imajo krvno bolezen ($P = 0,0049$), prav tako se statistično razlikujeta skupini pacientov z infekcijo ter drugimi boleznimi ($P = 0,0044$), kjer so statistično značilno nižje vrednosti IG pri okužbi. Skupini pacientov z drugimi vzroki in krvnimi boleznimi pa se statistično ne razlikujeta v deležu IG ($P = 0,3191$).



Slika 16: Grafični prikaz porazdelitve deležev IG na hematološkem analizatorju.

Primerjava med skupinami pacientov: A) bolniki z okužbami in krvnimi boleznimi; B) bolniki z okužbo in drugo diagnozo; C) bolniki z drugimi diagnozami in bolniki s krvnimi boleznimi.

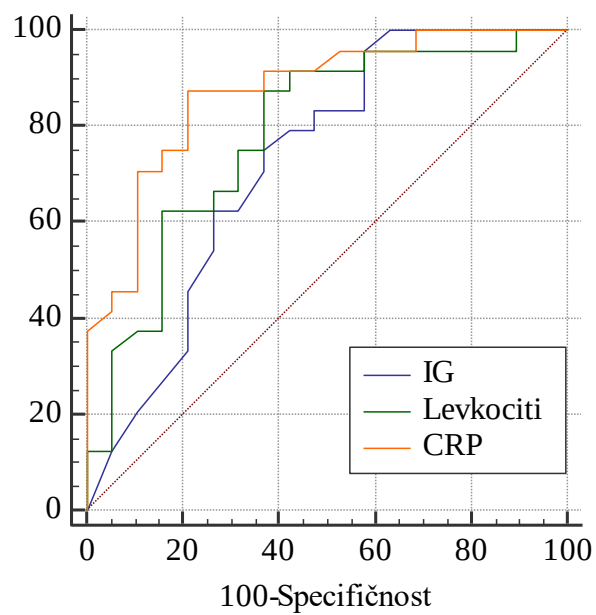
Primerjava ROC krivulj pri odraslih

Pri pacientih, ki so imeli $IG > 1\%$ in $IG > 2\%$, naročeno krvno sliko z diferencialno krvno sliko in CRP, smo primerjali ROC krivulje. Pacientov, ki so imeli znano diagnozo, $IG > 1\%$ in naročene vse tri parametre, je bilo 43, med temi so bili pacienti iz vseh treh skupin, glede na vzroke. Kot kriterij za prisotno okužbo smo postavili klinično potrjeno okužbo. Pacientov, ki imajo delež IG na hematološkem analizatorju $> 2\%$ in znano diagnozo ter smo jih vključili v ROC analizo, pa je 29.

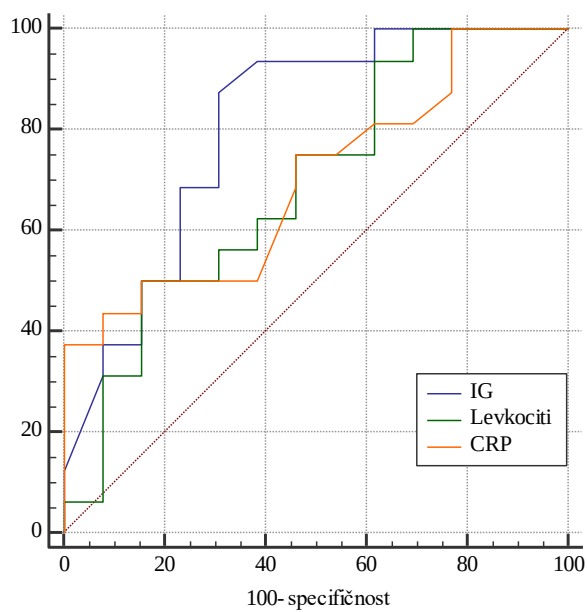
Primerjava ROC krivulj za paciente z vrednostmi IG analizatorja $> 1\%$ in $> 2\%$ je pokazala razlike v diagnostičnih uporabnostih parametrov (Slika 17). Največjo površino pod krivuljo in s tem tudi največjo diagnostično uporabnost pri pacientih ki so imeli delež $IG > 1\%$ smo določili pri parametru CRP, pri katerem je bila površina ($AUC = 0,873$). Drugo največjo površino pod krivuljo so imeli levkociti ($AUC = 0,784$). Parameter delež IG je imel najmanjšo $AUC = 0,725$. Pri pacientih, ki so imeli delež $IG > 2\%$, pa ima največjo diagnostično uporabnost parameter IG ($AUC = 0,808$), manjšo diagnostično uporabnost pa imata CRP ($AUC = 0,700$) in levkociti ($AUC = 0,692$).

Preglednica X: Vrednosti AUC.

Vključeni pacienti	Parameter	AUC	Občutljivost	Specifičnost
IG > 1%	IG%	0,725	75%	63%
	Levkociti	0,784	88%	63%
	CRP	0,873	88%	79%
IG > 2%	IG%	0,808	83%	63%
	Levkociti	0,692	50%	85%
	CRP	0,700	38%	100%



A



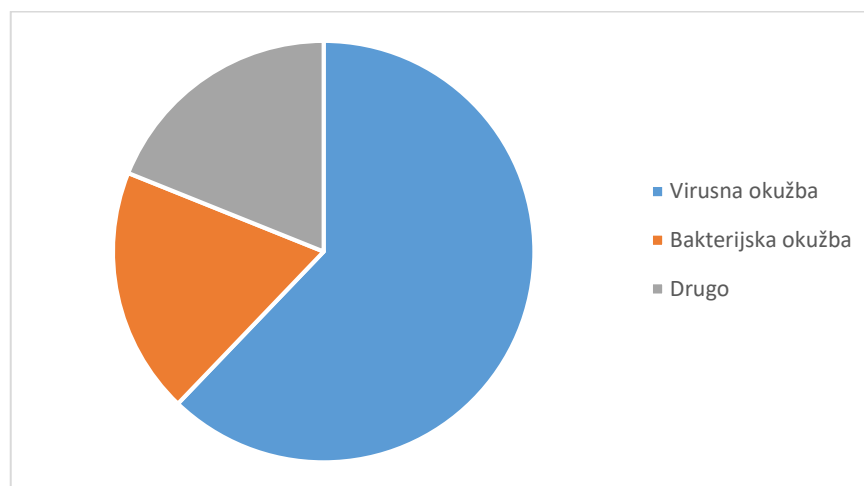
B

Slika 17: analiza ROC za zaznavanje okužb za parametre IG, Lkc in CRP.

A) Pacienti z znanimi diagnozami in vrednostjo IG > 1%; B) Pacienti z znanimi diagnozami in vrednostjo IG > 2%.

4.4.3 Predšolska populacija

Izmed 47 predšolskih pacientov, ki so prišli v pediatrično ambulanto, smo pri 37 pacientih pridobili klinični podatek o diagnozi, ki je bila postavljena na podlagi klinične slike ter laboratorijskih izsledkov. Vsi pacienti so imeli po opravljeni analizi diferencialne krvne slike na hematološkem analizatorju delež IG v krvi vsaj 1%. Vse obravnavane paciente smo ločili na 3 skupine glede na postavljeno diagnozo. Te skupine so virusne okužbe, bakterijske okužbe in drugo (Slika 18). 23 pacientov je imelo virusno okužbo, med njimi večina neopredeljeno. V tej skupini so bili pacienti z infekcijo zgornjih dihal in ne-gnojnim vnetjem srednjega ušesa. V skupino 7-ih pacientov z bakterijskimi okužbami spadata dve bakterijski pljučnici, neopredeljene bakterijske infekcije in gnojno vnetje srednjega ušesa. 7 pacientov pa je imelo druge bolezni.



Slika 18: Vzroki za pojav zvišanega IG% v krvi pri predšolskih otrocih.

Povezava med vrednostmi IG%, CRP in levkociti ter klinično diagnozo

Spodaj so prikazane vrednosti median parametra IG na hematološkem analizatorju, levkociti in CRP pri vseh treh skupinah pacientov.

Preglednica XI: Primerjava mediane IG analizatorja in MPKR, levkocitov in CRP med skupinami.

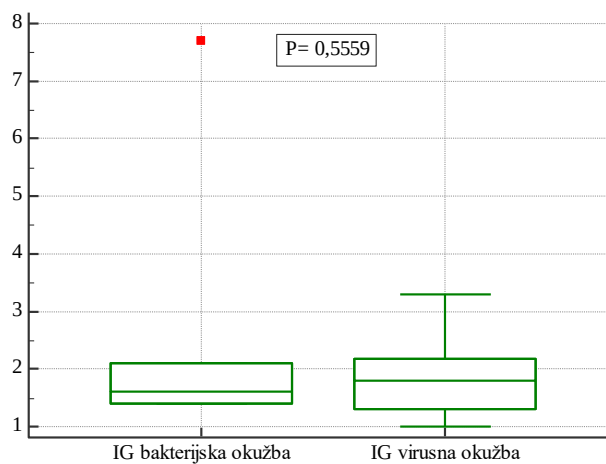
Vzrok	N	Mediana		Levkociti (10^9 /L)	CRP (mg/L)
		IG% analizator	IG% MPKR		
Virusna okužba	23	1,8	0	9,80	28,0
Bakterijska okužba	7	1,6	0	15,60	60,0
Drugo	7	1,8	0	6,84	8,0

Kot je razvidno iz razpredelnice XI, se vrednost parametrov razlikujejo glede na vrsto okužbe. Pri bakterijskih okužbah so bile vrednosti levkocitov in CRP višje v primerjavi z vrednostmi pri virusnih okužbah. Mediana levkocitov je pri bakterijski infekciji znašala $15,60 \times 10^9$ /L, medtem ko je pri virusnem $9,80 \times 10^9$ /L. CRP se je prav tako bolj povišal pri bakterijskih obolenjih, kjer je mediana znašala 60,0 mg/L v primerjavi z virusnimi, kjer je bila 28,0 mg/L. Delež IG določen s hematološkim analizatorjem je bil višji pri virusnih okužbah in drugih boleznih ter je znašal 1,8%, medtem ko je bil pri bakterijskih 1,6%.

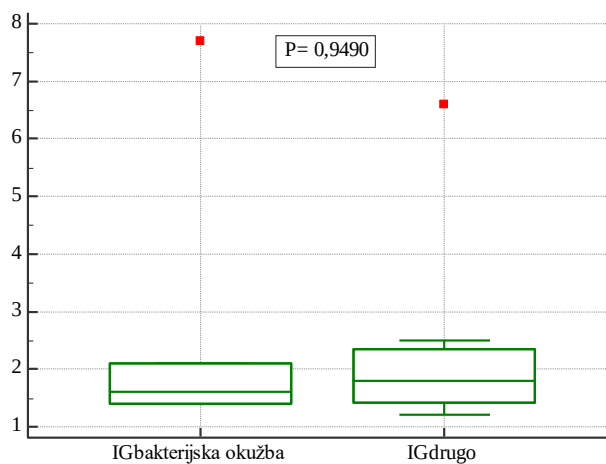
Razlike v deležu IG glede na vzroke

Tudi pri predšolski populaciji smo preverili, če obstaja statistično pomembna razlika v deležu IG med skupinami. Pri tem smo uporabili neparametrični Mann-Whitneyjev test za dve neodvisni spremenljivki (Slika 19).

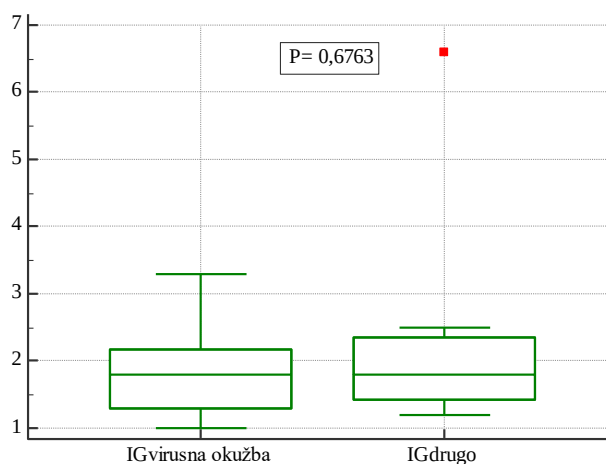
A



B



C



Slika 19: Prikaz razporeditve deležev IG pridobljenega s hematološkim analizatorjem.

Primerjava razporeditve rezultatov IG med skupinami: A) pacienti z bakterijsko in pacienti z virusno okužbo; B) pacienti z bakterijsko okužbo in skupino drugih diagnoz; C) pacienti z virusno okužbo in skupino drugih diagnoz.

S pomočjo statistične obdelave smo primerjali delež IG med posameznimi skupinami. Skupine se med seboj v vrednosti deleža IG statistično ne razlikujejo. Med seboj smo najprej primerjali skupini z virusno okužbo in bakterijsko, kjer smo dobili vrednost $P = 0,5559$, nato smo naredili primerjavo med skupino bakterijskih okužb in drugo ($P = 0,9490$) ter na koncu še med skupinama virusnih okužb in drugo ($P = 0,6763$). Vse skupine se statistično ne razlikujejo med seboj.

5 RAZPRAVA

Številne študije so že preučevale diagnostični pomen parametra IG, ki ga lahko določamo s hematološkim analizatorjem Sysmex XN-1000. Proučevana je bila predvsem njegova povezava s prepoznavo okužb ter njegova uporabnost kot pomožni kazalec za diagnostiko infekcij ter sepse (3,4,6,26). Tudi mi smo v magistrskem delu preverjali njegovo uporabnost v laboratoriju zdravstvenega doma ter primerjali rezultate IG, pridobljene s hematološkim analizatorjem, z rezultati diferencialne krvne slike, pridobljene s pomočjo mikroskopa.

Določili smo mejno vrednost IG hematološkega analizatorja za pregled krvnega razmaza, pri katerem je razmerje med občutljivostjo in specifičnostjo najboljše ter preučevali, kakšen vpliv ima prestavitev meje na število potrebnih pregledanih krvnih razmazov ter posledično na spremembo obsega dela v laboratoriju.

Nato smo preučili še diagnostično uporabnost parametra IG v povezavi s pridobljenimi kliničnimi informacijami vseh pacientov, v nadaljevanju pa tudi med ločenima skupinama predšolskih otrok do 6 leta in pacientov starejših od 6 let.

5.1 Primerjava določanja IG% med hematološkim analizatorjem Sysmex XN-1000 in MPKR

Pri primerjavi določanja nezrelih granulocitov z obema metodama smo najprej opravili osnovno statistično analizo vseh 152 meritev vzorcev in preučili porazdelitev vrednosti IG analizatorja (slika 7 in 8). Ugotovili smo, da se večina vzorcev deleža IG analizatorja nahaja v območju do 2% in da predstavljajo vrednosti IG > 3% le 29,6% vseh meritev. Torej so vrednosti IG, ki smo jih pridobili v Zdravstvenem domu, pričakovano nižje od tistih iz študij, kjer so obravnavali hospitalizirane paciente (3). Iz porazdelitve vrednosti IG med analizatorjem in MPKR so razvidni višji določeni deleži na analizatorju kot pri MPKR. Mediana vrednosti IG je bila večja kot mediana IG MPKR. Prav tako smo določili najnižjo in najvišjo vrednost, ki sta znašali za IG analizatorja 1,0% in 21,6%, medtem ko sta pri MPKR znašali vrednosti 0,0% in 15,0%.

Med deležem IG določenim s hematološkim analizatorjem ter MPKR smo določili statistično značilno razliko ($P < 0,0001$).

Podatki o mediani, najvišji in najnižji vrednosti ter graf razporeditve podatkov za hematološki analizator in MPKR potrjujejo v povprečju višje določene vrednosti IG na analizatorju kot pa pri MPKR. Razlike med pridobljenimi vrednostmi smo ovrednotili s pomočjo Bland-Altmanovega diagrama, ki je pokazal povprečje razlik IG analizatorja in IG DKS 2,43% (Slika 10).

Podatek o višjih vrednostih dobljenih z analizatorjem navaja tudi literatura. V študiji, ki je proučevala paciente na oddelkih intenzivne terapije, so ugotovili povprečno za 1,69% višje vrednosti IG določene z analizatorjem kot z MPKR, druga študija pa je določila povprečno razliko med IG analizatorja in MPKR 2,5% (30,40). Mi smo dobili povprečno razliko 2,43%, kar se sklada z obema omenjenima študijama.

Spearmanov koeficient korelacije (r) med določitvijo IG z analizatorjem ter MPKR znaša 0,598 ($P < 0,0001$), kar predstavlja srednjo/dobro povezavo (slika 8). Zaradi zmerne korelacije med MPKR in hematološkim analizatorjem zamenjava MPKR z določitvijo na analizatorju ni priporočljiva. Slabša korelacije med metodama je posledica nižjega števila celic, ki so preštete z mikroskopom (2 krat 100 celic) v primerjavi s hematološkim analizatorjem, subjektivnost pri morfološki klasifikaciji (ločitev med metamielociti in paličastimi nevtrofilnimi granulociti) ter razporeditvijo celic v razmazu (30).

Paciente smo nato ločili še na dve skupini. Prva skupina so predšolski otroci do 6 let, druga skupina pa odrasli pacienti nad 6 let. Pri primerjavi parametrov so bili višji deleži IG analizatorja in MPKR določeni v skupini odraslih oseb, vrednost levkocitov pa je bila višja pri predšolski populaciji. Med populacijo odraslih in predšolskih otrok smo določili statistično značilno razliko v vrednostih deleža IG ($P = 0,0025$).

5.2 Določitev mejne vrednosti IG% na hematološkem analizatorju

S pomočjo ROC krivulje smo določili mejno vrednost IG hematološkega analizatorja, pri kateri bi bilo priporočljivo izdelati ter pregledati DKS pod mikroskopom. Meja, pri kateri dobimo najboljše razmerje med specifičnostjo in občutljivostjo, je 2%. Pri tej vrednosti znaša občutljivost 80%, specifičnost 75% ter $AUC = 0,833$.

V času zbiranja in pregledovanja vzorcev pacientov je bila meja za izdelavo in pregled krvnega razmaza v Laboratoriju za klinično kemijo in biokemijo ZD Celje $> 1\%$ IG. Pri tej vrednosti je potrebna izdelava in barvanje krvnega razmaza ter pregled 100 celic pod

mikroskopom. V kolikor je med 100 celicami prisotna vsaj ena celica, ki je paličasti nevtrofilec, metamielocit, mielocit, promielocit ali blast, je treba pogledati skupno 200 celic ter kot končni izvid izdati rezultat MPKR. V kolikor v krvnem razmazu zgoraj našete celice niso prisotne, se sprosti rezultat DKS analizatorja, vendar brez izdane vrednosti IG, ki je del DKS analizatorja. Pri prestavitvi mejne vrednosti za izdelavo in pregled krvnega razmaza iz $> 1\%$ na $> 2\%$ bi od skupno zbranih 152 krvnih razmazov po novih kriterijih izdelali in pregledali le 69 razmazov. Obseg dela (priprave krvnih razmazov in pregledovanja pod mikroskopom) bi se tako zmanjšal za 54%. Ob tem pa bi izpustili in izdali izvid analizatorja pri 11-ih krvnih razmazih, ki so vsebovali nezrele granulocite brez pregleda MPKR. Vendar nobeden od teh vzorcev, ki bi jih po novi postavljeni mejni vrednosti izpustili, ni vseboval blastov ali promielocitov, analizator tudi ni dal nikakršnih opozoril. Torej s prestavitvijo meje z 1% na 2% v krvnem razmazu ne bi spregledali nobene pomembne najdbe, bi pa z dvigom meje občutno zmanjšali obseg dela.

Pri postavitvi meje na $> 3\%$ bi dosegli 63% občutljivost in 90% specifičnost, kar pomeni, da bi zgrešili 21 pacientov s prisotnimi nezrelimi granulociti v krvnem razmazu. Nizka diagnostična občutljivost pomeni večjo možnost spregledanja vzorcev, kjer so v resnici prisotni IG. Pri postavljeni meji $> 3\%$ bi izdelali in pregledali 47 krvnih razmazov, kar je le 22 krvnih razmazov manj kot pri meji $> 2\%$, saj je pretežni del zbranih vzorcev v območju do 2% (slika 7 in 8). Zaradi tega ni smiselno prestaviti meje iz $> 2\%$ na $> 3\%$, saj to ne vpliva bistveno na obseg dela, možnost za spregled nezrelih celic v krvnem razmazu pa je večja.

Literatura navaja mejne vrednosti $3,2\%$ za odraslo populacijo. Pri spremembi mejne vrednosti na 4% in 5% bi bilo preveliko zgrešenih pacientov (24). Predlagana je bila tudi mejna vrednost 5% pod pogojem, da je število levkocitov več kot $2,5 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ (41).

Zaradi vsega naštetega smo za laboratorij na primarni zdravstveni ravni postavili priporočljivo vrednost IG za pregled krvnega razmaza, ki znaša $> 2\%$. Nad to vrednostjo je treba narediti ter pregledati krvni razmaz.

5.3 Povezava parametra IG % z diagnozo

Številne študije so proučevale diagnostični pomen parametra IG% pri različnih hematoloških analizatorjih. Literatura predvsem navaja vrednosti IG kot napovednega dejavnika za prepoznavo okužb in sepse. Študije so dokazale, da se vrednost IG statistično razlikuje pri pacientih s pozitivnimi in pacienti z negativnimi hemokulturami ter tako določile, da je parameter IG boljši napovedni dejavnik za napoved okužbe kot število levkocitov, ANC ter razmerje med njima (4). Podobne rezultate je pokazala tudi študija, ki je preučevala paciente s sumom na sepso. Tudi tukaj so bile ugotovljene višje vrednosti IG med okuženimi in neokuženimi pacienti ter tistimi, ki so imeli pozitivne hemokulture (3). Tudi pri dojenčkih so ugotovili povezavo med povečanim deležem IG ter pozitivnimi hemokulturami. V tej študiji so vrednosti IG, ki so bile višje od 0,5%, povečale možnost za pozitivno hemokulturo za 3,63 krat (8).

Zato smo se v magistrskem delu osredotočili na napovedno vrednost parametra IG za napovedovanje okužb pri pacientih na primarni zdravstveni ravni, kjer načeloma življenjsko ogrožajoče sepse niso pogoste in pacienti niso potrebni intenzivne terapije. Zbrani pacienti so imeli predvsem težave z (blažjimi) okužbami, hematološkimi obolenji, rakavimi boleznimi, slabim počutjem in avtoimuskimi boleznimi. Odrasla populacija je prihajala k zdravniku in imela v krvi > 1% IG predvsem zaradi okužb in malignih bolezni, medtem ko je imela pediatrična populacija večinoma težave z neopredeljenimi virusnimi in nekaj bakterijskimi okužbami (slika 20).

Pridobili smo klinično informacijo za 81 pacientov ter skupno 121 vzorcev. Pri določanju diagnostičnega pomena deleža IG analizatorja smo se osredotočili na pomen deleža IG za zaznavo okužb. Določili smo 85% občutljivost in 52% specifičnost za potrditev okužbe pri vrednostih IG > 1%. Pri izbranih pacientih z znanimi diagnozami z deležem IG > 2% pa smo določili 81% občutljivost in 67% specifičnost (slika 15). Pri primerjavi obeh ROC krivulj dobimo podobno občutljivost, medtem ko se pri pacientih z znanimi diagnozami in deležem IG > 2% poveča diagnostična specifičnost.

5.3.1 Odrasla populacija

Najvišje vrednosti IG so imeli odrasli pacienti s potrjenimi karcinomi in limfomi, najnižje vrednosti pa pacienti, ki so imeli okužbo. Več podatkov smo imeli za paciente z limfomi, ki smo jih spremljali ob rednih kontrolah. Pri njih smo določili mediano IG 3,3%.

ROC krivulje za odraslo populacijo so pokazale največjo površino pod krivuljo in s tem tudi največjo diagnostično uporabnost za določitev okužbe pri parametru CRP, pri katerem je bila površina $AUC = 0,873$ z 88% občutljivostjo in 79% specifičnostjo. Drugo največjo površino pod krivuljo so imeli levkociti, delež IG pa je imel najmanjšo (slika 19, tabela X).

Najmanjša diagnostična uporabnost deleža IG, določenega s hematološkim analizatorjem, ni presenečenje. Literatura navaja, da so njegovo diagnostično uporabnost preverjali izključno pri pacientih s sumom na okužbo ali sepsa, določene skupine pacientov pa so izključili (4,19,40). Tako so se osredotočili izključno na paciente v enotah intenzivne terapije, paciente s krvnimi boleznimi, paciente ki jemljejo antibiotike pa so izključili (4). Medtem ko so na bolnišničnih oddelkih pacienti že razvrščeni glede na specifične vzroke za njihovo bolezensko stanje, pa na primarni zdravstveni ravni pacienti pridejo k splošnemu zdravniku zaradi različnih zdravstvenih težav. Vzrokov zanje pogosto na začetku ni mogoče jasno ločiti. Zato smo enotno obravnavali vse paciente, ki so prišli k osebemu zdravniku. Vrednosti deleža IG so bile pri infekcijah statistično nižje kot pri skupinah bolnikov s krvnimi boleznimi in drugimi težavami (slika 14). Zato se naši rezultati ne morejo neposredno primerjati z raziskavami iz literature, ki se osredotočajo le na dobro definirane skupine pacientov (5) ali starostno bolj homogene skupine (25,26,39). Če upoštevamo vse skupine pacientov, ki so bili obravnavani na ravni zdravstvenega doma, ima najvišjo diagnostično uporabnost za prepoznavo okužb parameter CRP.

Ločeno smo analizirali še paciente z znanimi diagnozami ter deležem $IG > 2\%$. Ta je pokazala največjo diagnostično uporabnost za določitev okužbe za parameter IG s 83% občutljivostjo in 63% specifičnostjo ($AUC = 0,808$). Parametra CRP in levkociti pa imata pri pogoju $IG > 2\%$ nižjo diagnostično uporabnost z $AUC = 0,700$ in $AUC = 0,692$ (slika 19). Ta rezultat znova potrjuje, da je tudi s stališča klinične uporabnosti meja 2% bolj smiselna.

5.3.2 *Pediatrična populacija*

Tako kot navaja literatura, so razlogi za pojav IG v krvi odrasle in pediatrične populacije različni (17). Vrednosti IG so se razlikovale od odrasle populacije ter se gibale od 1,0% do 7,7% z mediano 1,8%. V primerjavi z odraslo populacijo so IG vrednosti pri otrocih nižje. Najvišje vrednosti pri pediatričnih pacientih smo določili pri skupini z virusnimi okužbami in drugih stanjih, pri bakterijskih okužbah pa smo zasledili nižje vrednosti.

Vse našteje diagnoze tako pri odraslih kot pri otrocih se skladajo z raziskavo, kjer so določili najpogostejše vzroke za pojav IG v krvi otrok in odraslih oseb (17).

Pri otrocih se razporeditve vrednosti deleža IG med vsemi tremi določenimi skupinami statistično niso razlikovale.

5.4 Določitev klinične uporabnosti parametra IG na primarni zdravstveni ravni

Tako kot pri vseh parametrih, ki jih lahko pridobimo, je treba vsakega kritično pregledati ter preučiti njegove omejitve. Klinična uporaba IG naj bi bila omejena zaradi nizke občutljivosti ali specifičnosti metode (3,8). Granulociti se lahko pojavljajo ob različnih stanjih in ne samo ob okužbah. Pri zadovoljivi specifičnosti metode ter visoki negativni napovedni vrednosti bi lahko parameter služil kot dodatna informacija, ki bi bila uporabna v kombinacijami z drugimi kazalci in diagnostičnimi postopki. Pri določanju klinične uporabnosti parametrov IG za razlikovanje okužbe od drugih stanj, smo določili 85% občutljivost za paciente z deležem $IG > 1\%$ in 83% občutljivost za deleže $IG > 2\%$. Pri odrasli populaciji smo primerjali tudi parametre IG, CRP in levkociti med seboj. Največjo diagnostično uporabnost za paciente z deležem $IG > 1\%$ smo določili za CRP, pri skupini pacientov z $IG > 2\%$ pa je bila uporabnost za prepoznavo okužb najvišja za delež IG.

V zaključku lahko trdimo, da je parameter IG lahko na podlagi raziskav pomemben dodatni kazalec pri prepoznavi okužb ter začetnih znakov sepse. Prednost določitve IG je zagotovo tudi dejstvo, da za izvedbo analize niso potrebni dodatni odvzemi bioloških vzorcev, stroški in dodatni kader. Pri nadaljnji ocenitvi vrednotenja parametra so opazili potrebo po kontroli kvalitete ter uvedbo sheme zunanje kontrole kakovosti, ki bi omogočala analitično ovrednotenje parametra kot tudi primerjavo med laboratoriji (42). Vsi naši rezultati pa potrjujejo, da je njegova vrednost večja pri deležu nad 2%.

Parameter IG lahko služil kot dodatna informacija, ki bi bila uporabljena v kombinaciji z drugimi kazalci in diagnostičnimi postopki. Pri razumno postavljeni mejni vrednosti, pri kateri bi bilo treba izdelati krvni razmaz ter vrednotiti IG pod mikroskopom, bi bil lahko parameter IG del vsakega uradnega izvida in bil poleg drugih kazalcev v pomoč pri prepoznavanju in diagnosticiranju okužb na primarni ravni.

6 SKLEP

- Pretežni del zbranih vzorcev je imel delež IG v območju do 2%. Delež vzorcev vrednosti IG analizatorja $> 3\%$ je predstavljal le 29,6%.
- Primerjava določanja IG je pokazala statistično različne vrednosti, pri čemer je delež IG določen z analizatorjem v povprečju za 2,43% višji kot z MPKR.
- Korelacija (r) med metodama določanja deleža IG s hematološkim analizatorjem in MPKR je srednje dobra s koeficientom korelacije 0,598 ($P < 0,0001$).
- Določili smo novo mejno vrednost deleža IG, ki ga poda analizator, pri katerem je potreben MPKR. Ta znaša $> 2\%$, z občutljivostjo 80% in specifičnostjo 75%. S predstavitvijo mejne vrednosti bi se zmanjšalo število izdelanih in pregledanih MPKR za 54%, ob tem pa ne bi spregledali ključnih patoloških najdb.
- Pri vrednotenju opozorila »IG Present« smo določili 91% občutljivost in 32% specifičnost za opozorilo na prisotnost nezrelih granulocitov v krvnem razmazu.
- Pri mejni vrednosti IG $> 1\%$ smo določili 85% občutljivost in 52% specifičnost parametra hematološkega analizatorja za zaznavo okužb. Pri spremembi mejne vrednosti na IG $> 2\%$ smo pri skoraj enaki občutljivosti (81%) dosegli 67% specifičnost.
- Vrednosti IG so višje predvsem pri skupini odraslih bolnikov s krvnimi boleznimi ter pri skupini z drugimi bolezenskimi vzroki, ki niso okužba, medtem ko vrednosti IG dosegajo nižje vrednosti pri okužbah. Skupine bolnikov s krvnimi boleznimi in drugimi vzroki se v deležu IG medsebojno ne razlikujejo.
- Primerjava ROC krivulj med skupinami odraslih pacientov z znanimi diagnozami je pokazala največjo diagnostično uporabnost pri zaznavanju okužb za parameter CRP z 88% diagnostično občutljivostjo in 79% specifičnostjo. Pri izbranih pacientih z deležem IG $> 2\%$ pa je največjo diagnostično uporabnost za prepoznavo okužb imel parameter IG.
- Skupine pediatrične populacije se glede na razliko v deležu IG statistično ne razlikujejo med seboj.
- Naše delo je potrdilo, da bi bila mejna določena vrednost analizatorja IG $> 2\%$, pri katerem je potreben MPKR, tako laboratorijsko kot klinično smiselna.

7 LITERATURA

1. Bain B. J, Bates I, Laffan M. A LSM: Dacie and Lewis Practical Haematology. Elevent Edition, Churchill Livingstone 2011; 43-46.
2. Briggs C, Kunka S, Fujimoto H, Hamaguchi Y, Davis BH, Machin SJ: Evaluation of immature granulocyte counts by the XE-IG master: upgraded software for the XE-2100 automated hematology analyzer. *Lab Hematol* 2003; 9(3): 117–24.
3. Ali Ansari-Lari M, Kickler TS, Borowitz MJ: Immature Granulocyte Measurement Using the Sysmex XE-2100. Relationship to Infection and Sepsis. *Am J Clin Pathol.* 2003; 120: 795–9.
4. Senthilnayagam B, Kumar T, Sukumaran J, Jeya M, Rao K. R: Automated Measurement of Immature Granulocytes: Performance Characteristics and Utility in Routine Clinical Practice. *Patholog Res Int.* 2012; Article ID 483670, 6 pages, 2012.
5. Mare TA, Treacher DF, Shankar-Hari M, Beale R, Lewis SM, Chambers DJ, et al.: The diagnostic and prognostic significance of monitoring blood levels of immature neutrophils in patients with systemic inflammation. *Critical Care* 2015; 19: 57.
6. Nierhaus A, Klatte S, Linssen J, Eismann NM, Wichmann D, Hedke J, et al.: Revisiting the white blood cell count: immature granulocytes count as a diagnostic marker to discriminate between SIRS and sepsis -a prospective, observational study. *BMC Immunol* 2013; 14: 8-17
7. Van der Geest PJ, Mohseni M, Brouwer R, van der Hoven B, Steyerberg EW, Groeneveld ABJ: Immature granulocytes predict microbial infection and its adverse sequelae in the intensive care unit. *J Crit Care.* 2014; 29: 523-7.
8. Nigro KG, O’Riordan M, Molby EJ, Walsh MC, Sandhaus LM: Performance of an automated immature granulocyte count as a predictor of neonatal sepsis. *Am J Clin Pathol.* 2005; 123(4): 618–24.
9. Košnik M, Mravlje F, Štajer D, Černelč P KM: *Interna medicina*, 4.izdaja, Littera Picta d.o.o. Slovensko medicinsko društvo, Ljubljana, 2011; 1243-1244, 1247-1248, 1296-1303, 1309-1321.

10. Wintrobe MM, Greer JP: Wintrobe's clinical hematology. 13th Ed, 2014; 5: 26-27.
11. <http://www.newhealthadvisor.com/types-of-white-blood-cells.html>. (Dostopno 25.6.2017)
12. Podgornik H, Pretnar J ČP: Atlas krvnih celic. Ljubljana: Slovensko društvo za hematološko diagnostiko, Ljubljana 2013; 3: 13-16.
13. Brece K, Božnar Alič E, Podgornik H, Trampuš Bakija A ŽD: Priporočeni postopki za mikroskopski pregled krvnega razmaza, Slovensko združenje za klinično kemijo (SZKK), Ljubljana, 2012; 4-6, 11-16.
14. Hall, J. E., Guyton AC: Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology. 12th editi. Philadelphia, 2010; 423-432.
15. Bain BJ, Clark DM, Wilkins BS: Infection and Reactive Changes. In: Bone Marrow Pathology. 4th ed. 2009; 100.
16. Theml H, Diem H, Haferlach T: Color Atlas of Hematology: Practical Microscopic and Clinical Diagnosis. Thieme, 2004; 17-19, 112.
17. Roehrl MHA, Lantz D, Sylvester C, Wang JY: Age-Dependent Reference Ranges for Automated Assessment of Immature Granulocytes and Clinical Significance in an Outpatient Setting. Arch Pathol Lab Med, 2011; 135:471-477.
18. Bain BJ: A Beginner's Guide to Blood Cells. Second edition, 2004; 79.
19. Buoro S, Mecca T, Azzarà G, Esposito SA, Seghezzi M, Vavassori M, et al.: Extended leukocyte differential count and C-reactive protein in septic patients with liver impairment: diagnostic approach to evaluate sepsis in intensive care unit. Ann Transl Med. 2015; 3(17): 244.
20. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al.: Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis ,1992; 1644–55.
21. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al: The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). Jama, 2016; 315(8): 801–10.

22. Baron RM, Baron MJ, Perrella MA: Pathobiology of sepsis: Are we still asking the same questions? *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 2006; 34(2): 129–34.
23. Annane D, Bellissant E, Cavaillon J-M: Septic shock. *Lancet.* 2005; 365(9453): 63–78.
24. Bernstein L., H RJ: Validation and Calibration of the Relationship between Granulocyte Maturation and the Septic State. *Clin Chem Lab Med.* 2011; (49): 2089–95.
25. Cimenti C, Erwa W, Herkner KR, Kasper DC, Müller W, Resch B: The predictive value of immature granulocyte count and immature myeloid information in the diagnosis of neonatal sepsis. *Clin Chem Lab Med.* 2012; 50(8): 1429–32.
26. Cimenti C, Erwa W, Müller W, Resch B: The Role of Immature Granulocyte Count and Immature Myeloid Information in the Diagnosis of Neonatal Sepsis. In: Resch B, editor. *Neonatal bacterial infection.* 2013; 59–78.
27. Wilcox RA. Cancer-Associated Myeloproliferation: Old Association, New Therapeutic Target. *Mayo Clin Proc.* 2010; 85(7): 656–63.
28. Che Y-Q, Shen D, Zhang S-M, Qi J: Identification of immature granulocytes in cancer chemotherapy patients by cell counting vs. microscopic examination of blood smears. *Mol Clin Oncol.* 2014; 2(2): 207–11.
29. Fernandes B, Hamaguchi Y: Automated enumeration of immature granulocytes. *Am J Clin Pathol.* 2007; 454–63.
30. Maenhout TM, Marcelis L: Immature granulocyte count in peripheral blood by the Sysmex haematology XN series compared to microscopic differentiation. *J Clin Pathol.* 2014; 67(7): 648–50.
31. Eilertsen H, Hagve TA: Do the flags related to immature granulocytes reported by the sysmex XE-5000 warrant a microscopic slide review? *Am J Clin Pathol.* 2014; 142:553-560.
32. Sysmex. Sysmex corporation, Automated hematology analyzer XN series: Navodila za uporabo. 2010-2013. Dostopno v laboratoriju za klinično kemijo.

33. <https://www.sysmex-europe.com/academy/knowledge-centre/calendar-2014/measurement-technology-and-scattergram.html>. (Dostopno 26.6.2017).
34. https://www.sysmex.com/us/en/Brochures/XN-Series_Main_Brochure_MKT-10-1174.pdf. (Dostopno 26.6.2016).
35. <https://www.sysmex-europe.com/academy/knowledge-centre/measurement-technologies.html>. (Dostopno 28.6.2017).
36. <https://www.sysmex-europe.com/academy/knowledge-centre/measurement-technologies/fluorescence-flow-cytometry.html> (Dostopno 22.5.2017).
37. <https://www.sysmex.com/us/en/Products/Hematology/XSSeries/Pages/XS-Series-Hematology-Analyzers.aspx> (Dostopno 25.5.2017).
38. <https://www.sysmex-europe.com/academy/knowledge-centre/calendar-2014/measurement-technology-and-scattergram.html> (Dostopno 1.6.2017).
39. Henriot I, Launay E, Boubaya M, Cremet L, Illiaquer M, Caillon H, et al: New parameters on the hematology analyzer XN-10 (SysmexTM) allow to distinguish childhood bacterial and viral infections. *Int J Lab Hematol*. 2017; 39(1): 14–20.
40. Buoro BYS, Mecca T, Vavassori M, Esposito SA, Papagni G, Marchesi G, et al: Immature granulocyte count on the new Sysmex XN - 9000 : performance and diagnosis of sepsis in the intensive care unit. *Signa Vitae* 2015; 10(2): 54-64.
41. Hotton J, Broothaers J, Swaelens C, Cantinieaux B: Performance and abnormal cell flagging comparisons of three automated blood cell counters. *Am J Clin Pathol*. 2013; 140(6): 845–52.
42. Briggs C, Mellors I, Roderick A, Ward A, O'Malley C, Barker J, et al: Quality counts: New parameters in blood cell counting. *Int J Lab Hematol*. 2009; 31(3): 277–97.