

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KARMEN DEŽMAN

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI PROGRAM
LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KARMEN DEŽMAN

**DOLOČANJE NEZRELIH GRANULOCITOV S HEMATOLOŠKIM
ANALIZATORJEM IN MIKROSKOPSKIM PREGLEDOM
KRVNEGA RAZMAZA**

**DETERMINATION OF IMMATURE GRANULOCYTES WITH A
HEMATOLOGY ANALYZER AND MICROSCOPIC EXAMINATION**

MAGISTRSKI PROGRAM
LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo sem opravljala v Specializiranem hematološkem laboratoriju Kliničnega oddelka za hematologijo, UKC Ljubljana, pod mentorstvom izr. prof. dr. Helene Podgornik, univ. dipl. inž. kem. inž., spec. med. biokem. in somentorstvom mag. Elizabete Božnar Alič, spec. med. biokem.

Zahvala

Na tem mestu bi se iskreno zahvalila moji mentorici izr. prof. dr. Heleni Podgornik za vse strokovne nasvete in usmerjanje pri izdelavi naloge ter za vso podporo in prijazne nasvete tekom magistrskega študija. Iskrena hvala tudi somentorici mag. Elizabete Božnar Alič, spec. med. biokem. za pomoč pri zbiranju in analizi vzorcev. Hvala Alenki, Ivani, Nataliji in Tadeju za vso pomoč v laboratoriju, ki je doprineslo k nastanku te naloge, ter puncam na citogenetiki za vse prijazne nasvete in vzpodbudne besede v času študija.

Hvala tudi moji družini za vso razumevanje, potrpežljivost in podporo še posebno pa Nastji in Aleksu, ki sta bila marsikdaj prikrajšana za kakšno prosto urico in igro z mamico.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice izr. prof. dr. Helene Podgornik, univ. dipl. inž. kem. inž., spec. med. biokem. in somentorstvom mag. Elizabete Božnar Alič, spec. med. biokem.

Karmen Dežman

KAZALO VSEBINE

1	UVOD.....	1
1.1	GRANULOCITI	2
1.1.1	Razvojne stopnje granulocitov.....	2
1.1.2	Morfološke nepravilnosti jedra granulocitov.....	6
1.1.3	Morfološke nepravilnosti citoplazme granulocitov	7
1.2	POJAV NEZRELIH GRANULOCITOV V PERIFERNI KRVI.....	7
1.2.1	Reaktivne spremembe levkocitne krvne slike	7
1.2.2	Okužbe	8
1.2.3	Sepsa	8
1.2.4	Maligne krvne bolezni	10
1.3	DOLOČANJE NEZRELIH GRANULOCITOV	11
1.3.1	Ujemanje določanja IG z mikroskopskim pregledom in s hematološkim analizatorjem	11
1.3.2	Kdaj pregledamo krvni razmaz pri opozorilu na IG?	12
2	NAMEN DELA.....	14
3	MATERIALI IN METODE	15
3.1	PREISKOVANI VZORCI.....	15
3.2	DOLOČANJE PARAMETRA NEZRELI GRANULOCITI	16
3.2.1	Hematološki analizator Sysmex XN-1000	16
3.2.1.1	Reagenti in kontrole.....	17
3.2.2	Hematološki analizator Beckman Coulter DxH800.....	17
3.2.3	Mikroskopski pregled krvnega razmaza.....	18
3.2.3.1	Laboratorijska oprema	18
3.2.3.2	Reagenti	19
3.2.3.3	Izdelava krvnega razmaza.....	19

3.2.3.4	Barvanje krvnega razmaza.....	20
3.2.3.5	Vrednotenje krvnega razmaza	20
3.3	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV.....	21
4	REZULTATI.....	22
4.1	VREDNOTENJE DOLOČANJA IG NA HEMATOLOŠKEM ANALIZATORJU SYSMEX XN-1000	22
4.1.1	Vrednotenje opozoril analizatorja na IG.....	22
4.1.2	Primerjava določanja IG s hematološkim analizatorjem in mikroskopskim diferenciranjem.....	23
4.1.3	Določitev mejne vrednosti deleža IG na hematološkem analizatorju Sysmex XN-1000	25
4.2	DOLOČANJE IG NA DVEH RAZLIČNIH HEMATOLOŠKIH ANALIZATORJIH V PRIMERJAVI Z MIKROSKOPSKO DOLOČITVIJO	26
4.2.1	Primerjava deleža IG pri različnih skupinah bolnikov	30
4.2.1.1	Bolniki s krvnimi obolenji	30
4.2.1.2	IG pri bolnikih z okužbami	33
4.2.1.3	IG pri bolnikih z neznano diagnozo	36
4.2.1	Primerjava deleža IG med skupinami bolnikov.....	38
4.2.1.1	Bolniki z okužbami	40
4.2.1.2	Primerjava bolnikov s plazmocitomom, mieloproliferativnimi boleznimi in sepsa	41
5	RAZPRAVA	43
5.1	PRIMERJAVA DOLOČITVE DELEŽA IG S HEMATOLOŠKIM ANALIZATORJEM IN MIKROSKOPSKIM PREGLEDOM.....	43
5.2	PRIMERJAVA DOLOČANJA IG Z DVEMA HEMATOLOŠKIMA ANALIZATORJEMA	46
5.3	DOLOČITEV MEJNE VREDNOSTI IG NA ANALIZATORJU SYSMEX XN- 1000	47
5.4	PRIMERJAVA DELEŽA IG MED TESTNIMI SKUPINAMI.....	48

6	ZAKLJUČKI.....	51
7	LITERATURA.....	52

KAZALO SLIK

Slika 1: Mieloblast.....	3
Slika 2: Promielocit.....	3
Slika 3: Mielocit.....	4
Slika 4: Metamielocit.....	4
Slika 5: Paličasti granulocit.....	5
Slika 6: Nevtrofilni granulocit.....	5
Slika 7: Pelger-Huëtova nepravilnost jedra nevtrofilcev.....	7
Slika 8: Razsevni diagram kanala WDF pri analizatorju Sysmex XN-1000 (25). 17	
Slika 9: VCSn tehnologija določanja pod različnimi koti analizatorja Beckman Coulter (29).....	18
Slika 10: Korelacija deleža IG med analizatorjem in mikroskopsko DKS.....	24
Slika 11: Bland-Altmanov diagram ujemanja mikroskopske določitve IG in deležem IG hematološkega analizatorja.....	24
Slika 12: ROC krivulja za delež IG določen s hematološkim analizatorjem.....	25
Slika 13: Primerjava določitve deleža IG z mikroskopsko DKS in hematološkim analizatorjem Sysmex XN-1000.	27
Slika 14: Primerjava določitve deleža IG z mikroskopsko DKS in hematološkim analizatorjem Beckman Coulter DxH 800.....	28
Slika 15: Primerjava določitve deleža IG z dvema različnima hematološkima analizatorjema Sysmex XN-1000 in Beckman Coulter DxH 800... ..	29
Slika 16: Diagram prepognjene empirične kumulativne porazdelitve. Primerjava deleža IG z ročno DKS ter različnima hematološkima analizatorjema (N = 163). 30	
Slika 17: Bolezenska stanja krvnih bolnikov (N=108).....	31
Slika 18: Primerjava določitve deleža IG z dvema hematološkima analizatorjema in mikroskopsko DKS pri krvnih bolnikih.....	33
Slika 19: Bolezenska stanja bolnikov z okužbami (N=55).....	34
Slika 20: Primerjava določitve deleža IG z dvema hematološkima analizatorjema in mikroskopsko DKS pri bolnikih z okužbam.....	36

Slika 21: Primerjava določitve deleža IG z dvema hematološkima analizatorjema in mikroskopsko DKS pri bolnikih z neznano diagnozo.....	38
Slika 22: Mediana deleža IG pri preiskovanih skupinah.....	39
Slika 23: Grafični prikaz porazdelitve deleža IG določenega s hematološkim analizatorjem Sysmex XN-1000.....	40
Slika 24: Grafični prikaz porazdelitve deleža IG merjenega s hematološkim analizatorjem Sysmex XN-1000.	41
Slika 25: Grafični prikaz porazdelitve deleža IG merjenega s hematološkim analizatorjem Sysmex XN-1000.	42
Slika 26: Primerjava mediane IG in korelacije pri posameznih preučevanih skupinah.....	44
Slika 27: Prikaz razlik meritev med analizatorjema in mikroskopsko DKS za izstopajoče vrednosti.....	45
Slika 28: ROC krivulja za preiskovane parametre.....	49

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Pričakovana statistična variabilnost pri diferenciaciji belih krvnih celic po Rümkeju.....	1
Preglednica II: Definicija SIRS, sepse, hude sepse in septičnega šoka	9
Preglednica III: Vrednotenje opozoril analizatorja Sysmex XN-1000 na IG ter primerjava z literaturnimi navedbami.....	23
Preglednica IV: Primerjava določitve deleža IG z analizatorjem in mikroskopsko DKS. (N=705).	23
Preglednica V: Primerjava lastnosti testa pri različnih mejnih vrednostih deleža IG določenega s hematološkim analizatorjem.	26
Preglednica VI: Delež IG določen na tri različne načine.	26
Preglednica VII: Delež IG pri krvnih bolnikih na tri načine.	31
Preglednica VIII: Delež IG pri bolnikih z okužbami na tri načine.....	34
Preglednica IX: Delež IG pri bolnikih z neznano diagnozo na tri načine.	36
Preglednica X: Primerjava mediane IG in korelacije za preučevane skupine.	44
Preglednica XI: Primerjava mejnih vrednosti za IG.....	47
Preglednica XII: AUC pri preiskovanih parametrih (N = 55).	49

POVZETEK

Novejši in sodobnejši hematološki analizatorji z uporabo novih tehnologij omogočajo poleg klasične 5-delne diferencialne krvne slike tudi kvantitativno določitev nezrelih granulocitov (parameter IG), med katere uvrščajo promielocite, mielocite in metamielocite. Nezreli granulociti se v nizkem deležu normalno pojavijo v periferni krvi nosečnic, nedonošenčkov in novorojenčkov, zvišano število pa najpogosteje zasledimo pri okužbah, hudem vnetju ali pri malignih krvnih boleznih.

V nalogi smo preverjali zanesljivost določanja parametra IG z dvema različnima hematološkima analizatorjema v primerjavi s standardno mikroskopsko določitvijo ter ugotovili, da se z večanjem mediane deleža IG izboljšuje korelacija med preiskovanimi metodami. Delež IG določen s hematološkim analizatorjem Sysmex XN-1000 je bil v povprečju za 1,9 do 3,1 % višji v primerjavi z mikroskopsko DKS, medtem ko je ta razlika pri analizatorju Beckman Coulter DxH-800 znašala le 0,2 do 0,7 %. Pri opredelitvi zanesljivosti opozoril analizatorja na prisotnost IG smo določili 73 % občutljivost, 88 % specifičnost ter 92 % negativno napovedno vrednost opozoril, kar pomeni, da lahko avtomatsko določanje IG uporabimo presejalno pri odločanju za mikroskopski pregled krvnega razmaza. Mejno vrednost IG, pri kateri se odločimo za mikroskopski pregled krvnega razmaza, smo dvignili z do sedaj uporabljene 1 % na 3 %, kljub slabši občutljivosti in specifičnosti testa pri višji vrednosti, saj se je s tem bistveno zmanjšal obseg mikroskopskih pregledov krvnih razmazov, spregledali pa nismo nič ključnega. Med preiskovanimi skupinami smo najvišji delež IG določili pri hematoloških bolnikih (mediana = 7,9 %), ki je bil značilno višji v primerjavi z bolniki z okužbami (mediana = 3,0 %) in bolniki z nepoznano diagnozo (mediana = 2,6 %). Med bolniki z okužbami, je bil delež IG najvišji pri tistih s potrjeno sepso (mediana = 4,5 %). Bil je statistično značilno višji v primerjavi z bolniki s pljučnico (mediana = 1,4 %).

Za identifikacijo in določanje številčne koncentracije nezrelih granulocitov so zdaj na voljo različni hematološki analizatorji, vendar nobeden od njih ne razlikuje posameznih razvojnih stopenj mieloične vrste. Zato kljub temu, da je število prešteti celic pri mikroskopskem diferenciranju majhno in služi le za grobo oceno pogostosti posamezne vrste levkocitov, ostaja zlati standard za prepoznavanje in pravilno morfološko opredelitev celic, kar je še posebej pomembno pri malignih krvnih boleznih. Določanje deleža IG s

hematološkimi analizatorji je dobra podlaga za mikroskopski pregled, kombinacija obeh načinov določanja pa zagotavlja boljšo kakovost rezultatov.

ABSTRACT

Newer and more advanced hematology analyzers that are using technologically more sophisticated approaches, give us besides classical 5-part differential blood count also quantitative determination of immature granulocytes (IG parameter), among which we classify promyelocyte, myelocyte and metamyelocyte. Immature granulocytes appear in the low percentage in the peripheral blood of pregnant women, premature neonate and newborns, while increasing number of those can be observed at infections, severe inflammation or at blood malignancies.

In the study, we were examining reliability of the IG parameter settings with two different hematological analyzers in comparison with standard microscopic determination. By increasing median of the IG proportion, the correlation between the trial methods was improving. IG determined by hematology analyzer Sysmex XN-1000, were on average from 1.9 to 3.1% higher in comparison to the microscopic DKS, while Beckman Coulter DxH-800 analyser showed only 0.2 to 0, 7% difference. 73% sensitivity, 88% specificity and 92% negative predictive value for IG flags on Sysmex XN-1000 was calculated, confirming that IG flag could be useful for deciding on microscopic examination of blood smears. Analyzer IG Cut-off value for microscopic examination of blood smears was increased from current 1% to 3%, despite lower sensitivity and specificity of the test at the increased value; because the number of microscopic examinations of blood smears was considerably reduced, without dismissing anything important. The highest proportion of IG was determined in haematological patients (median = 7.9%) and was significantly higher compared to patients with infections (Me = 3.0%) and patients with unknown diagnosis (median = 2.6%). Among infected patients, the proportion of IG was the highest in those with confirmed sepsis (median = 4.5%), and statistically significantly higher compared to patients with pneumonia (median = 1.4).

For the identification and counting of immature granulocytes, different hematology analyzers are now available. None of them however can distinguish between individual development stages of the myeloid lineage. Therefore, despite the fact that the number of counted cells at microscopic differentiation is small and serves only as a rough estimation of the frequency of each type of white blood cell, this technique remains a golden standard for the identification and definition of the correct morphology of cells, which is especially

important in blood malignancies. Determination of the IG with hematology analyzer is a good basis for further clinical research, while a combination of both methods of determination ensures better quality of the results.

SEZNAM OKRAJŠAV

KRATICA	POMEN
CRP	C-reaktivni protein
DKS	Diferencialna krvna slika
FSC	Prednje sipanje svetlobe (angl. Forward scattered light)
GFHC	Francosko združenje za celično hematologijo (angl. Francophone Group of Cell Haematology)
IG	Nezreli granulociti (angl. Immature granulocytes)
IL-6	Interlevkin 6
ISHL	Mednarodno združenje laboratorijske hematologije (angl. International Society for Laboratory Haematology)
KIKKB	Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo
KML	Kronična mieloična levkemija
KMPB	Kronična mieloproliferativna bolezen
LBP	Lipopolisaharidi
MDS	Mielodisplastični sindrom
MPKR	Mikroskopski pregled krvnega razmaza
PMF	Primarna mielofibroza
SFL	Stransko sipanje fluorescenčne svetlobe (angl. Side fluorescent light)
SHL	Specializiran hematološki laboratorij
SIRS	Sistemski vnetni odgovor (ang. Systemic inflammatory response syndrome)
SSC	Stransko sipanje svetlobe (angl. Side scattered light)

1 UVOD

Nekateri sodobni hematološki analizatorji poleg klasične 5-delne diferencialne krvne slike vključujejo tudi parameter IG (ang. Immature granulocytes), ki določa nezrele granulocite. Mednje uvršča promielocite, mielocite in metamielocite ter jih podaja kot relativno (%) in absolutno ($\times 10^9/L$) vrednost. Kadar je v vzorcu krvi prisotno nizko število IG, je zanesljivejša meritev s hematološkim analizatorjem, saj ta prešteje večje število celic kot jih opredelimo z mikroskopskim diferenciranjem, kar prikazuje tudi tabela po Rümkeju (Preglednica I) (1, 2).

Preglednica I: Pričakovana statistična variabilnost pri diferenciaciji belih krvnih celic po Rümkeju (Prirejeno po 2).

Delež IG (% IG)	95% interval zaupanja prešteti IG%/100 levkocitov
1	0 - 3
2	0 - 5
3	0 - 7
4	1 - 8
5	2 - 10
6	2 - 11
7	2 - 12
8	3 - 14
9	4 - 15
10	5 - 16

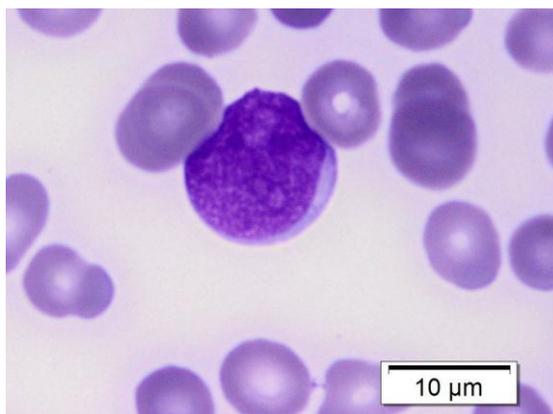
Novejše raziskave, ki se nanašajo na parameter IG, so osredotočene na zgodnje odkrivanje in razlikovanje med bakterijsko in virusno okužbo ter prepoznavanje bolnikov na intenzivni negi, ki jim grozi sepsa (3). Poleg tega raziskujejo še, če ima spremljanje IG pri pacientih s sistemskim vnetjem diagnostični in napovedni pomen (4).

1.1 GRANULOCITI

Granulociti so levkociti z značilnimi zrnci v citoplazmi in nastajajo z dozorevanjem matičnih celic v kostnem mozgu. Matična celica ima sposobnost samoobnove ter ohranitve svojih lastnosti in sposobnost dozorevanja v matične celice, ki so usmerjene v določeno vrsto krvnih celic pri čemer sodelujejo rastni in diferencijski dejavniki: faktor, ki spodbuja razvoj predhodnikov monocitov (CSF-1); faktor, ki spodbuja razvoj granulocitov (G-CSF); faktor, ki spodbuja zorenje granulocitov in monocitov (GM-CSF); faktor, ki spodbuja nastanek granulocitov, monocitov in eritrocitov (IL-3) in eritropoetin, ki spodbuja nastanek eritrocitov. Poznavanja dejavnosti teh faktorjev imajo pomembno vlogo v razumevanju nastanka malignih novotvorb in novih poti za zdravljenje krvnih bolezni, pri katerih pride do okrnjenega nastajanja krvnih celic (5).

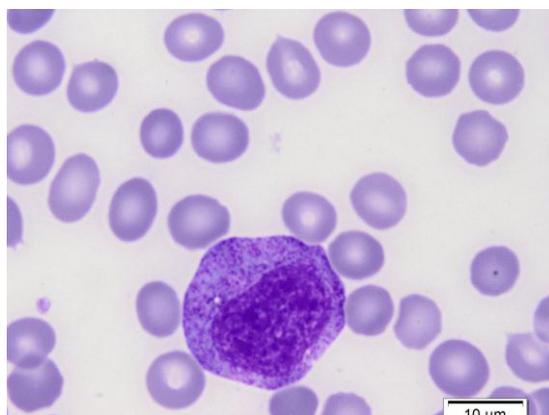
1.1.1 Razvojne stopnje granulocitov

Prva celica v razvoju granulocitov je **mieloblast** (slika 1) . Meri od 12 do 20 μm . Večino celice zavzema jedro, ki je okrogle ali ovalne oblike ter običajno vsebuje od 2 do 5 nukleolov. Jedrna struktura je rahla in mrežasta. Citoplazma je svetlomodre barve in običajno ne vsebuje zrn. V citoplazmi levkemično spremenjenih mieloblastov so lahko prisotni vključki (Auerjeve paličice) ali vakuole (6).



Slika 1: Mieloblast.

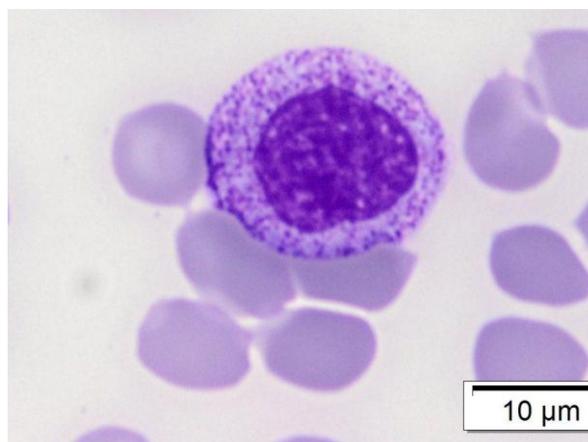
Promielocit je večji od mieloblasta in meri od 15 do 25 μm (slika 2). Jedro je lahko rahlo upognjeno ali ovalno in ravno tako vsebuje 2 do 5 nukleolov. Pri jedrnem kromatinu je že vidna začetna zgostitev. Citoplazma je obilnejša in vsebuje številna azurofilna zrnca. Levkemični promielociti so običajno morfološko spremenjeni z jedri v obliki peščene ure ter vključki v citoplazmi (6).



Slika 2: Promielocit.

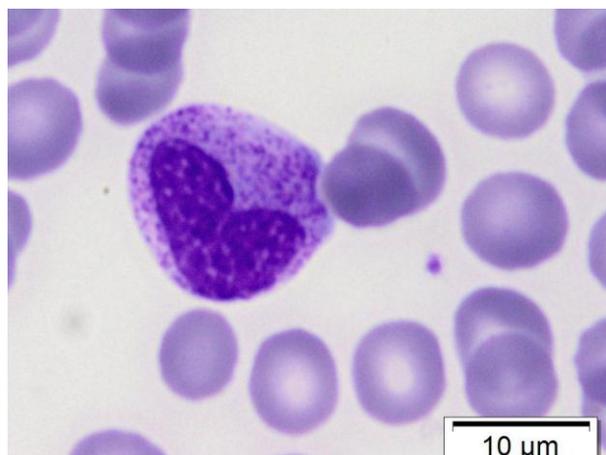
Sledi **mielocit**, ki je okrogla do rahlo ovalna celica velika 10 do 20 μm (slika 3). Jedro je ovalno ali nakazano zažeto na eni strani in zavzema le še polovico celice. Kromatin je zmerno zgoščen, citoplazma pa vsebuje specifična zrnca po katerih jih delimo na nevtrofilne, eozinofilne in bazofilne mielocite. Nevtrofilni in eozinofilni mielociti se lahko

v krvi pojavijo pri reaktivnih spremembah ali levkemijah, medtem ko je pojav bazofilnih mielocitov omejen na levkemije (6).



Slika 3: Mielocit.

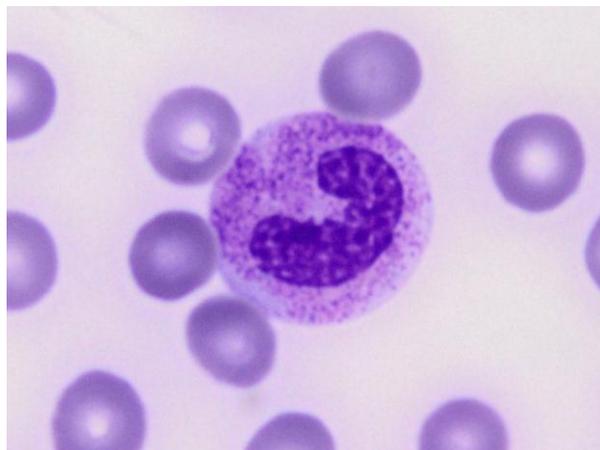
Metamielocit meri od 10 do 12 μm (slika 4). Jedro ima upognjeno v obliki ledvice ali fižola. Kromatin je grobo zrnat. Citoplazma je obilna, modrorožnata s specifičnimi zrcni. Posamezne nevtrofilne metamielocite lahko občasno najdemo v krvi zdravih oseb. Ob okužbah in nekaterih malignih novotvorbah pa se njihovo število poveča (6).



Slika 4: Metamielocit.

Paličasti granulocit je zrela celica, ki ima jedro razpotegnjeno in upognjeno v obliki palčke (slika 5). Kromatin je grobo zrnat, citoplazma je rožnata s specifičnimi številnimi

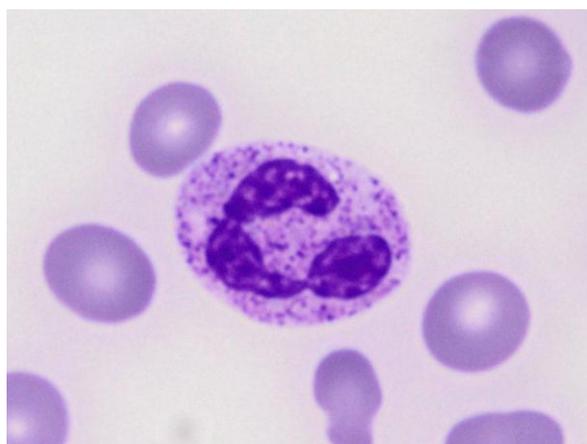
zrnci. Posamezne paličaste granulocite lahko zasledimo pri zdravih ljudeh. Njihova številčna koncentracija se uporablja pri zaznavanju okužb novorojenčkov (6).



Slika 5: Paličasti granulocit.

Glede na vsebnost specifičnih zrn končno diferencirane granulocite delimo na nevtrofilce, eozinofilce in bazofilce.

Zrel nevtrofilni granulocit je velik 12 do 15 μm . Jedro vsebuje grobo zrnat kromatin in je razdeljeno na 3 do 5 segmentov (slika 6). Citoplazma je rožnata s številnimi specifičnimi zrnci. Povečano število nevtrofilcev najdemo v krvi pri bakterijskih okužbah, akutni kronični vnetni reakciji ter pri mieloproliferativnih boleznih (7).



Slika 6: Nevtrofilni granulocit.

Eozinofilni granulocit je nekoliko večji od nevtrofilca in meri 12-17 μm . Jedro ima običajno dva, redkeje tri segmente. Citoplazma je polna rdeče-oranžnih zrn (6). Od celotnega števila levkocitov v krvi predstavlja v povprečju le 1-3 %. Povečanje njihovega števila je lahko kazalec alergije ali prisotnosti parazitov (5).

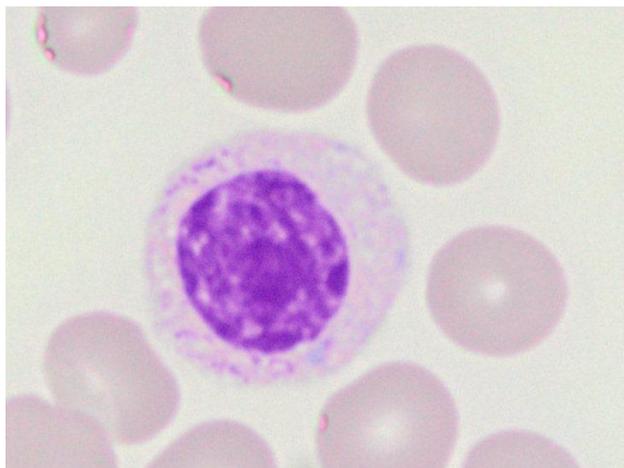
Bazofilni granulociti so podobne velikosti kot nevtrofilci, in sicer merijo od 10 do 14 μm . Citoplazma vsebuje groba temnovijolična zrnca, ki običajno zakrivajo jedro z dvema segmentoma (5).

Zvečano število bazofilcev zasledimo pri mieloproliferativnih boleznih, pri hipotirozi, pri virusnih okužbah, pri z IgE posredovani preobčutljivostni reakciji, pri zlorabi drog in pri hiperlipidemiji (6).

1.1.2 Morfološke nepravilnosti jedra granulocitov

Med morfološke nepravilnosti jedra granulocitov uvrščamo hipersegmentacijo in hiposegmentacijo jedra. O hipersegmentiranih granulocitih govorimo, ko le ti vsebujejo pet ali več segmentov. Zasledimo jih pri megaloplastni anemiji, mieloproliferativnih novotvorbah in mielodisplastičnih sindromih (MDS) (9). Zaradi višje intenzitete fluorescence in višjega stranskega sipanja svetlobe v primerjavi z normalnimi nevtrofilci nekateri analizatorji velike hipersegmentirane nevtrofilce v citogramu razvrščajo v območje IG (10).

Hiposegmentacija jedra je prisotna, ko ima le to en ali dva segmenta in jo imenujemo Pelger-Huëtova nepravilnost, ki se deduje avtosomno dominantno (slika 7). Pri heterozigotni obliki je jedro preščipnjeno in ima videz očal, pri homozigotni pa je jedro okroglo. Kljub hiposegmentaciji je funkcija nevtrofilcev normalna, zato je zelo pomembno, da jih uvrščamo med zrele nevtrofilce in ne med mlajše celice granulocitne vrste. Če gre za pridobljeno hiposegmentacijo, govorimo o pelgeroidni anomaliji jeder, ki je značilna za MDS (9).



Slika 7: Pelger-Huëtova nepravilnost jedra nevtrofilcev.

1.1.3 Morfološke nepravilnosti citoplazme granulocitov

Morfološke nepravilnosti citoplazme granulocitov zasledimo pri okužbah in nekaterih krvnih boleznih. Toksične granulacije nevtrofilcev opišemo, kadar je povečano število in intenziteta obarvanosti granulacij in se pojavijo ob okužbah. Skupaj s toksičnimi granulacijami se običajno pojavijo tudi Döhlejeva telesa. To so okrogli ali ovalni svetlomodri vključki na obrobju citoplazme granulocitov (9).

1.2 POJAV NEZRELIH GRANULOCITOV V PERIFERNI KRVI

Nezreli granulociti so normalno prisotni v kostnem mozgu. V periferni krvi jih fiziološko lahko zasledimo v nizkem deležu pri novorojenčkih, nedonošenčkih in nosečnicah predvsem v tretjem trimesečju, redko tudi pri zdravi odrasli osebi. Patološko pa so prisotni ob okužbi ali hudem vnetju oziroma kot kazalec malignega krvnega obolenja (11).

1.2.1 Reaktivne spremembe levkocitne krvne slike

Reaktivne spremembe levkocitne krvne slike običajno nastopijo, kadar se pojavi kratkotrajno povečanje števila levkocitov. Kadar je število levkocitov zelo povečano, govorimo o levkemoidni reakciji. Pri mieloični levkemoidni reakciji slika spominja na

kronično mieloično levkemijo (KML) in je lahko prisotna pri sepsah, po obilni krvavitvi ter pri nekaterih razširjenih malignih novotvorbah v kostnem mozgu (11).

1.2.2 Okužbe

Ob hujših okužbah se v krvi lahko pojavi večje število paličastih nevtrofilcev (več kot 10%) ali celo metamielociti, mielociti in promielociti. Gre za t. i. pomik v levo v diferencialni levkocitni krvni sliki. Hujšo okužbo lahko spremljajo temno modri predeli citoplazme (Doehlejeva telesca) in vijoličasta zrnca v citoplazmi nevtrofilcev (toksične granulacije) (5).

1.2.3 Sepsa

Sepsa je nevarno stanje, ki je posledica okužbe, kjer pride poleg lokalnega vnetja na mestu okužbe tudi do sistemskega vnetja. Znaki sistemskega vnetja so vazodilatacija, povečana prepustnost žilne stene, spremenjeno število levkocitov ter okvara delovanja različnih organov. Tako vnetno dogajanje imenujemo tudi sistemski vnetni odgovor, krajše SIRS (ang. Systemic inflammatory response syndrome). Težka sepsa in septični šok sta najpomembnejši vzrok smrtnosti pri bolnikih na intenzivnih oddelkih (5).

Obstaja enotna definicija SIRS, sepse, hude sepse in septičnega šoka, ki so jo sprejeli na konferenci ameriškega Združenja za intenzivno medicino leta 1992 in je prikazana v spodnji preglednici II.

Preglednica II: Definicija SIRS, sepse, hude sepse in septičnega šoka (12).

	Definicija
SIRS	2 ali več sistemskih znakov vnetja: Vročina (telesna temperatura > 38°C ali < 36°C) Srčna frekvenca > 90/min Frekvenca dihanja > 20 vdihov na minuto ali $\text{paCO}_2 < 32 \text{ mm Hg}$ (< 4,3 kPa) Levkociti > $12 \times 10^9/\text{L}$ ali < $4 \times 10^9/\text{L}$ ali > 10 % paličastih nevtrofilcev v krvni sliki
Sepsa	Sindrom sistemskega vnetnega odgovora IN okužba
Huda sepsa	Sepsa IN odpoved delovanja organa: Znaki organske disfunkcije, nezadostne prekrvitve ali arterijske hipotenzije
Septični šok	Huda sepsa IN arterijska hipotenzija, neodzivna na nadomeščanje tekočine: Sistolični tlak < 90 mm Hg ali znižanje sistoličnega tlaka $\geq 40 \text{ mm Hg}$ ob odsotnih drugih razlogih za hipotenzijo

Legenda: pa-CO_2 – delni tlak ogljikovega dioksida v arterijski krvi

Za pravilno zdravljenje in preživetje bolnikov na intenzivnih oddelkih je ključno hitro diagnosticiranje okužbe in natančno razlikovanje med SIRS in sepsa. Narejenih je bilo kar nekaj študij, da bi odkrili zanesljivega in zgodnjega pokazatelja okužb. Za razlikovanje med sepsa in SIRS je najboljši pokazatelj rast mikroorganizmov v odvzetih hemokulturah, vendar pa ima preiskava nizko specifičnost in je dokaj zamudna. Obstajajo tudi drugi laboratorijski kazalci vnetja (C-reaktivni protein (CRP), interlevkin-6 (IL-6), lipopolisaharidi (LBP), prokalcitonin, število levkocitov), vendar ne odražajo samo sepse, temveč tudi drugače povzročena sistemska vnetja (virusne okužbe, avtoimunske bolezni, vnetja zaradi poškodb ali kirurškega posega). Zato so v eni izmed študij želeli ugotoviti, ali je število nezrelih granulocitov (IG) v periferni krvi boljši pokazatelj zgodnjega odkrivanja sepse v primerjavi z ostalimi označevalci. V raziskavo so vključili 70 bolnikov intenzivne nege ter jim določili število IG s hematološkim analizatorjem, CRP, LBP in IL-6. S pomočjo ROC analize so določili specifičnost in občutljivost za posamezen opazovan

parameter. Ugotovili so, da se število IG značilno razlikuje med okuženimi in neokuženimi bolniki ($P < 0,0001$) z 89,2% občutljivostjo in 76,4% specifičnostjo še posebej v prvih 48 urah po nastopu SIRS. Pri ostalih opazovanih parametrih je bila občutljivost manj kot 68%. Zaključili so, da je skupno število IG v krvi bolnikov na intenzivni negi dober zgodnji pokazatelj za razlikovanje med okuženimi in neokuženimi bolniki in bi njihovo rutinsko določanje lahko pripomoglo k hitremu odkrivanju okuženih bolnikov v intenzivni negi in s tem razlikovanju med bolniki s SIRS in sepsa (3). Ugotavljali so tudi diagnostični in prognostični pomen spremljanja ravni IG pri pacientih s SIRS, sepsa in tistimi brez vnetja. Ugotovili so, da imajo paličasti nevtrofilci diagnostični pomen pri razlikovanju med sepsa, SIRS in N-I SIRS (sindrom neinfekcijskega sistemskega vnetnega odgovora). Ugotovili so, da so statistično značilno prisotni v višjem deležu pri večini bolnikov s SIRS v primerjavi z bolniki N-I SIRS ($P < 0,01$) ter zdravimi osebami (0 %). Zvišan delež paličastih nevtrofilcev je statistično značilno prisoten pri bolnikih s sepsa v primerjavi z bolniki z morebitno sepsa ($p < 0,05$). Raziskali so tudi vpliv IG na preživetje bolnikov na intenzivnih oddelkih. Ugotovili so, da so imeli bolniki, ki so umrli v prvem tednu, višji delež mielocitov in metamielocitov v periferni krvi (mediana = 9 %, $p < 0,05$) kot bolniki, ki so umrli po 2 do 4-ih tednih (mediana = 0,5 %) . Dokazali so, da zvišana raven IG v periferni krvi kaže na slabše preživetje bolnikov s sepsa in SIRS. Delež mielocitov in metamielocitov je višji pri bolnikih z dokazano sepsa (srednja vrednost = 7 ± 14 %) v primerjavi z zdravo kontrolno skupino. Mejna vrednost za paličaste nevtrofilce $> 8,5$ % definira sepsa s 84 % občutljivostjo in 71 % specifičnostjo (4). Paličaste nevtrofilce hematološki analizatorji ne razvrščajo med IG, temveč med zrele nevtrofilne granulocite ter podajo opozorilo.

1.2.4 Maligne krvne bolezni

IG-je zasledimo v venski krvi tudi pri nekaterih malignih krvnih boleznih. Njihov pojav je značilen predvsem za kronično mieloično levkemijo (KML) in primarno mielofibrozo (PMF), pogosto pa jih zasledimo tudi pri mielodisplastičnem sindromu (MDS). KML in PMF sodita v skupino kroničnih mieloproliferativnih boleznih (KMPB), za katere je značilno zvečano nastajanje vseh treh celičnih vrst zaradi motnje na ravni krvotvorne matične celice. Bolezni sta si med seboj klinično zelo podobni zato so za njuno opredelitev pomembne predvsem citogenetske in molekularno genetske preiskave.

Za MDS je značilna neučinkovita tvorba ene, dveh ali pa vseh treh vrst krvnih celic v kostnem mozgu in posledično znižano število le-teh v venski krvi. V krvnem razmazu zasledimo eritrocite različnih oblik in velikosti ter bazofilno punktirane eritrocite. Citoplazma granulocitov (zrelih in nezrelih) je hipogranulirana, lahko je prisotna psevdopelgeroidna nepravilnost oziroma hipo-segmentiranost jeder nevtrofilcev (5).

1.3 DOLOČANJE NEZRELIH GRANULOCITOV

Zlati standard za določanje nezrelih granulocitov je mikroskopski pregled krvnega razmaza. Ker je metoda slabo standardizirana, časovno zamudna in potrebuje izkušenega laboratorijskega delavca, se vse več laboratorijev poslužuje določanja IG s hematološkim analizatorjem. Avtomatizirani hematološki analizatorji so eni izmed najsodobnejših instrumentov v današnjih kliničnih laboratorijih, ki omogočajo hitro, natančno in poceni analizo osnovnih parametrov krvne slike. Zmogljivejši analizatorji pa z uporabo novih tehnologij omogočajo tudi kvantitativno določitev dodatnih parametrov. Na tržišču je več različnih zmogljivejših hematoloških analizatorjev, ki poleg opozoril na prisotnost IG, omogočajo tudi njihovo kvantitativno določitev ter s tem zmanjšajo obseg dela ter skrajšajo čas do izdaje izvida (13, 14).

1.3.1 Ujemanje določanja IG z mikroskopskim pregledom in s hematološkim analizatorjem

Za nekatere novejšje hematološke analizatorje, ki omogočajo kvantitativno določitev parameta IG, so bile narejene primerjave z vrednostjo IG določeno z mikroskopskim pregledom krvnega razmaza (MPKR). Rezultati različnih študij so bili med seboj podobni.

V bolnišnici v Hamburgu so v analizo vključili 246 vzorcev venske krvi. Dva laboratorijska delavca sta ločeno diferencirala po 200 celic. Določili so zelo dobro ujemanje med metodama tako za absolutne vrednosti ($r = 0,900$) kot tudi za relativne vrednosti ($r = 0,871$). Ločeno so preverjali koleracijo za vrednosti označene z zvezdico, ki naj bi bile po podatkih proizvajalcev, manj zanesljive, in ravno tako ugotovili odlično

ujemanje ($r = 0,881$). Zelo dobro korelacijo ($r = 0,884$) so dokazali tudi v skupini vzorcev novorojenčkov starih od 0 do 33 dni (15).

Podobno korelacijo med metodama ($r = 0,830$) so ugotovili v drugi študiji, kjer so z Bland-Altmanovim diagramom dokazali za 2,5 % višje vrednosti IG izmerjene s hematološkim analizatorjem v primerjavi z MPKR. Rezultati so pokazali, da se sistematična napaka večja z višjo vrednostjo IG (> 3 % IG) (16).

V skupini 203 preiskovancev z različnimi obolenji in kliničnimi stanji so ravno tako dokazali močno povezavo med vrednostjo IG določeno s hematološkim analizatorjem in MPKR za absolutne ($r = 0,800$) in relativne vrednosti ($r = 0,820$). Zaradi visoke stopnje nenatančnosti, nizkega števila prešteti celic in subjektivnosti mikroskopskega diferenciranja, so za štetje IG uporabili pretočno citometrijo, kjer so uporabili specifična protitelesa, ki se vežejo na antigene granulocitov odvisno od stopnje dozorevanja. Ugotovili so zelo močno povezavo v primerjavi z določitvijo IG s hematološkim analizatorjem ($r = 0,930$) in malo slabšo z MPKR ($r = 0,820$). Zaključili so, da sta oba načina določitve IG primerna za zamenjavo standardiziranega MPKR (17).

1.3.2 Kdaj pregledamo krvni razmaz pri opozorilu na IG?

Odločitveni kriterij za MPKR pri opozorilu na prisotnost IG so različni glede na to, kdo jih je oblikoval.

Francosko združenje za celično hematologijo (GFHC) priporoča, da se ob pojavu opozorila na prisotnost IG opravi mikroskopski pregled krvi ob prvi analizi in v primeru, ko analizator ne poda številčne vrednosti IG (18).

Mednarodno združenje laboratorijske hematologije (ISLH) ravno tako priporoča pregled krvi ob prvi analizi, nato pa ob opozorilu preverjanja delta za levkocite (19).

Po podatkih iz literature različnih študij za različne hematološke analizatorje, naj bi krvni razmaz pregledali nad vrednostjo IG > 3 %, število IG naj bi bilo nad to vrednostjo precejšeno (16). V eni od študij priporočajo, da ob pojavu opozorila na IG in številčni vrednosti IG $\leq 2,0$ % ter odsotnosti ostalih opozoril, izdamo vrednost analizatorja. Pri vrednostih IG $\geq 2,0$ % opravimo MPKR, pri čemer avtor navaja, da ni problem v

zanesljivosti rezultata, temveč je potrebno pregledati druge nepravilnosti celic povezane z levkemoidno reakcijo, sepsa ali hematološkim obolenjem, npr. KML in PMF (20).

V eni od študij so ugotovili, da MPKR ni potreben pri vrednostih IG $\leq 5\%$ in pri številu levkocitov več kot $2,5 \times 10^9 / L$ ter odsotnosti ostalih opozoril (21).

2 NAMEN DELA

Namen naše raziskave je določiti zanesljivost določanja parametra IG z dvema različnima hematološkima analizatorjema Sysmex XN-1000 in DxH 800 (Beckman Coulter) v primerjavi s standardno mikroskopsko določitvijo. Medsebojno bomo primerjali tudi kvantitativno določitev IG za oba analizatorja.

Za analizator Sysmex XN-1000 bomo celovito opredelili zanesljivost opozoril na IG, tako da bomo določili občutljivost, specifičnost, pozitivno in negativno napovedno vrednost ter celokupno učinkovitost opozoril.

Določiti želimo tudi mejno vrednost IG na hematološkem analizatorju Sysmex XN-1000, pri kateri bi se odločili za mikroskopski pregled in jo primerjati s sedanjo mejno vrednostjo $> 1 \% \text{ IG}$ ali $> 0,10 \times 10^9/\text{L}$.

V raziskavo bomo vključili bolnike z različnimi krvnimi boleznimi in bolnike z različnimi okužbami ter preverili, ali med skupinami bolnikov s temi boleznimi obstaja statistično značilna razlika v deležu IG v venski krvi.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 PREISKOVANI VZORCI

Skupno smo v analizo vključili 868 vzorcev polne krvi preiskovancev odvzete v epruvete s K₃EDTA, ki so bili poslani v Specializirani hematološki laboratorij (SHL) Kliničnega oddelka za hematologijo in v Laboratorij za analitiko telesnih tekočin Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo (KIKKB) Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani za rutinsko določitev krvne slike.

Vzorci smo nato razdelili v dve skupini. V prvo skupino smo vključili 705 vzorcev, ki so bili poslani v SHL in so imeli poleg hemograma narejen tudi mikroskopski pregled krvne slike, ne glede na delež IG.

V drugo skupino smo uvrstili 163 vzorcev krvi, pri katerih smo s hematološkim analizatorjem ali mikroskopsko DKS prešteli ≥ 1 % IG. 108 vzorcev krvi je bilo poslanih v SHL iz različnih ambulant in oddelkov UKC Ljubljana (59 preiskovancev s Kliničnega oddelka za hematologijo, 43 iz Klinike za intenzivno interno medicino, 3 iz Kliničnega oddelka za nefrologijo, 1 iz Klinike za gastroenterologijo ter 2 iz Kliničnega oddelka za hipertenzijo), 55 vzorcev krvi pa je bilo analiziranih v Laboratoriju za analitiko telesnih tekočin (KIKKB). Pri vseh 163-ih vzorcih smo krvno sliko določili na dveh hematoloških analizatorjih, in sicer Sysmex XN-1000 in Beckman Coulter DX-800, in naredili krvni razmaz za oceno IG. Dva laboratorijska delavca sta vsak ločeno diferencirala 100 celic. Vsi vzorci so bili do analize hranjeni na sobni temperaturi in analizirani v štirih urah od odvzema.

3.2 DOLOČANJE PARAMETRA NEZRELI GRANULOCITI

3.1.1 Hematološki analizator Sysmex XN-1000

S hematološkim analizatorje Sysmex XN-1000 lahko analiziramo vzorce polne krvi in telesnih tekočin. Določanje posameznih hematoloških parametrov poteka v sedmih analiznih kanalih, in sicer WDF, WNR, WCP, RET, RBC/PLT, HGB in PLT-F.

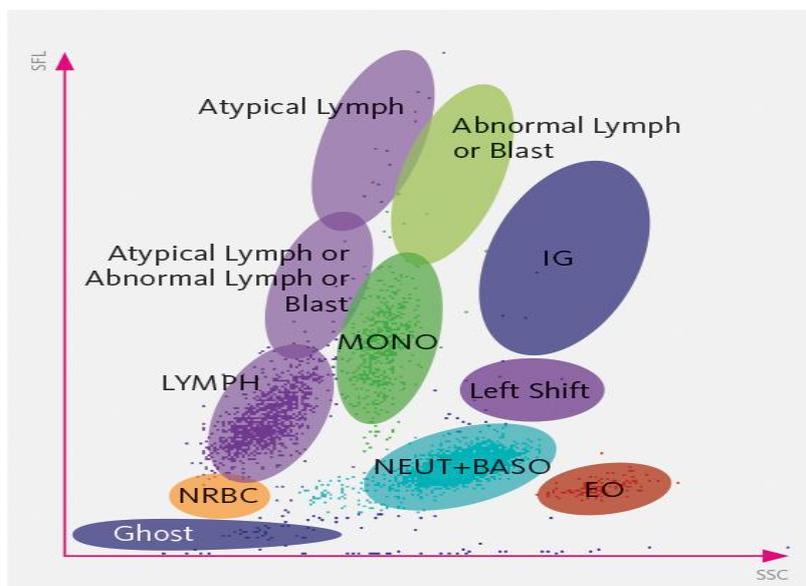
Analizator deluje na principu pretočne citometrije s polprevodnim laserjem katerega valovna dolžina je 633 nm. Za analizo potrebujemo le 88 μ L vzorca (10, 22).

Vzorec potuje skozi pretočno celico in ob interakciji laserskega žarka s celico pride do sipanja svetlobe. Štetje in razvrščanje celic poteka na treh ravneh: prednje sipanje svetlobe (FSC), stransko sipanje svetlobe (SSC) ter stransko sipanje fluorescentne svetlobe (SFL). Intenziteta FSC je sorazmerna velikosti celic, intenziteta SSC pa posredno kaže na notranjo strukturo celic, medtem ko SFL prikazuje vsebnost DNA in RNA v celici.

Celice s podobnimi fizikalnimi in kemijskimi lastnostmi tvorijo skupek celic v citogramu (10,23).

Določanje parametra IG poteka v analiznem kanalu WDF (ang. WBC differential). S pomočjo reagenta Lysercell WDF poteče hemoliza in razgradnja eritrocitov in trombocitov, celična membrana levkocitov pa postane prehodna za fluorescenčno barvilo, ki ga vsebuje reagent Fluorocell WDF. Fluorescenčno barvilo obarva nukleinske kisline in celične organele levkocitov.

V citogramu se nato celice porazdelijo (diferencirajo) glede na njihovo fluorescenco in notranjo strukturo (Slika 1). Intenziteta fluorescence signala je sorazmerna z vsebnostjo nukleinskih kislin v celici. Intenzivnejša je pri nezrelih, atipičnih in reaktivnih celicah, zaradi vsebnosti večjih količin RNA, zato jih lahko zaznamo in preštejemo. Analizator poda 6-delno avtomatizirano diferencialno krvno sliko, ki vsebuje podatke o absolutnem številu in relativnem deležu nevtrofilnih granulocitov, limfocitov, monocitov, eozinofilcev, bazofilcev ter nezrelih granulocitov. Parameter IG daje skupno število promielocitov, mielocitov in metamielocitov (10, 24). IG najdemo zaradi nezrelosti pri visoki vrednosti SFL in zaradi granuliranosti pri visoki vrednosti SSC (Slika 1).



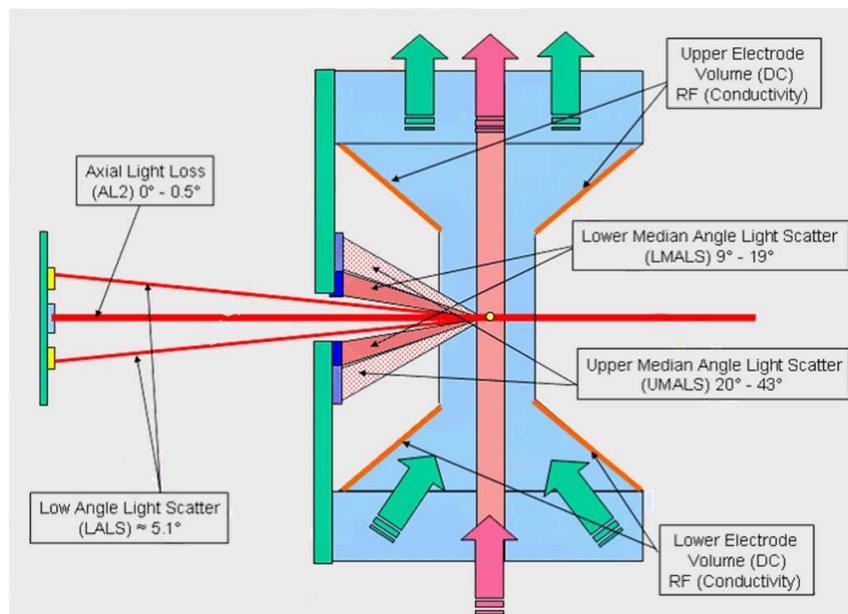
Slika 8: Razsevni diagram kanala WDF pri analizatorju Sysmex XN-1000 (25).

3.2.1.1 Reagenti in kontrole

Pred analizo vzorcev je dnevno potrebno analizirati kontrolne vzorce krvi na treh koncentracijskih ravneh. Kontrolno kri hranimo v temnem in hladnem prostoru pri temperaturi 2 do 8 °C, pred analizo jo segrejemo na sobno temperaturo. Neodprte kontrole shranjujemo do roka uporabe, odprte pa menjujemo tedensko. Vse reagente uporabljamo in shranjujemo pri temperaturi od 15 do 30 °C, kot narekuje proizvajalec.

3.2.2 Hematološki analizator Beckman Coulter DxH800

DxH 800 je sodobnejši Coulterjev avtomatiziran hematološki analizator s katerim lahko analiziramo vzorce polne krvi in telesnih tekočin in deluje na principu pretočne citometrije in hidrodinamičnega fokusiranja. Za analizo celotne krvne slike, diferencialne krvne slike ter številčne koncentracije normoblastov in retikulocitov potrebuje 165µL vzorca. Pri določitvi 5-delne diferencialne krvne slike uporablja t.i. VCSn tehnologijo, kjer so meritvi volumna in prevodnosti v novi pretočni celici dodali parameter AL2 (Axial light loss – meritev svetlobe, ki se absorbira, ko gre celica skozi pretočno celico) ter štiri meritve razpršene svetlobe pod različnimi koti, in sicer LALS (Low angle light scatter), MALS (Median angle light scatter), LMALS (Lower median angle light scatter) in UMALS (Upper median angle light scatter) (Slika 2).



Slika 9: VCSn tehnologija določanja pod različnimi koti analizatorja Beckman Coulter (29).

Analizator opozarja na prisotnost nezrelih granulocitov, omogoča pa tudi kvantitativno določitev pod parametrom @EGC (Early granulocytod cell), vendar je namenjen zgolj v raziskovalne namene (26 - 28).

3.2.3 Mikroskopski pregled krvnega razmaza

3.2.3.1 Laboratorijska oprema

- Predmetna stekla (Vitrognost, 26 x 76 mm, z matirnim robom)
- Krovna stekla (Brand, 22 x 22mm)
- Nastavki za pripravo krvnih razmazov Diff-Safe Blood Dispenser
- Kadičke za barvanje krvnih razmazov
- Nosilci za preparate
- Štoparica
- Imerzijsko olje
- Števec za štetje celic
- Svetlobni mikroskop Olympus BH-2

3.2.3.2 Reagenti

- May-Grünwald (Sigma Life Science); eozin in metilensko modrilo v metanolu
- Giemsa (Fluka Analytical); eozin in dva derivata metilenskega modrila v metanolu – azur I in azur II
- Sörensov fosfatni pufer
- Redestilirana voda

Predhodno smo pripravili vse delovne raztopine. Sörensov fosfatni pufer je sestavljen iz raztopine A, ki vsebuje 9,1 g/L KH_2PO_4 raztopljenega v redestilirani vodi in iz raztopine B, ki vsebuje 9,5 g/L Na_2HPO_4 ali 11,9 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ raztopljenega v redestilirani vodi. Za pripravo matične raztopine pufra smo potrebovali 630 mL raztopine A in iz 370 mL raztopine B ter uravnali pH vrednost na 6,6. Za barvanje smo pripravili delovno raztopino pufra, in sicer smo 50 mL matične raztopine dodali 950 mL redestilirane vode in umerili pH vrednost na 6,8. S tako pripravljenim delovnim Sörensovim fosfatnim puffrom, smo nato pripravili raztopine May-Grünwalda v razmerju 1:1 ter 10% raztopino Giemse.

3.2.3.3 Izdelava krvnega razmaza

Za priprava razmaza smo s pomočjo nastavka za pripravo razmazov kanili kapljico venske krvi pod matiranim robom na sredino predmetnega stekla. Nato smo se s krovnim stekelcem pod kotom 30-45° dotaknili kapljice krvi, in jo enakomerno razpotegnili vzdolž predmetnega stekla v nasprotno smer. Pri tem smo morali paziti, da je bil poteg hiter in enakomeren, saj smo le tako dobili ustrezno tanek razmaz, ki se je končal v rahlo zaokroženi liniji (rep razmaza). Predmetno steklo smo takoj ustrezno označili in posušili na zraku.

Krvni razmaz je potrebno napraviti čim prej po odvzemu, najkasneje v štirih urah. S tem se izognemo številnim artefaktom, kot so sferocitoza, ehinocitoza in degeneracija nevtrofilcev (30).

3.2.3.4 Barvanje krvnega razmaza

Za barvanje krvnih razmazov smo uporabili panoptično barvanje po Pappenheimu. Posušene razmaze smo zložili v nosilce za barvanje in jih barvali po naslednjem postopku:

- Raztopina May-Grünwald - **5** minut.
- Raztopina May- Grünwald in fosfatni pufer v razmerju 1:1 - **1** minuto.
- Raztopina Giemse v fosfatnem pufru v razmerju 1:10 - **20** minut.
- Spiranje v fosfatnem pufru in pod tekočo vodo.

3.2.3.5 Vrednotenje krvnega razmaza

Pobarvane in posušene krvne razmaze smo vrednotili s pomočjo mikroskopa Olympus BH-2. Najprej smo pod malo povečavo (povečava 100x) poiskali jasno sliko vidnega polja in primerno gosto področje za diferenciranje levkocitov. Pod povečavo 1000x pa smo določili diferencialno belo krvno sliko in opisali morebitne spremembe eritrocitov, trombocitov in levkocitov (31).

Pri pregledu krvnega razmaza moramo upoštevati, da se različne vrste krvnih celic neenakomerno razvrščajo po površini razmaza. Večje celice, kot so nevtrofilci, monociti, blasti, promielociti in mielociti, so zaradi svoje velikosti številčnejši v repu razmaza, zato je zelo pomembno, da pregledamo celoten krvni razmaz in diferenciramo s »cik-cak« tehniko (30).

Zavedati se moramo, da je število prešteti celic pri ročnem diferenciranju majhno in služi le za grobo oceno pogostosti posamezne vrste levkocitov, zato je pomembneje kot sama številčna vrednosti, da celice pravilno morfološko opredelimo (32).

3.3 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Vse podatke smo zbrali v preglednice ter s pomočjo programa Microsoft Excel 2007 izračunali diagnostično specifičnost in občutljivost, pozitivno in negativno napovedno vrednost ter celokupno učinkovitost. Diagnostična specifičnost je verjetnost negativnega rezultata pri resnično negativnih vzorcih, diagnostična občutljivost pa je verjetnost pozitivnega rezultata pri vzorcih, ki so resnično pozitivni. Pozitivna napovedna vrednost napoveduje verjetnost resnično pozitivnih vzorcev pri pozitivnem testu, negativna napovedna vrednost pa verjetnost resnično negativnih vzorcev pri negativnem testu (33).

S pomočjo računalniškega programa MedCalc, verzija 14.8.1., smo s Spearmanovim koeficientom korelacije in Bland-Altmanovim diagramom preverjali medsebojno povezavo med rezultati dobljenimi z različnimi metodami, z Wilcoxonovim testom za odvisne vzorce pa smo med seboj statistično primerjali vse tri načine določitve IG, pri čemer smo uporabili korekcijo Bonfferoni za multiplo testiranje. S testom Mann-Whitney smo preverjali razlike med skupinami bolnikov z različnimi diagnozami in z ROC analizo določili mejno vrednost za parameter IG na analizatorju.

Z Bland-Altmanovim diagramom smo prikazali primerjavo povprečja rezultatov dveh različno merjenih spremenljivk in ugotavljali, kakšno je ujemanje med njima (34). Ustrezno ujemanje je takrat, ko je velik delež razlik na Bland-Altmanovem diagramu majhen oziroma dovolj blizu nič (35).

Porazdelitev vrednosti IG smo preverjali s testom Kolmogorov-Smirnov za normalno porazdelitev parametrov v populaciji. Test je pokazal nenormalno porazdelitev podatkov ($p < 0,05$). S koeficientom asimetrije (Skewnes) pa smo ugotovili, da je porazdelitev podatkov desnostranska. Zato smo za izračun povezave med mikroskopsko DKS in analizatorjem uporabili Spearmanov koeficient korelacije.

4 REZULTATI

4.1 VREDNOTENJE DOLOČANJA IG NA HEMATOLOŠKEM ANALIZATORJU SYSMEX XN-1000

V statistično analizo smo najprej vključili vse vzorce, pri katerih je bila v mesecu novembru 2014 v Specializiranem hematološkem laboratoriju UKC Ljubljana poleg hemograma narejena tudi mikroskopska DKS. Med seboj smo primerjali vrednosti IG merjene s hematološkim analizatorjem Sysmex XN-1000 in vrednosti IG, ki smo jih določili z mikroskopsko DKS. Preverili smo tudi opozorila na nezrele granulocite. Skupno je bilo analiziranih 705 vzorcev.

4.1.1 Vrednotenje opozoril analizatorja na IG

Hematološki analizator Sysmex XN-1000 poda opozorilo na prisotnost IG (IG present), ko le ti presežejo nastavljeno prazno vrednost. Opozorila analizatorja smo vrednotili glede na izsledke mikroskopske DKS. Vključili smo 705 vzorcev z in brez opozoril na IG. Mejna vrednost za pozitivno najdbo IG pri mikroskopski DKS je bila $\geq 1\%$. Izračunali smo občutljivost, specifičnosti, pozitivno in negativno napovedno vrednost ter celokupno učinkovitost opozoril analizatorja Sysmex XN-1000 na IG ter vrednosti primerjali s podatki v literaturi (Preglednica III).

Preglednica III: Vrednotenje opozoril analizatorja Sysmex XN-1000 na IG ter primerjava z literaturnimi navedbami.

Opozorilo na IG	Sysmex	Sysmex	Beckman
»IG present«	XN-1000	XN-2000 (25)	Coulter DxH 800 (25)
Občutljivost (%)	73	88	84
Specifičnost (%)	88	84	67
Pozitivna napovedna vrednost (%)	63	68	48
Negativna napovedna vrednost (%)	92	95	75
Celokupna učinkovitost (%)	80	85	71

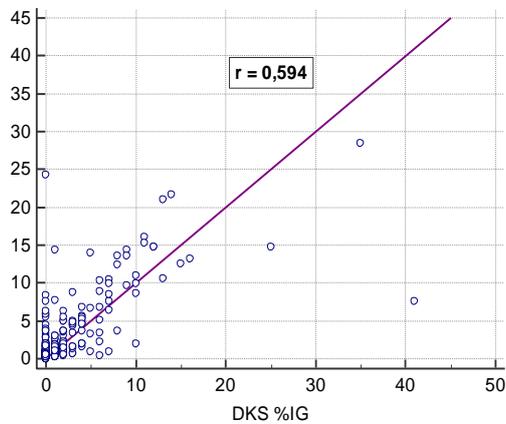
4.1.2 Primerjava določanja IG s hematološkim analizatorjem in mikroskopskim diferenciranjem

Pri 705-ih vzorcih smo določili mediano, najvišjo ter najnižjo izmerjeno vrednost za IG (Preglednica IV).

Preglednica IV: Primerjava določitve deleža IG z analizatorjem in mikroskopsko DKS. (N=705).

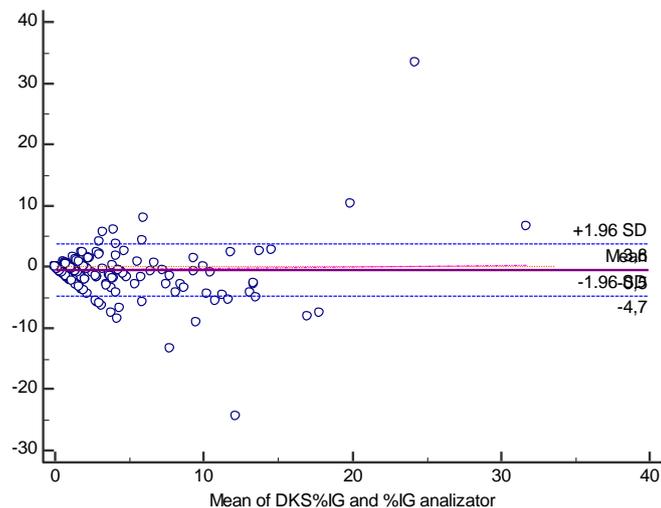
	% IG		
	Mediana	Min	Max
Analizator	0,40	0,00	28,40
DKS	0,00	0,00	41,00

Spearmanov koeficient korelacije (r) znaša 0,594 (P < 0,0001) (Slika 3), kar pomeni zmerno do dobro povezavo med deležem IG določenim z mikroskopsko DKS in vrednostjo določeno na hematološkem analizatorju.



Slika 10: Korelacija deleža IG med analizatorjem in mikroskopsko DKS.

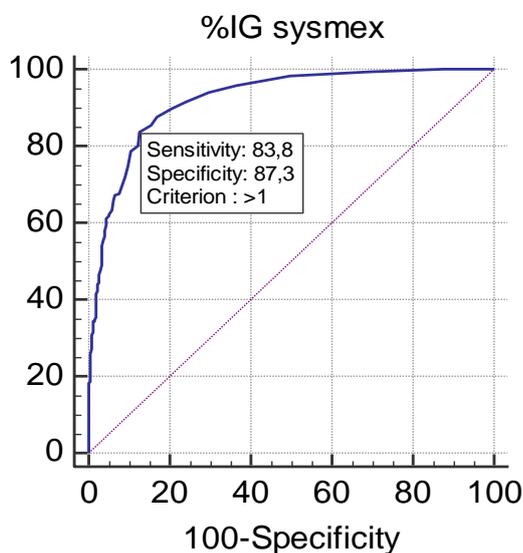
Iz Bland-Altmanovega diagrama je razvidno (Slika 4), da so vrednosti IG določene s hematološkim analizatorjem za 0,5% višje kot pri mikroskopski DKS (Slika 4). Ključno pa je, da se večina vrednosti nahaja znotraj 2SD.



Slika 11: Bland-Altmanov diagram ujemanja mikroskopske določitve IG in deležem IG hematološkega analizatorja.

4.1.3 Določitev mejne vrednosti deleža IG na hematološkem analizatorju Sysmex XN-1000

ROC krivulja služi za iskanje optimalnega razmerja med specifičnostjo in občutljivostjo diagnostičnega testa. S pomočjo ROC-analize smo želeli ovrednotiti mejno vrednost za parameter IG na hematološkem analizatorju Sysmex XN-1000. Vključili smo 868 vzorcev. Pri mejni vrednosti za %IG > 1 % je površina pod krivuljo največja in znaša (AUC) 0,921. (Slika 5).



Slika 12: ROC krivulja za delež IG določen s hematološkim analizatorjem.

Preverili smo občutljivost in specifičnost testa ter AUC pri različnih mejnih vrednostih. Rezultati so prikazani v spodnji preglednici V.

Preglednica V: Primerjava lastnosti testa pri različnih mejnih vrednostih deleža IG določenega s hematološkim analizatorjem.

	$\geq 2 \%$	$\geq 3 \%$	$\geq 4 \%$
Občutljivost	66,67%	49,32%	58,87%
Specifičnost	61,29%	75,00%	64,29%
AUC	0,676	0,631	0,615
p vrednost	0,0008	0,0402	0,1412

4.2 DOLOČANJE IG NA DVEH RAZLIČNIH HEMATOLOŠKIH ANALIZATORJIH V PRIMERJAVI Z MIKROSKOPSKO DOLOČITVIJO

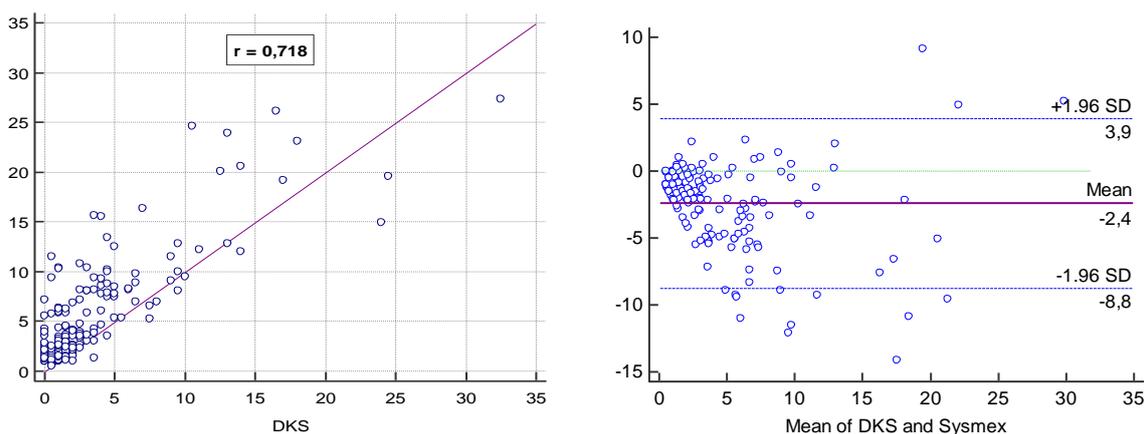
Pri 163-ih vzorcih smo z mikroskopsko DKS ali/in s hematološkim analizatorjem določili ≥ 1 % IG. Primerjavo med obema analizatorjema smo naredili le na teh vzorcih, ki so imeli po enem od treh načinov vsaj 1 % IG. Med seboj smo primerjali vrednosti IG določene na dveh različnih hematoloških analizatorjih z vrednostmi IG določenimi z mikroskopsko DKS. V preglednici VI so prikazane osnovne statistične značilnosti meritev. Število analiziranih vzorcev z analizatorjem Beckman Coulter DxH 800 je nižje ($N = 135$), ker analizator ni določil deleža IG pri vseh vključenih vzorcih.

Preglednica VI: Delež IG določen na tri različne načine.

IG (%)				
Način določitve	N	Mediana	Min	Max
Mikroskopska DKS	163	2,00	0,00	32,0
Sysmex XN-1000	163	3,90	0,50	27,3
Beckman Coulter DxH 800	135	1,70	0,00	25,4

Porazdelitev meritev smo preverjali s testom Kolmogorov-Smirnov za normalno porazdelitev parametrov v populaciji. Test je pokazal nenormalno porazdelitev podatkov ($p < 0,05$), zato smo za izračun povezave med ročno DKS in analizatorjem uporabili Spearmanov koeficient korelacije.

Pri primerjavi hematološkega analizatorja Sysmex XN-1000 z mikroskopsko DKS je Spearmanov koeficient korelacije (r) znašal 0,718 ($P < 0,0001$) (Slika 6A), kar pomeni zmerno do dobro povezavo med mikroskopsko DKS in vrednostjo IG določeno na analizatorju. Iz Bland-Altmanovega diagrama je razvidno, da je povprečje razlik -2,4%, kar pomeni, da je delež IG določen na hematološkem analizatorju Sysmex XN-1000 v povprečju za 2,4 % višji kot pri določitvi z mikroskopsko DKS (Slika 6B). Zelo podobno vrednost so določili v eni izmed študij, kjer so ugotavljali za 2,5 % višji delež IG določen s hematološkim analizatorjem v primerjavi z mikroskopsko določitvijo (16).



A

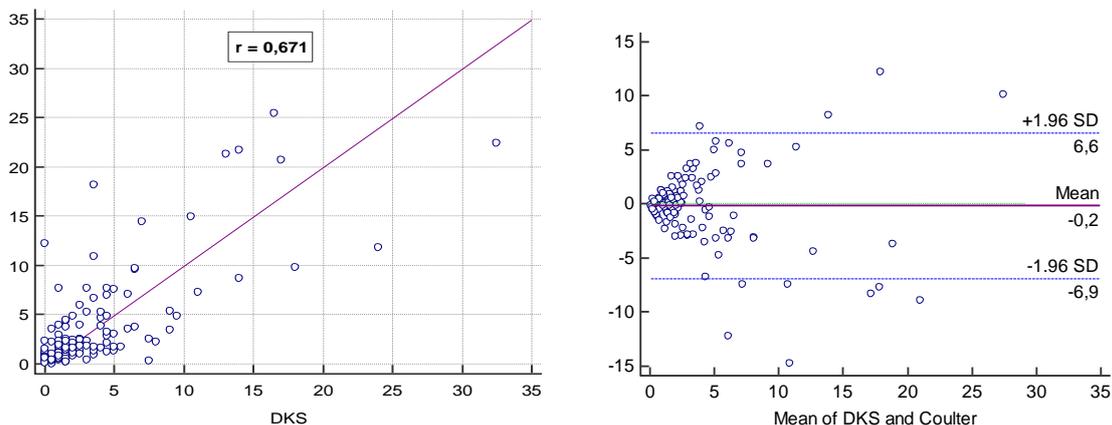
B

Slika 13: Primerjava določitve deleža IG z mikroskopsko DKS in hematološkim analizatorjem Sysmex XN-1000.

A) Korelacija med hematološkim analizatorjem in mikroskopsko DKS. B) Bland-Altmanov diagram primerjave razlik ($N = 163$).

Nadalje smo primerjali delež IG določen s hematološkim analizatorjem Beckman Coulter DxH 800 in mikroskopsko DKS. Spearmanov koeficient korelacije (r) je bil nekoliko nižji in je znašal 0,671 ($P < 0,0001$) (Slika 7A), kar še vedno pomeni zmerno do dobro povezavo med deležem IG določenim s hematološkim analizatorjem in določitvijo z mikroskopsko DKS. Tudi Bland-Altmanov diagram potrjuje dobro ujemanje med primerjanima metodama, saj se večina rezultatov nahaja znotraj območja $\pm 1,96$ SD. Porazdelitev točk na diagramu je v obliki

troblje, kar pomeni, da so pri višjem deležu IG razlike med metodama večje. Iz Bland-Altmanovega diagrama je razvidno, da pri analizatorju Beckman Coulter DxH 800 praktično ni zamika (0,2 %) glede na določitev z mikroskopsko DKS. (Slika 7B).



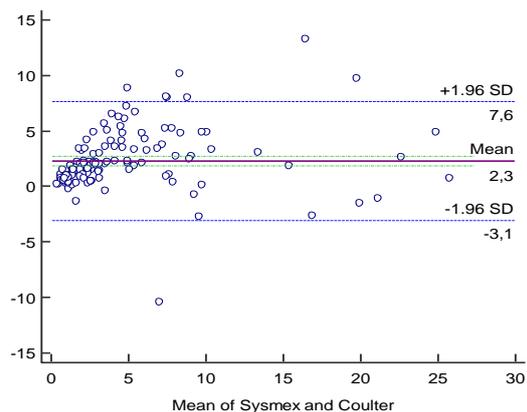
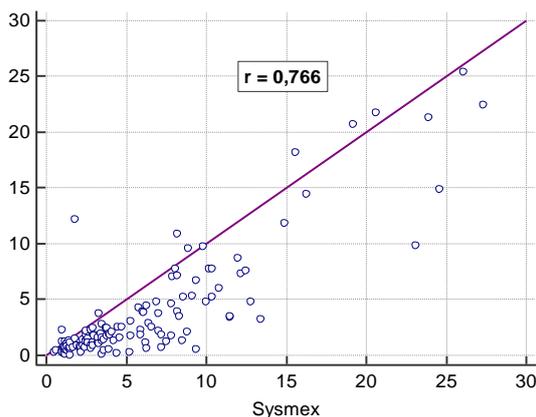
A

B

Slika 14: Primerjava določitve deleža IG z mikroskopsko DKS in hematološkim analizatorjem Beckman Coulter DxH 800.

A) Korelacija med hematološkim analizatorjem in mikroskopsko DKS. B) Bland-Altmanov diagram primerjave razlik (N = 135).

Preverili smo tudi ujemanje med obema analizatorjema in s Spearmanovim koeficientom korelacije ($r = 0,766$) ($P < 0,0001$) ugotovili močno povezavo (Slika 8A). Tudi z Bland-Altmanovim prikazom smo ugotovili močno povezavo med deleži IG določenimi na dveh različnih hematoloških analizatorjih. Razvidno je, da je povprečje razlik 2,3 %, kar pomeni, da je delež IG izmerjen na hematološkem analizatorju Sysmex XN-1000 za 2,3 % višji kot delež IG izmerjen na hematološkem analizatorju Beckman Coulter DxH 800 (Slika 8B).



A

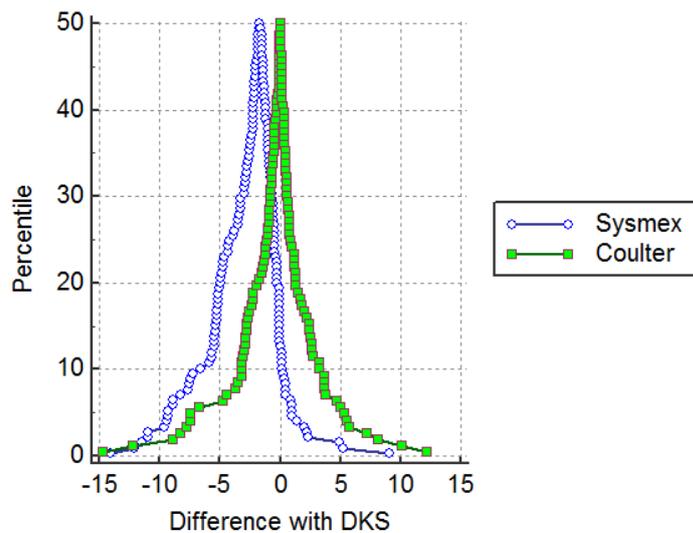
B

Slika 15: Primerjava določitve deleža IG z dvema različnima hematološkima analizatorjema Sysmex XN-1000 in Beckman Coulter DxH 800.

A) Korelacija med analizatorjema. B) Bland-Altmanov diagram. (N = 135).

Z Wilxonovim testom za odvisne vzorce smo med seboj statistično primerjali vse tri načine določitve IG, pri čemer smo uporabili korekcijo Bonfferoni za multiplo testiranje, kar pomeni, da smo za mejo značilnosti namesto $p < 0,05$ upoštevali $p < 0,05/3 = 0,017$. Ugotovili smo, da obstaja statistično značilna razlika v določitvi deleža IG s hematološkim analizatorjem Sysmex XN-1000 in mikroskopsko DKS ($p < 0,0001$) ter v določitvi med obema hematološkima analizatorjema ($p < 0,0001$). Statistično značilni razlik v določitvi deleža IG med hematološkim analizatorjem Beckman Coulter DxH in mikroskopsko DKS nismo ugotovili ($p = 0.847$).

Za boljši pregled razlik merjenja deleža IG smo naredili še diagram prepognjene empirične kumulativne porazdelitve ali gorski diagram, ki je komplementaren Bland-Altmanovem diagramu. Razvidno je, da je vrh, ki prikazuje meritve z analizatorjem Sysmex pomaknjen v levo, medtem ko se vrh, ki prikazuje meritve z analizatorjem Beckman Coulter, skoraj prekriva z navpično črto, ki označuje razliko 0 (Slika 9). Dobimo enake vrednosti kot iz Bland-Altmanovega diagrama, da je delež IG določen na hematološkem analizatorju Sysmex XN-1000 za 2,4 % višji kot pri določitvi z mikroskopsko DKS (Slika 6B) ter, da je delež IG določen z analizatorjem Beckman Coulter le za 0,2 % višji kot z ročno DKS (Slika 7B). Lepo je tudi vidna razlika v merjenju deleža IG med hematološkima analizatorjema.



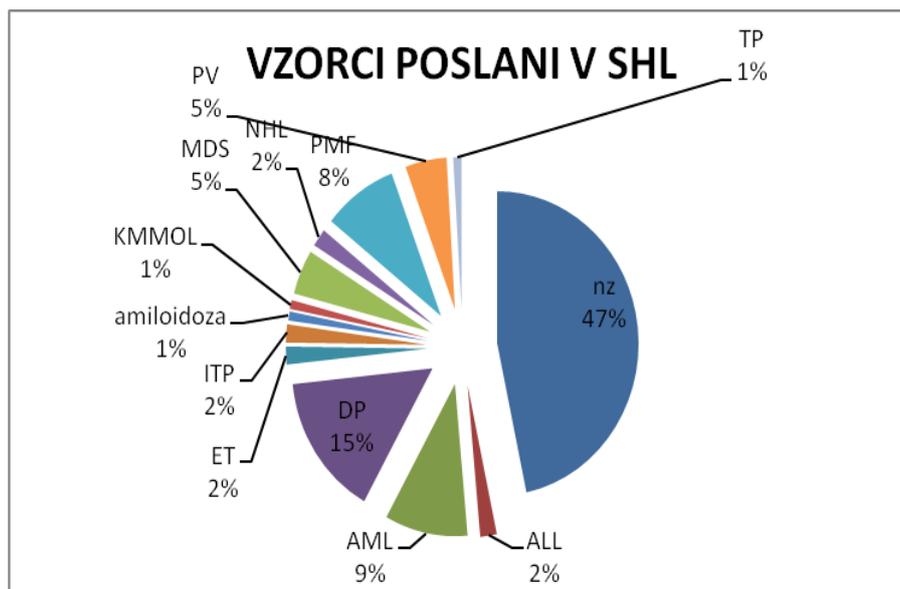
Slika 16: Diagram prepognjene empirične kumulativne porazdelitve. Primerjava deleža IG z ročno DKS ter različnima hematološkima analizatorjema (N = 163).

4.2.1 Primerjava deleža IG pri različnih skupinah bolnikov

Vzorci preiskovancev z vsaj 1 % IG (N = 163) smo nadalje razdelili v tri glavne skupine. V prvo skupino smo vključili bolnike z različnimi hematološkimi obolenji, v drugo bolnike z okužbami Klinike za infektivne bolezni in vročinska stanja ter v tretjo bolnike ostalih klinik UKC Ljubljana, za katere nismo poznali diagnoze, večina jih je bila iz Centra za intenzivno interno medicino (CIIM).

4.2.1.1 Bolniki s krvnimi obolenji

Vključili smo 61 bolnikov z različnimi krvnimi obolenji ter določili delež IG na obeh hematoloških analizatorjih ter z mikroskopsko DKS (Slika 10). V preglednici VII so prikazane osnovne statistične značilnosti deleža IG določenega na tri različne načine.



Slika 17: Bolezenska stanja krvnih bolnikov (N=108).

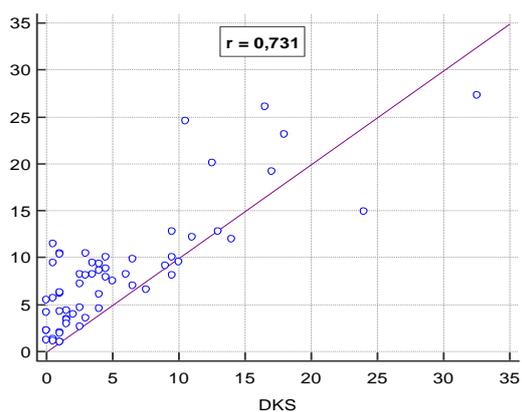
ALL – akutna limfoblastna levkemija, AML – akutna mieloblastna levkemija, DP – disemeniran plazmocitom, ET – esencialna trombocitopenija, ITP – idiopatska trombocitopenična purpura, KMMOL – kronična mielomonocitna levkemija, MDS – mielodisplastični sindrom, NHL – ne-Hodgkinov limfom, PMF – primarna mielofibroza, PV – policitemija vera, TP – trombocitopenija, nz – neznana diagnoza

Preglednica VII: Delež IG pri krvnih bolnikih določen na tri načine.

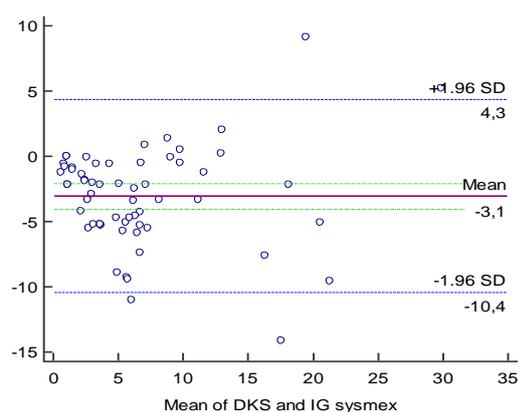
IG (%)				
Način določitve	N	Mediana	Min	Max
Mikroskopska DKS	61	3,00	0,00	32,5
Sysmex XN-1000	61	7,90	1,00	27,3
Coulter DxH 800	40	4,35	0,20	25,4

S Spearmanovim koeficientom korelacije smo ugotavljali povezavo med deležem IG določenim z mikroskopsko DKS in na hematoloških analizatorjih Sysmex XN-1000 ($r = 0,731$) ($P < 0,0001$) in Coulter DxH 800 ($r = 0,748$) ($P < 0,0001$) ter povezavo med obema hematološkima analizatorjema ($r = 0,783$) ($P < 0,0001$). Tudi Bland-Altmanov diagram potrjuje dobro ujemanje med primerjanimi metodami, saj se večina rezultatov nahaja znotraj

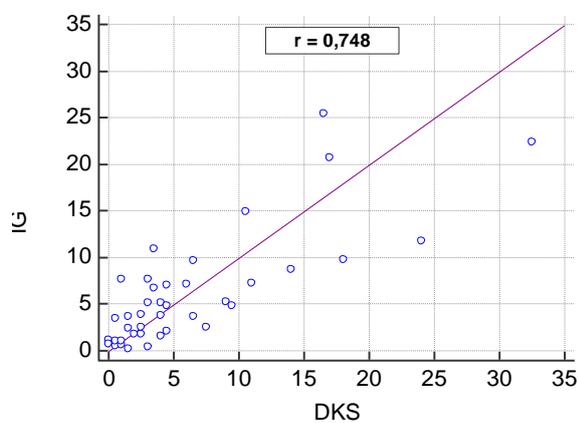
območja ± 1.96 SD. Povprečje razlik primerjave med Sysmex XN-1000 in mikroskopsko DKS znaša $-3,1$, kar pomeni, da je delež IG določen s hematološkim analizatorjem za $3,1$ % višji kot z mikroskopsko DKS (Slika 11B). Podobno povprečje razlik je tudi med obema hematološkima analizatorjema ($3,5\%$) (Slika 11Č). Povprečje razlik med Coulter DxH 800 in mikroskopsko DKS pa znaša $0,2$ %, enako kot za celotno skupino preiskovancev (slika 11Č).



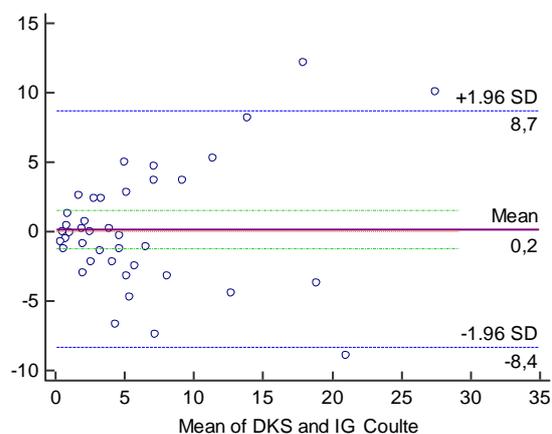
A



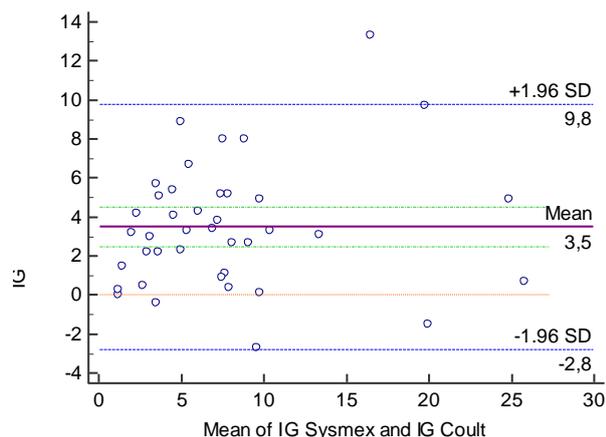
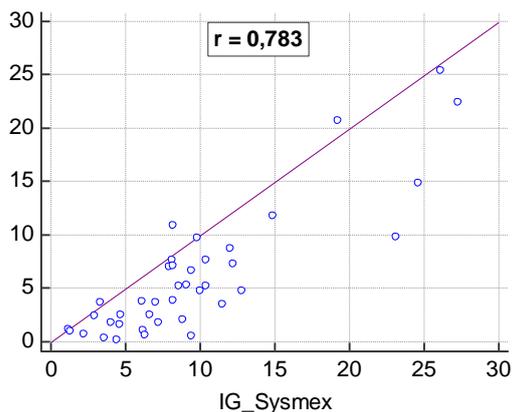
B



C



Č



D

E

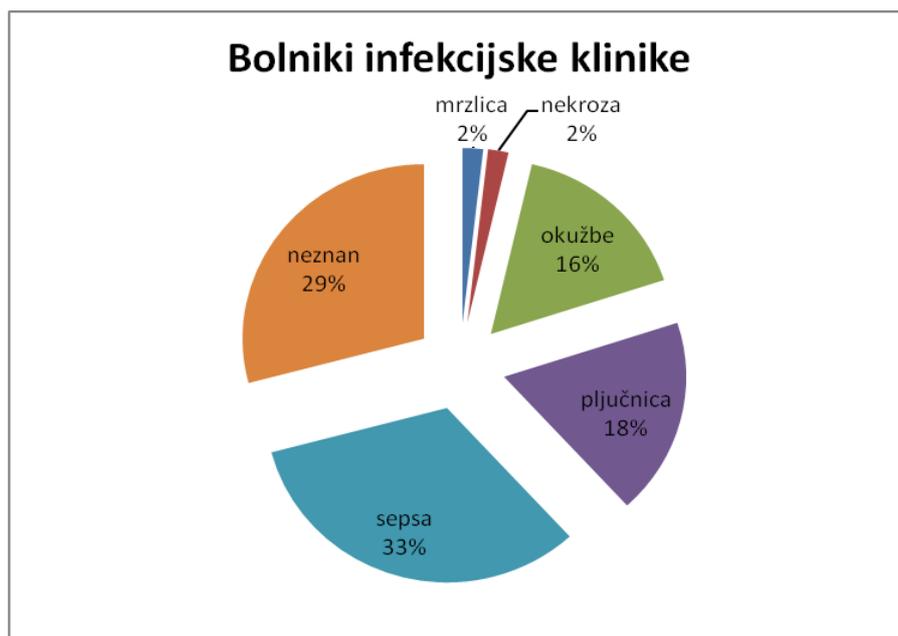
Slika 18: Primerjava določitve deleža IG z dvema hematološkima analizatorjema in mikroskopsko DKS pri krvnih bolnikih.

A) Korelacija med mikroskopsko DKS in hematološkim analizatorjem Sysmex XN-1000. B) Bland-Altmanov diagram: mikroskopska DKS in hematološki analizator Sysmex XN-1000 (N = 61). C) Korelacija med mikroskopsko DKS in hematološkim analizatorjem Beckman Coulter DxH 800. Č) Bland-Altmanov diagram: mikroskopska DKS in hematološki analizator Coulter Beckman DxH 800 (N = 40). D) Korelacija med hematološkima analizatorjema Sysmex XN_1000 in Beckman Coulter DxH 800. E) Bland-Altmanov diagram: hematološki analizator Sysmex XN-1000 in hematološki analizator Coulter Beckman DxH 800 (N = 40).

Tudi tukaj smo z Wilcoxonovim testom za odvisne vzorce smo med seboj statistično primerjali vse tri načine določitve IG pri bolnikih s krvnimi boleznimi, pri čemer smo zopet uporabili Bonfferoni korekcijo za multiplo testiranje ter za mejo značilnosti določili $p < 0,017$. Ugotovili smo, da obstaja statistično značilna razlika v določitvi deleža IG s hematološkim analizatorjem Sysmex XN-1000 in mikroskopsko DKS ($p < 0,0001$) ter v določitvi med obema hematološkima analizatorjema ($p < 0,0001$). Statistično značilni razlik v določitvi deleža IG med hematološkim analizatorjem Beckman Coulter DxH in mikroskopsko DKS nismo ugotovili ($p = 0.902$).

4.2.1.2 IG pri bolnikih z okužbami

V to skupino smo uvrstili 55 bolnikov Klinike za infekcijske bolezni in vročinska stanja. Med njimi je bilo 18 bolnikov s potrjeno sepsa, 10 bolnikov s pljučnico, 9 s potrjeno drugo okužbo, 1 z nekrozo, 1 z mrzlico ter 16 bolnikov z neznano diagnozo (slika 12). Vsi ti bolniki so imeli povišane vrednosti CRP (od 9 do 401), tudi bolniki z neznano diagnozo (CRP od 56 do 395), iz česar lahko sklepamo, da je bilo tudi pri teh prisotno neko vnetno dogajanje. V spodnji preglednici VIII so prikazane osnovne statistične značilnosti določitve deleža IG.



Slika 19: Bolezenska stanja bolnikov z okužbami (N=55).

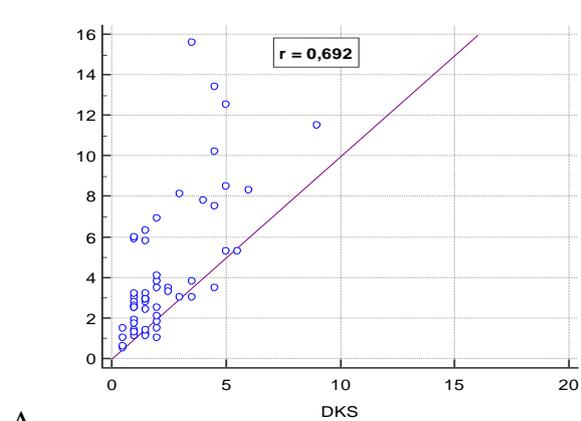
Preglednica VIII: Delež IG pri bolnikih z okužbami določen na tri načine.

				IG (%)	
Način določitve	N	Mediana	Min	Max	
Mikroskopska DKS	55	1,50	0,50	9,00	
Sysmex XN-1000	55	3,00	0,50	15,6	
Coulter DxH 800	52	1,50	0,00	18,2	

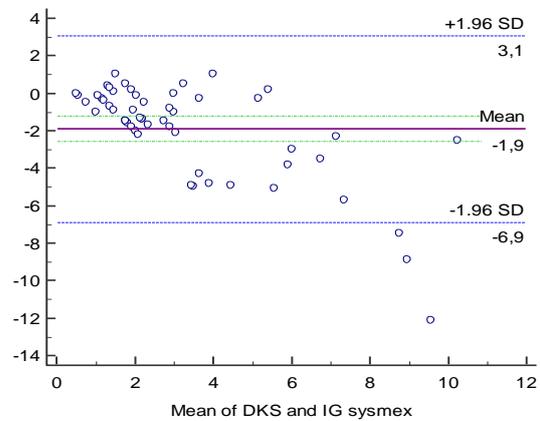
Tudi tu smo porazdelitev meritev preverjali s testom Kolmogorov-Smirnov za normalno porazdelitev parametrov v populaciji. Test je pokazal nenormalno porazdelitev podatkov ($p < 0,05$), zato smo za izračun povezave uporabili Spearmanov koeficient korelacije, ki je pokazal zmerno do dobro povezavo med hematološkim analizatorjem Sysmex XN-1000 in mikroskopsko DKS ($r = 0,692$) ($P < 0,0001$) (Slika 13A). Nekoliko nižji je bil pri primerjavi analizatorja Coulter DxH 800 z mikroskopsko DKS ($r = 0,578$) ($P < 0,0001$), odlično povezavo pa smo ugotovili pri primerjavi obeh analizatorjev ($r = 0,833$) ($P < 0,0001$).

Dobro ujemanje med meritvami potrjuje tudi Bland-Altmanov diagram, saj se večina rezultatov nahaja znotraj območja ± 1.96 SD, izstopajo le posamezne meritve. Primerjava

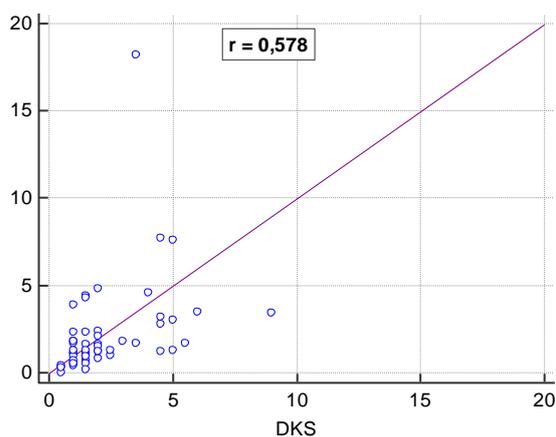
obeh analizatorjev kaže naraščanje povprečne napake z velikostjo merjene vrednosti (Slika 13Č).



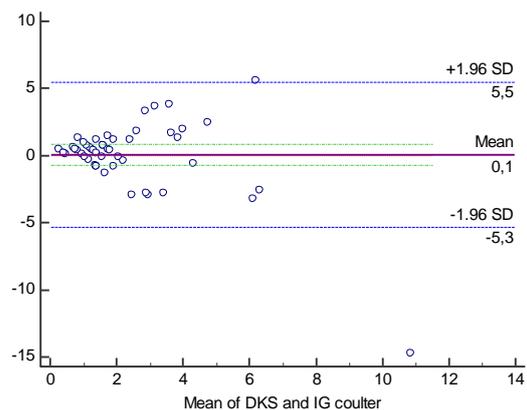
A



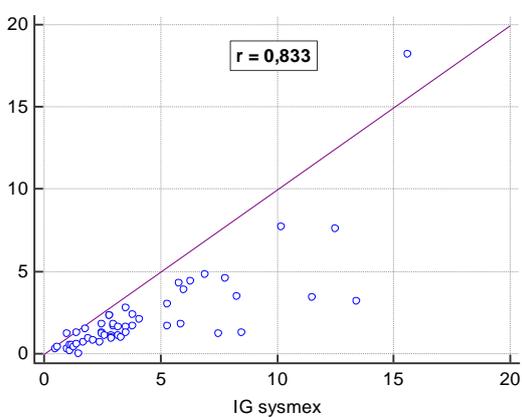
B



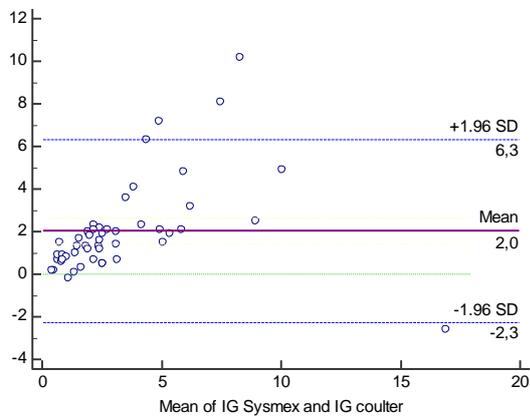
C



Č



D



E

Slika 20: Primerjava določitve deleža IG z dvema hematološkima analizatorjema in mikroskopsko DKS pri bolnikih z okužbami.

A) Korelacija med mikroskopsko DKS in hematološkim analizatorjem Sysmex XN-1000. B) Bland-Altmanov diagram: mikroskopska DKS in hematološki analizator Sysmex XN-1000 (N = 55). C) Korelacija med mikroskopsko DKS in hematološkim analizatorjem Coulter Beckman DxH 800. Č) Bland-Altmanov diagram: mikroskopska DKS in hematološki analizator Coulter Beckman DxH 800 (N = 52). D) Korelacija med hematološkima analizatorjema Sysmex XN-1000 in Coulter Beckman DxH 800. E) Bland-Altmanov diagram: hematološki analizator Sysmex XN-1000 in hematološki analizator Coulter Beckman DxH 800 (N = 52).

Z Wilcoxonovim testom za odvisne vzorce smo med seboj statistično primerjali vse tri načine določitve IG pri bolnikih z okužbami, pri čemer smo zopet uporabili Bonfferoni korekcijo za multiplo testiranje ter za mejo značilnosti določili $p < 0,017$. Ugotovili smo, da obstaja statistično značilna razlika v določitvi deleža IG s hematološkim analizatorjem Sysmex XN-1000 in mikroskopsko DKS ($p < 0,0001$) ter v določitvi med obema hematološkima analizatorjema ($p < 0,0001$), medtem ko med hematološkim analizatorjem Beckman Coulter DxH in mikroskopsko DKS ne obstaja statistično značilna razlika ($p = 0.115$) v določitvi deleža IG.

4.2.1.3 IG pri bolnikih z neznano diagnozo

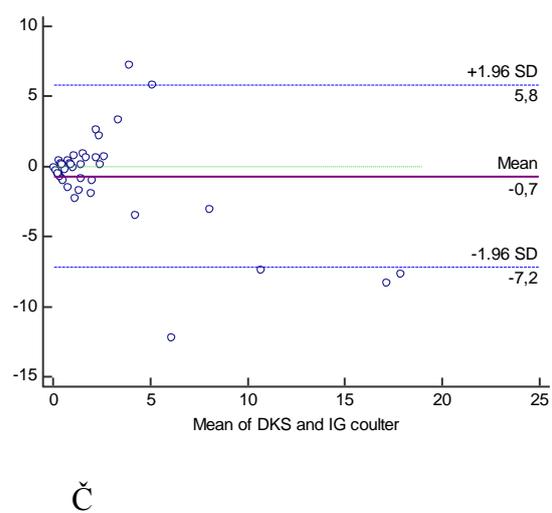
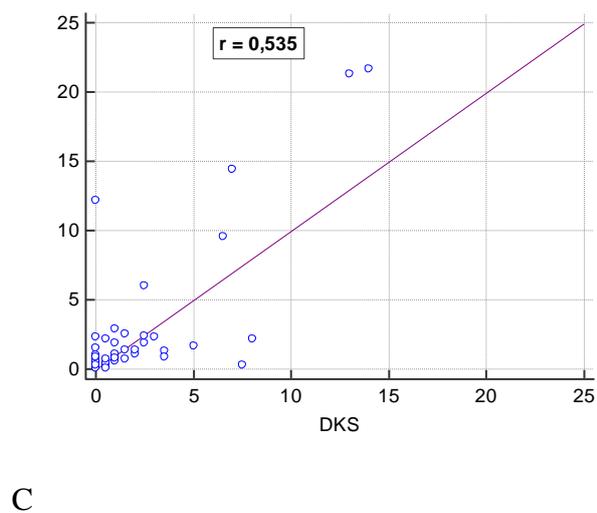
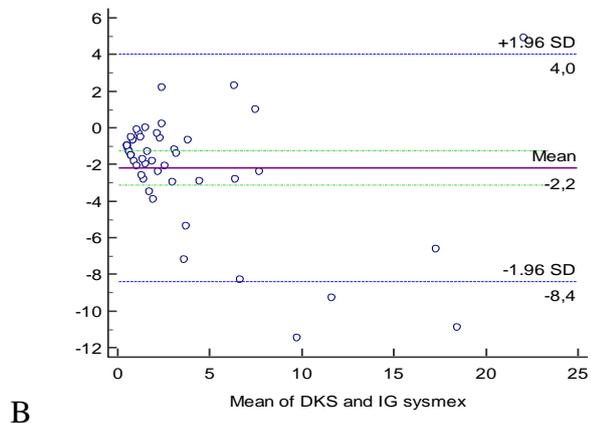
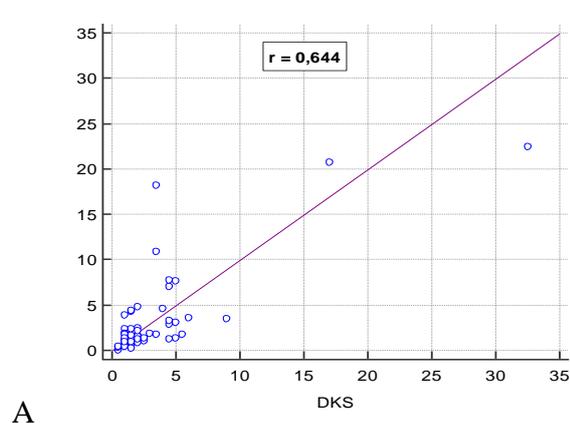
V to skupino smo uvrstili 47 vzorcev bolnikov, za katere nismo poznali diagnoze in so prihajali iz ostalih klinik UKC Ljubljana, večina iz CIIM. V preglednici IX so podane statistične značilnosti za vse tri načine določanja deleža IG pri tej skupini preiskovancev.

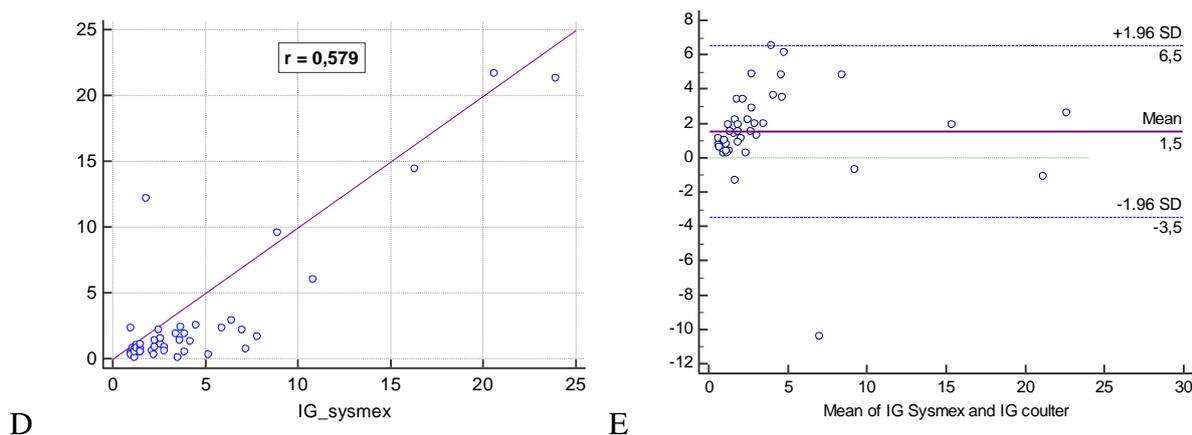
Preglednica IX: Delež IG pri bolnikih z neznano diagnozo na tri načine.

IG (%)				
Način določitve	N	Mediana	Min	Max
Mikroskopska DKS	47	1,00	0,00	24,5
Sysmex XN-1000	47	2,60	1,00	23,9
Coulter DxH 800	43	1,10	0,10	21,7

Tudi v tej skupini bolnikov je porazdelitev podatkov, ki smo jo preverjali s testom Kolmogorov-Smirnov, nenormalna ($p < 0,05$), zato smo za izračun povezave uporabili Spearmanov koeficient korelacije, s katerim smo ugotovili zmerno do dobro povezavo med

deležem IG določenim s hematološkim analizatorjem Sysmex XN-1000 in mikroskopsko DKS ($r = 0,664$) ($P < 0,0001$), med hematološkim analizatorjem Coulter DxH 800 in mikroskopsko DKS ($r = 0,535$) ($P = 0,0002$) ter med obema analizatorjema ($r = 0,579$) ($P < 0,0001$). Dobro ujemanje meritev potrjujejo tudi Bland-Altmanovi diagrami.





Slika 21: Primerjava določitve deleža IG z dvema hematološkima analizatorjema in mikroskopsko DKS pri bolnikih z neznano diagnozo.

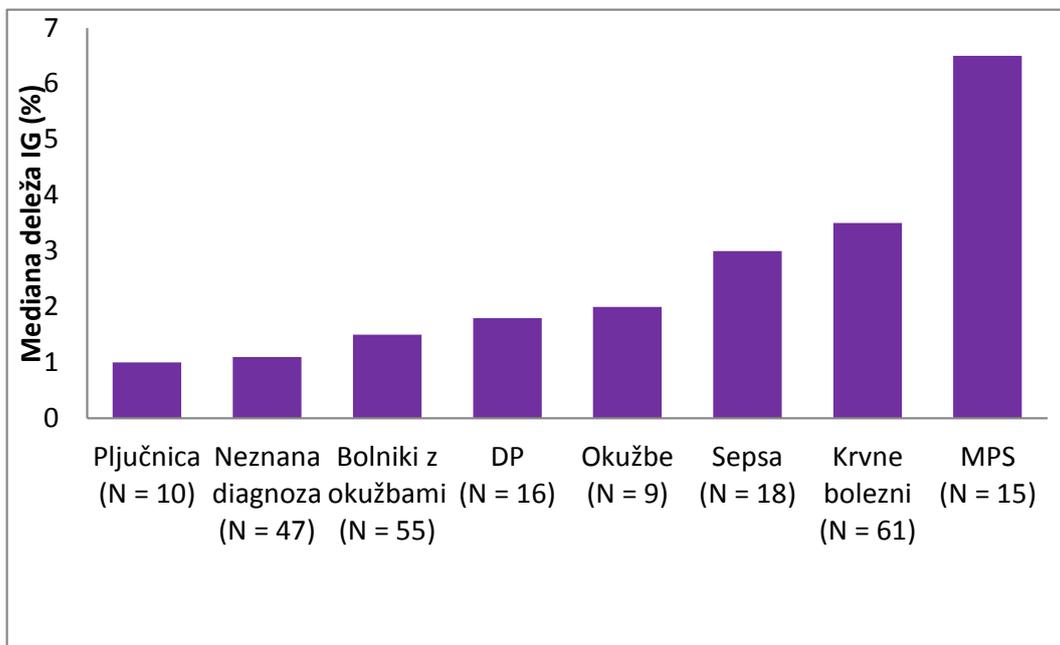
A) Korelacija med mikroskopsko DKS in hematološkim analizatorjem Sysmex XN-1000. B) Bland-Altmanov diagram: mikroskopska DKS in hematološki analizator Sysmex XN-1000 (N = 47). C) Korelacija med mikroskopsko DKS in hematološkim analizatorjem Coulter Beckman DxH 800. Č) Bland-Altmanov diagram: mikroskopska DKS in hematološki analizator Coulter Beckman DxH 800 (N = 43). D) Korelacija med hematološkima analizatorjema Sysmex XN-1000 in Coulter Beckman DxH 800. E) Bland-Altmanov diagram: hematološki analizator Sysmex XN-1000 in hematološki analizator Coulter Beckman DxH 800 (N = 43).

Tudi pri bolnikih z nepoznano diagnozo smo z Wilcoxonovim testom za odvisne vzorce med seboj statistično primerjali vse ti načine določitve IG, pri čemer smo zopet uporabili Bonfferoni korekcijo za multiplo testiranje ter za mejo značilnosti določili $p < 0,017$. Ugotovili smo, da obstaja statistično značilna razlika v določitvi deleža IG s hematološkim analizatorjem Sysmex XN-1000 in mikroskopsko DKS ($p < 0,0001$) ter v določitvi med obema hematološkima analizatorjema ($p < 0,0001$), medtem ko med hematološkim analizatorjem Beckman Coulter DxH in mikroskopsko DKS ne obstaja statistično značilna razlika ($p = 0,142$) v določitvi deleža IG.

4.2.1 Primerjava deleža IG med skupinami bolnikov

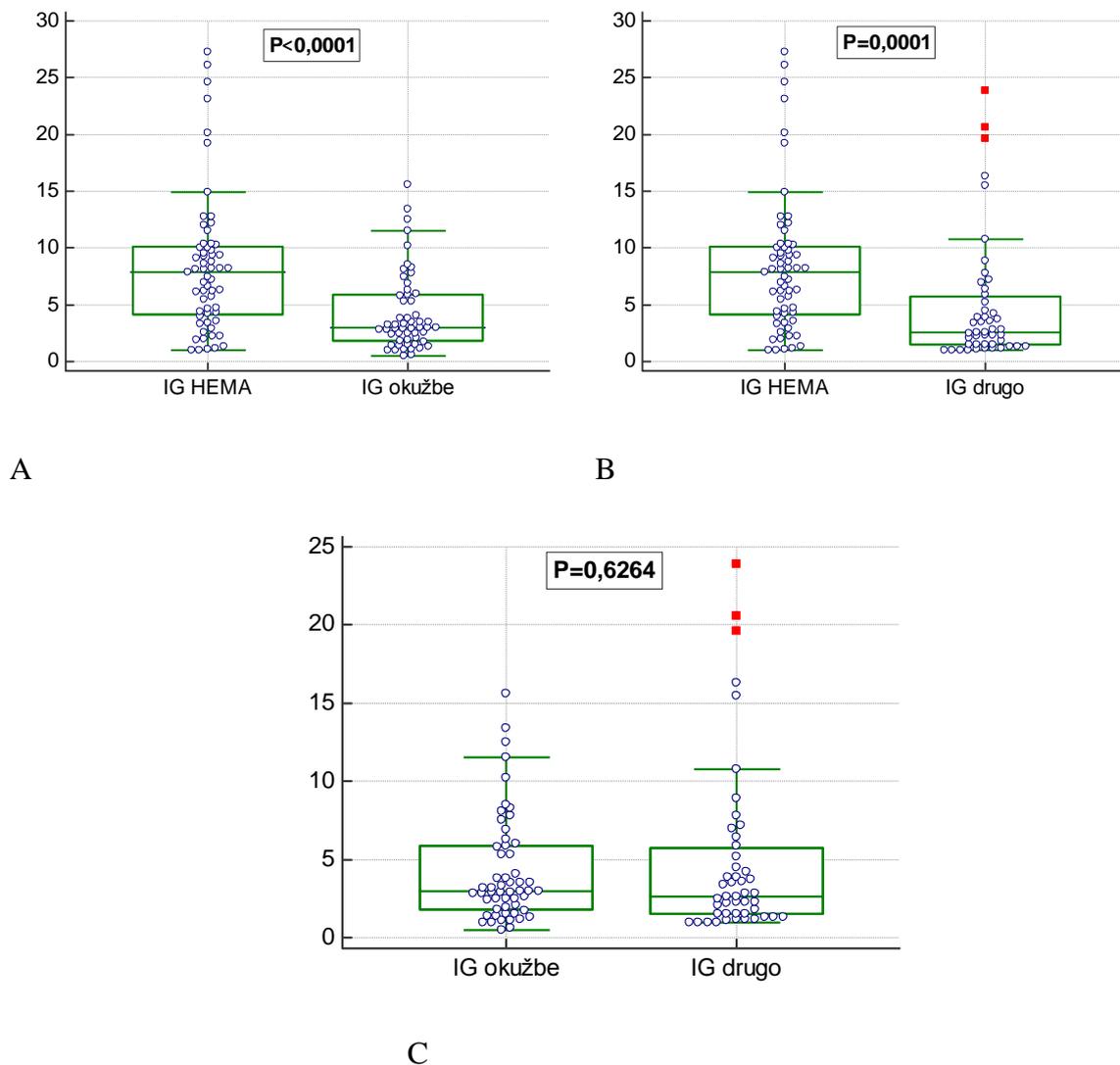
Za vse primerjave med različnimi skupinami bolnikov smo uporabili neparametrični test Mann-Whitney za dve neodvisni spremenljivki. Uporabili smo Bonfferoni korekcijo za multiplo testiranje ter za mejo značilnosti določili $p < 0,017$. Izrisali smo grafe na katerih so označene točke posamezne meritve, mediana za IG pri posamezni testni skupini ter 5. in 95. percentil vseh vrednosti za posamezno skupino. Primerjali smo le tiste skupine, kjer je bilo število bolnikov dovolj veliko za primerjavo. Te skupine prikazuje spodnji diagram, iz

katerega je razvidno, kako so se razlikovale glede na mediano deleža IG, določeno z mikroskopskim pregledom.



Slika 22: Mediana deleža IG pri preiskovanih skupinah.

Želeli smo preveriti, ali obstaja med skupinami hematoloških bolnikov, bolnikov Klinike za infektivna stanja in vročinske bolezni, ki so imeli dokazano neko okužbo ali sepsa in bolnikov z neznano diagnozo, statistično značilna razlika v določitvi deleža IG s hematološkim analizatorjem Sysmex XN-1000. Statistični test je pokazal, da je bil delež IG značilno višji pri hematoloških bolnikih v primerjavi z infektivnimi bolniki ($P < 0,0001$) (Slika 16A) in bolniki z neznano diagnozo ($P = 0,0001$) (Slika 16B), medtem ko se skupini bolnikov infektivne klinike in bolnikov brez diagnoze med seboj nista razlikovali ($P = 0,6264$) (Slika 16C).

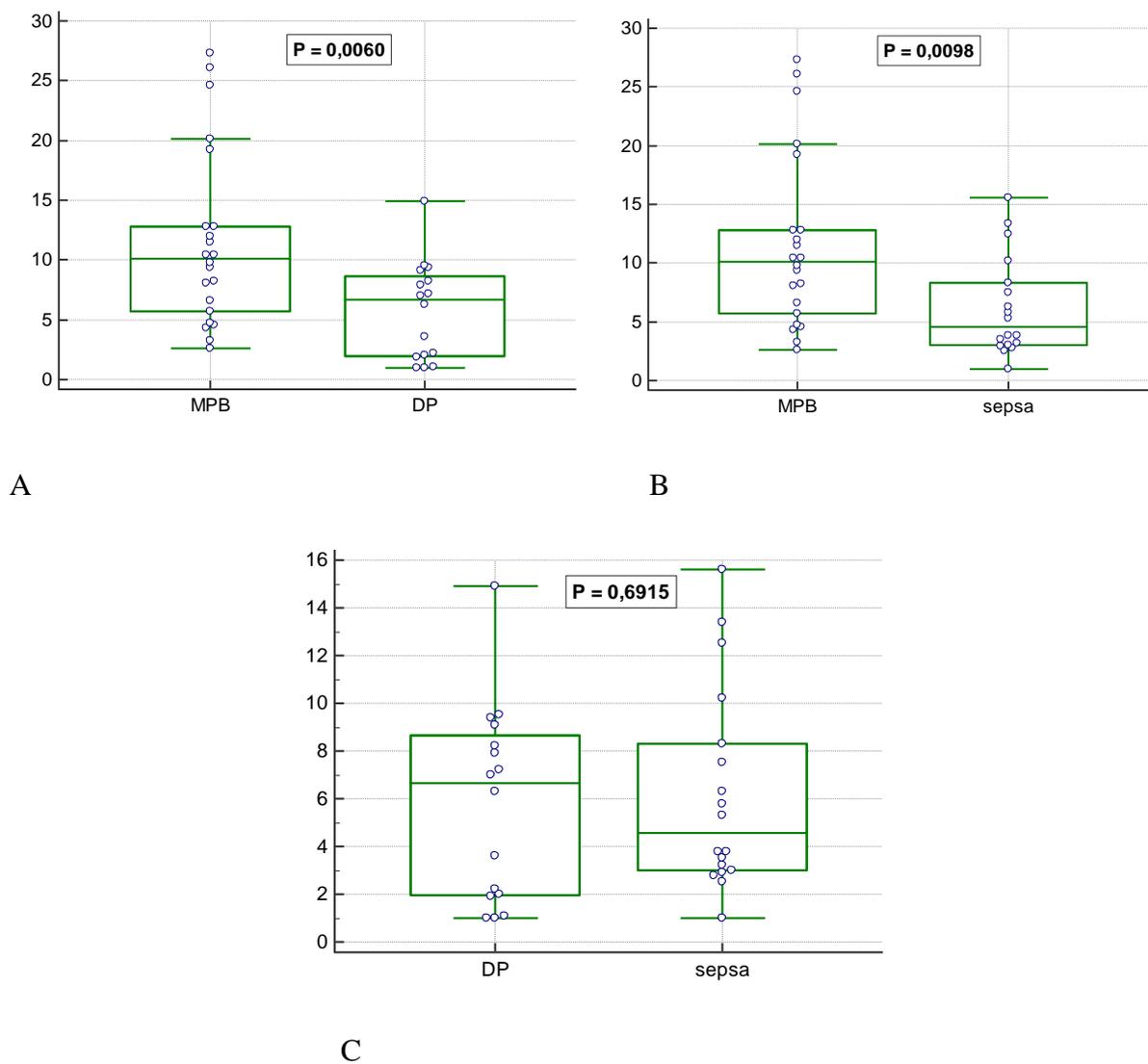


Slika 23: Grafični prikaz porazdelitve deleža IG določenega s hematološkim analizatorjem Sysmex XN-1000.

Primerjava med testnimi skupinami s testom Mann-Whitney: A) hematološki bolniki (N = 61) in bolniki z okužbami (N = 55); B) hematološki bolniki (N = 61) in bolniki z neznano diagnozo (N = 47); C) bolniki z okužbami (N = 55) in bolniki z neznano diagnozo (N = 47).

4.2.1.1 Bolniki z okužbami

Preveriti smo želeli tudi, ali obstaja statistično značilna razlika v določitvi deleža IG pri bolnikih s sepso, drugo okužbo in bolnikih s pljučnico. Delež IG je bil statistično značilno nižji pri bolnikih s pljučnico v primerjavi z bolniki s sepso ($P = 0,0037$) (Slika 17A), medtem ko se skupina bolnikov z okužbo ni statistično razlikovala od skupine bolnikov s pljučnico ($P = 0,1025$) (Slika 17B) in skupine bolnikov s sepso ($P = 0,1498$) (Slika 17C).



Slika 25: Grafični prikaz porazdelitve deleža IG merjenega s hematološkim analizatorjem Sysmex XN-1000.

Primerjava med testnimi skupinami s testom Mann-Whitney: A) bolniki s plazmocitomom (N = 16) in bolniki z mieloproliferativnimi boleznimi (N = 15); B) bolniki z mieloproliferativnimi boleznimi (N = 15) in sepsa (N = 18); C) bolniki s plazmocitomom (N = 16) in sepsa (N = 18).

5 RAZPRAVA

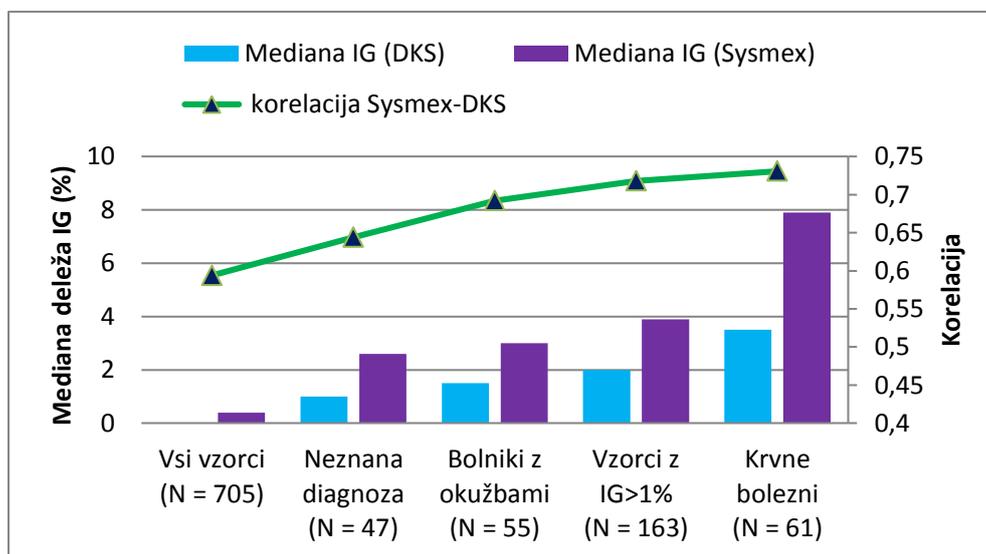
5.1 PRIMERJAVA DOLOČITVE DELEŽA IG S HEMATOLOŠKIM ANALIZATORJEM IN MIKROSKOPSKIM PREGLEDOM

Za celovito vrednotenje določanja IG na hematološkem analizatorju Sysmex XN-1000 smo analizirali vse hemograme za določeno časovno območje, pri katerih je bil narejen tudi mikroskopski pregled krvnega razmaza. V primerjavo ujemanja določitve deleža IG s hematološkim analizatorjem Sysmex XN-1000 in standardizirano mikroskopsko DKS smo vključili 705 vzorcev periferne krvi bolnikov, ki so imeli narejeno mikroskopsko DKS, ne glede na vrednost IG. Spearmanov koeficient korelacije je pokazal zmerno do dobro povezavo med deležem IG z mikroskopsko DKS in deležem IG določenim s hematološkim analizatorjem. Nato smo ločeno preverili ujemanje med mikroskopsko določitvijo IG in določitvijo s hematološkim analizatorjem pri vrednostih $IG \geq 1\%$ in ugotovili pri istem analizatorju veliko boljšo korelacijo. V preglednici X so prikazane vrednosti mediane IG določene z mikroskopskim pregledom ter korelacije med analizatorjem in mikroskopsko DKS za posamezne preiskovane skupine. Razvidno je, da z večanjem mediane IG narašča tudi korelacija med določitvijo s hematološkim analizatorjem in mikroskopsko DKS, tako za Sysmex-ov kot tudi za Coulter-jev hematološki analizator (Slika 19).

Vsi Bland-Altmanovi diagrami so pokazali, da so vrednosti IG v območju nizkih vrednosti (okrog 1 %) zgoščene in ni večjih odstopanj med njimi, pri višjih vrednostih IG pa je razpršenost le teh večja (Slika 4, 6B, 7B, 8B). Korelacijski koeficient sicer z naraščajočo mediano narašča, obenem pa smo opazili tudi trend večanja razlike med metodama z naraščanjem deleža IG, kar se sklada s podatki iz literature, kjer tudi navajajo, da je delež pri $IG > 3\%$ precenjen (36). Mi smo ugotovili, da je precenjen tudi pri nižjih vrednostih mediane. Na vrednosti analizatorja se vendarle lahko bolj zanesemo pri nizkih deležih IG, medtem ko moramo biti pri višjih vrednostih pozorni, saj je že pri vrednosti mediane IG 2,6 % razlika med določitvama 2,2 %. Zanašanje na vrednosti analizatorja pri nižjih vrednostih IG pa je smiselno tudi zaradi bistveno večjega števila prešteti celic in velike napake, ki je pri diferenciranju zgolj do 100 celic v tem območju večja.

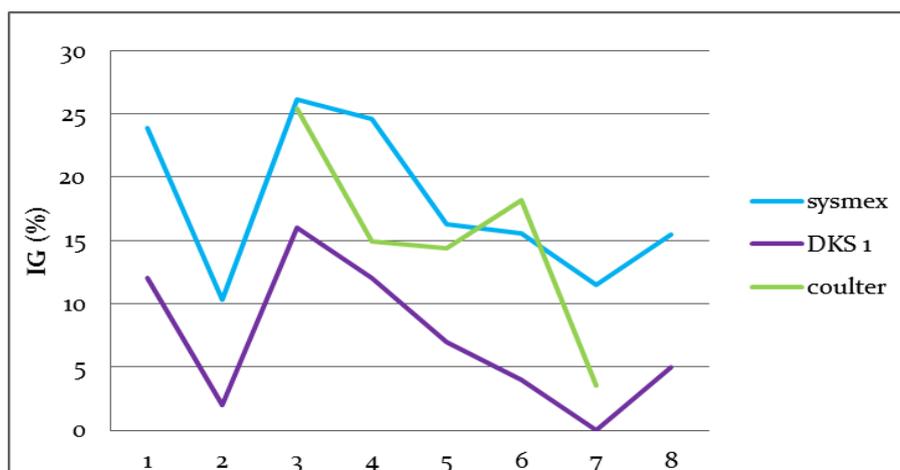
Preglednica X: Primerjava mediane IG in korelacije za preučevane skupine.

	Mediana IG			Spearmanov koeficient korelacije		
	DKS	Sysmex	Povprečna razlika median Sysmex-DKS (%)	Sysmex/DKS	Coulter/DKS	Sysmex/Coulter
Vsi vzorci (N = 705)	0	0,4	0,5	0,594	/	/
Neznana diagnoza (N = 47)	1,0	2,6	2,2	0,644	0,535	0,579
Bolniki z okužbami (N = 55)	1,5	3,0	1,9	0,692	0,578	0,833
Vzorci z IG>1% (N = 163)	2,0	3,9	2,4	0,718	0,671	0,766
Krvne bolezni (N = 61)	3,5	7,9	3,1	0,731	0,748	0,783



Slika 26: Primerjava mediane IG in korelacije pri posameznih preučevanih skupinah.

Bland-Altmanovi diagrami potrjujejo dobro ujemanje med izsledki analizatorjev in mikroskopske DKS (Slika 6B, Slika 7B, Slika 8B), vendar nekatere vrednosti izstopajo. Preverili smo, kaj je vzrok 8-ih izstopajočih vrednosti in ugotovili, da so bile vse te vrednosti določene na analizatorju Sysmex XN-1000 označene z zvezdico, kar pomeni, da po navodilih proizvajalca niso zanesljive in je potreben mikroskopski pregled razmaza. Preverili smo tudi, če je vzrok prisotnost drugih patoloških celic, npr. blastov. Pri štirih bolnikih je bila prisotna ena izmed mieloproliferativnih bolezni, od teh smo pri dveh v krvnem razmazu zasledili blaste, pri enem pa Pelger-Huětovo nepravilnost jedra nevtrofilcev, zaradi česar jih je analizator na citogramu razvrščal v območje IG (10). En bolnik je imel dokazano sepsa, za ostale tri pa nismo poznali diagnoze in v krvnem razmazu nismo zasledili sumljivih celic. Na spodnjem grafu (slika 20) so prikazani vzorci z izstopajočimi vrednostmi deleža IG določenimi na tri načine. Vidimo, da kljub opazni razliki v vrednosti IG med analizatorjem Sysmex in mikroskopsko DKS, ostaja ta razlika pri različnih vzorcih podobna, medtem, ko to ne moremo trditi pri primerjavi s Coulterjevim analizatorjem.



Slika 27: Prikaz razlik meritev med analizatorjema in mikroskopsko DKS za izstopajoče vrednosti.

5.2 PRIMERJAVA DOLOČANJA IG Z DVEMA HEMATOLOŠKIMA ANALIZATORJEMA

V primerjavo določanja IG z dvema različnima analizatorjema smo vključili le vzorce, pri katerih smo bodisi z analizatorjem ali DKS določil več kot 1 % IG (Preglednica X).

Korelacija med hematološkima analizatorjema Sysmex XN-1000 in Beckman Coulter DxH 800 je močna ($r = 0,766$) (Slika 6A). Ujemanje med analizatorjema smo nato preverili še pri različnih skupinah bolnikov: hematološki bolniki, bolniki z okužbami ter bolniki, pri katerih nismo poznali diagnoze. Ugotovili smo odlično povezavo med obema hematološkima analizatorjema pri skupini hematoloških bolnikov ($r = 0,783$) in bolnikov z okužbami ($r = 0,833$). Drugje smo ugotovili zmerno do dobro povezavo. Tudi tukaj velja, da z naraščanjem mediane vrednosti IG narašča tudi korelacija med analizatorjema. Izjema je skupina bolnikov z okužbami, kjer smo določili najboljše ujemanje med analizatorjema pri $Me = 3,0$ % (Preglednica X).

Delež IG določen s hematološkim analizatorjem Sysmex XN-1000 je bil v povprečju za 1,9 do 3,1 % višji kot določen z mikroskopsko DKS, medtem ko je ta razlika pri analizatorju Beckman Coulter DxH-800 znašala le 0,2 do 0,7 %. Preverili smo, če je mogoče vzrok to, da analizator Beckman Coulter DxH 800 ni izmeril deleža IG pri vseh analiziranih vzorcih, zato smo izključili te vzorce in ponovno preverili ujemanje med mikroskopsko DKS in analizatorjem Sysmex XN-100. Ugotovili smo za malenkost boljšo korelacijo ($r = 0,735$), medtem ko razlika v deležu IG ostaja enaka (2,4 %).

Nekateri avtorji navajajo, da je vzrok za višjo vrednost IG na analizatorju lahko v diferenciranju med metamielociti in paličastimi nevtrofilci pri mikroskopski DKS ter da analizator prešteje veliko večje število celic kot pri mikroskopskem diferenciranju (15). Glede na to, da se analizatorja bistveno razlikujeta med seboj, bi težko na ta način pojasnjevali veliko razliko pri analizatorju Sysmex XN-1000. Vrednost IG pri analizatorju Beckman Coulter DxH 800 izgleda bliže mikroskopski oceni, čeprav medsebojna korelacija teh dveh vrednosti ni najboljša. Treba je izpostaviti, da mikroskopska določitev v skladu z referenčno metodo pregleda 200 celic, mi pa smo diferencirali le do 100 celic z dvema analitikoma. Del razlik morda lahko pripišemo tudi temu. Za določitev prave vrednosti pa bi morali uporabiti pretočno citometrijo.

5.3 DOLOČITEV MEJNE VREDNOSTI IG NA ANALIZATORJU SYSMEX XN-1000

S pomočjo ROC-analize smo določili mejno vrednost za parameter IG na hematološkem analizatorju. Najboljše razmerje med specifičnostjo (87,3%) in občutljivostjo (83,8%) smo določili pri mejni vrednosti >1 % IG. Površina pod krivuljo 0,921 kaže na zelo dobro diagnostično uporabnost testa pri tej mejni vrednosti. To je tudi vrednost, ki je predhodno nastavljena na aparatu. V različnih študijah so bile določene različne mejne vrednosti za različne hematološke analizatorje, in sicer za Sysmex XT1800 in Sysmex XE-2000 na zdravi populaciji preiskovancev ter za Beckman Coulter na bolnikih s sumom na okužbo (Preglednica XI). V primerjavi z njimi ima naša določitev najboljše razmerje med specifičnostjo in občutljivostjo.

Preglednica XI: Primerjava mejnih vrednosti za IG.

študija	mejna vrednost (%IG)	Občutljivost (%)	Specifičnost (%)
naša	$>1,0$	83,8	87,3
Roehrl et al. (41)	0,9	70,37	58,67
Bruegel et al. (40)	0,5	88,89	37,33
Senthilnayagam et al. (37)	1,1	70,37	62,67

Občutljivost in specifičnost lahko spreminjamo s premikom mejne vrednosti za pozitiven rezultat (33). Za naše vzorce smo preverili občutljivost in specifičnost testa pri različnih mejnih vrednostih: $IG \geq 2$ %, $IG \geq 3$ % in $IG \geq 4$ % (Preglednica V). Z dvigom mejne vrednosti se nižata tako občutljivost kot tudi specifičnost testa, nižja se tudi AUC, kar kaže na slabšo uporabnost testa. Pri vrednosti $IG \geq 3$ % p vrednost znaša 0,0402, kar pomeni, da še obstaja statistično značilna razlika v deležu IG med pozitivno in negativno skupino, medtem ko pri mejni vrednosti $IG \geq 4$ % ($p = 0,1412$) ni več statistično značilne razlike med obema skupinama in ne moremo ločiti med njima. Mejna vrednost, ki jo zdaj uporablja Specializiran hematološki laboratorij na hematološkem analizatorju je > 1 % IG ali $> 0,10 \times 10^9/L$ IG.

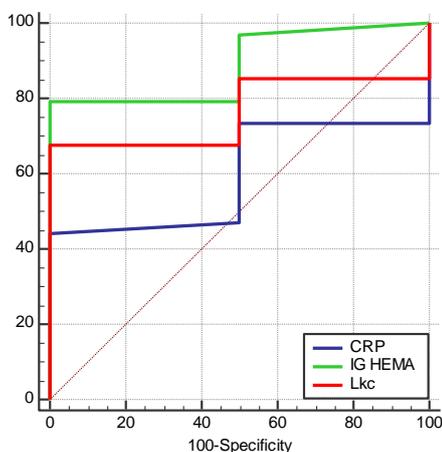
Da bi se izognili nepotrebnim pregledom krvnega razmaza, smo ovrednotili zanesljivost opozoril hematološkega analizatorja na prisotnost nezrelih granulocitov. Z mikroskopsko določitvijo DKS, smo preverili prisotnost IG-jev ter prepoznali oziroma izključili druge patološke celice. Določili smo 73 % občutljivost in 88 % specifičnost opozoril. Odlična je bila NNV (92 %), medtem ko je bila nekoliko slabša PNV (63 %). Preverili smo, ali v primeru dviga mejne vrednosti na 3 % tvegamo in spregledamo pomembne celice. Vzorcev med 1 % in 3 % IG, pri katerih smo z mikroskopsko DKS zasledili blaste, je bilo 8, pri petih vzorcih je nanje opozoril tudi analizator. Pri ostalih treh vzorcih nas nanje ni opozoril, vendar smo pri dveh krvni razmaz pregledali zaradi nizkih trombocitov, pri enem pa je bila mikroskopska DKS naročena s strani naročnika zaradi zdravljenja akutne levkemije. Glede na dobljene rezultate bi bilo torej smiselno mejno vrednost zvišati na 3 %, kljub slabši občutljivosti in specifičnosti testa, saj bi se s tem zmanjšal obseg mikroskopskih pregledov krvnih razmazov obenem pa ne bi spregledali nič ključnega.

5.4 PRIMERJAVA DELEŽA IG MED TESTNIMI SKUPINAMI

Preverili smo, ali med hematološkimi bolniki, bolniki Klinike za infektivne bolezni in vročinska stanja ter bolniki z nepoznano diagnozo obstaja statistično značilna razlika v določitvi deleža IG s hematološkim analizatorjem Sysmex XN-1000. Določili smo, da je delež IG največji v skupini hematoloških bolnikov ($Me = 7,9 \%$) ter je statistično značilno višji v primerjavi z ostalima dvema skupinama. Najmanjši pa v skupini bolnikov z nepoznano diagnozo ($Me = 2,6 \%$), ki se ni statistično razlikovala od skupine bolnikov Klinike za infektivne bolezni in vročinska stanja (Preglednica XII). V skupini bolnikov z nepoznano diagnozo je bila večina bolnikov iz Centra za intenzivno interno medicino, 16 s Klinike za infektivne bolezni in vročinska stanja ter 8 bolnikov ostalih klinik. Lahko predvidevamo, da so to bolniki, pri katerih je verjetnost prisotnosti okužbe zelo velika, zato ni presenetljivo, da se skupini med seboj nista statistično razlikovali.

Bolnike Klinike za infektivne bolezni in vročinska stanja smo ločili po diagnozi na bolnike s sepso, okužbo in pljučnico. Pri bolnikih s pljučnico smo določili statistično značilno najnižji delež IG ($Me = 1,4 \%$) v primerjavi z ostalima skupinama, ki se med seboj niso statistično

razlikovale. Meja za razlikovanje med okužbo in sepsa je nejasna in problematična in je ne moremo določiti le na podlagi deleža IG, kar so ugotovili tudi že v predhodnih študijah (4). S pomočjo površine pod ROC krivuljo (AUC) smo preverili, kateri od merjenih parametrov je boljši pokazatelj okužbe (Slika 21). Primerjali smo % IG in število levkocitov določenih na analizatorju Sysmex XN-1000 ter CRP pri 55 bolnikih Klinike za infekcijske bolezni in vročinska stanja. Dobljene vrednosti smo primerjali z literaturo. Ugotovili smo, da ima med preiskovanimi parametri v obeh primerih najboljšo diagnostično uporabo % IG z največjo površino pod krivuljo (AUC naša = 0,89 in AUC literatura = 0,79) (Preglednica XII).



Preglednica XII: AUC pri preiskovanih parametrih (N = 55).

parameter	AUC naša	AUC literatura
IG (%)	0,89	0,79
Lkc (10⁹/L)	0,76	0,53
CRP (mg/L)	0,59	0,76

Slika 28: ROC krivulja za preiskovane parametre.

Ocenjevali so tudi napovedno vrednost % IG v primerjavi s celokupnim številom levkocitov in CRP v diagnostiki, invazivnosti in resnosti okužb. Bolnikom s sumom na okužbo so kri odvzeli tri dni zaporedoma in ugotovili, da CRP in % IG naraščata s stopnjo invazivnosti okužbe ter, da je % IG višji pri bolnikih, ki so kasneje ob okužbi razvili septični šok v primerjavi s tistimi, ki ga niso. Zaključili so, da je delež IG v kombinaciji s CRP in levkociti bolj uporaben parameter za odkrivanje in spremljanje resnosti okužb (38).

V literaturi navajajo, da vrednosti IG > 3 % z 90 % specifičnostjo napovedujejo bakterijsko okužbo ter imajo pod 0,5 % IG visoko negativno napovedno vrednost (39). Za naše bolnike z okužbami smo določili mejno vrednost > 1,5 % IG s 77 % občutljivostjo in 100 % specifičnostjo. IG > 3 % smo določili pri skoraj vseh naših bolnikih s sepsa (95 %), pri večini

bolnikov z okužbami (67 %) ter pri dobri polovico bolnikov, za katere ne poznamo diagnoze (52 %).

V skupini hematoloških bolnikov jih je bilo največ z MPB in plazmocitomom, zato smo za ti dve skupini preverjali razliko. Po pričakovanjih je bil delež IG statistično značilno višji pri bolnikih z MPB (Me = 10,1) v primerjavi z bolniki s plazmocitomom (Me = 6,65) (P = 0,0060) (Slika 17). Zanimalo nas je tudi, ali se delež IG pri bolnikih s sepsa razlikuje od hematoloških bolnikov. Ugotovili smo, da je ta razlika med bolniki s sepsa in MPB statistično značilna, medtem ko bolnike s sepsa in plazmocitomom med seboj ne moremo ločiti le na podlagi deleža IG.

V različnih študijah so določali referenčne vrednosti za IG na zdravi populaciji. Določili so različne zgornje mejne vrednosti, in sicer 0,5 % oz. $0,003 \times 10^9/L$ (40), 0,8 % (37), 0,22 % oz. $0,01 \times 10^9/L$ (18) in 0,9% oz $0,07 \times 10^9/L$ (41).

Zaključimo lahko, da je delež IG določen s hematološkim analizatorjem dobra podlaga za dodatne preiskave ter da s kombinacijo obeh načinov določanja zagotavljamo najboljšo kakovost rezultatov. Parameter IG se določa hkratno z ostalimi parametri krvne slike ter nam s tem daje dodatne informacije o krvni sliki brez dodatnih stroškov in dodatnega odvzema krvi.

6 ZAKLJUČKI

- Ugotovili smo zmerno do dobro povezavo med deležem IG določenim z mikroskopsko DKS in s hematološkim analizatorjem Sysmex XN-1000 ($r = 0,594$) za vse zbrane vzorce določenega časovnega obdobja.
- Opredelili smo zanesljivost opozoril analizatorja na prisotnost IG pri mejni vrednosti 1 % in določili 73 % občutljivost, 88 % specifičnost ter 92 % NNV in nekoliko slabšo PNV (63 %) opozoril.
- Pokazali smo, da lahko dvignemo mejno vrednost IG za mikroskopski pregled krvnega razmaza na 3 %, kljub slabši občutljivosti in specifičnosti testa, saj se s tem zmanjša obseg mikroskopskih pregledov krvnih razmazov, ne spregledamo pa nič ključnega.
- Pri mejni vrednosti deleža $IG \geq 1$ % smo najboljšo korelacijo ugotovili med hematološkima analizatorjema Sysmex XN-1000 in Beckman Coulter DxH 800 ter najslabšo med analizatorjem Beckman Coulter DxH 800 in ročno DKS. Ugotovili smo, da se z večanjem mediane deleža IG izboljšuje korelacija med preiskovanimi metodami.
- Ugotovili smo, da je delež IG določen s hematološkim analizatorjem Sysmex XN-1000 v povprečju za 1,9 do 3,1 % višji v primerjavi z mikroskopsko DKS, medtem ko je ta razlika pri analizatorju Beckman Coulter DxH-800 znašala le 0,2 do 0,7 %.
- Najvišji delež IG smo določili pri bolnikih s krvnimi boleznimi. Ta je bil značilno višji v primerjavi z bolniki z okužbami in bolniki z neznano. Med hematološkimi bolniki je bil delež IG najvišji pri bolnikih z MPB.
- Pri bolnikih z okužbami je bil delež IG najvišji pri tistih s potrjeno sepso, ter je bil statistično značilno višji, kot pri bolnikih s pljučnico. Za bolnike z okužbami smo za analizator Sysmex XN-1000 določili mejno vrednost $> 1,5$ % IG pri 77 % občutljivosti in 100 % specifičnosti.

7 LITERATURA

1. Bain BJ: Basic haematological techniques. In Dacie and Lewis Practical Haematology. Eleventh Edition, Churchill Livingstone 2011; 3: 42-48.
2. Sysmex corporation: The Immature Granulocyte Count – The first to know about inflammation ;Sysmex Xtra online. 2011 (dostopno na http://www.sysmex.nl/fileadmin/media/f100/Xtra/Xtra_article_The_Immature_Granulocyte_Count.pdf .) (Dostopno 2.3.2016)
3. Nierhaus A, Klatte S, Linssen J, Eisman N M, Wichann D, Hedke J, Braune A S, Klugr Stefan: Revisiting the white blood cell count: immature granulocytes count as a diagnostic marker to discriminate between SIRS and sepsis – a prospective, observational study. BMC Immunology 2013; 14: 8-17.
4. Mare TA Treacher DF, Shankar-Hari M, Beale R, Lewis SM, Chamber DJ, Brown KA: The diagnostic and prognostic significance of monitoring blood levels of immature neutrophils in patients with systemic inflammation. Critical Care 2015; 19:57.
5. Košnik M, Mravlje F, Štajer D, Černelč P, Koželj M: interna medicina, 4. izdaja, Littera Picta d.o.o. Slovensko medicinsko društvo, Ljubljana, 2011; 53-55, 1243-1244, 1247-1248, 1309-1321.
6. Barbara J. Bain: Blood Cells A Practical Guide, Fourth Edition, Blackwell Publishing 2006; 90-123.
7. Ciesla B: Hematology in Practice,; F. A. Davis Company, Philadelphia, 2007; 144-149.
8. Drew Provan, et al.: Oxford Handbook of Clinical Haematology, Second edition
© Oxford University Press 2004; 134-148.
9. Podgornik H, Pretnar J, Černelč P: Atlas krvnih celi, Slovensko društvo za hematološko diagnostiko, Ljubljana 2013; 3: 13-16.

10. Sysmex corporation, Automated hematology analyzer, Xn series: Navodila za uporabo, 2010-2013. Dostopno v specializiranem hematološkem laboratoriju.
11. Beck N. Diagnostic Hematology, Springer-Verlag London Limited 2009; 317-354.
12. Jereb M, Trampuž A: Novosti v patogenezi in zdravljenju sepse. Zdrav Vest. 2003; 72:675-80.
13. Hotton J, PharmD, Broothaers J, Swaelens C, Cantinieaux B, MD: Performance and Abnormal Cell Flagging Comparisons of Three Automated Blood Cell Counter. Am J Clin Pathol 2013; 140: 845-852.
14. Tan BT, MD, PhD, Nova AJ, George TI, MD: Evaluation of the Beckman Coulter UniCel DxH 800, Beckman Coulter Lh 750, and Abbott Diagnostics Cell-Dyn Sapphire Hematology Analyzers on Adult Specimens in a Tertiary Care Hospital. Am J Clin Pathol. 2011; 135: 939-951.
15. Weiland Th , Kalman H, Heihn H: Evaluation of the Automated Immature Granulocyte Count (IG) on Sysmex XE-2100 Automated Haematology Analyser vs. Visual Microscopy (NCCLS H20-A). Sysmex Journal International. 2002; 12: 63-70.
16. Maenhout TM, Marcelis L: Immature granulocyte count in peripheral blood by Sysmex haematology XN series compared to microscopic differentiation. J Clin Pathol 2014; 67: 648-650.
17. Fernandes B, MD, Hamaguchi Y: Automated Enumeration of Immature Granulocytes. Am J Clin Pathol 2007; 128:454-463.
18. Geneviévé F, Galois AC, Mercier-Bataille D, Wagner-Ballon O, Trimoreau F, Fenneteau O, Schillinger F, Leymarie V, Girard S, Settegrana C, Daliphard S, Soenen-Cornu V, Cividin M, Lesesve JF, Chatelain B, Troussard X, Bardet V: Smear microscopy revision: propositions by the GFHC. Feuilletts de Biologie. 2014; 314: 1-9.
19. Barnes PW, McFadden SL, Machin SJ, Simson E: The international consensus group for hematology review: Suggested criteria for action following automated CBC and WBC differential analysis. Laboratory Hematology. 2005;11:83-90.

20. Rosenthal N, Connell B, Brown B, Kruger J, Capper M, Blaine K: Automated Immature Granulocyte Counts on the new Sysmex XNTM Automated Hematology Analyzer. *Int J Lab Hematol.* 2012; 34: 1-180.
21. Hotton J, PharmD, Broothaers J, Swaelens C, Cantinieaux B, MD: Performance and Abnormal Cell Flagging Comparisons of Three Automated Blood Cell Counter. *Am J Clin Pathol* 2013; 140: 845-852.
22. https://www.sysmex.com/us/en/Brochures/XN-Series_Main_Brochure_MKT-10-1174.pdf (Dostopno 2.3.2016).
23. <http://www.sysmex-europe.com/academy/knowledge-centre/measurement-technologies/fluorescence-flow-cytometry.html> (Dostopno 2.3.2016).
24. https://www.sysmex.com/us/en/Brochures/XNSeries_Main_Brochure_MKT-10-1174.pdf (Dostopno 2.3.2016).
25. <http://www.sysmex-europe.com/academy/knowledge-centre/calendar-2014/measurement-technology-and-scattergram.html> (Dostopno 8.3.2016).
26. <https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/wsr/index.htm> (Dostopno 6.6.2016).
27. Brent T, Armando J, Tracy IG: Evaluation of the Beckman Coulter UniCel DxH 800 and Abbott Diagnostics Cell-Dyn Sapphire Hematology Analyzers on Pediatric and Neonatal Specimens in a Tertiary Care Hospital. *Am J Clin Pathol.* 2011; 135: 929-938.
28. Jean A, Boutet C, Lenormand B, et al. The new haematology analyzer DxH 800: an evaluation of the analytical performances and leucocyte flags, comparison with the LH 755. *Int J Lab Hematol.* 2011; 33:138–145.
29. https://www.beckmancoulter.com/ucm/idc/groups/public/documents/webasset/glb_bci_156438.pdf (Dostopno 6.6.2016).
30. Berce K, Božnar Alič E, Podgornik H, Trampuš Bakija A, Žontar D: Priporočeni postopki za mikroskopski pregled krvnega razmaza, Slovensko združenje za klinično kemijo (SZKK), Ljubljana, 2012.
31. M. Gobec, Et al, Vaje iz klinične kemije, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2015.

32. Standardni operativni postopek, Diferencialna krvna slika (SHL-20-012-03). Dostopno v specializiranem hematološkem laboratoriju. (Dostopno 22.4.2016)
33. Osredkar J., Marc J., Laboratorijska medicina I., Učbenik za študente medicine, farmacije in laboratorijske biomedicine, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2012: 14-46.
34. Editorial I: Using the Bland-Altman method to measure agreement with repeated measures. *Br J Anaesth.* 2007; 99(3): 309-311.
35. Lajovic J. Ujemanje metod merjenja-praktični pristop. *Strokovna revija ISIS*, 2010; 10: 44-48.
36. Eilertsen H, Mcs, Hagve T, MD, PhD: Do the Flags Related to Immature granulocytes Reported by the Sysmex XE-500 Warrant a Microscopic Slide Review? *Am J Clin Pathol* 2014; 142:553-560.
37. Senthilnayagam B, Kumar T, Sukumaran J, Jeya M, Rao K R: Automated Measurement of Immature Granulocytes: Performance Characteristics and Utility in Routine Clinical Practice. *Pathology Research International*; 2012, Article ID 483670, 6 pages, 2012. doi:10.1155/2012/483670.
38. van der Geest PJ, Mohseni M, Brouwer R, van der Hoven B, Steyerberg EW, Groeneveld AB: Immature granulocytes predict microbial infection and its adverse sequale in the intensive care unit. *J Crit Care.* 2014; 29: 523-7.
39. Ansari-Lari MA, Kickler TS, Borowitz MJ: Immature granulocyte measurement using the Sysmex XE-2100. Relationship to infection and sepsis. *Am J Clin Pathol* 2003, 120: 795–799.
40. Bruegel M, Fiedler GM, Matthes G, Triery J: Reference Values for Immature Granulocytes in Healthy Blood Donors Genereted on the Sysmex XE-2100 Automated Hematology Analyse. *Sysmex Journal International.* 2004; 14: 5-7.
41. Roehrl MH, 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.

PRILOGA

Preglednica 1 : Podatki za hematološke bolnike.

ZAP. ŠT.	IG SYSMEX (%)	IG COULTER (%)	Lkc (x10 ⁹ /L)	Nevtrofilci (%)	IG DKS (%)	CRP (mg/L)
1	8,2	3,9	13,35	76,3	2,5	NP
2	9,1	5,3	5,4	58,4	9	Pod 5
3	2,6	/	7,39	64,7	2,5	Pod 5
4	12	8,7	18,91	33,9	14	30
5	2,2	/	5,39	55,1	0	165
6	8,1	/	10,18	32,3	9,5	33
7	4,2	/	1,42	60,6	0	137
8	1,9	/	4,2	48,7	1	11
9	1	/	60,9	64,4	1	Pod 5
10	1,2	1,2	9,51	93,7	0	21
11	4,6	1,6	18,71	78,2	4	NP
12	7,5	/	3,47	40,9	5	20
13	2	/	5,48	51,6	1	Pod 5
14	6,6	2,5	5	53,6	7,5	NP
15	3,6	0,4	3,6	73,3	3	Pod 5
16	1	/	4,86	49,2	1	Pod 5
17	10,3	/	2,82	51,7	1	81
18	20,1	/	6,95	51,6	12,5	17
19	1,1	/	5,23	35,1	0,5	Pod 5
20	9,5	/	3,47	53	10	16
21	5,5	/	5,81	48,9	0	24
22	12,8	/	5,47	37,1	13	Pod 5
23	8,2	7,1	16,45	62,1	6	7
24	26,1	25,4	27,9	60,9	16,5	8
25	3,3	3,7	14,14	78,8	1,5	NP
26	23,1	9,8	100,37	54,4	18	Pod 5
27	24,6	14,9	7,73	39	10,5	11
28	2,9	2,4	6,26	74,1	1,5	17
29	6,3	0,6	6,88	68,5	1	Pod 5
30	12,8	4,8	10,24	66,7	9,5	NP
31	10,4	5,2	17,05	69,1	3	16
32	4	1,8	3,25	56,3	2	49
33	4,7	2,5	3,83	57,8	2,5	Pod 5
34	8,1	7,7	6,95	42,9	3	Pod 5
35	11,5	3,5	3,56	45,2	0,5	116
36	6,1	3,8	4,45	40,3	4	5
37	8,8	2,1	2,95	27,2	4,5	81

38	4,3	/	14,63	56,2	1	15
39	14,9	11,8	21,8	65,7	24	30
40	4,4	0,2	304,5	3,6	1,5	92
41	3,4	/	28,32	14,8	1,5	14
42	9,4	6,7	5,34	47,2	3,5	Pod 5
43	8,6	5,2	7,76	34,1	4	34
44	9,8	9,7	7,17	49,7	6,5	Pod 5
45	6,2	1,1	7,23	83,1	1	Pod 5
46	6,2	/	6,25	54,2	1	108
47	7,2	1,8	4,69	72,8	2,5	13
48	1,3	1	6,2	24,8	0,5	Pod 5
49	10,4	7,7	8,25	68,7	1	52
50	12,2	7,3	10,73	71,4	11	13
51	2,2	0,7	19	75,7	0	9
52	7	3,7	7,43	63,5	6,5	77
53	10	4,8	13,76	47,7	4,5	80
54	5,7	/	5,25	52,7	0,5	42
55	9,4	0,5	4,9	70,6	0,5	346
56	8,2	10,9	9,04	50,8	3,5	27
57	7,9	7	5,56	47,6	4,5	36
58	9,3	/	4,93	58,6	4	65
59	10	/	3,01	9,7	9,5	54
60	19,2	20,7	6,52	50,9	17	6
61	27,3	22,4	26,56	50,7	32,5	NP

Preglednica 2: Podatki za infekcijske bolnike.

ZAP. ŠT.	IG SYSMEX (%)	IG COULTER (%)	Lkc (x10 ⁹ /L)	Nevtrofilci (%)	IG DKS (%)	CRP (mg/L)
1	6,3	4,4	15,35	84,7	1,5	53
2	1,7	0,7	7,44	79,6	1	NP
3	3,8	2,4	13,01	71,3	2	19
4	2,6	1,1	10,55	76,4	1	NP
5	8,1	/	6,14	73	3	104
6	3	/	4,67	18,4	3,5	137
7	3,5	1,3	35,85	84,5	2,5	320
8	2,9	1	9,25	81	1,5	113
9	8,3	3,5	28,53	79,2	6	170
10	1	0,3	10,27	82,8	0,5	173
11	2,9	0,9	18,65	91,5	1,5	246
12	6,9	4,8	9,91	64,5	2	74
13	6	3,9	6,67	54,1	1	156
14	12,5	7,6	19,63	55,7	5	163

15	8,5	1,3	10,65	62,9	5	61
16	2,4	0,7	14,32	78,8	1,5	304
17	2,9	1,1	22,06	87,3	1,5	49
18	1	1,2	8,88	82	2	191
19	15,6	18,2	24,04	59,5	3,5	212
20	1,1	0,2	15,23	78,7	1,5	189
21	5,3	1,7	21,85	89	5,5	176
22	3,3	1	13,46	73,3	2,5	215
23	0,6	0,4	1,7	31,8	0,5	9
24	2,1	0,8	14,33	89,7	2	56
25	1,4	1,3	8,8	73,3	1,5	91
26	1,8	1,5	6,24	77,3	2	39
27	2,5	1,2	18,85	85,1	2	53
28	3	1,7	12,29	83,9	1	65
29	5,8	4,3	18,85	72,1	1,5	161
30	11,5	3,4	26,17	81,6	9	128
31	2,5	1,3	10,76	82,6	1	85
32	3,5	1,6	13,89	84	2	192
33	1,3	0,4	20,33	85,1	1	401
34	5,3	3	7,18	77,1	5	318
35	4,1	2,1	7,84	78,6	2	14
36	3,8	1,7	10,4	77,8	3,5	155
37	7,8	4,6	35,09	80,2	4	246
38	3	1,8	14	83	3	173
39	1,9	0,9	12,13	85,1	1	71
40	5,9	1,8	13,04	80,3	1	305
41	13,4	3,2	10,13	63,1	4,5	261
42	1,4	0,6	17,28	89,5	1	24
43	1,5	0	7,4	70,1	0,5	68
44	3,5	2,8	35,8	97,1	4,5	395
45	1,1	0,5	7,8	70,6	1	56
46	7,5	1,2	19,8	87,6	4,5	198
47	1,5	/	0,8	23,8	2	Pod 5
48	2,5	1,8	8,5	88,1	1	259
49	2,8	2,3	12	72,5	1	51
50	10,2	7,7	39,2	92,8	4,5	204
51	1,2	0,5	14,7	77,8	1,5	205
52	3,2	1,1	14,1	84,7	1	215
53	0,5	0,3	25,5	94,6	0,5	99
54	2,8	2,3	31,2	87,5	1,5	135
55	3,2	1,6	12,6	88,8	1,5	126

Preglednica 3: Podatki za bolnike brez znane diagnoze.

ZAP. ŠT.	IG SYSMEX (%)	IG COULTER (%)	Lkc (x10 ⁹ /L)	Nevtrofilci (%)	IG DKS (%)
1	1,3	0,8	17,45	87,8	1
2	23,9	21,3	28,86	52,3	13
3	4,2	1,3	25,5	91,3	3,5
4	7,8	1,7	19,47	77,1	5
5	1	/	6,3	78,4	0
6	2,8	0,6	25,2	83,4	1
7	20,6	21,7	29,89	59,7	14
8	2,8	0,9	15,97	88,7	0
9	19,6	/	24,94	62	24,5
10	2,3	/	4,28	69,4	2,5
11	1,1	0,8	13,63	84,5	1
12	1,2	0,5	25,06	89	0
13	1,5	1,1	12,2	86,1	1
14	7	2,2	7,4	76,3	8
15	1	2,3	12,28	81,9	0
16	8,9	9,6	15,65	70,3	6,5
17	1,3	1	9,96	81,6	0
18	2,5	2,2	11,26	83,2	0,5
19	7,2	0,7	12,3	76,6	0
20	16,3	14,4	31,15	62,1	7
21	1,8	12,2	26,31	88,7	0
22	4,5	2,5	14,27	77,8	1,5
23	1,2	0,1	9,98	85,3	0,5
24	3,4	1,9	9,48	74,8	1
25	2,3	0,9	6,42	69,3	1
26	3,5	0,1	56,75	96	0
27	3,6	1,4	6,89	66,9	1,5
28	1,2	0,7	8,97	81,6	0,5
29	2,2	0,3	22,47	85,1	0,5
30	3,9	0,5	51,76	95	0
31	2,6	1,1	12,97	74,4	2
32	6,4	2,9	9,72	67,6	1
33	2,1	0,6	6,72	80,1	0
34	1,5	0,5	12,12	76,7	0
35	1,3	0,9	8,59	89,9	3,5
36	2,6	1,5	10,15	75,8	0
37	10,8	6	11,8	65,4	2,5
38	15,5	/	29,76	75	4
39	3,7	2,4	9,52	79,2	2,5

40	1	0,3	22,8	86,9	0
41	3,9	1,9	6,72	74	2,5
42	1,5	0,7	10,61	7409	1,5
43	1	0,4	7,21	59,6	0,5
44	1,5	0,5	12,81	88,2	0
45	5,2	0,3	24,23	88,2	7,5
46	5,9	2,3	5,07	74	3
47	2,3	1,4	9,89	66,8	2