

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NATALIJA FRANKOVIČ

**DOLOČANJE POVPREČNE FLUORESCENCE  
ERITROCITOV Z EOSIN -5- MALEIMIDOM**

DIPLOMSKA NALOGA  
VISOKOŠOLSKI STROKOVNI PROGRAM  
LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NATALIJA FRANKOVIČ

**DOLOČANJE POVPREČNE FLUORESCENCE  
ERITROCITOV Z EOSIN -5- MALEIMIDOM**

DETERMINATION OF RED BLOOD CELL MEAN  
FLUORESCENCE BY EOSIN -5- MALEIMIDE

DIPLOMSKA NALOGA  
VISOKOŠOLSKI STROKOVNI PROGRAM  
LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2014

Diplomsko nalogo sem opravljala v Specializiranem laboratoriju Kliničnega oddelka za hematologijo v Ljubljani, pod mentorstvom doc. dr. Uroša Mlakarja, dr. med. in somentorstvom doc. dr. Helene Podgornik, spec. med. biok.

Zahvaljujem se doc. dr. Urošu Mlakarju, dr. med. in doc. dr. Heleni Podgornik, spec. med. biok. za strokovno pomoč in nasvete pri izdelavi diplomske naloge. Posebna zahvala gre tudi Ivanki Nerad, ki mi je nesebično pomagala pri analiziranju vzorcev, pa tudi Darji Žontar in Alenki Babnik.

Največja zahvala moji družini, ki mi je v času študija vedno stala ob strani, me podpirala in ves čas verjela vame.

Hvala tudi vsem ostalim, ki ste kakorkoli pomagali pri izdelavi diplomske naloge.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Uroša Mlakarja, dr. med. in somentorstvom doc. dr. Helene Podgornik, spec. med. biok.

Ljubljana, 2014

Natalija Frankovič

## KAZALO VSEBINE

<b>I.</b>	<b>POVZETEK</b>
.....	<b>7</b>
<b>II.</b>	<b>SEZNAM OKRAJŠAV</b>
.....	<b>9</b>
<b>1 UVOD</b> .....	<b>10</b>
1.1 ZGRADBA IN DELOVANJE ERITROCITOV .....	10
1.2 ANEMIJE .....	11
1.2.1 Hemolitične anemije.....	12
1.3 DEDNA HEMOLITIČNA ANEMIJA ZARADI NAPAKE V ERITROCITNI MEMBRANI .....	13
1.3.1 Laboratorijska diagnostika .....	16
1.4 TESTI UGOTAVLJANJA SFEROCITOZE.....	17
1.5 OPIS IN DELOVANJE PRETOČNEGA CITOMETRA .....	20
<b>2 NAMEN DELA</b> .....	<b>22</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>23</b>
3.1 PREISKOVANCI .....	23
3.2 POSTOPEK DOLOČANJA POVPREČNE FLUORESCENCE ERITROCITOV .....	23
3.2.1 Odvzem in dostava vzorca.....	23
3.2.2 Princip določanja .....	23
3.2.3 Reagenti, kalibratorji, kontrole.....	23
3.2.4 Instrumenti in oprema.....	24
3.2.5 Delovni postopek.....	24
3.2.6 Podajanje rezultatov .....	25
3.3 STATISTIČNA OBDELAVA REZULTATOV .....	25
<b>4 REZULTATI</b> .....	<b>26</b>

4.1	Določanje stabilnosti zamrznjene koncentrirane raztopine EMA .....	26
4.2	Ponovljivost določanja PFE.....	28
4.3	Določitev spodnje mejne vrednosti PFE pri zdravih preiskovancih.....	29
4.4	Indeksa PSVE in PVE pri zdravih preiskovancih.....	31
4.5	Določanje presejalnih parametrov pri bolnikih s podedovano sferocitozo.....	32
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA .....</b>	<b>36</b>
5.1	Uporaba odtajane raztopine EMA .....	36
5.2	Ponovljivost določanja povprečne fluorescence eritrocitov (PFE).....	36
5.3	Določitev spodnje mejne vrednosti PFE pri zdravih preiskovancih in določitev praznje vrednosti za PS.....	36
5.5	Uporaba presejalnih parametrov PSVE in PVE pri podedovani sferocitozi (PS)	37
<b>6</b>	<b>SKLEPI .....</b>	<b>39</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>40</b>
<b>8</b>	<b>PRILOGA .....</b>	<b>42</b>

## KAZALO SLIK

Slika 1: Dozorevanje eritrocita.....	10
Slika 2: Šesterokotna mreža ogrodja (4).....	14
Slika 3: Zgradba eritrocitne membrane (5).....	15
Slika 4: Prikaz sferocitov v krvnem razmazu.....	17
Slika 5: Test ozmotske rezistence pri podedovani sferocitozi (4).....	18
Slika 6: Denaturacija proteinov z SDS (10).....	20
Slika 7: Histogram fluorescence eritrocitov pri vzorcu bolnika s PS (A) in vzorcu zdravega preiskovanca (B).....	25
Slika 8: Meritve PFE s svežo in odtajano koncentrirano raztopino.....	26
Slika 9: Odvisnost vrednosti PFE (sveže barvilo) in PFE (odtajano barvilo).....	27
Slika 10: Primerjava PFE vzorcev merjenih s svežo koncentrirano raztopino in z odtajano koncentrirano raztopino EMA.....	27
Slika 11: Primerjava meritev PFE opravljenih takoj in po 24-urnim zamikom.....	28
Slika 12: Vrednosti PFE pri krvnih vzorcih z vrednostmi levkocitov in trombocitov v in izven referenčnih meja.....	29
Slika 13: Vrednosti PFE kontrolnih skupin glede na dan določanja PFE.....	30
Slika 14: Razmerje PSVE/PVE (%) ter razlika PVE-PSVE (fL) pri zdravih preiskovancih.....	31
Slika 15: Vrednosti PFE pri normalnih vzorcih in vzorcih s PS.....	32
Slika 16: Vrednost PSVE/PVE (%) pri normalnih vzorcih in vzorcih s PS.....	33
Slika 17: Vrednost PVE-PSVE (fL) pri normalnih vzorcih in vzorcih s PS.....	34
Slika 18: ROC krivulja, diagnostična točnost parametra PVE-PSVE (fL) pri podedovani sferocitozi.....	35
Slika 19: ROC krivulja, diagnostična točnost parametra PSVE/PVE (%) pri podedovani sferocitozi.....	35

## KAZALO TABEL

Tabela 1: Primerjava mediane parametrov pri normalnih vzorcih in vzorcih bolnikov s podedovano sferocitozo .....	32
Tabela 2: Vrednosti za izračun napovedne vrednosti .....	37

## KAZALO PRILOG

Priloga 1: Razvrstitev anemij (1).....	42
Priloga 2: Laboratorijske značilnosti hemolitične anemije (1).....	43
Priloga 3: Spremembe eritrocitov v krvnem razmazu pri HA (1).....	43
Priloga 4: Shema patofiziologije podedovane sferocitoze (3).....	44
Priloga 5: Shema pretočnega citometra (12) .....	44
Priloga 6: Določitev PFE s svežo in odtajano koncentrirano raztopino EMA .....	45
Priloga 7: Prikaz ponovljivosti določanja PFE takoj in po 24-ih urah .....	47
Priloga 8: Parametri krvne slike v območju referenčnih mej .....	48
Priloga 9: Parametri krvne slike z odstopanjem od referenčnih vrednostih .....	49
Priloga 10: Določanje vrednosti PFE pri preiskovancih brez odstopanja v krvni sliki.....	50
Priloga 11: Določanje vrednosti PFE pri preiskovancih z odstopanjem v krvni sliki.....	53
Priloga 12: Presejalni parametri pri bolnikih s PS.....	55

## I. POVZETEK

Podedovana sferocitoza (PS) spada med dedne hemolitične anemije, za katero so značilni številni sferociti v krvi. Nastane kot posledica nepravilnosti v proteinskem ogrodju membrane. Med vzroke nastale bolezni prištevamo pomanjkanje proteina 4.2, beljakovine 3 (AE1), ankirina in / ali spektrina.

Pri diagnostiki se poslužujemo presejalnih in potrditvenih testov. Med presejalnimi testi se je v zadnjem desetletju najbolje uveljavil test vezave eosin -5- maleimida (EMA) na eritrocite. Test temelji na merjenju povprečne fluorescence eritrocitov (PFE) s pomočjo pretočne citometrije. Zaradi pomanjkanja beljakovine AE1 pri PS, je vrednost PFE pri bolnikih s to boleznijo manjša. Ker pa je pretočna citometrija relativno težje dostopna, se z razvojem hematoloških analizatorjih pojavljajo tudi novi, predvsem raziskovalni parametri, ki prevzemajo vlogo presejalnih kazalcev za nadaljnjo zahtevnejšo diagnostiko. Tak je npr. povprečni sferični volumen eritrocitov (PSVE).

Cilj naše naloge je bil določiti spodnjo mejno vrednost PFE. V raziskavo smo vključili 186 vzorcev krvi zdravih preiskovancev in bolnikov brez PS in anemije, katerim smo s pretočnim citometrom izmerili vrednost PFE. Kot spodnjo mejno vrednost PFE smo določili vrednost 35,7 enot. Pri nobenem od zdravih bolnikov nismo določili PFE nižje od te vrednosti (100% specifičnost).

V nalogi smo tudi preverili stabilnost predpriprave koncentrirane raztopine fluorescenčnega barvila. Vrednost PFE smo merili s svežo pripravljeno raztopino barvila in z odtajano (predhodno zamrznjena na  $-20^{\circ}\text{C}$ ). glede na razlike vrednosti PFE, merjene z odtajano raztopino lahko zaključimo, da uporaba zamrznjene, vnaprej pripravljene raztopine ni primerna.

Za izvajanje notranje kontrole kakovosti pri vsakem izvajanju preiskave naredimo tudi analizo 6-ih vzorcev krvi. V našem delu smo preverili vpliv različnih odstopanj v krvni sliki na PFE, da bi opredelili, kaj je primeren kontrolni vzorec. Ugotovili smo, da je EMA test tako specifičen za prirojene korpuskularne anemije, med katerimi je PS najpogostejša, da smemo za notranjo kontrolo vzeti skorajda poljubni vzorec krvi.

Kot presejalni test PS je primernejše uporabiti razliko PVE-PSVE ( $< 9,6 \text{ fL}$ ), kot pa kvocient PSVE/PVE ( $> 94,8\%$ ), saj ima slednji dokaj slabo specifičnost.

Vrednost PVE nam pove povprečni volumen eritrocita.



## **II. SEZNAM OKRAJŠAV**

Hb - hemoglobin

HA - hemolitične anemije

PVE - povprečni volumen eritrocitov

PNH - paroksizmalna nočna hemoglobinurija

LDH - laktat dehidrogenaza

G/E - G- granulociti, E- eritroblasti

AIHA - avtoimunska hemolitična anemija

G - 6 - PD - glukoza -6- fosfat dehidrogenaza

PS - podedovana sferocitoza

AE1 - beljakovina 3

PKHE - povprečna koncentracija hemoglobina v eritrocitih

PHE - povprečna količina hemoglobina v eritrocitih

KVVE - koeficient variacije volumna eritrocitov

PSVE - povprečni sferični volumen eritrocitov

PFE - povprečna fluorescenca eritrocitov

SDS - PAGE - poliakrilamidna gelska elektroforeza z natrijevim dodecilsulfatom

SDS - natrijev dodecilsulfat

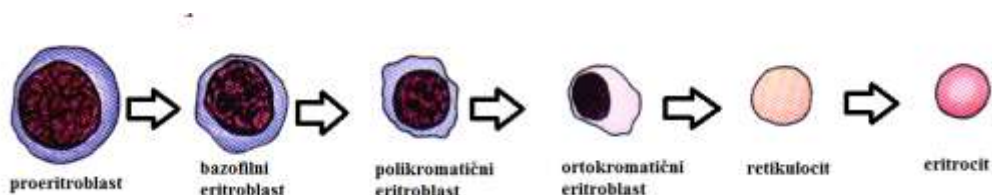
EMA - eosin -5- maleimid

K - EDTA - kalijeve sol - etilendiamintetraacetne kisline

# 1 UVOD

## 1.1 ZGRADBA IN DELOVANJE ERITROCITOV

Tako kot vse druge krvne celice tudi eritrociti nenehno odmirajo. Njihovo število v krvi se ohranja v fizioloških mejah, ker nepretrgano nastajajo in se izplavljajo iz kostnega mozga. Pri nastajanju eritrocitov (eritropoeza) gre za dva procesa, ki potekata hkrati: delitev (proliferacija) in dozorevanje (diferenciacija). Šele iz matičnih celic, usmerjenih v rdečo vrsto, nastajajo značilni predhodniki, ki jih lahko morfološko razlikujemo od drugih celic. S skupnim imenom jih imenujemo eritroblasti. Razvoj poteka po naslednjih stopnjah: proeritroblast, bazofilni eritroblast, polikromatični eritroblast, ortokromatični eritroblast, retikulocit, eritrocit. (slika 1).



**Slika 1: Dozorevanje eritrocita**

Eritrociti spadajo med zrele celice rdeče vrste. Njihova naloga je prenos kisika iz pljuč v periferna tkiva. Ker vsebujejo encim karboanhidrazo, ki katalizira nastajanje in razpad ogljikove kisline ( $H_2CO_3$ ), sodelujejo posredno tudi pri transportu ogljikovega dioksida iz tkiv. So 7 do 8  $\mu m$  velike celice, ki imajo obliko bikonkavne ploščice (diskocit). Vsebujejo krvno barvilo hemoglobin, ki ga je 98 % vseh beljakovin v citoplazmi, kar je posledica, da se pri panoptičnem barvanju obarvajo rožnato oranžno.

Eritrociti nimajo jedra, endoplazemskega retikuluma z ribosomi in mitohodrijev, tako se razlikujejo od drugih krvnih celic. Zato ne porabljajo kisika, niso zmožni delitve in sinteze beljakovin.

Zaradi velike upogljivosti eritrocitne membrane in njene odpornosti proti strižnim silam, lahko eritrociti ob prehodu skozi kapilare spreminjajo obliko. Te lastnosti so posledica zgradbe membrane, ki jo sestavljajo:

- dvoslojna lipidna membrana (plazmalema),
- integralne beljakovine,
- beljakovinsko ogrodje, na katerega se prilega lipidna membrana.

Normalna življenjska doba eritrocitov v krvi je 100 do 120 dni. Ko ostarijo, jih fagocitirajo makrofagi retikuloendotelijskega sistema. Glavno vlogo pri razgradnji ostarelih eritrocitov ima vranica. S staranjem eritrocitov se zmanjša aktivnost številnih encimov, ki vzdržujejo njihovo zgradbo in funkcijo.

Zato se zmanjša upogljivost eritrocitne membrane in poveča krhkost eritrocitov, zmanjša se površinski naboj membrane in poveča količina methemoglobina v eritrocitu.

Te in druge spremembe, ki nastanejo s staranjem eritrocitov, upočasnijo njihov prehod skozi rdečo vranično pulpo.

Za eritrocite neugodno okolje v rdeči pulpi (nizka koncentracija glukoze, blaga hipoksija s hiperkapnijo in nekoliko nižja pH vrednost) dodatno okvari ostarele eritrocite, ki jih nato makrofagi fagocitirajo (1).

## 1.2 ANEMIJE

Anemija ali slabokrvnost je ena izmed najpogostejših bolezni. Lahko se pojavi kot samostojna bolezen, pogosteje pa kot znak oz. simptom številnih drugih bolezni. Nastane zaradi zmanjšanega nastajanja eritrocitov v kostnem mozgu ali skrajšanja življenjske dobe eritrocitov v krvnem obtoku. Svetovna zdravstvena organizacija kot spodnjo normalno vrednost hemoglobina za moške priporoča 130 g/L, za ženske pa 120 g/L.

Po koncentraciji Hb lahko anemijo opredelimo kot:

- blago - Hb > 100 g/L
- srednje hudo - Hb 100 - 70 g/L
- hudo - Hb < 70 g/L

Upoštevati moramo, da je nastanek anemije bolj pogosto posledica drugih bolezni – simptomatska anemija, kot pa samostojna bolezen - idiopatska anemija. Temu ustrezno lahko pri klinični sliki ugotovimo znake osnovne bolezni. Neredko pa je anemija v ospredju klinične slike, medtem ko znakov osnovne bolezni še ni, ali pa so slabo izraženi.

Glede na potek, je lahko anemija akutna ali kronična. Po načinu nastanka pa razlikujemo:

- anemijo zaradi krvavitve
- anemijo zaradi pomanjkljivega nastajanja eritrocitov
- anemijo zaradi hitrejšega razpada eritrocitov

Najpomembnejši znak anemije je bledica kože in sluznice. Na barvo kože vpliva poleg koncentracije hemoglobina v krvi še njena pigmentacija, debelina in prekrvavitev kože. Drugi splošni znaki pa so povečan pulzni tlak, kapilarne pulzacije, povečanje srca, edemi (2).

### 1.2.1 Hemolitične anemije

Nastanejo zaradi povečanega razpada eritrocitov (hemolize). Zaradi hemolize se lahko tvorba eritrocitov petkratno do sedemkratno poveča. Kadar povečana eritropoeza nadomesti povečani razpad eritrocitov, anemije ni. Govorimo o kompenzirani anemiji. Anemija nastopi takrat, ko povečana eritropoeza ne dohaja več povečanega razpada eritrocitov.

Glede na mesto razpada eritrocitov razlikujemo **intravaskularno** (eritrociti razpadejo v krvnem obtoku, hemoglobin se sprosti v plazmo) in **ekstravaskularno** (eritrociti razpadejo v retikuloendotelijskem sistemu, predvsem v vranici) **hemolizo**.

Vzroki za intravaskularni razpad so naslednji: mehanična poškodba eritrocitov, aktivacija komplemента na njihovi površini, toksična okvara (eksogeni toksini). Vzroki za ekstravaskularno hemolizo pa so: na površino eritrocitov vezani imunoglobulini ali komplement, zmanjšana sposobnost eritrocitov za deformacijo, zato so bolj dovzetni za normalne načine razgradnje.

Glede na mesto vzroka za hemolizo pa ločimo **korpuskularne** (vzrok za hemolizo je posledica nepravilnosti v zgradbi eritrocitov) in **ekstrakorpuskularne hemolitične anemije** (vpliv imajo zunanji dejavniki.)

Po povprečnem volumnu eritrocitov (PVE) razdelimo anemije v mikrocitne, makrocitne in normocitne (morfološka klasifikacija). To razvrščanje je pomembno predvsem pri opredelitvi anemij zaradi pomanjkljivega nastajanja eritrocitov.

Pri vsakdanjem delu se uporablja kombinacija patogenetičnega in morfološkega razvrščanja (priloga 1 ) (1, 2).

Kljub različni etiopatogenezi imajo hemolitične anemije (HA) mnogo skupnih kliničnih in laboratorijskih značilnosti. Zlatenica, ki je lahko klinični znak pospešene razgradnje Hb, je bolj ali manj izrazita.

Pri kroničnih hemolitičnih anemijah ugotovimo običajno tudi povečano vranico. Laboratorijski znaki hemolitične anemije so odsev povečane razgradnje eritrocitov in posledično povečane eritropoeze (priloga 2).

Pomembno vlogo v diagnostiki hemolitičnih anemij ima mikroskopski pregled krvnega razmaza. V razmazu krvi lahko ugotovimo značilne morfološke spremembe eritrocitov za določeno hemolitično anemijo (priloga 3 ) (1).

### **1.3 DEDNA HEMOLITIČNA ANEMIJA ZARADI NAPAKE V ERITROCITNI MEMBRANI**

#### **PODEDOVANA SFEROCITOZA (PS)**

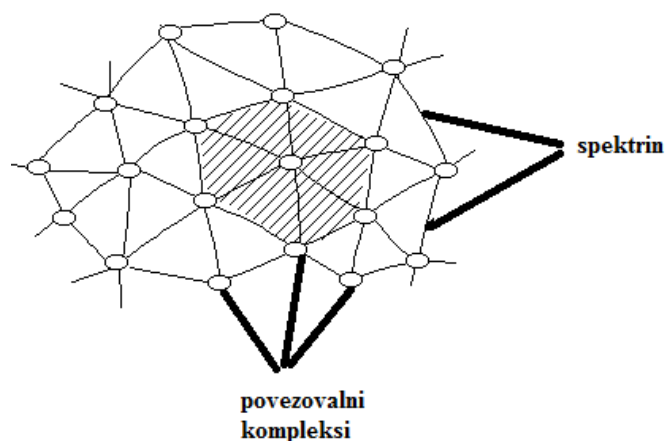
Podedovana sferocitoza (PS) je pri nas najpogostejša vrsta dedne hemolitične anemije, za katero je značilno povečano število sferocitov v krvi. Deduje se dominantno z avtosomnim kromosomom, kar pomeni, da je dovolj, da otrok dobi okvarjen gen le enega od staršev, da se bolezen izrazi pri njem. PS je pri sorodnikih lahko tako blaga, da ne iščejo zdravniške pomoči. Prevalenca bolezni je okoli 22/100.000 prebivalcev in je odvisna od tega, kakšni diagnostični kriteriji so bili uporabljeni.

PS je posledica nenormalnosti v proteinskem ogrodju membrane. Vzroki za nastale napake so pomanjkanje ali disfunkcija proteina 4.2, beljakovine 3 (AE1), ankirina in / ali spektrina.

Ker so lipidne plasti nestabilne, se iz membrane sproščajo lipidi (v obliki mikromehurčkov) zato se zmanjša površina eritrocitne membrane. Posledično nastanejo sferociti, ki pa so manj elastični in v vranici težje prehajajo skozi reže med rdečo pulpo in venskimi sinusi. Površina spremenjenih eritrocitov se dodatno zmanjša, ker se zadržujejo v neugodnem okolju rdeče pulpe (majhna koncentracija glukoze in nizka pH vrednost). Sferocitoza doseže tako stopnjo, da sferociti vranice ne zapustijo več in v njej razpadejo (priloga 4).

Lipidno membrano tvorijo v glavnem fosfolipidi in neesterificirani holesterol. Na beljakovinsko ogrodje je membrana pritrjena s pomočjo glikoforina C in beljakovine 3, ki sta transmembranski beljakovini.

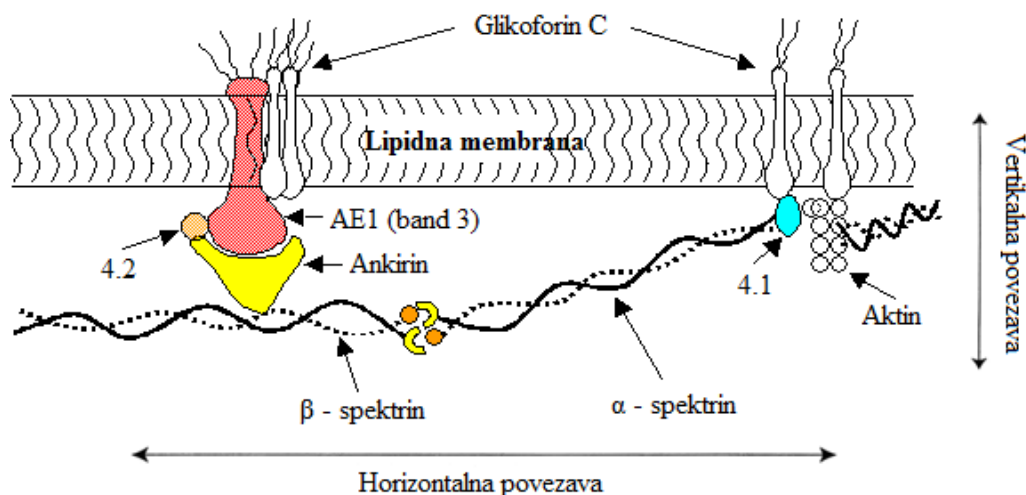
Glavni del beljakovinskega ogrodja pa je spektrin. Je vlaknasta beljakovina, ki jo sestavljata dve izomeri  $\alpha$  in  $\beta$ , povezani v heterodimer. Dva heterodimera povezana stran s stranjo tvorita tetramer. Aktin s pomočjo proteina 4.1 organizira spektrin v šesterokotno mrežo ogrodja (horizontalna povezava) (slika 2).



**Slika 2: Šesterokotna mreža ogrodja (4)**

Ankirin je povezan z anionskim izmenjevalcem, imenovanim band 3 (AE1) na eni strani, na drugi strani pa s  $\beta$  - spektrinom. Protein 4.2 stabilizira njuno povezavo.

Preko proteina 4.1 pa je spektrin povezan z glikoforinom C. Z opisanimi vertikalnimi povezavami je lipidna membrana na več mestih pritrjena na beljakovinsko ogrodje (slika 3) (4, 6) .



**Slika 3: Zgradba eritrocitne membrane (5)**

Med glavne značilnosti podedovane sferocitoze spadajo anemija, zlatenica in povečana vranica. Zaradi povečane eritropoeze je anemija blaga ali pa je ni, zlatenica je običajno zmerna, medtem ko je vranica pri večini povečana. Bolezen se navadno odkrije že v otroštvu. Simptomi se izražajo različno pri različnih družinah.

Za bolezen so značilna hitra poslabšanja anemije, krize, ki jih povzročijo okužbe. Posledica je zmanjšanje števila retikulocitov v krvi in celic rdeče vrste v kostnem mozgu. Medtem pa lahko zlatenica začasno popusti. Poslabšanje anemije lahko povzroči tudi pomanjkanje folatov, ker so zaradi povečane eritropoeze potrebe po folatih večje.

Tako kot pri drugih hemolitičnih anemijah, se tudi pri PS pogosto pojavijo žolčni kamni, ki nastanejo zaradi povečane koncentracije bilirubina v žolču. Predvsem pri starejših bolnikih se včasih pojavijo kronične razjede kože in podkožja goleni, ki se težje zdravijo.

Sredstvo izbora za zdravljenje je splenektomija oz. odstranitev vranice. S tem PS sicer ne ozdravimo, odstranimo pa organ, v katerem sferociti najbolj odmirajo. Po splenektomiji se življenjska doba eritrocitov podaljša. Večina drugih simptomov PS mine. Ostanjejo le sferociti in znižana ozmotska rezistenca eritrocitov.

Splenektomija je potrebna pri vsakem bolniku s PS, razen pri najbolj mili obliki bolezni. Zaradi nevarnosti okužb pri otrocih, opravimo poseg po petem letu starosti. Pred splenektomijo bolnika cepimo s polivalentno pnevmokokno vakcino. Po posegu bolniki običajno nimajo težav. Ponoven pojav anemije je lahko znak obstoja stranske vranice, ki je pri operaciji nismo odstranili in ki po splenektomiji hipertrofira (1).

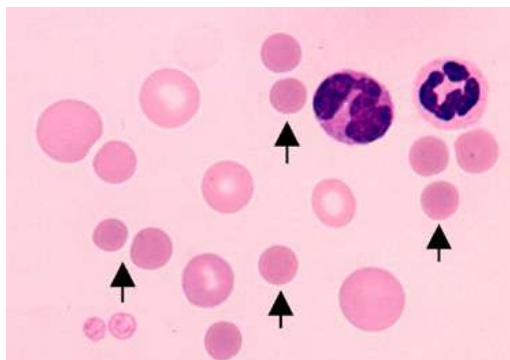
### **1.3.1 Laboratorijska diagnostika**

Z anamnezo in pregledom bolnika se začne diagnostika PS. Pri tem so pomembni podatki o podobni anemiji med krvnimi sorodniki. Značilni klinični znaki za PS so anemija, ki jo navadno ugotovimo že v otroštvu, blaga zlatenica in povečana vranica. Diagnostika se nadaljuje z analizo kompletne krvne slike in nekaterimi biokemičnimi preiskavami. Laboratorijski izsledki ustrezajo ekstravaskularni hemolitični anemiji. Anemija je zmerna. Če število retikulocitov ni močno povečano, je povprečni volumen eritrocitov (PVE) normalen ali nekoliko zmanjšan, povprečna koncentracija hemoglobina (PKHE) pa je nekoliko zvečana.

Za nadaljnjo diagnostiko je pomembna ocena morfologije eritrocitov. V razmazu periferne krvi ugotovimo sferocite, včasih posamezne eritroblaste. Za razliko od normalnih eritrocitov so sferociti manjši, imajo bolj sferično obliko in zato nimajo svetline v sredini (slika 4).

Za diagnozo PS je bil dolgo ključen test osmotske rezistence eritrocitov. Z njim kvantitativno ocenimo stopnjo sferocitoze.





**Slika 4: Prikaz sferocitov v krvnem razmazu**

PS moramo razlikovati od drugih hemolitičnih anemij, pri katerih tudi ugotovimo sferocite v krvnem razmazu. V poštev prihaja predvsem avtoimunska hemolitična anemija (AIHA), za katero je značilen pozitiven direktni Coombsov test. Pri bolnikih s klasično klinično sliko omenjene laboratorijske preiskave zadoščajo za diagnozo PS in nadaljnja diagnostika ni več potrebna. Dodatne preiskave za potrditev so potrebne, če niso prisotne omenjene diagnostične značilnosti in smo izključili druge vzroke za hemolizo. Te dodatne preiskave lahko razdelimo na presejalne teste in potrditev pomanjkanja nekaterih proteinov eritrocitne membrane z elektroforezo (1, 6).

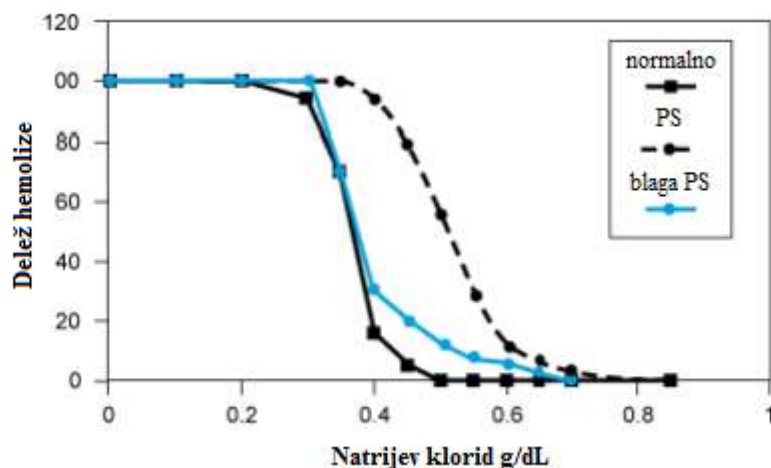
## **1.4 TESTI UGOTAVLJANJA SFERO-CITOZE**

### **1.4.1 Presejalni testi**

#### **Test osmotske rezistence**

Najstarejši test za dokaz sferocitoze je test osmotske rezistence eritrocitov. Z njim kvantitativno ocenimo stopnjo sferocitoze. Merimo odpornost eritrocitov na hipoozmolarno okolje. Za srednjo osmotsko rezistenco vzamemo tisto koncentracijo NaCl, pri kateri je hemoliza eritrocitov 50%.

Sferociti so zaradi manjšega razmerja med površino in volumnom, manj odporni na hipoozmolarno okolje kot eritrociti. Zato pri PS 50% hemoliza nastopi pri manj zmanjšani koncentraciji NaCl. Običajno 50% hemoliza eritrocitov nastopi med 0,40 in 0,44% NaCl (slika 5) (1, 4).



Slika 5: Test ozmotske rezistence pri podedovani sferocitozi (4)

### Test hipertonične kriohemolize

Sferociti v hiperozmolarnem okolju so še posebej občutljivi na temperaturne spremembe. Na osnovi teh značilnosti je predstavljen nov diagnostični test, ki sta ga razvila Streichman in Gescheidt. Test je visoko specifičen in dovolj občutljiv za dokazovanje PS pri vseh bolnikih, vključno z asimptomatskimi nosilci bolezni. Za razliko od drugih metod diagnosticiranja PS, omenjeni test ni odvisen od celičnega razmerja površina – volumen.

### Eritrocitni indeksi

Eritrocitni indeksi so številčni podatki, ki prikazujejo značilnosti eritrocitov, kot sta volumen (velikost) in obarvanost. Slednja nam pove količino in koncentracijo hemoglobina v eritrocitu. Z njimi si pomagamo pri opredelitvi anemij. Med eritrocitne indekse spadajo povprečni volumen eritrocitov (PVE), povprečna količina hemoglobina v eritrocitu (PHE) in povprečna koncentracija hemoglobina v eritrocitu (PKHE). Te in druge meritve nam omogočajo hematološki analizatorji. Mi smo uporabili hematološki analizator Coulter LH 750.

Med osnovnimi laboratorijskimi značilnostmi za PS so tudi spremenjene vrednosti nekaterih parametrov. Kot navajajo v literaturi (7) so vrednosti povprečne koncentracije hemoglobina v eritrocitih (PKHE) in vrednost koeficienta variacije volumna eritrocitov (KVVE) pri PS povišane. Vrednosti povprečnega sferičnega volumna eritrocitov (PSVE) pa so znižane.

Medtem, ko je PVE eritrocitni indeks, ki ga rutinsko določamo kot del eritrocitne slike, pa je PSVE eksperimentalni parameter, ki ga določajo le nekateri analizatorji ob določitvi retikulocitov.

Merjenje povprečnega sferičnega volumna eritrocitov (PSVE) poteka v hipoozmolarnem okolju, kar povzroči fragmentacijo sferocitov in to je posledica, da je vrednost PSVE manjša od PVE. Ugotovili so, da je pri bolnikih s PS razlika (PVE - PSVE) večja od 9,6 fL (7). Ta razlika ima pri ugotavljanju PS 90,6% specifičnost in 100% občutljivost. V Specializiranem hematološkem laboratoriju je bila že opravljena raziskava o uporabnosti kvocienta PSVE/PVE (izraženega v odstotkih) za presajanje PS. Referenčne vrednosti PSVE/PVE so bile postavljene v območju 94,8 - 109,8% (8). Glede na te podatke lahko povzamemo, da ima PSVE pomembno mesto pri presajanju podedovane sferocitoze (7).

### **TEST VEZAVE EOZIN -5- MALEIMIDE (EMA)**

Test s pomočjo uporabe pretočne citometrije meri intenziteto fluorescence nepoškodovanih eritrocitov po inkubaciji z barvilom. Uporablja se barvilo eosin -5- maleimide (EMA), ki kovalentno reagira z Lys - 430 na prvi zunajcelični zanki band 3 proteina (AE1). Pri tem predpostavljamo, da je eosin kromofor globoko v transmembranskim jedru proteina AE1.

Test opravimo s pomočjo pretočnega citometra. Rezultati kažejo zmanjšanje fluorescence eritrocitov pri PS v primerjavi z normalnimi, kar je posledica pomanjkanja proteina AE1. Ker test lahko kaže tudi na pomanjkanje drugih beljakovin, kot sta spektrin in protein 4.2, ima funkcijo zanesljivega presejalnega testa.

EMA test, ki temelji na fluorescentnem barvanju, je občutljiv, specifičen in hiter diagnostičen test, ki se lahko izvede v manj kot dveh urah (9).

#### **1.4.2 Potrditveni testi**

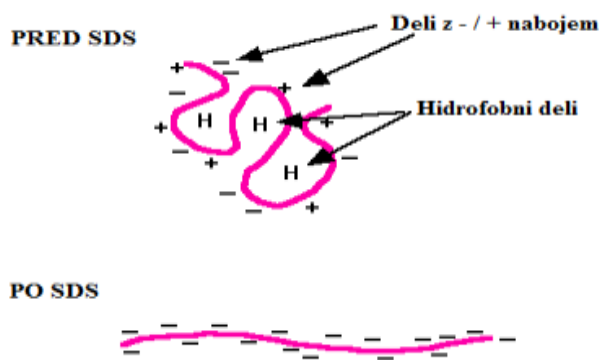
##### **Elektroforeza z metodo SDS – PAGE (poliakrilamidna gelska elektroforeza z natrijevim dodecilsulfatom)**

Poliakrilamidna gelska elektroforeza se uporablja pri potrjevanju PS. Zaznava pomanjkanje ene ali več beljakovin v eritrocitni membrani. Običajno pa ni potrebna izvedba omenjenega testa, ker se kot dokončna diagnoza potrditve PS uporabljajo drugi testi npr. test vezave eosin -5- maleimide (EMA).

Separacijo makromolekul v električnem polju imenujemo elektroforeza, ki temelji na principu potovanja nabitih delcev, ki potujejo proti anodi ali katodi.

Hitrost potovanja molekul je odvisna od naboja in oblike molekul ter od molekulske mase. Pogosto pa se za separacijo proteinov uporablja poliakrilamidni gel, kot podpora mediju in natrijevemu dodecilsulfatu za denaturacijo proteinov. Ta metoda se imenuje poliakrilamidna elektroforeza z natrijevim dodecil sulfatom (SDS - PAGE).

Natrijev dodecil sulfat (SDS) je močen detergent, ki se uporablja za denaturacijo proteinov v razvite, posamezne polipeptide. SDS se na polipeptide veže ob konstantnem razmerju 1,4 g SDS/g proteina. Po taki obdelavi postanejo proteini linearne oblike. Ker imajo proteini po denaturaciji enoten negativni naboj in linearno obliko, poteka ločba samo glede na relativno molekularno maso (slika 6) (10, 11).



**Slika 6: Denaturacija proteinov z SDS (10)**

## 1.5 OPIS IN DELOVANJE PRETOČNEGA CITOMETRA

Pretočna citometrija je način, s katerim merimo in analiziramo lastnosti posameznih celic, ki v suspenziji ena za drugo potujejo skozi ozek snop laserske svetlobe. V eni sekundi lahko analiziramo več sto celic, kar nam da zanesljivo podobo o fizikalnih in biokemičnih lastnosti celic.

Svetlobni žarek, ki zadene celico, se odbije ali lomi, ali pa se absorbira v določenih fluorokromih, ki nato izsevajo svetlobo večjih valovnih dolžin.

Glavni sestavni deli pretočnega citometra so:

- vir svetlobe
- pretočna komora z optičnim sistemom ogledal, leč in filtrov
- elektronika, ki spreminja svetlobne impulze v električne in slednje v digitalne
- računalnik, ki zbira, analizira, usklajuje in uravnava delovanje aparata

Vir svetlobe pri današnjih pretočnih citometrih je laserski žarek, ki je lahko argonski, kriptomski ali kombiniran helij - kadmijski ali helij - neonski. Pri starejših pretočnih citometrih so uporabljali živosrebrove ali neonske žarnice.

Pretočni citometer je zgrajen predvsem iz pretočne komore, skozi katero tečejo celice v izotonični tekočini. Ob prehodu snopa žarkov odda posamezna celica signal.

Fotodetektorji zbirajo signale preko sistema več leč in filtrov ter jih selekcionirajo. Dva fotodetektorja merita odboj ali lom svetlobe, eden iz smeri vira - FALS in drugi pravokotno na smer vpadne svetlobe - RALS.

Detektor FALS je pomemben za ugotovitev velikosti celic. Površinsko strukturo in granuliranost celic pa odraža velikost RALS signala.

V dveh ali več detektorjih, ki so opremljeni z barvnimi filtri, izmerimo izsevano svetlobo. Fotodetektorji pretvorijo svetlobne signale v električne. Računalnik zabeleži električne signale in jih nato grafično in matematično prikaže (priloga 5) (12).

## 2 NAMEN DELA

Kot najzanesljivejši presejalni test za ugotavljanje PS uporabljamo t. i. EMA test, ki uporablja vezavo eosin -5- maleimida na membrano eritrocitov. Vezava tega barvila je v primerjavi z normalnimi eritrociti pri PS zmanjšana, kar se pri preiskavi s pretočno citometrijo kaže kot zmanjšana povprečna fluorescenca eritrocitov (PFE). Mejno vrednost PFE mora določiti vsak laboratorij posebej na številnih vzorcih preiskovancev brez PS, obenem pa jo mora ob izvajanju vsakega testa ob sumu na PS določiti tudi pri 6-ih normalnih vzorcev krvi kot notranjo kontrolo kakovosti.

V krvi bolnikov s PS so prisotni številni sferociti. Njihova površina je v primerjavi z volumnom majhna, zato je spremenjeno razmerje med povprečnim sferičnim volumnom eritrocitov (PSVE) in povprečnim volumnom eritrocitov (PVE). Uporaba teh dveh eritrocitnih indeksov je upoštevaje enostavnost in cenenost pri PS zelo obetavna v presejalne namene.

V mojem diplomskem delu smo se zato osredotočili na ovrednotenje EMA testa in možnost uporabe indeksa PSVE.

Namen moje diplomske naloge je bil:

- Preverili bomo stabilnost koncentrirane raztopine fluorescenčnega barvila za izvajanje presejalnega testa EMA pri PS
- Preverili bomo ponovljivost EMA testa s pretočno citometrijo
- Preverili bomo parametre krvne slike, ki zagotavljajo, da je vzorec primeren kot »normalen« za izvajanje notranje kontrole kakovosti pri EMA testu
- Na velikem številu vzorcev krvi bomo določili spodnjo mejno vrednost PFE, pod katero bo laboratorij izdal pozitiven izvid za PS
- Preverili bomo negativno napovedno vrednost kvocienta PSVE/PVE (> 94,8%) in razlike PVE-PSVE (< 9,6 fL) pri normalnih vzorcih krvi oziroma njuno pozitivno napovedno vrednost pri PS.

### **3 MATERIALI IN METODE**

#### **3.1 PREISKOVANCI**

V raziskavo smo vključili 186 naključnih vzorcev krvi, ki so jih v Specializirani hematološki laboratorij KO za hematologijo UKC Ljubljana napotili za določitev krvne slike. Analizirali smo tudi 18 vzorcev bolnikov s PS. Preiskovanci so bili moški in ženske različnih starosti. Raziskava je potekala v obdobju od maja 2011 do avgusta 2013.

#### **3.2 POSTOPEK DOLOČANJA POVPREČNE FLUORESCENCE ERITROCITOV**

##### **3.2.1 Odvzem in dostava vzorca**

Vensko kri odvezamemo direktno v 4,5 mL Vacutainer epruveto s K - EDTA. Prenos vzorca naj bo takoj pri sobni temperaturi.

##### **3.2.2 Princip določanja**

Za določanje povprečne fluorescence eritrocitov smo uporabili test vezave EMA z barvilom eozin - 5 - maleimidom, še prej pa smo odvzetim vzorcem krvi naredili hemogram vključno s štejetjem retikulocitov, kjer je kot raziskovalni parameter na hematološkem analizatorju LH750 (Beckman Coulter) podan tudi PSVE.

##### **3.2.3 Reagenti, kalibratorji, kontrole**

Matična raztopina PBS (10x koncentrirana):

- 40,0 g NaCl
- 1,0 g KCl
- 1,0 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 7,6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O

Natehtane soli raztopimo v 300 mL demineralizirane vode in dopolnimo v merilni buči do 500 mL.

Delovna raztopina PBS: 100 mL matične raztopine PBS razredčimo z 900 mL demineralizirane vode in dodamo 1 g NaN<sub>3</sub> (natrijev azid služi kot konzervans).

PBS / BSA (puferirana fiziološka raztopina z 0,5% govejim albuminom za spiranje in redčenje eritrocitov): Od 100 mL PBS odpipetiramo 0,5 mL in dodamo 0,5 mL BSA (goveji albumin).

Priprava raztopine EMA: V črno epruveto odtehtamo 0,5 mg eozin -5- maleimida in ga raztopimo v 1 mL PBS.

### **3.2.4 Instrumenti in oprema**

- hematološki analizator LH 750 (Beckman Coulter)
- avtomatske pipete (5, 10, 20, 100, 200, 500 in 1000 mL)
- ustrezno veliki nastavki za pipete
- centrifuga (Lavofuge 24)
- plastične epruvete
- črne epruvete
- tehtnica METTLER TOLEDO, Ax - 304
- vibrajoči mešalnik Vortex
- pretočni citometer Coulter EPICS XL - MCL

### **3.2.5 Delovni postopek**

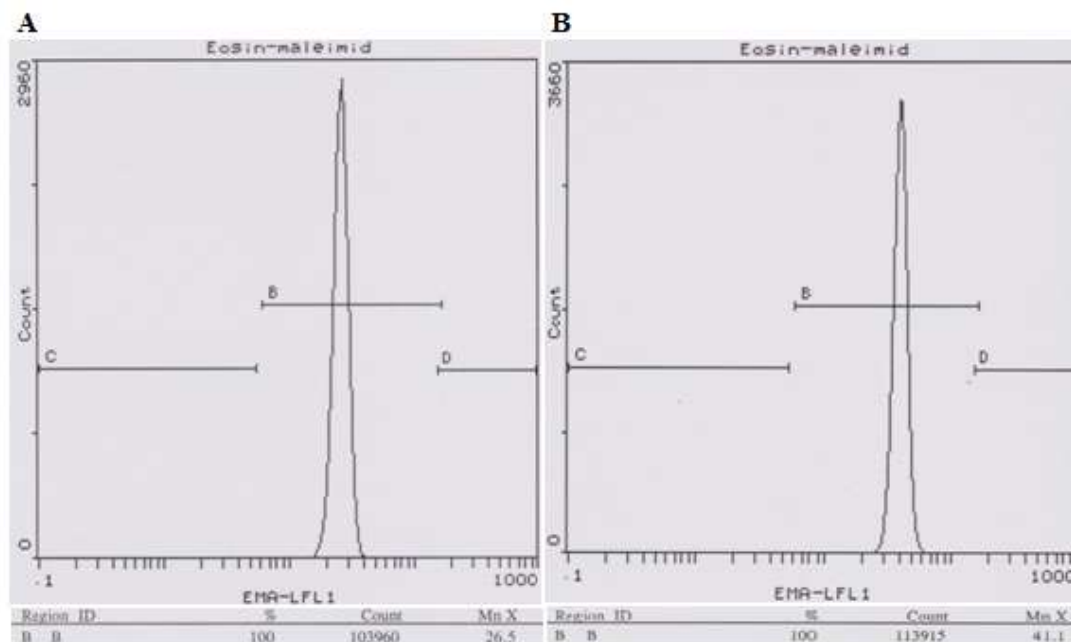
- 0,5 mL EDTA krvi centrifugiramo
- odstranimo supernatant
- 4x speremo s PBS / BSA (ročno spiranje)
- po 5  $\mu$ L spranih stisnjenih eritrocitov odpipetiramo v male epruvete
- v vsako epruveto dodamo 25  $\mu$ L EMA
- inkubiramo eno uro v temi pri sobni temperaturi
- centrifugiramo, odstranimo supernatant
- 3x speremo s PBS / BSA (ročno spiranje)
- sprane eritrocite razredčimo s 500  $\mu$ L PBS / BSA
- za analizo na pretočnem citometru vzamemo 100  $\mu$ L razredčene obarvane suspenzije in 1,4 mL PBS / BSA



### 3.2.6 Podajanje rezultatov

Vzorce vrednotimo pri fluorescenci v zelenem območju (525 nm - FL1). Preštejemo najmanj 15 000 celic in odčitamo povprečno fluorescenco eritrocitov (PFE = MnX).

Primerjamo PFE bolnika s PFE normalnih vzorcev (slika 7).



**Slika 7: Histogram fluorescence eritrocitov pri vzorcu bolnika s PS (A) in vzorcu zdravega preiskovanca (B)**

### 3.3 STATISTIČNA OBDELAVA REZULTATOV

Dobljene rezultate smo analizirali in obdelali s pomočjo programa SPSS. Rezultate smo analizirali na neparametričen način.

S Spearmanovim koeficientom korelacije smo primerjali povezanost dveh spremenljivk.

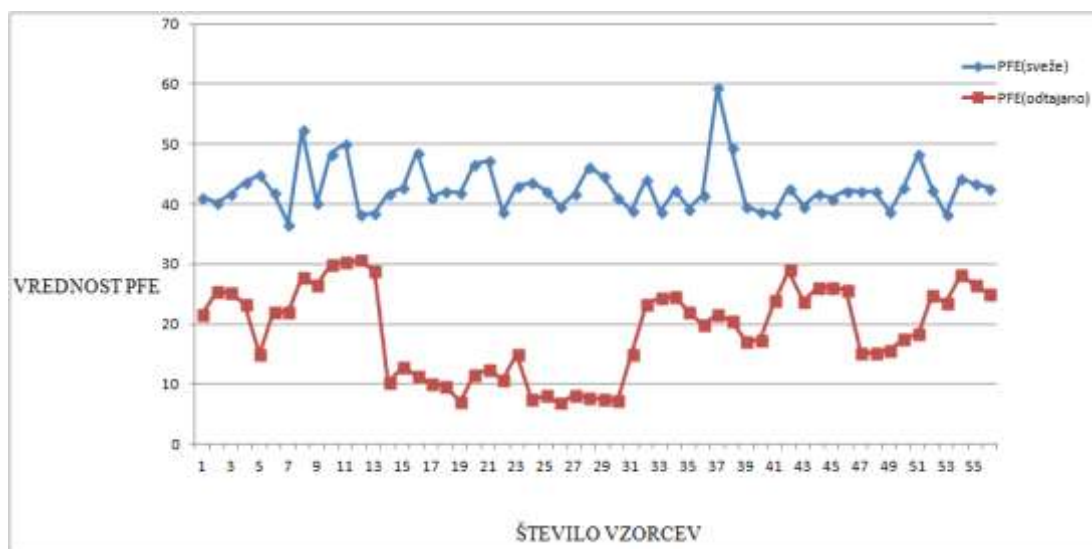
Za primerjavo spremenljivk med skupinama (zdravi, bolniki s PS) smo uporabili Wilcoxon - ov test. Vrednosti obeh skupin smo grafično prikazali v obliki kvantilnega diagrama. Vsak okvir z dvema ročajema predstavlja pet točk. Minimum in maksimum ter 1. in 3. kvartil. Odebeljena črta znotraj vsakega okvirja predstavlja mediano. Lahko so prisotni tudi osamelci (»°«) in ekstremi (»\*«).

## 4 REZULTATI

### 4.1 Določanje stabilnosti zamrznjene koncentrirane raztopine EMA

Analizirali smo 56 vzorcev krvi. Za analizo smo uporabili sveže pripravljeno koncentrirano raztopino in odtajano koncentrirano raztopino barvila. Sveže pripravljeno koncentrirano raztopino smo pripravili po predpisanem postopku. V črno epruveto smo natehtali 0,5 mg eosin -5- maleimida in z mešanjem raztopili v 1 mL raztopine PBS.

Pripravili smo tudi 10 mL raztopine EMA za zamrzovanje. V epruveto smo natehtali 5 mg eosin -5- maleimida in z mešanjem raztopili v 10 mL raztopine PBS. Pripravljeno raztopino smo razdelili v epice po 20  $\mu$ L in takoj zamrznili na - 20°C.

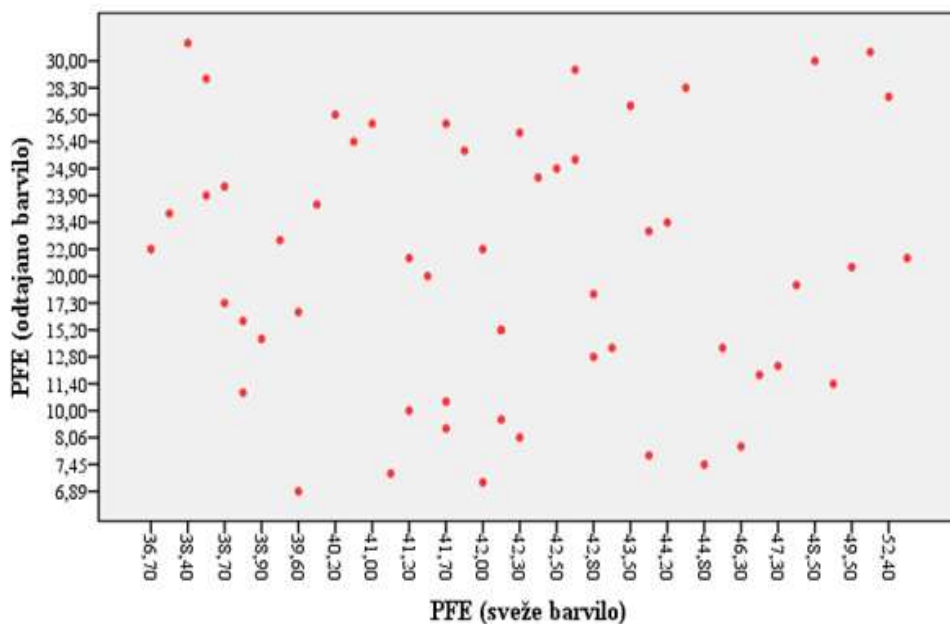


**Slika 8: Meritve PFE s svežo in odtajano koncentrirano raztopino**

Slika 8 prikazuje razliko meritve PFE s svežo in odtajano koncentrirano raztopino fluorescenčnega barvila EMA. Vzporedno smo analizirali 56 vzorcev krvi (priloga 6).

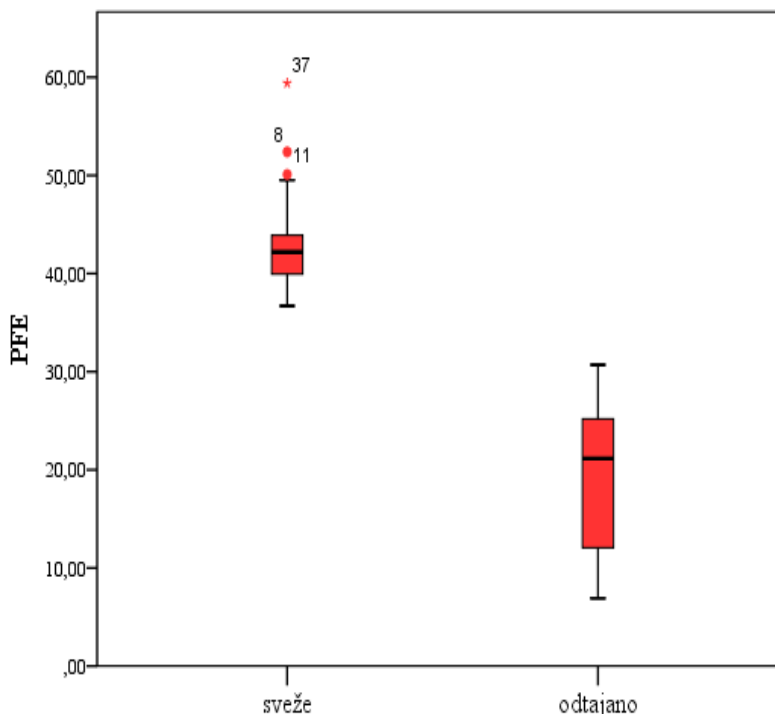
Ugotovili smo, da je mediana vzorcev PFE analiziranih s svežo koncentrirano raztopino barvila 42,2 enot (od 36,7 do 59,4 enot), medtem ko je bila pri vzorcih merjeno z odtajano raztopino barvila 21,2 enot (od 6,9 enot do 30,7 enot).

Spearmanov koeficient korelacije ( $\rho = -0,047$ ) kaže, da med meritvama ni povezave, sipanje podatkov brez izraženega trenda pa kaže tudi slika 9.



**Slika 9: Odvisnost vrednosti PFE (sveže barvilo) in PFE (odtajano barvilo)**

Brez statistične analize je očitno, da vse vrednosti, določene z odtajano raztopino barvila ležijo pod tistimi, določenimi s svežo raztopino. Slika 10 prikazuje razliko med obema skupinama.

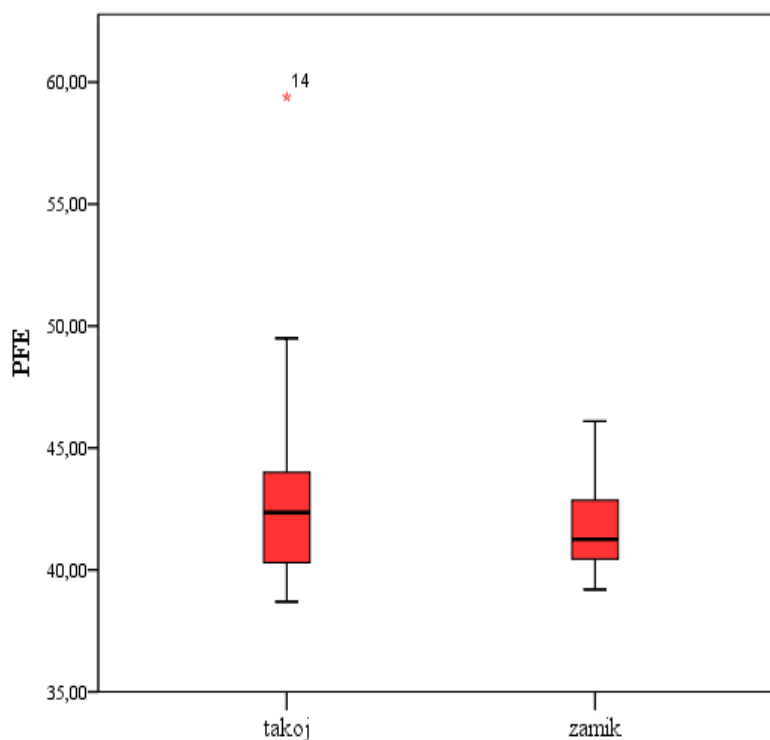


**Slika 10: Primerjava PFE vzorcev merjenih s svežo koncentrirano raztopino in z odtajano koncentrirano raztopino EMA**

Glede na te rezultate smo PFE v vseh nadaljnjih poskusih določali le s svežo raztopino EMA.

#### 4.2 Ponovljivost določanja PFE

Ker se PFE pri PS določa v SHL za področje celotne Slovenije, in zaradi dolgotrajnosti postopka, je določanje na dan prispetja vzorca včasih nemogoče. Zanimalo nas je, kako 24-h zamik izvedbe analize vpliva na rezultate. Meritve smo opravili dvakrat, in sicer v 2-eh urah po prejemu vzorca v laboratorij in nato še po 24-ih urah.



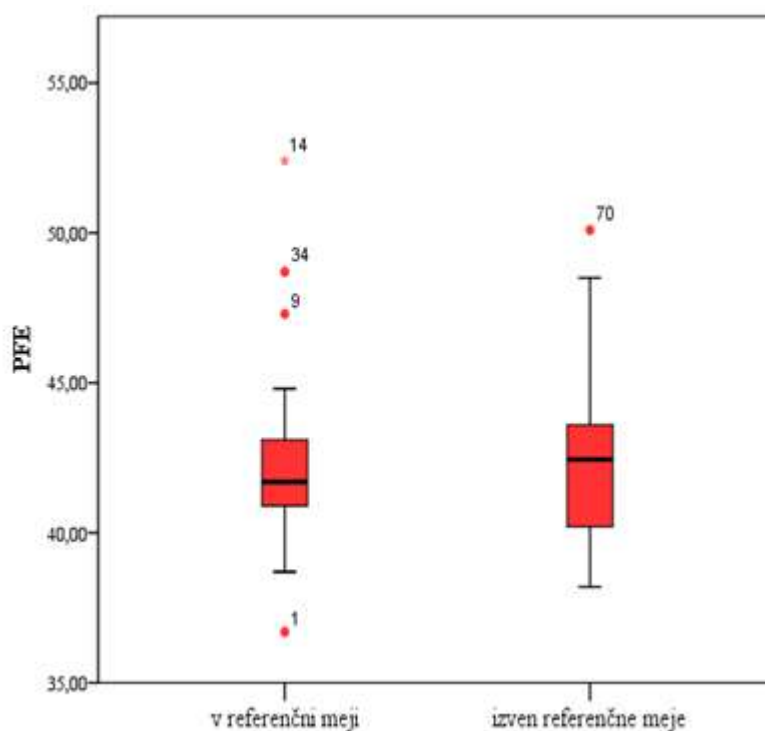
**Slika 11: Primerjava meritev PFE opravljenih takoj in po 24-urnim zamikom**

Slika 11 prikazuje porazdelitev rezultatov meritve PFE, določene s svežo koncentrirano raztopino fluorescenčnega barvila. Analizirali smo 24 vzorcev krvi (priloga 7). Ugotovili smo, da je mediana PFE vzorcev pri takojšnji meritvi 42,2 enot, pri merjenju po 24-ih urah pa je 41,6 enot. Wilcoxonov test je pokazal, da je vrednost PFE določena na krvi po 24-ih urah statistično značilno ( $p=0,031$ ) nižja.

### 4.3 Določitev spodnje mejne vrednosti PFE pri zdravih preiskovancih

Za določitev spodnje mejne vrednosti PFE smo v analizo vključili 186 vzorcev krvi preiskovancev brez PS. Vzorce smo najprej razdelili v dve skupini: vzorci brez odstopanja v krvni sliki in vzorci z odstopanjem v krvni sliki.

Najprej smo določili PFE pri 41 preiskovancih, kjer so bili vsi parametri krvne slike v referenčnih mejah (priloga 8). Ta je bila 41,7 enot . Nato smo določili PFE pri 38-ih vzorcih preiskovancev z odstopanjih od referenčnih vrednostih pri številčni koncentraciji levkocitov in trombocitov (priloga 9). PFE je bila 42,5 enot. Ti dve skupini se medsebojno statistično ne razlikujeta (Mann - Whitney-ev test  $p > 0,5$ ). Slika 12 prikazuje porazdelitev PFE vrednosti obeh skupin.

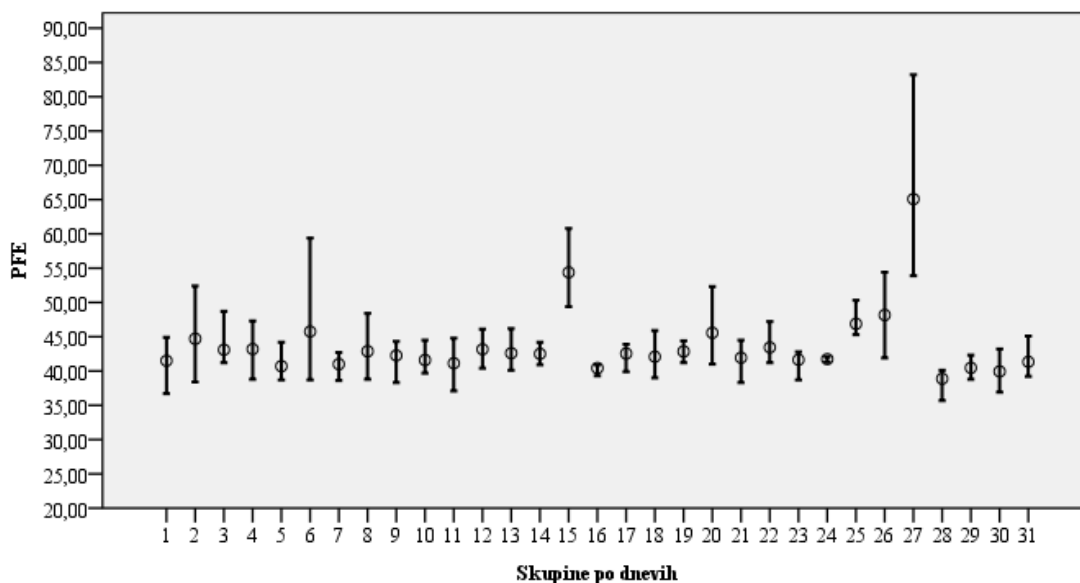


**Slika 12: Vrednosti PFE pri krvnih vzorcih z vrednostmi levkocitov in trombocitov v in izven referenčnih meja**

V drugo skupino smo uvrstili preiskovance, kjer so presejalni parametri PSVE/PVE in / ali PVE-PSVE odstopali. Vrednosti, ki odstopajo od referenčne vrednosti, so v prilogi 11 označene z rdečo barvo. Vrednosti PFE so med 35,7 in 72,0 enot. Mediana je pri vrednosti 42,2 enot. Tudi ta skupina se ne razlikuje od vrednosti, ki smo jih dobili pri zgoraj omenjenih skupinah z in brez odstopanj v krvni sliki.

### 4.3.1 Določanje PFE vrednosti glede na kontrolno skupino

Ker se pri vsakem določanju PFE opravi test tudi pri 6-ih normalnih vzorcih, nas je zanimalo, kakšna je ponovljivost določitve PFE v kontrolni skupini.

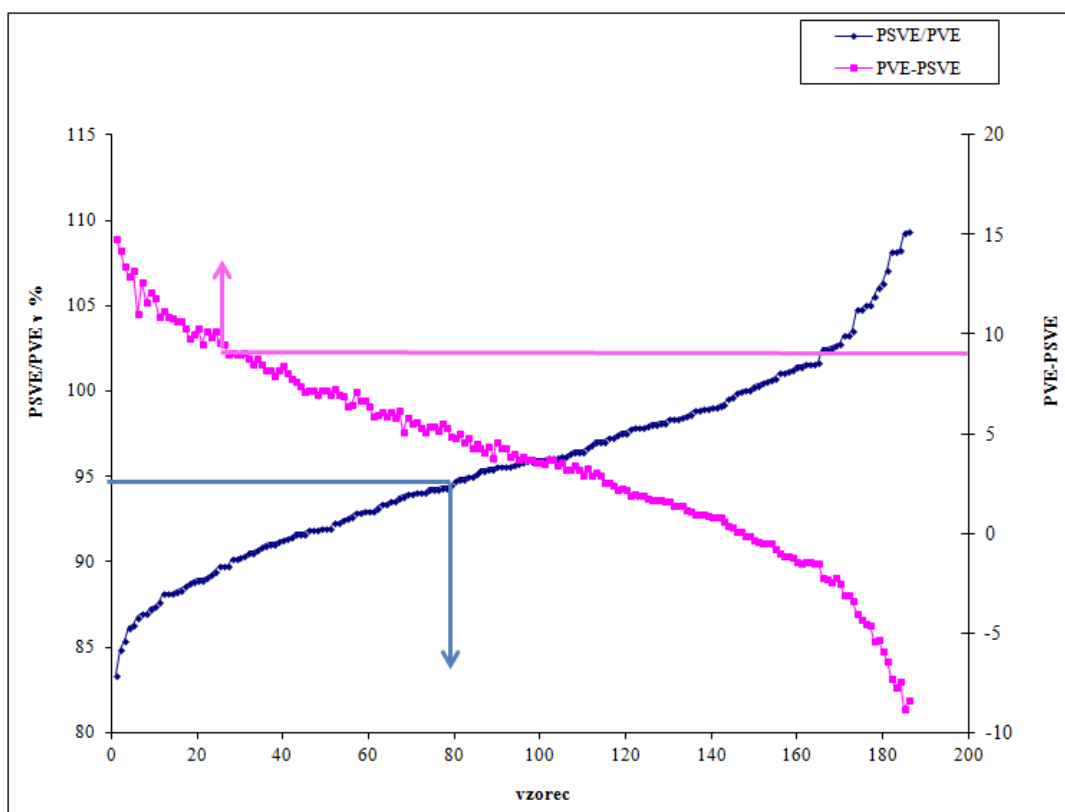


**Slika 13: Vrednosti PFE kontrolnih skupin glede na dan določanja PFE**

Slika 13 prikazuje povprečno vrednost PFE merjeno ob različnih dnevih za posamezno kontrolno skupino. Graf zajema vrednosti vseh 186 preiskovancev razporejenih po skupinah, glede na dan določanja. V vsaki skupini je različno število vzorcev (od 6 do 12 vzorcev). Opazimo, da je nekaj skupin (6, 15, 25, 26, 27) izrazito nad mediano, ki je 42,3 enot. Odstopanja navzdol so manj izrazita.

Ker se skupini z normalno krvno sliko in z odstopanji v krvni sliki nista medsebojno razlikovali, smo analizirali vse vzorce z normalno krvno sliko in tiste z odstopanji skupaj. Poleg tistih, navedenih v prilogah 8 in 9 smo dodatno vključili še vzorce, ki smo jih uporabljali v kontrolnih skupinah (slika 13) pri določanju PS pri rutinskih EMA testih. Vrednost PFE se pri vseh 186 preiskovancih nahaja med 35,7 enot in 83,2 enot. Mediana je 42,3 enot.

#### 4.4 Indeksa PSVE in PVE pri zdravih preiskovancih



**Slika 14: Razmerje PSVE/PVE (%) ter razlika PVE-PSVE (fL) pri zdravih preiskovancih**

Ker literatura navaja razliko PVE-PSVE kot ustrezen presejalni parameter pri PS (7), v SHL pa je v uporabi tudi razmerje PSVE/PVE (8), smo se odločili primerjati ta dva parametra med seboj. Analizirali smo vseh 186 vzorcev preiskovancev brez PS.

Slika 14 prikazuje razmerje PSVE/PVE in PVE-PSVE (fL) za zdrave preiskovance. Opazimo, da je kar 79 vzorcev pod spodnjo referenčno mejo vrednosti PSVE/PVE (94,8%), medtem ko pa je samo 23 vzorcev nad zgornjo referenčno mejo vrednosti PVE-PSVE (9,6 fL).

#### 4.5 Določanje presejalnih parametrov pri bolnikih s podedovano sferocitozo

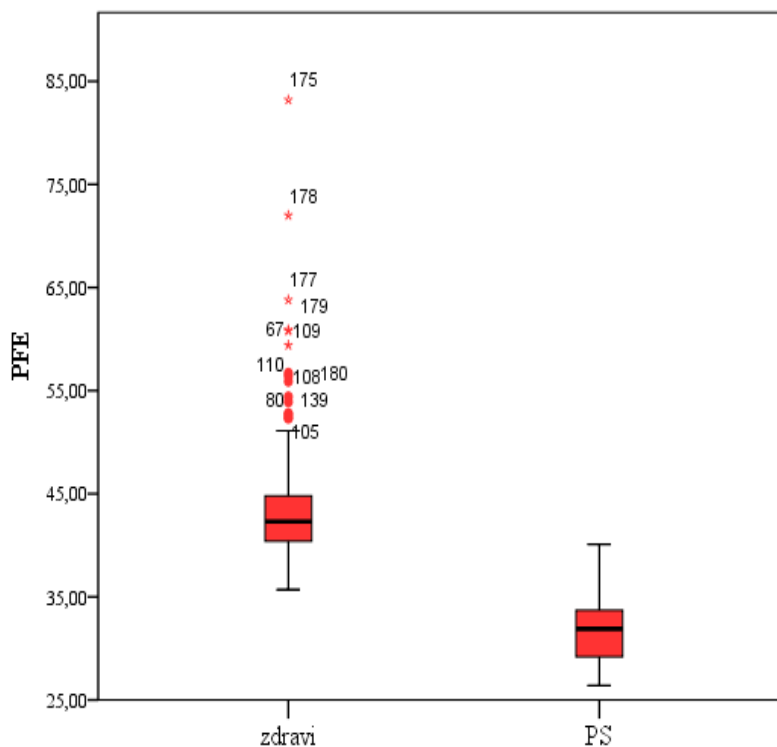
Presejalne parametre (PFE, PSVE/PVE, PVE-PSVE) določene pri veliki skupini vseh preiskovancev brez PS smo primerjali s tistimi pri bolnikih s potrjeno PS.

V prilogi 12 so prikazane vse vrednosti za bolnike s PS. Analizirali smo 18 vzorcev krvi bolnikov s PS. Mediana vrednosti PFE je 31,9 enot, maksimum PFE 40,1 enot, minimum pa 26,4 enot.

**Tabela 1: Primerjava mediane parametrov pri normalnih vzorcih in vzorcih bolnikov s podedovano sferocitozo**

	PFE	PVE(fl)	PSVE (fl)	PSVE/PVE (%)	PVE-PSVE (fl)
<b>NORMALNI VZORCI (N=186)</b>	43,7	91,7	87,8	95,8	3,9
<b>VZORCI S PODEDOVANO SFERO-CITOZO (N=18)</b>	32	85,2	67,9	79,6	17,4

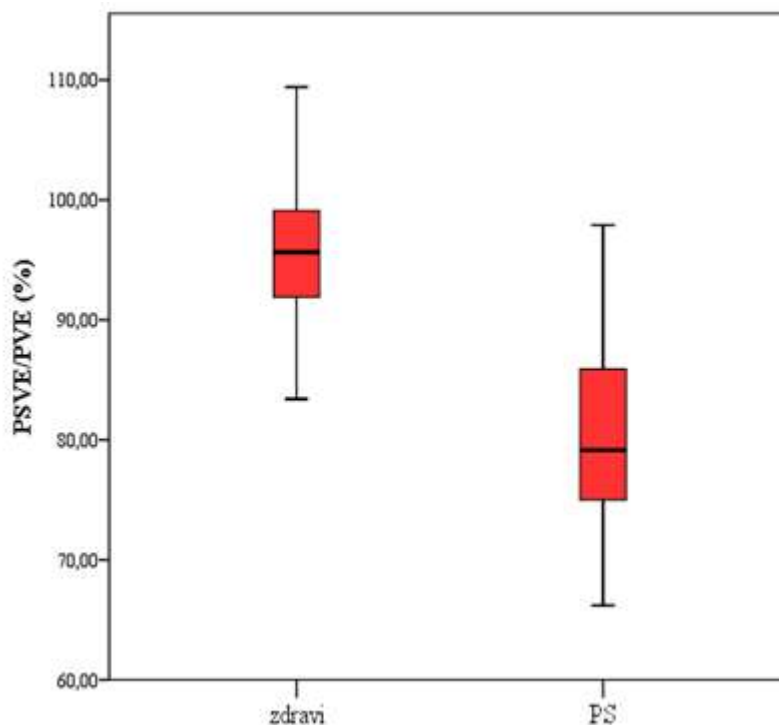
Tabela 1 prikazuje primerjavo mediane parametrov pri zdravih preiskovancih in bolnikih s PS.



**Slika 15: Vrednosti PFE pri normalnih vzorcih in vzorcih s PS**

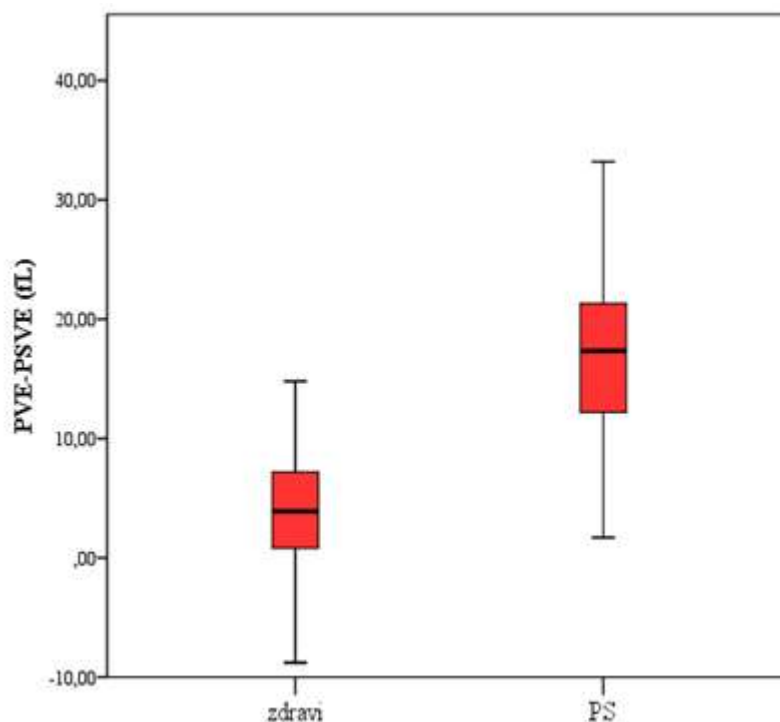


Slika 15 prikazuje primerjavo porazdelitve vrednosti PFE pri zdravih preiskovancih in preiskovancih s PS. Vrednosti so pri zdravih preiskovancih med 35,7 enot in 83,2 enot. Pri preiskovancih s PS pa so med 26,4 enot in 40,1 enot. Mediana pri zdravih je 42,3 enot, pri preiskovancih s PS pa 31,9 enot.



**Slika 16: Vrednost PSVE/PVE (%) pri normalnih vzorcih in vzorcih s PS**

Slika 16 prikazuje primerjavo vrednosti PSVE/PVE (%) med zdravimi preiskovanci in preiskovanci s PS. Vrednosti se pri zdravih preiskovancih med 83,4% in 109,4%, pri preiskovancih s PS pa so med 66,2% in 102,1%. Mediana je pri zdravih 95,7%, pri bolnikih s PS pa 79,2%.



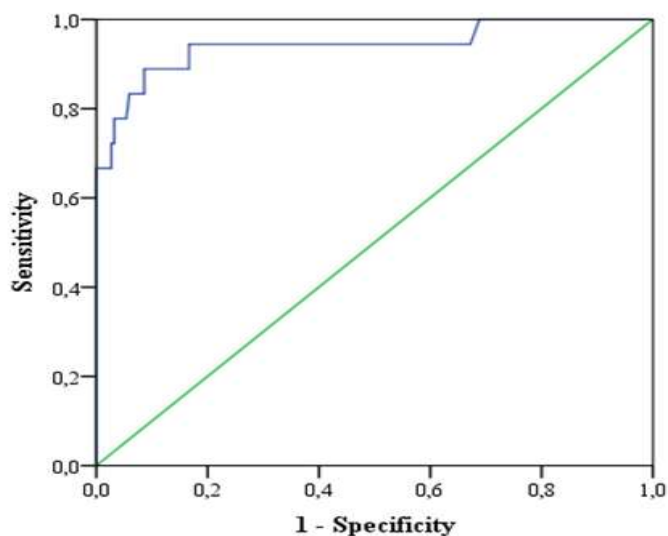
**Slika 17: Vrednost PVE-PSVE (fL) pri normalnih vzorcih in vzorcih s PS**

Slika 17 prikazuje vrednost PVE-PSVE (fL) pri zdravih preiskovancih in bolnikih s PS. Vrednosti PVE-PSVE (fL) so pri zdravih preiskovancih med -8,8 fL in 14,8 fL, pri bolnikih s PS pa so med 1,7 fL in 33,2 fL. Mediana je pri zdravih 3,9 fL, pri bolnikih s PS pa je 17,4 fL.

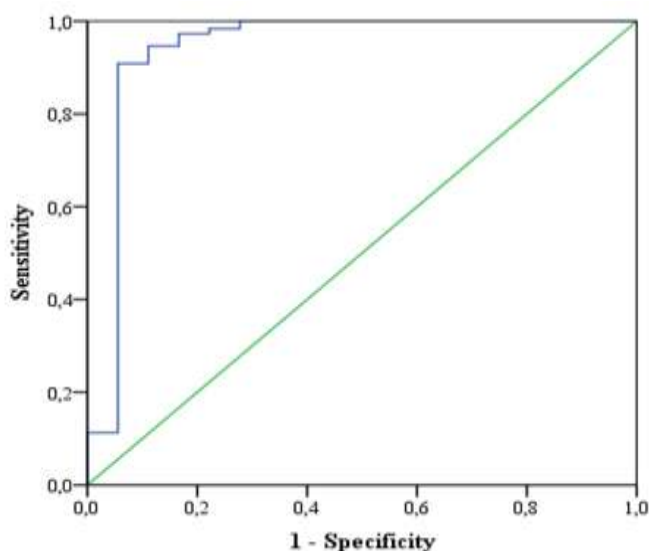
Vrednosti presejalnih parametrov PFE in PSVE/PVE (%) so bile pri bolnikih s PS značilno manjše kot pri zdravih preiskovancih (Wilcoxonov test  $p < 0,05$ ) (slika 15 in 16).

Vrednost parametra PVE-PSVE (fL) pa je bila pri bolnikih s PS značilno večja, kot pri zdravih preiskovancih (Wilcoxonov test  $p < 0,05$ ) (slika 17).

Iz rezultatov (zdravi in bolniki s PS) smo z ROC krivuljami ocenili diagnostično natančnost presejalnih parametrov PSVE/PVE in PVE-PSVE (slika 18 in 19). Ugotovili smo, da ima parameter PVE-PSVE nekoliko večjo diagnostično natančnost (večja površina pod krivuljo,  $P=0,942$ ), kot parameter PSVE/PVE ( $P=0,940$ ).



**Slika 18: ROC krivulja, diagnostična točnost parametra PVE-PSVE (fL) pri podedovani sferocitozi**



**Slika 19: ROC krivulja, diagnostična točnost parametra PSVE/PVE (%) pri podedovani sferocitozi**

## **5 RAZPRAVA**

### **5.1 Uporaba odtajane raztopine EMA**

Ugotovili smo, da zamrzovanje sveže koncentrirane raztopine fluorescenčnega barvila z namenom kasnejše enostavnejše izvedbe analize ni primerno (slika 8), čeprav literatura navaja (9), da lahko uporabljamo predhodno zamrznjen koncentrat.

### **5.2 Ponovljivost določanja povprečne fluorescence eritrocitov (PFE)**

Na ponovljivost rezultatov vpliva več dejavnikov, med katere štejemo koncentracijo in stabilnost barvila, čas inkubacije, shranjevanje vzorca in čas, v katerem se analiza izvede. Želeli smo preveriti ponovljivost določanja PFE po 24 -ih urah. Dobljene rezultate smo statistično analizirali in grafično prikazali (slika 11). Wilcoxonov test kaže, da so rezultati pri meritvi s 24 - urnim zamikom značilno nižji ( $p= 0,031$ ). Ker pa najnižja izmerjena vrednost ni bila niti po 24-ih urah pod mejno vrednostjo, določeno na velikem številu normalnih vzorcev, je tudi določitev s 24-urnim zamikom še vedno sprejemljiva in ne vpliva na končni pozitiven ali negativen presejalni izsledek.

### **5.3 Določitev spodnje mejne vrednosti PFE pri zdravih preiskovancih in določitev prazne vrednosti za PS**

Namen naše raziskave je bil določiti spodnjo mejno vrednost povprečne fluorescence eritrocitov (PFE) pri EMA testu, pod katero bo laboratorij izdal pozitiven izvid za podedovane sferocitozo (PS).

Kot spodnjo mejno vrednost PFE smo vzeli vrednost 35,7 enot. Pri nobenem od zdravih bolnikov nismo določili PFE nižjo od te vrednosti (specifičnost 100%), smo pa pri dveh bolnikih določili vrednost večjo od te (lažno negativni).

### **5.4 Notranja kontrola kakovosti pri izvajanju EMA testa**

Zelo pomembno je, da se pri EMA testu vselej opravi tudi določitev PFE pri 6-ih vzorcih krvi preiskovancev brez PS (9). Naši poskusi na seriji vzorcev preiskovancev brez PS (priloga 8 in 9 ) so pokazali, da je test zelo ponovljiv, da pa občasno serije zelo odstopajo navzgor (slika 13).

Notranja kontrola kakovosti s šestimi normalnimi vzorci je vsekakor zelo pomembna za zanesljivost analiz, hkrati pa je treba v zahteve za kakovostno izvedbo le-te dodati zahtevo, da naj bo povprečna fluorescenca kontrolne skupine med 39 in 43 enot.

Če torej povprečna vrednost PFE teh šestih vzorcev odstopa od zgornjih vrednosti, ki smo jo določili na naši seriji, potem je potrebno raztopino fluorescenčnega barvila ponovno pripraviti in test ponoviti. Obenem pa smo tudi ugotovili, da ne glede na odstopanja v parametrih krvne slike, kri vsakega preiskovanca, ki nima anemije (in seveda podedovane sferocitoze), lahko služi kot kontrolna kri.

### 5.5 Uporaba presejalnih parametrov PSVE in PVE pri podedovani sferocitozi (PS)

Pri presejalnima parametroma PFE in PVE-PSVE sta imela po dva bolnika lažno negativno vrednost, torej imata enako občutljivost (90%), razlika je v specifičnosti. Pri parametru PSVE/PVE pa je imel en bolnik lažno negativno vrednost, torej ima boljšo občutljivost (95%), kot prej navedena presejalna parametra.

V eni od diplomskih nalog, kjer je bila opravljena raziskava o uporabnosti kvocienta PSVE/PVE (izraženega v odstotkih) za presajanje PS, so bile postavljene referenčne vrednosti v območje med 94,8 - 109,8% (14). Specifičnost tega razmerja se je pri naši raziskavi na veliki skupini zdravih pokazala kot dokaj slaba, saj je kar 45% vseh vzorcev pod spodnjo referenčno mejo (94,8%). Je pa pri tej mejni vrednosti negativna napovedna vrednost zelo blizu 100%.

**Tabela 2: Vrednosti za izračun napovedne vrednosti**

	<b>PFE</b>	<b>PSVE/PVE (%)</b>	<b>PVE-PSVE (fL)</b>
<b>Resnično pozitivni</b>	18	18	18
<b>Resnično negativni</b>	186	186	186
<b>Lažno pozitivni</b>	0	79	23
<b>Lažno negativni</b>	2	1	2
<b>Negativna napovedna vrednost</b>	98,9%	99,5%	98,9%
<b>Pozitivna napovedna vrednost</b>	100%	18,6%	43,9%

V literaturi je kot zgornja meja razlike med PVE in PSVE za zdravega preiskovanca podana vrednost 9,6 fL (7).

Naši rezultati kažejo, da je le 14% vseh vzorcev zdravih presegalo referenčno območje (> 9,6 fL; lažno pozitivni). Ocenjujemo torej, da je kot presejalni test za PS primernejše uporabiti razliko vrednosti PVE-PSVE, kot pa kvocient PSVE/PVE .

Tukaj smo kot skupino negativnih vzeli preiskovance brez PS in anemije. Za zanesljivo oceno presejalnih parametrov pa bi morali zbrati skupino preiskovancev z anemijo brez PS.

## 6 SKLEPI

1. Ugotovili smo, da uporaba odtajane predhodno pripravljene in zamrznjene raztopine EMA ni primerno, saj so vrednosti PFE z zamrznjeno raztopino nesprejemljivo nizke.
2. Določanje PFE s 24-urnim zamikom daje sicer značilno nižje rezultate, vendar ne toliko nižjih, da bi izdali zaradi časovnega zamika lažno pozitiven izvid.
3. Kot spodnjo praznjo vrednost PFE za zdrave preiskovance smo določili vrednost 35,7 enot.
4. Kot kontrolno kri (6 vzorcev) lahko vzamemo tudi vzorce krvi z odstopanjem v levkocitni in trombocitni krvni sliki.
5. Ocenjujemo, da je kot presejalni parameter pri PS primernejše uporabiti razliko vrednosti PVE-PSVE, upošteva mejno vrednost 9,6 fL, kot pa kvocient PSVE/PVE (94,8 %), ker je prvi bolj specifičen. Njuna občutljivost je enaka.

## 7 LITERATURA

1. Dušan A, Peter Č, Uroš M, Mojca M, Tadej P, Helena P, Irena P. Z, Jože P, Samo Z: Bolezni krvi in krvotvornih organov, Interna medicina, Ljubljana, 2005: 6 - 40.
2. Petra P, Primož R, Marcel R, Nace R, Andrej S, Dragana S: Anemije - seminar, Medicinska fakulteta Maribor, Maribor, 2007; 16: 3 - 9.
3. Patofiziologija sferocitoze.  
<http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140673608615883/images?imageId=gr2&sectionType=green&hasDownloadImagesLink=true>
4. Mlakar U: Diagnostični algoritem za ugotavljanje podedovane sferocitoze, UKC Ljubljana.  
<http://www.hematologija.org/admin/files/news/pics/file/Mlakar%20U%20p07.pdf>
5. Eritrocitna membrana.  
[http://erasmeinfo.ulb.ac.be/globule/English/memb\\_phyp.htm](http://erasmeinfo.ulb.ac.be/globule/English/memb_phyp.htm)
6. Bolton-Maggs P. H. B, Stevens R. F, Dodd N. J, Lamont G, Tittensor P, King M. J: Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis, British Journal of Haematology, 2004; 126: 455 - 474.
7. Evolution of mean sphered corpuscular volume for predicting hereditary spherocytosis: International Journal of Laboratory Hematology, 2010; 32: 519 - 23.  
<http://books.google.si/books?id=SWALY-1TqDMC&pg=PA589&lpg=PA589&dq=MSCV-MCV&source=bl&ots=zsFpRWWCpg&sig=DvL20ECnZVBEbhESDMqnDS5FquM&hl=sl&sa=X&ei=2ERmUr24HifNsgagzoCwCQ&ved=0CHkQ6AEwBw#v=onepage&q=MSCV-MCV&f=false>
8. Dvoršak K: Ugotavljanje podedovane sferocitoze s pretočno citometrijo (diplomska naloga), Ljubljana 2006.
9. May Jean K, Judith B, Chris R, Clare F, David G, Keith C: Rapid flow cytometric test for the diagnosis of membrane cytoskeleton - associated haemolytic anaemia, British Journal of Haematology, 2000; 111: 924 - 933.
10. Introduction to SDS - PAGE.  
<http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/studies/sds-page/rbcmembrane.html>
11. Polyacrylamide gel elektroforesis.  
[http://en.wikipedia.org/wiki/Polyacrylamide\\_gel\\_electrophoresis](http://en.wikipedia.org/wiki/Polyacrylamide_gel_electrophoresis)



12. Kotnik V, Čurin Šerbec V, Hartman Pretnar K, Ihan A, Jeras M, Kopitar A. N, Malovrh T, Simčič S, Stopinšek S, Skvarč M, Vidan Jeras B, Wraber B: Imunološki priročnik, Medicinska fakulteta, Ljubljana, 2010: 78 - 79.

## 8 PRILOGA

### Priloga 1: Razvrstitev anemij (1)

<i>Povečana razgradnja ali izgube</i>	<i>Zmanjšana tvorba eritrocitov</i>
<b>Hemoliza</b>	<b>Normocitne anemije</b>
<b>Korpuskularne HA:</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• aplastična</li><li>• mieloftizična</li><li>• bolezni endokrinih žlez</li><li>• kronična ledvična odpoved</li><li>• kronične jetrne bolezni</li><li>• kronično vnetje</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• PNH</li><li>• podedovana sferocitoza</li><li>• podedovana eliptocitoza</li><li>• hemoglobinopatije</li><li>• encimopatije</li></ul>	
<b>Ekstrakorpuskularne HA:</b>	<b>Mikrocitne anemije</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• imunske in avtoimunske</li><li>• zaradi mehanične okvare</li><li>• zaradi drugih vzrokov</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• sideropenična deficitarna</li><li>• sideroblastna</li><li>• talasemija</li></ul>
<b>Krvavitev</b>	<b>Makrocitne anemije</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• anemija po akutni krvavitvi</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• megaloblastna</li><li>• nemegaloblastne makrocitne</li></ul>

**Priloga 2: Laboratorijske značilnosti hemolitične anemije (1)**

***POVEČANA RAZGRADNJA (HEMOLIZA)***

<b><u>Posredni kazalci:</u></b>	<b><u>Neposredni kazalci:</u></b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• plazma: ↑ hemoglobin</li> <li>• serum: ↑ bilirubin,                      ↑ haptoglobin,                      ↑                      methemalbumin,                      ↑ LDH*</li> <li>• urin: ↑ hemosiderin,                      ↑ hemoglobin</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↓ življenjska doba eritrocitov</li> </ul>

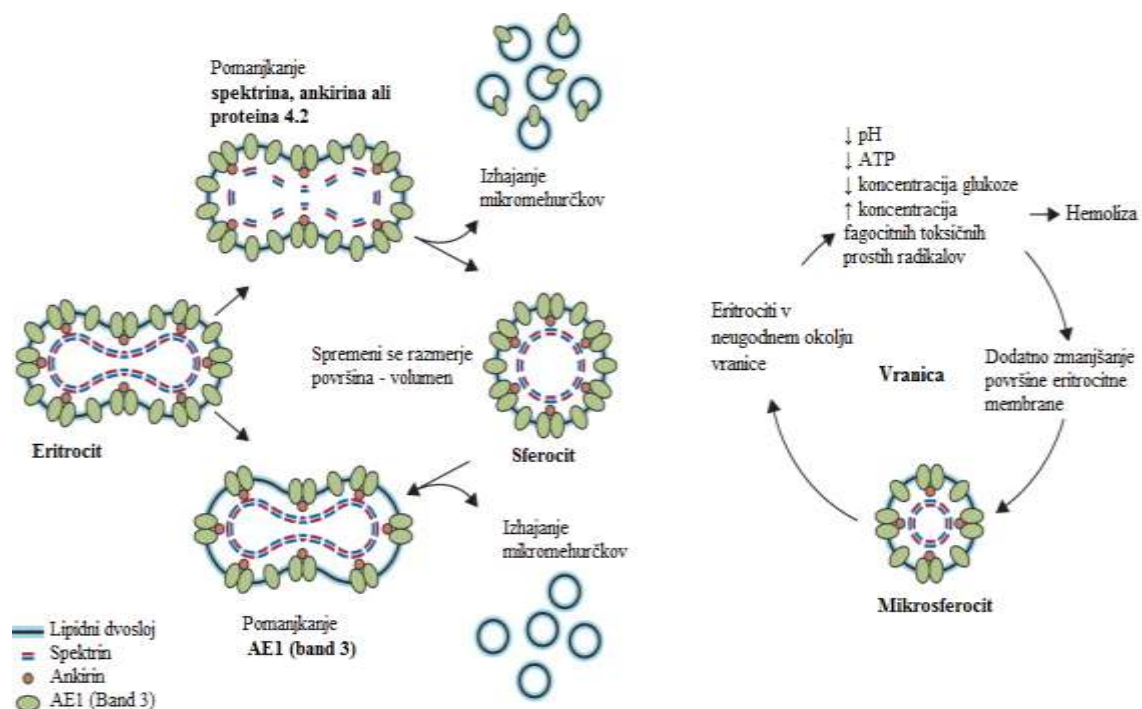
***POVEČANA ERITROPOEZA***

- kri: retikulocitoza
- kostni mozeg: hiperplazija, razmerje G/E (< 1)

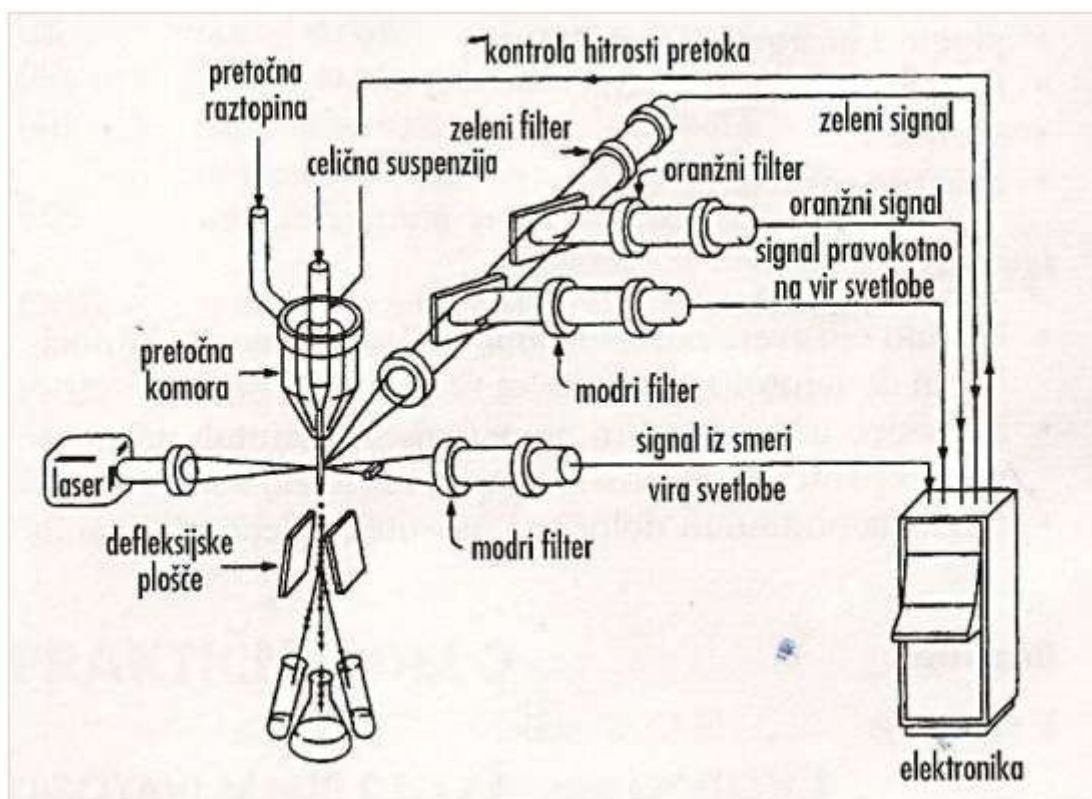
**Priloga 3: Spremembe eritrocitov v krvnem razmazu pri HA (1)**

<b><i>ERITROCITI</i></b>	<b><i>VZROKI</i></b>
• Shizociti	mehanična okvara eritrocitov
• Sferociti	podedovana sferocitoza, AIHA*
• Drepanociti	Hb S
• Kodociti	Hb C, Hb D, talasemija
• Heinzova telesca	pomanjkljiva aktivnost G – 6- PD** nestabilni Hb

### Priloga 4: Shema patofiziologije podedovane sferocitoze (3)



### Priloga 5: Shema pretočnega citometra (12)



**Priloga 6: Določitev PFE s svežo in odtajano koncentrirano raztopino EMA**

<b>ŠT.VZ.</b>	<b>PFE(sveže)</b>	<b>PFE(odtajano)</b>
vz 1	41,2	21,7
vz 2	40,3	25,4
vz 3	41,8	25,3
vz 4	43,6	23,3
vz 5	44,9	15
vz 6	42	22
vz 7	36,7	22
vz 8	52,4	27,8
vz 9	40,2	26,5
vz 10	48,5	30
vz 11	50,1	30,4
vz 12	38,4	30,7
vz 13	38,6	28,9
vz 14	41,7	10,3
vz 15	42,8	12,8
vz 16	48,7	11,4
vz 17	41,2	10
vz 18	42,2	9,76
vz 19	42	7,09
vz 20	46,6	11,6
vz 21	47,3	12,5
vz 22	38,8	10,8
vz 23	43,1	15
vz 24	43,6	7,62
vz 25	42,3	8,06
vz 26	39,6	6,89
vz 27	41,7	8,17
vz 28	46,3	7,71
vz 29	44,8	7,45
vz 30	41,1	7,36
vz 31	38,9	15,1
vz 32	44,2	23,4
vz 33	38,7	24,4
vz 34	42,4	24,7
vz 35	39,3	22,1
vz 36	41,6	20
vz 37	59,4	21,7
vz 38	49,5	20,6
vz 39	39,6	17,2
vz 40	38,7	17,3

<b>vz 41</b>	38,6	23,9
<b>vz 42</b>	42,7	29
<b>vz 43</b>	39,7	23,7
<b>vz 44</b>	41,7	26,1
<b>vz 45</b>	41	26,1
<b>vz 46</b>	42,3	25,7
<b>vz 47</b>	42,2	15,2
<b>vz 48</b>	42,2	15,2
<b>vz 49</b>	38,8	15,6
<b>vz 50</b>	42,8	17,5
<b>vz 51</b>	48,4	18,4
<b>vz 52</b>	42,5	24,9
<b>vz 53</b>	38,3	23,6
<b>vz 54</b>	44,3	28,3
<b>vz 55</b>	43,5	26,6
<b>vz 56</b>	42,7	25,1
<b>Mediana</b>	<b>42,2</b>	<b>21,2</b>
<b>SD</b>	<b>4,0</b>	<b>7,4</b>
<b>MIN</b>	<b>36,7</b>	<b>6,89</b>
<b>MAX</b>	<b>59,4</b>	<b>30,7</b>

**Priloga 7: Prikaz ponovljivosti določanja PFE takoj in po 24-ih urah**

<b>ŠT. VZ.</b>	<b>PFE(sveže)</b>	<b>PFE(po 24h)</b>
<b>vz 1</b>	40,1	41,2
<b>vz 2</b>	43	41,3
<b>vz 3</b>	42,2	41,2
<b>vz 4</b>	43	42,7
<b>vz 5</b>	46,2	46,1
<b>vz 6</b>	41,1	40,8
<b>vz 7</b>	46,1	42
<b>vz 8</b>	40,4	39,3
<b>vz 9</b>	41,3	39,3
<b>vz 10</b>	42,9	41,3
<b>vz 11</b>	44,8	43,3
<b>vz 12</b>	43,5	42,9
<b>vz 13</b>	41,6	41
<b>vz 14</b>	59,4	42,8
<b>vz 15</b>	49,5	41,6
<b>vz 16</b>	39,5	39,5
<b>vz 17</b>	38,7	39,2
<b>vz 18</b>	44,5	43
<b>vz 19</b>	40,9	40,5
<b>vz 20</b>	40,2	41,1
<b>vz 21</b>	40,2	40,4
<b>vz 22</b>	39,7	40,2
<b>vz 23</b>	43,2	44,7
<b>vz 24</b>	42,5	43,9
<b>Mediana</b>	<b>42,4</b>	<b>41,3</b>
<b>SD</b>	<b>4,3</b>	<b>1,8</b>
<b>MIN</b>	<b>38,7</b>	<b>39,2</b>
<b>MAX</b>	<b>59,4</b>	<b>46,1</b>

**Priloga 8: Parametri krvne slike v območju referenčnih mej**

VZOREC	RBC	HGB	HCT	WBC	PLT	PVE	PSVE	PFE	PSVE/PVE	PVE-PSVE
vz 1	4,99	150	0,437	4,4	277	87,6	85,4	36,7	97,5	2,2
vz 2	5,22	166	0,49	8,9	273	93,8	83,6	41,7	89,1	10,2
vz 3	5,02	151	0,452	5,8	365	90	80	39,6	88,9	10
vz 4	5,21	165	0,478	6,8	205	91,7	83,5	44,2	91,1	8,2
vz 5	4,42	138	0,405	8,4	195	91,6	78,2	39,7	85,4	13,4
vz 6	4,04	126	0,372	5,2	154	92,2	81,5	41,2	88,4	10,7
vz 7	4,19	135	0,39	5,2	207	93,2	80,3	40,3	86,2	12,9
vz 8	4,72	148	0,437	8,9	362	92,5	90,8	44,8	98,2	1,7
vz 9	4,59	131	0,383	5,4	219	83,5	72,5	47,3	86,8	11
vz 10	4,37	131	0,387	5,9	243	88,5	77,6	38,8	87,7	10,9
vz 11	4,94	151	0,442	10,2	346	89,4	82	43,1	91,7	7,4
vz 12	3,95	129	0,374	4,6	230	94,5	90,9	44,8	96,2	3,6
vz 13	4,38	141	0,4	4,9	236	91,4	83,6	40,9	91,5	7,8
vz 14	4,75	140	0,422	9,7	180	88,9	86,3	52,4	97,1	2,6
vz 15	4,64	136	0,403	8,7	426	86,8	79,8	39,4	91,9	7
vz 16	4,3	140	0,408	3,8	160	94,8	87,5	41,6	92,3	7,3
vz 17	4,62	153	0,444	3,8	141	96	87,6	44,5	91,3	8,4
vz 18	4,5	144	0,419	7,1	166	93	83,9	40,9	90,2	9,1
vz 19	5,13	157	0,459	6	216	89,4	84,1	40,2	94,1	5,3
vz 20	5,06	162	0,463	6,5	149	91,4	80,7	41,3	88,3	3,1
vz 21	4,51	135	0,404	10	178	89,4	87,6	42,9	98	-8,6
vz 22	4,51	146	0,421	4,8	188	93,3	83	43,5	89	4,3
vz 23	4,96	161	0,472	6,1	230	95,1	88,4	40,1	93	2,1
vz 24	4,42	136	0,402	6,1	181	91	82,8	43	91	0
vz 25	4,87	154	0,452	5,5	159	92,9	83	41,1	89,3	3,6
vz 26	4,21	137	0,411	6,3	172	97,6	93,3	44,2	95,6	2
vz 27	4,68	152	0,443	8,8	225	94,7	92,7	42,8	97,9	-3,2
vz 28	4,19	136	0,396	5	227	94,6	85,5	42,2	90,4	9,1
vz 29	3,98	120	0,354	10,6	252	89,1	77,5	41,6	87	11,6
vz 30	4,43	138	0,407	5,4	189	91,8	86,6	40,2	94,3	5,2
vz 31	4,21	137	0,407	4,9	211	96,8	92,5	44,8	95,6	4,3
vz 32	4,26	136	0,401	6,3	194	94,2	88,9	42	94,4	5,3
vz 33	3,88	119	0,354	9,1	508	91,3	85,8	41,1	94	5,5
vz 34	4,17	128	0,377	5,8	190	90,4	83,2	48,7	92	7,2
vz 35	4,39	132	0,386	6	239	87,8	86,9	41,8	99	0,9
vz 36	4,32	136	0,397	4,8	258	91,8	94,1	42,3	102,5	-2,3
vz 37	5,09	166	0,481	5,2	182	94,5	92,2	38,7	96,2	2,3
vz 38	5,08	157	0,467	8	303	91,9	93,3	42,3	97,6	-1,4
vz 39	5,16	159	0,458	9,1	341	88,7	89,1	41	101,5	-0,4
vz 40	4,91	148	0,428	6,9	231	87,3	83,8	41,7	100,4	3,5
vz 41	4,52	145	0,433	7,7	185	95,7	91,8	42,7	95,9	3,9



**Priloga 9: Parametri krvne slike z odstopanjem od referenčnih vrednostih**

VZOREC	RBC	HGB	HCT	WBC	PLT	PVE	PSVE	PFE	PSVE/PVE	PVE-PSVE
vz 1	5,1	157	0,458	6,2	144	89,7	82,5	38,6	92	7,2
vz 2	4,95	168	0,47	4,7	170	94,9	86,1	38,2	90,7	8,8
vz 3	4,92	157	0,459	9,2	462	93,2	92,2	48,5	98,9	1
vz 4	4,36	145	0,421	4,7	218	96,7	91,9	40,2	95	4,8
vz 5	4,53	141	0,411	4,4	122	90,8	95,4	46,6	105,1	-4,6
vz 6	4,54	138	0,409	4,9	119	90,1	81,6	42,8	90,6	8,5
vz 7	5,04	167	0,491	61,8	162	97,3	84,7	38,7	87	12,6
vz 8	4,49	143	0,421	73,7	266	93,8	82	42,2	87,4	11,8
vz 9	4,57	145	0,428	41,3	203	93,7	85,2	42,8	90,9	8,5
vz 10	4,23	133	0,401	5,5	217	94,8	89,2	43,5	94,1	5,6
vz 11	4,18	134	0,4	14,9	205	95,6	83,5	46,1	87,3	8,3
vz 12	4,44	140	0,407	6,3	125	91,7	80,9	40,4	88,2	3,5
vz 13	4,9	150	0,352	13,1	355	92,1	81,2	43	88,2	10,9
vz 14	3,68	128	0,371	4,7	169	100,8	94,6	46,2	93,8	6,2
vz 15	4,38	146	0,424	7,4	548	96,9	86,7	43,1	89,5	10,2
vz 16	4,16	137	0,39	3,4	179	93,8	84,2	42,4	89,8	9,6
vz 17	3,99	145	0,4	7,1	229	100,3	93,2	39,7	92,9	7,1
vz 18	3,95	131	0,385	3,3	175	97,5	94,1	43,2	96,5	3,4
vz 19	3,87	128	0,372	3,7	174	96,2	90,4	42,5	94	5,8
vz 20	3,84	112	0,331	12,8	601	86,1	85,3	42,6	99,1	0,8
vz 21	3,79	109	0,328	4,1	339	86,5	87,9	44	101,6	-1,4
vz 22	5,09	144	0,428	9,4	331	84,1	78,2	40,4	93	5,9
vz 23	4,08	126	0,375	18,1	231	91,9	82,9	42	90,2	9
vz 24	3,95	125	0,363	14,8	150	91,8	84,2	41,2	91,7	7,6
vz 25	4,8	150	0,442	7,8	76	92,1	86	38,4	93,4	6,1
vz 26	4,49	140	0,401	4,3	91	89,3	82,8	39,3	92,7	6,5
vz 27	4,6	134	0,398	12,5	1146	86,4	81,3	38,8	94,1	5,1
vz 28	4,83	145	0,42	3,7	197	86,8	80,4	38,3	92,6	6,4
vz 29	4,28	129	0,383	13,3	372	89,5	87,8	50,1	98,1	1,7
vz 30	3,81	129	0,397	5,7	94	99,5	101	44,9	101,5	-1,5
vz 31	3,72	135	0,391	7,8	291	105,3	100,7	46,3	95,6	4,6
vz 32	5,67	133	0,412	5,7	188	72,6	73,1	43,6	100,7	-0,5
vz 33	4,94	146	0,427	3,5	144	86,5	82,2	41,7	95	4,3
vz 34	4,01	126	0,373	3,1	148	92,9	88,6	42,4	95,4	4,3
vz 35	4,66	136	0,398	11	89	85,4	82,2	38,7	96,2	3,2
vz 36	4,39	136	0,408	60,5	393	92,9	89,2	42,2	96	3,7
vz 37	3,65	124	0,362	4,6	190	99,1	95,8	44,3	96,7	3,3
vz 38	4,42	148	0,43	10,8	501	97,2	98,3	42,5	101,1	-1,1

**Priloga 10: Določanje vrednosti PFE pri preiskovancih brez odstopanja v krvni sliki**

ŠT.VZ.	PFE	PVE (82-98 fL)	PSVE	PSVE/PVE (94,8-108%)	PVE-PSVE (<9,6 fL)
vz 1	44,8	94,5	90,9	96,2	3,6
vz 2	44,8	92,5	90,8	98,2	1,7
vz 3	36,7	87,6	85,4	97,5	2,2
vz 4	42,8	94,7	92,7	97,9	2
vz 5	44,2	97,6	93,3	95,6	4,3
vz 6	44,8	96,8	92,5	95,6	4,3
vz 7	42,9	89,4	87,6	98	1,8
vz 8	44	86,5	87,9	101,6	-1,4
vz 9	42,6	86,1	85,3	99,1	0,8
vz 10	43,2	97,5	94,1	96,5	3,4
vz 11	46,6	90,8	95,4	105,1	-4,6
vz 12	52,4	88,9	86,3	97,1	2,6
vz 13	40,2	96,7	91,9	95	4,8
vz 14	48,5	93,2	92,2	98,9	1
vz 15	42,5	97,2	98,3	101,1	-1,1
vz 16	42,7	95,7	91,8	95,9	3,9
vz 17	42,2	92,9	89,2	96	3,7
vz 18	42,7	87,3	83,3	96	3,5
vz 19	41,7	88,7	89,1	100,4	-0,4
vz 20	41	91,9	93,3	101,5	-1,4
vz 21	42,3	94,5	92,2	97,6	2,3
vz 22	38,7	85,4	82,2	96,2	3,2
vz 23	42,4	92,9	88,6	95,4	4,3
vz 24	42,2	93,9	97,3	103,6	-3,4
vz 25	41,7	86,5	82,2	95	4,3
vz 26	42,3	91,8	94,1	102,5	-2,3
vz 27	41,8	87,8	86,9	99	0,9
vz 28	43,6	91,1	88,6	97,3	2,6
vz 29	50,1	89,5	87,8	98,1	1,7
vz 30	40,9	89,7	89,4	99,7	0,3
vz 31	40,1	88	88,1	100,1	-0,1
vz 32	39,3	90,4	89	98,4	1,4
vz 33	40,8	90,8	89,1	98,1	1,7
vz 34	40,7	91,6	90,2	98,5	1,4
vz 35	40,8	90,5	90,8	100,3	-0,3
vz 36	39,9	89,7	86,5	96,4	3,2
vz 37	41,6	82,7	86,7	104,8	-4
vz 38	43,3	89,4	96,8	108,3	-7,4
vz 39	43,4	90,3	94,6	104,8	-4,3
vz 40	43,2	89,4	97,8	109,4	-8,4

<b>vz 41</b>	43,9	86,2	91,5	106,1	-5,3
<b>vz 42</b>	39,8	88,7	87,5	98,6	1,2
<b>vz 43</b>	39,2	90,1	92,6	102,8	-2,5
<b>vz 44</b>	39	85,4	85,3	100	0,1
<b>vz 45</b>	43,2	89,7	88,9	99,1	0,8
<b>vz 46</b>	45,4	92,5	98,4	106,4	-5,9
<b>vz 47</b>	45,9	94,2	103	109,3	-8,8
<b>vz 48</b>	41,8	88,8	96,1	108,2	-7,3
<b>vz 49</b>	44	94,2	95,3	101,2	-1,1
<b>vz 50</b>	44,2	96,9	102,3	105,6	-5,4
<b>vz 51</b>	44,4	94,4	102,1	108,2	-7,7
<b>vz 52</b>	41,2	90,3	96,7	107,1	-6,4
<b>vz 53</b>	41,5	94,8	97,9	103,3	-3,1
<b>vz 54</b>	44,8	86,6	85,5	98,7	1,1
<b>vz 55</b>	43,4	93	89	95,7	4
<b>vz 56</b>	45,5	97	96,2	99,2	0,8
<b>vz 57</b>	41	88,2	84,3	95,6	3,9
<b>vz 58</b>	44,5	89	85,3	95,8	3,7
<b>vz 59</b>	42,5	97,3	92,3	94,9	5
<b>vz 60</b>	42,3	89,9	91,4	101,7	-1,5
<b>vz 61</b>	38,3	89,3	85,7	96	3,6
<b>vz 62</b>	43,8	89,9	86,3	96	3,6
<b>vz 63</b>	45,2	90,2	88,3	97,9	1,9
<b>vz 64</b>	41,2	90,3	88,4	97,9	1,9
<b>vz 65</b>	41,4	93,4	91,2	97,6	2,2
<b>vz 66</b>	42,6	97,1	92,7	95,5	4,4
<b>vz 67</b>	41,7	90,1	89,1	98,9	1
<b>vz 68</b>	38,7	88,9	88,3	99,3	0,6
<b>vz 69</b>	42,1	94,2	90,1	95,4	4,1
<b>vz 70</b>	41,3	88,4	85	96,1	3,4
<b>vz 71</b>	41,7	91,9	88,7	96,5	3,2
<b>vz 72</b>	41,4	85,9	84,5	98,4	1,4
<b>vz 73</b>	41,8	88,4	90,6	102,5	-2,2
<b>vz 74</b>	42,1	94	90,3	96,1	3,7
<b>vz 75</b>	46,7	93,1	89,4	96	3,7
<b>vz 76</b>	45,3	90,8	89,8	99	1
<b>vz 77</b>	47	92,8	95,2	102,6	-2,4
<b>vz 78</b>	48,8	96,2	92,5	96,1	3,7
<b>vz 79</b>	54,4	94,5	90	95,2	4,5
<b>vz 80</b>	41,9	85,2	81,4	95,5	3,8
<b>vz 81</b>	45,7	94,3	93,9	99,6	0,4
<b>vz 82</b>	52,8	90,6	91,8	101,3	-1,2
<b>vz 83</b>	45,4	87,8	85,9	97,8	1,9

<b>vz 84</b>	83,2	87,5	88	100,6	-0,5
<b>vz 85</b>	56,7	87,9	88,9	101,1	-1
<b>vz 86</b>	39,5	87,8	86,2	98,2	1,6
<b>vz 87</b>	39,3	91,8	87	94,8	4,8
<b>vz 88</b>	39,2	88,6	86,2	97,3	2,4
<b>vz 89</b>	40,1	87,7	89,1	101,6	-1,4
<b>vz 90</b>	39,5	92,7	95,8	103,3	-3,1
<b>vz 91</b>	42,3	91,4	91,5	100,1	-0,1
<b>vz 92</b>	41,3	83	80,1	96,5	2,9
<b>vz 93</b>	40,8	92,7	94,2	101,6	-1,5
<b>vz 94</b>	38,8	90,4	85,8	94,9	4,6
<b>vz 95</b>	42,8	87,8	92,3	105,1	-4,5
<b>vz 96</b>	44,3	96,3	97,1	100,8	-0,8
<b>vz 97</b>	39,2	94,3	91,4	96,9	2,9
<b>Mediana</b>	<b>42,3</b>	90,4	90	98,5	1,4
<b>SD</b>	<b>5,3</b>	3,5	4,6	3,7	3,4
<b>Min</b>	<b>36,7</b>	82,7	80,1	94,8	-8,8
<b>Max</b>	<b>83,2</b>	97,6	103	109,4	5

**Priloga 11: Določanje vrednosti PFE pri preiskovancih z odstopanjem v krvni sliki**

ŠT.VZ.	PFE	PVE (82-98 fL)	PSVE	PSVE/PVE (94,8-108%)	PVE-PSVE (<9,6 fL)
vz 1	40,9	91,4	83,6	91,5	7,8
vz 2	39,7	91,6	78,2	85,4	13,4
vz 3	44,2	91,7	83,5	91,1	8,2
vz 4	43,1	89,4	82	91,7	7,4
vz 5	38,8	88,5	77,6	87,7	10,9
vz 6	47,3	83,5	72,5	86,8	11
vz 7	39,6	90	80	88,9	10
vz 8	41,7	93,8	83,6	89,1	10,2
vz 9	40,3	93,2	80,3	86,2	12,9
vz 10	41,2	92,2	81,5	88,4	10,7
vz 11	41,6	89,1	77,5	87	11,6
vz 12	42,4	93,8	84,2	89,8	9,6
vz 13	43,1	96,9	86,7	89,5	10,2
vz 14	41,1	92,9	83	89,3	9,9
vz 15	46,2	100,8	94,6	93,8	6,2
vz 16	43	92,1	81,2	88,2	10,9
vz 17	42,2	94,6	85,5	90,4	9,1
vz 18	43	91	82,8	91	8,2
vz 19	40,1	95,1	88,4	93	6,7
vz 20	43,5	93,3	83	89	10,3
vz 21	41,3	91,4	80,7	88,3	10,7
vz 22	40,4	91,7	80,9	88,2	10,8
vz 23	46,1	95,6	83,5	87,3	12,1
vz 24	40,1	83,4	78,3	93,9	5,1
vz 25	40,4	84,1	78,2	93	5,9
vz 26	42,5	96,2	90,4	94	5,8
vz 27	39,7	100,3	93,2	92,9	7,1
vz 28	40,2	89,4	84,1	94,1	5,3
vz 29	40,2	91,8	86,6	94,3	5,2
vz 30	40,9	93	83,9	90,2	9,1
vz 31	44,5	96	87,6	91,3	8,4
vz 32	43,5	94,8	89,2	94,1	5,6
vz 33	38,3	86,8	80,4	92,6	6,4
vz 34	42,8	93,7	85,2	90,9	8,5
vz 35	38,8	86,4	81,3	94,1	5,1
vz 36	42,2	93,8	82	87,4	11,8
vz 37	38,6	89,4	82,2	91,9	7,2
vz 38	41,6	94,8	87,5	92,3	7,3
vz 39	59,4	92,1	85,2	92,5	6,9
vz 40	49,5	93,5	84,7	90,6	8,8

vz 41	39,4	86,8	79,8	91,9	7
vz 42	38,7	97,3	84,7	87	12,6
vz 43	39,3	89,3	82,8	92,7	6,5
vz 44	38,4	92,1	86	93,4	6,1
vz 45	48,7	90,4	83,2	92	7,2
vz 46	41,2	91,8	84,2	91,7	7,6
vz 47	42	91,9	82,9	90,2	9
vz 48	42,8	90,1	81,6	90,6	8,5
vz 49	41,1	91,3	85,8	94	5,5
vz 50	42	94,2	88,9	94,4	5,3
vz 51	38,2	94,9	86,1	90,7	8,8
vz 52	38,6	89,7	82,5	92	7,2
vz 53	44,3	99,1	95,8	96,7	3,3
vz 54	48,4	108,7	105,6	97,1	3,1
vz 55	43,6	72,6	73,1	100,7	-0,5
vz 56	46,3	105,3	100,7	95,6	4,6
vz 57	44,9	99,5	101	101,5	-1,5
vz 58	52,7	94,5	80,3	84,9	14,2
vz 59	49,4	88,3	79,3	89,8	9
vz 60	51,1	86,3	76,8	89	9,5
vz 61	56,4	87,6	80,6	92	7
vz 62	60,8	90,4	83,4	92,3	7
vz 63	55,9	89,9	84	93,4	5,9
vz 64	46,4	94,7	89,3	94,3	5,4
vz 65	52,3	105,9	105,8	99,9	0,1
vz 66	42,1	81,5	83,7	102,7	-2,2
vz 67	47,2	97,5	92	94,4	5,5
vz 68	41,8	90,4	84,6	93,6	5,8
vz 69	42,4	98,6	95,7	97,1	2,9
vz 70	42,8	98,2	98,7	100,5	-0,5
vz 71	46,3	85,6	78,5	91,7	7,1
vz 72	45,7	94,6	83,4	88,2	11,2
vz 73	50,3	88,8	81,6	91,9	7,2
vz 74	53,9	92,4	83,4	90,3	9
vz 75	63,8	89,1	74,3	83,4	14,8
vz 76	72	96,4	83,2	86,3	13,2
vz 77	60,9	93,2	85	91,2	8,2
vz 78	35,7	87,7	77,9	88,8	9,8
vz 79	39,7	90,5	80,2	88,6	10,3
vz 80	39,9	92,9	83,4	89,8	9,5
vz 81	37	88,6	82,6	93,2	6
vz 82	40	94,1	87,4	92,9	6,7
vz 83	36,9	91,9	85,5	93	6,4

vz 84	39,7	98,9	97,3	98,4	1,6
vz 85	43,2	94,9	89,5	94,3	5,4
vz 86	39,6	89,4	81,5	91,1	7,9
vz 87	40,5	93,8	85,7	91,4	8,1
vz 88	39,3	96,1	90	93,6	6,1
vz 89	45,1	88,9	84	94,5	4,9
<b>Mediana</b>	<b>42,2</b>	92,1	83,5	91,7	7,3
<b>SD</b>	<b>6,4</b>	5,1	6,3	3,6	3,3
<b>Min</b>	<b>35,7</b>	72,6	72,5	83,4	-2,2
<b>Max</b>	<b>72</b>	108,7	105,8	102,7	14,8

### Priloga 12: Presejalni parametri pri bolnikih s PS

VZOREC	PFE(MnX)	PVE(fL)	PSVE(fL)	PSVE/PVE (%)	
				(< 94,8%)	(> 9,6 Fl)
vz 1	33,1	79,8	68,8	85,9	11
vz 2	40,1	75,9	58,1	76,5	17,8
vz 3	31,9	87,2	65,9	75,5	21,3
vz 4	33,7	81,1	79,4	97,9	1,7
vz 5	27,5	68,3	55,5	81,2	12,8
vz 6	39,6	89,9	77,7	86,4	12,2
vz 7	35,3	98,2	65	66,2	33,2
vz 8	33,6	84,8	69,3	81,7	15,5
vz 9	29,5	84,2	67,5	80,2	16,7
vz 10	26,4	78,9	59,2	75	19,7
vz 11	26,5	83,9	73,5	87,6	10,4
vz 12	29,2	79,2	56,8	71,7	22,4
vz 13	32,8	91,4	72,1	78,8	19,3
vz 14	30,7	95	74,5	78,4	20,5
vz 15	31,9	104,1	73,1	70,2	31
vz 16	34,1	79,1	70,2	88,7	8,9
vz 17	31,4	91,8	67,5	73,5	24,3
vz 18	27,9	82,6	65,7	79,5	16,9
<b>Mediana</b>	<b>31,9</b>	<b>84,1</b>	<b>68,2</b>	<b>79,2</b>	<b>17,4</b>
<b>Min</b>	<b>26,4</b>	<b>68,3</b>	<b>55,5</b>	<b>66,2</b>	<b>1,7</b>
<b>Max</b>	<b>40,1</b>	<b>104,1</b>	<b>79,4</b>	<b>102,1</b>	<b>33,2</b>