

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SIMONA KAŠE

MAGISTRSKA NALOGA

Magistrski študij laboratorijske biomedicine

Ljubljana, 2014

Univerza v Ljubljani



Fakulteta za farmacijo

SIMONA KAŠE

**PRIMERJAVA MIKROSKOPSKEGA DOLOČANJA CELIC
V LIKVORJU Z AVTOMATIZIRANO METODO NA
HEMATOLOŠKEM ANALIZATORJU SYSMEX XN-1000**

**COMPARISON OF MICROSCOPIC METHOD WITH
SYSMEX XN-1000 AUTOMATED METHOD FOR COUNTING
CELLS IN CEREBROSPINAL FLUID**

MAGISTRSKA NALOGA

Magistrski študij laboratorijske biomedicine

Magistrsko nalogo sem opravila v Laboratoriju za analitiko telesnih tekočin, Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani, pod vodstvom mentorja, prof. dr. Milana Skitka in somentorice mag. Elizabete Božnar Alič.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Milanu Skitku in somentorici mag. Elizabeti Božnar Alič za izkazano pomoč in nesebične nasvete pri izdelavi magistrske naloge.

Zahvaljujem se tudi partnerju, staršem in sodelavcem v službi za podporo pri mojem študiju in vzpodbudne besede ter zaposlenim v Laboratoriju za analitiko telesnih tekočin za pomoč v laboratoriju in pri izdelavi magistrske naloge.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo z naslovom *Primerjava mikroskopskega določanja celic v likvorju z avtomatizirano metodo na hematološkem analizatorju Sysmex XN-1000* samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Milana Skitka in somentorstvom mag. Elizabete Božnar Alič.

Podpis:

Predsednik komisije: izr. prof. dr. Iztok Grabnar

Mentor: izr. prof. dr. Milan Skitek

Somentor: mag. Elizabeta Božnar Alič

Član: izr. prof. dr. Mitja Kos

Ljubljana, 2014

KAZALO

1.	UVOD	1
1.1.	ANATOMIJA IN FIZIOLOGIJA.....	1
1.1.1.	Možganski precati	1
1.1.2.	Možganske ovojnice	2
1.1.3.	Horoidni pleteži in krvno-likvorska pregrada	3
1.1.4.	Krvno-možganska pregrada	4
1.2.	LIKVOR.....	4
1.2.1.	Nastanek in cirkulacija.....	4
1.2.2.	Količina	5
1.2.3.	Vloga.....	5
1.2.4.	Sestava	5
1.2.5.	Resorpcija.....	6
1.2.6.	Preiskave	6
1.3.	BOLEZNI OSREDNJEGA ŽIVČEVJA.....	7
1.4.	ODVZEM VZORCA LIKVORJA	8
1.5.	CELICE V LIKVORJU	8
1.6.	ANALIZA CELIC	9
2.	IZHODIŠČA IN NAMEN DELA	11
3.	MATERIALI IN METODE	12
3.1.	VZORCI IN POPULACIJA.....	12
3.2.	REAGENTI, INSTRUMENTI IN OPREMA.....	13
3.2.1.	Mikroskopska metoda	13
	Pri mikroskopskem določanju koncentracije levkocitov in eritrocitov potrebujemo (39): ...	13
3.2.2.	Avtomatizirana metoda	13
3.3.	MIKROSKOPSKO DOLOČANJE	14
3.4.	AVTOMATIZIRANA METODA.....	15
3.4.1.	Sysmex XN-1000	15
3.4.2.	Hidrodinamsko fokusiranje in impedanca	16
3.4.3.	Pretočna citometrija	17
3.5.	ZUNANJA KONTROLA KAKOVOSTI.....	18
3.6.	STATISTIKA	19
4.	REZULTATI	22

4.1.	TOČNOST	22
4.2.	NATANČNOST	22
4.3.	PRIMERJAVA METOD	23
4.3.1.	Levkociti	25
4.3.2.	Eritrociti	27
4.3.3.	Mononuklearni levkociti	28
4.3.4.	Polimorfonuklearni levkociti.....	29
4.3.5.	Zunanja kontrola kakovosti	30
5.	RAZPRAVA.....	31
6.	SKLEPI	45
7.	LITERATURA	46

KAZALO SLIK

Slika 1: Prikaz možganskih prekatov.....	1
Slika 2: Možganske ovojnice.....	2
Slika 3: Mreža Fuchs-Rosenthal-ove komore	14
Slika 4: Pretočna celica	17
Slika 5: Sistem pretočne citometrije	18

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Orientacijske referenčne vrednosti	6
Preglednica II: Razdelitev populacije glede na starost	12
Preglednica III: Število in delež vzorcev, razdeljenih glede na koncentracije levkocitov	13
Preglednica IV: Povprečne vrednosti relativnih napak (n=23)	22
Preglednica V: Povprečne vrednosti, standardni odklon in koeficienti variacije za kontrolne meritve (n=23)	23
Preglednica VI: Povzetek statističnih izračunov za Bland – Altmanov diagram.....	24
Preglednica VII: Rezultati zunanje kontrole kakovosti, ZL1/13	30
Preglednica VIII: Rezultati avtomatizirane metode za levkocite za zunanjo kontrolo kakovosti ZL1/13.....	30

KAZALO DIAGRAMOV

Diagram 1: Bland-Altmanov diagram razlik za levkocite ($10^6/L$)	25
Diagram 2: Bland-Altmanov diagram razlik za levkocite »do 5« ($10^6/L$).....	25
Diagram 3: Bland-Altmanov diagram razlik za levkocite »do 30« ($10^6/L$).....	26
Diagram 4: Bland-Altmanov diagram razlik za levkocite »do 200« ($10^6/L$).....	26
Diagram 5: Bland-Altmanov diagram razlik za meritev eritrocitov ($10^6/L$).....	27
Diagram 6: Bland-Altmanov diagram razlik za meritev eritrocitov »do 1000« ($10^6/L$)	27
Diagram 7: Bland-Altmanov diagram razlik za mononuklearne celice, koncentracije ($10^6/L$)	28
Diagram 8: Bland-Altmanov diagram razlik za mononuklearne celice, deleži (%).	28
Diagram 9: Bland-Altmanov diagram razlik za polimorfonuklearne celice ($10^6/L$)	29
Diagram 10: Bland-Altmanov diagram razlik za polimorfonuklearne celice, delež (%).	29

SEZNAM OKRAJŠAV

ERC	eritrociti
kat. št.	kataloška številka
KV	koeficient variacije
LKC	levkociti
MN	mononuklearni levkociti
MN %	delež mononuklearnih levkocitov
NaCl	natrijev klorid
OŽ	osrednje živčevje
PMN	polimorfonuklearni levkociti
PMN %	delež polimorfonuklearnih levkocitov
SD	standardna deviacija oziroma standardni odklon
TC-BF / TC	»skupno število celic z jedrom«, (ang. total nucleated cell count-body fluid)
UKC	Univerzitetni klinični center

POVZETEK

Mikroskopsko določanje številčne koncentracije eritrocitov in levkocitov ter diferenciacija levkocitov v likvorju oziroma »ročna« metoda še vedno velja za »zlati standard«. Ročna metoda ima ekonomske in analitične slabosti. Namen te naloge je ugotoviti ujemanje med ročno in avtomatizirano metodo. V raziskovalno delo smo vključili 119 vzorcev likvorja, ki so bili analizirani med aprilom in majem 2013. Vse vzorce smo analizirali z ročno mikroskopsko in avtomatizirano metodo, s hematološkim analizatorjem Sysmex XN-1000, ki ima ločen modul za analizo telesnih tekočin. Z Bland-Altmanovo statistično analizo smo določili primerljivost rezultatov med metodama.

Pri določanju številčne koncentracije levkocitov in eritrocitov daje avtomatizirana metoda točne rezultate (povprečna relativna napaka za eritrocite 2,3 % (nivo I) in -0,8 % (nivo II), za levkocite 0,9 % (nivo I)). Slabšo točnost smo zaznali pri zvišanih koncentracijah levkocitov (povprečna relativna napaka -15,2 % (nivo II)) in absolutnih številčnih koncentracijah mononuklearnih (MN, nivo I -8,3 %, nivo II -11,7 %) in polimorfonuklearnih celic (PMN, nivo I -13,8 %, nivo II -17,6 %). Pri določanju koncentracije levkocitov sta metodi v koncentracijskih območjih $0 - 5 \times 10^6/\text{L}$ (povprečni odklon $0,6 \times 10^6/\text{L}$), $0 - 30 \times 10^6/\text{L}$ (povprečni odklon $1,2 \times 10^6/\text{L}$) in $0 - 200 \times 10^6/\text{L}$ levkocitov (povprečni odklon $0,2 \times 10^6/\text{L}$) dobro ujemajo. V vseh primerih daje avtomatizirana metoda višje številčne koncentracije levkocitov kot ročna metoda. Pri določanju deležev (povprečni odklon 4,85 %, meje ujemanja -69,4 – 79,1 %) in koncentracije MN (povprečni odklon $14,09 \times 10^6/\text{L}$, meje ujemanja $-100,3 - 128,5 \times 10^6/\text{L}$) in PMN (delež - povprečni odklon 5,44 %, meje ujemanja -52,79 – 63,68 %; koncentracija - povprečni odklon $6,0 \times 10^6/\text{L}$, meje ujemanja $-164,0 - 176,1 \times 10^6/\text{L}$) je primerljivost rezultatov slabša. Slabša primerljivost rezultatov pri primerjavi eritrocitov (povprečni odklon $1105,6 \times 10^6/\text{L}$) je posledica visoke spodnje meje zaznave analizatorja. Pri 109 vzorcih (93,2%) je bila razlika med številom levkocitov in »skupnim številom celic z jedrom« od 0 do $3 \times 10^6/\text{L}$. Šest vzorcev (5,1%) ima razliko levkociti/»skupno število celic z jedrom« od 4 do $11 \times 10^6/\text{L}$. Pri primerjavi rezultatov avtomatizirane metode pri analizi zunanje kontrole kvalitete (ZL1/13, RfB) so rezultati za koncentracijo levkocitov (vzorec A 5 %, vzorec B -3,1 %) odlični.

Ključne besede: likvor, mikroskopska metoda, Sysmex XN-1000

ABSTRACT

A microscopic or manual method is still the »gold standard« for counting cells in the cerebrospinal fluid. Manual method has economic and laboratory disadvantages. The purpose of our work is to evaluate the agreement between the automated and manual methods. In the research work we included 119 samples of the cerebrospinal fluid, which were analyzed in the period from April to May 2013. All samples were analyzed with the manual and automated methods on the Sysmex XN-1000. The Sysmex XN-1000 is a modified hematology analyzer with a separated body fluid mode. The agreement between the methods was examined by the Bland-Altman statistical analysis.

When determining the leucocyte and erythrocyte concentration, the automated method provides accurate results (average relative error for erythrocytes 2,3 % (level I) and -0,8 % (level II), leucocytes 0,9 % (level I)). A lower degree of accuracy was observed at higher leucocyte levels (average relative error -15,2 % (level II) and absolute MN concentration (level I -8,3 %, level II -11,7 %) and PMN concentrations (level I -13,8 %, level II -17,6 %). Good agreement of the methods was found in leucocytes at concentration levels $0 - 5 \times 10^6/\text{L}$ (bias $0,6 \times 10^6/\text{L}$), $0 - 30 \times 10^6/\text{L}$ (bias $1,2 \times 10^6/\text{L}$) and $0 - 200 \times 10^6/\text{L}$ (bias $0,2 \times 10^6/\text{L}$). In all these cases the automated method gives higher counts than manual method. The results of MN proportion (bias 4,85 %, limits of agreement -69,4 – 79,1 %) and MN concentration (bias $14,09 \times 10^6/\text{L}$, limits of agreement $-100,3 - 128,5 \times 10^6/\text{L}$) and PMN (proportion - bias 5,44 %, limits of agreement -52,79 – 63,68 %; concentration - bias $6,0 \times 10^6/\text{L}$, limits of agreement $-164,0 - 176,1 \times 10^6/\text{L}$) are unreliable. Poor agreement of the erythrocyte counts (bias $1105,6 \times 10^6/\text{L}$) is the result of the high lower detection limit. The difference between the leucocyte count and »total nucleated cell count« with 109 samples (93,2%) was from $0 - 3 \times 10^6/\text{L}$. Six samples (5,1%) have the leucocyte/»total nucleated cell count« difference from $4 - 11 \times 10^6/\text{L}$. Excellent results of leucocyte count were achieved when comparing the results of automated analysis of external quality control (ZL1/13, RfB).

Key words: cerebrospinal fluid, microscopic method, Sysmex XN-1000

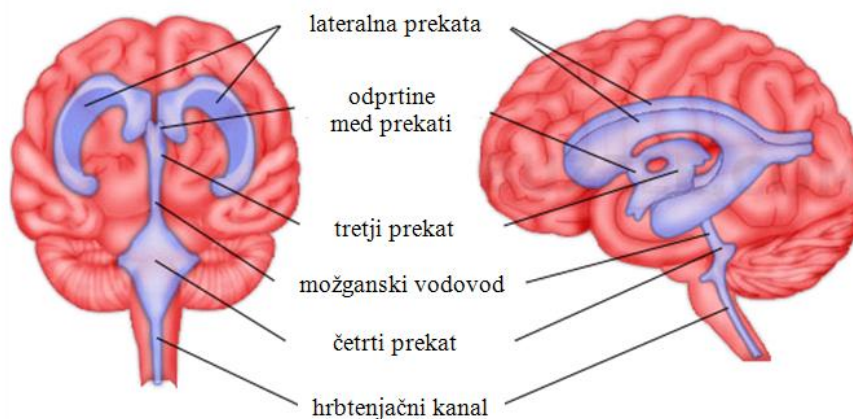
1. UVOD

1.1. ANATOMIJA IN FIZIOLOGIJA

1.1.1. Možganski precati

Možganski precati (*ventriculi cerebri*) ležijo v velikih možganih. Stranska prekata (*ventriculi lateralis*) ležita v levi in desni polobli, tretji prekat (*ventriculus tertius*) leži v diencefalonu. Med možganskim deblom in malimi možgani leži četrti prekat – *ventriculus quartus* (1,2,3).

Stranski prekat je paren in sega v vse režnje velikih možganov. Preko odprtine, široke 0,5 cm (*foramen interventriculaere*), sta stranska prekata povezana s tretjim prekatom. Tretji prekat je neparen in ima obliko navpične špranje. Stransko meji na talamus, spodaj na hipotalamus, spredaj in zgoraj na možgansko gredo (*corpus callosum*). Zadaaj preko ozkega možganskega vodovoda – *aqueductus cerebri* prehaja v četrti prekat (1,2,3). Četrti prekat prehaja navzdol v veliko cisterno (*cisterna magna*) in centralni kanal (1,2,4).



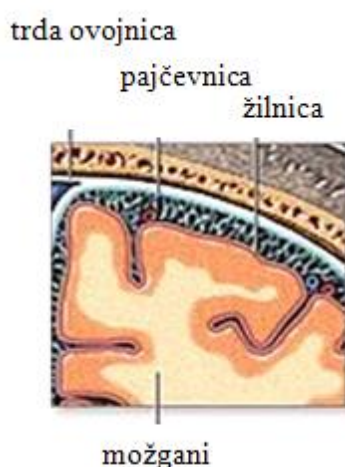
Slika 1: Prikaz možganskih prekatov
(prirejeno po viru: <http://www.buzzle.com/articles/ventricles-of-the-brain.html>, dostopano 24.10.2013)

V možganskih precatih se pretaka možganska tekočina imenovana likvor ali cerebrospinalna tekočina katero izločajo horoidni pleteži in ependimske celice (2,5). Horoidni pleteži se nahajajo v vseh precatih. Likvor teče iz stranskih prekatov skozi medprekatno odprtino (*foramen interventriculare*) v tretji prekat, nato pa skozi možganski

vodovod v četrti prekat. Iz četrtega prekata odteka v subarahnoidalni prostor osrednjega živčevja skozi tri odprtine pod malimi možgani (1,2).

1.1.2. Možganske ovojnice

Možgane in hrbtenjačo obdajajo tri ovojnice oziroma t.i. meninge. Zunanja trda ovojnica, imenovana *dura mater*, obdaja lobanjo in kanal v hrbtenici. Srednja ovojnica je filamentozna membrana, tako imenovana *arahnoida*. Mehka ovojnica ali žilnica, ki obdaja površino možganov in hrbtenjače, se imenuje *pia mater* (6).



Slika 2: Možganske ovojnice

(prirejeno po viru: http://sl.wikipedia.org/wiki/%C4%8Clove%C5%A1ki_mo%C5%BEgani, dostopano 24.10.2013)

Trda ovojnica ima dva lista, med katerima je epiduralni prostor. Zunanji list je pokostnica, notranji pa prava *dura*. Zunanji list *dure* odeva celotni hrbtenični kanal, notranji list pa sega samo do drugega križničnega vretenca. Epiduralni prostor v hrbteničnem kanalu vsebuje maščevje in venske pleteže. V možganskem epiduralnem prostoru so široki venski sinusi, ki zbirajo kri iz možganov in očesne votline. V njih se tudi resorbira likvor (1,2,3).

Med trdo ovojnico in pajčevnico je subduralni prostor, med pajčevnico in žilnico pa subarahnoidalni prostor, v katerem se nahaja likvor. Pajčevnica v hrbtenici sega do drugega križničnega vretenca tako kot notranji list trde ovojnice. V sinusih trde ovojnice pajčevnica tvori zrnaste strukture (t.i. arahnoidalne granulacije), skozi katere se likvor

resorbira v sinuse trde ovojnice. Te granulacije so posebej izrazite v zgornjem sagitalnem sinusu (1,2,3).

Žilnica vsebuje krvne žile in sodeluje tudi pri zgradbi horoidnih pletežev v prekatih. Ker žilnica sega do drugega ledvenega vretenca, je subarahnoidalni prostor v hrbtenici zelo obsežen (1,2,3).

1.1.3. Horoidni pleteži in krvno-likvorska pregrada

Horoidni pletež (*plexus choroideus*) je gobasta struktura (7) v kateri se žile notranje možganske ovojnice razraščajo v notranjost prekata (1). Prisotni so v vseh prekatih (8). Likvor nastaja iz plazme zaradi razlike v hidrostatskem tlaku in sekrecijo z aktivnim transportom v kapilarah horoidnega pleteža (6).

Ependimske celice prekrivajo površino možganskih prekatov in so med seboj povezane s tesnimi stiki (4,9). Tesen stik med endotelijskimi celicami skupaj z mrežo kapilar v horoidnem pletežu imenujemo krvno-likvorska pregrada. Tesni stiki med celicami preprečujejo prehod številnim molekulam (8,10). Snovi prehajajo v likvor z difuzijo, olajšano difuzijo in aktivnim transportom (11). Ependimske celice so se modificirale za transportne funkcije. Na strani likvorja so zelo podobne transportnemu epiteliju z mikrovili in vsebujejo veliko količino mitohondrijev na bazalni strani celic. Na apikalni strani so ependimske celice povezane s tesnimi stiki (8,10).

Kapilare v horoidnem pletežu se razlikujejo od kapilar v možganih v tem, da je omogočen prosti prehod molekul čez endotelijske celice skozi fenestracije in medcelične vrzeli (11,12).

Notranje epitelijske celice pajčevnice sestavljajo celice, ki so povezane med seboj s točkastimi stičišči. Stičišča omogočajo hitro difuzijo likvorja in njegovo uravnoteženje s subarahnoidalno tekočino, ki tvori glavno pot drenaže likvorja (8).

1.1.4. Krvno-možganska pregrada

Krvno-možgansko pregrado tvorijo endotelijske celice globokih možganskih kapilar (4). Kapilare v možganih se od sistemskih kapilar razlikujejo po tesnih stikih, manjšem številu pinocitnih vakuol, večjem številu mitohondrijev (odraz visoke metabolične aktivnosti), tanjši bazalni membrani (vzdrževanje strukturne trdnosti v primeru hidrostatskega stresa) in po prisotnosti nožic astrocitov (13,14). Kapilare horoidnega pleteža imajo bolj opazne fenestracije (14,15).

1.2. LIKVOR

Likvor ali cerebrospinalna tekočina je bistra, kristalno čista, brezbarvna tekočina. Kroži v prostoru med pajčevnico in žilnico, v tako imenovanim subarahnoidalnem prostoru. Zapolnjuje prekate in obdaja zunanjo površino možganov, deluje kot mehanska zaščita in izvaja drenažo presnovnih produktov možganov (7,16,17).

1.2.1. Nastanek in cirkulacija

Večina likvorja (70-80 %) nastaja v možganskih prekatih, v horoidnih pletežih. Ostalih 20-30% proizvajajo endodimske celice (17,18).

Kljub temu, da likvor nastaja s filtracijo plazme, ni ultrafiltrat plazme (6). Endotelij kapilar horoidnega pleteža je fenestriran in prva stopnja nastajanja likvorja je prehod ultrafiltrata plazme skozi endotelij katerega olajša hidrostatski tlak. Med drugo stopnjo nastajanja likvorja ultrafiltrat prehaja čez horoidni epitelij, kar je aktivni metaboličen proces, ki spremeni ultrafiltrat v sekrecijski produkt t.i. likvor. Druga stopnja je aktiven proces. Nastajanje likvorja se bistveno ne spreminja z zmernimi spremembami v intrakranialnem tlaku (18).

Likvor nastaja neprenehoma in kroži v intrakranialnem in spinalnem subarahnoidalnem prostoru (2,7,19).

Na cirkulacijo likvorja delujejo spremenljivi hidrodinamski pogoji cerebrospinalne pulzacije (povečanje možganskega volumna v sistoli in njegovo zmanjšanje v diastoli),

elastičnost možganskih ovojnic, razširitev ven pri izdihu, vzdržnosti pri vdihu, položaj telesa in premikanje glave (16). Veliki in hitri premiki likvorja se dogajajo z vsakim srčnim utripom med sistolo in diastolo. Ta premikanja predstavljajo nihanje naprej in nazaj med prekati in okrog po subarahnoidalnem prostoru (20).

1.2.2. Količina

Pri odraslem človeku vsako uro nastane približno 20 mL likvorja, kar je 500 mL dnevno (4,21). Volumen pri odraslem človeku znaša 90-150 mL likvorja, pri rojstvu in dojenčkih pa 10–60 mL (17). Celotna količina likvorja se zamenja v 6-8h (5,7).

Pri dojenčku, količina likvorja variira med 40-60 mL, pri majhnih otrocih 60-100 mL, pri starejših otrocih 80-120 mL. V patoloških stanjih kot sta meningitis in hidrocefalus, se lahko količina likvorja zelo poveča ali zmanjša (spontana alikvorea, postpunkcijski meningizem, včasih po poškodbi možganov) (16).

1.2.3. Vloga

Ključna vloga likvorja je vzdrževanje homeostaze možganov (22). Likvor ima pomembno vlogo pri vzdrževanju kemičnega okolja osrednjega živčevja (OŽ), zagotavlja mehansko podporo možganom, dobavlja hranila in odstranjuje odpadne snovi OŽ, transportira biološko aktivne snovi ter predstavlja mazivo (lubrikant) za OŽ (6,17,22).

1.2.4. Sestava

Po sestavi je podoben plazmi brez beljakovin. Glavne sestavine so glukoza in kloridni ioni, beljakovin je zelo malo (6).

Spremembe v sestavi oziroma pojav krvnih celic v likvorju kažejo na bolezni ovojnic ali druge bolezni možganov (6).

Preglednica I: Orientacijske referenčne vrednosti (17)

Parameter	odrasli	enote	opombe
Albumin	0,10 – 0,30	g/L	
Kalcij	1,05 – 1,35	mmol/L	
Klorid	115 – 130	mmol/L	
Glukoza	2,75 – 4,40	mmol/L	
Laktat	1,13 – 3,23	mmol/L	
Celokupni proteini	0,15 – 0,45	g/L	novorojenčki: 0,15-1,00 odrasli po 60. letu: 0,15-0,60
Levkociti	0 - 5	10 ⁶ /L	novorojenčki: 0-30

1.2.5. Resorpcija

Likvor se resorbira v venske sinuse prek pajčevničnih (arahnoidnih) granulacij (19). Granulacije se nahajajo znotraj celotne površine lobanje in po hrbteničnem kanalu do točk, kjer hrbtenjačni živci zapuščajo trdo ovojnico (7). Resorpcija likvorja nazaj v kri poteka v razmerju, ki je enak nastajanju likvorja (6).

Večina likvorja odteka neposredno v kri preko pajčevničnih vilijev in granulacij, le manjši del odteka v limfne vozle (23,24). Odtekanje likvorja v limfne vozle ima verjetno pomembno vlogo pri novorojenčkih, kjer pajčevnični viliji še niso razviti (23,25).

Likvor počasi odteka iz subarahnoidalnega prostora vzdolž olfaktornih živcev in vzdolž vseh drugih možganskih in perifernih živcev v periferna tkiva (20).

1.2.6. Preiskave

Preiskave likvorja so pomembne v diagnostiki bolezni OŽ, tako okužb kot tudi nevroloških motenj (26).

Osnovna citološka analiza likvorja zajema: določanje številčne koncentracije in diferenciacijo levkocitov ter določanje številčne koncentracije eritrocitov (5,6).

Biokemična analiza likvorja zajema določanje koncentracije glukoze, laktata, proteinov, albumina in imunoglobulinov. Pri določanju koncentracije glukoze, albuminov in imunoglobulinov primerjalno analiziramo tudi koncentracijo analita v serumu (26).

Druge specialne preiskave: mikrobiološke kulture, bakteriološki sediment likvorja, določitev encimske aktivnosti laktat dehidrogenaze in njenih izoencimov, določitev encimske aktivnosti nevron-specifične enolaze, določitev koncentracije proteina S100 (26).

1.3. BOLEZNI OSREDNJEGA ŽIVČEVJA

Vsaka posamezna motnja OŽ ima svoj patološki mehanizem, ki se lahko kaže kot sprememba v makroskopski, mikroskopski in biokemični sestavi likvorja (27).

Med boleznimi OŽ prištevamo (28):

- cerebrovaskularne bolezni (npr. možganska kap, motnje možganskega krvnega pretoka),
- tumorji OŽ (npr. gliomi, tumorji ovojnic, možganske metastaze),
- žilne anomalije in žilni tumorji (npr. anevrizme, angiomi, hemanglioblastomi),
- demielinizacijske bolezni (npr. multipla skleroza, akutni diseminirani encefalomyelitis, akutni hemoragični encefalomyelitis),
- degenerativne in heredodegenerativne bolezni (npr. Parkinsonova bolezen, Chorea Huntington, demenca, Creutzfeld-Jakobova bolezen, Alzheimerjeva bolezen),
- poškodbe OŽ (kranio-cerebralne poškodbe in poškodbe hrbtenjače),
- okužbe OŽ (npr. bakterijske, virusne, itd.),
- razvojne motnje (npr. cerebralna paraliza, disfraizem, fakomatoze),
- metabolične in toksične bolezni (npr. Wilsonova bolezen, sindrom Wernicke-Korsakow, funikularna mieloza),
- bolezni hrbtenjače (sindromi prečnega prereza hrbtenjače, vaskularne bolezni hrbtenjače, spinalni tumorji, metastaze, žilne anomalije, vnetne bolezni, degenerativne bolezni) (28).

1.4. ODVZEM VZORCA LIKVORJA

Najpogostejše se odvzame vzorec likvorja z lumbalno punkcijo. Redkeje se izvajata subokcipitalna ali ventrikularna punkcija (17,26).

Likvor se vzorči v plastične (polipropilenske) epruvete. Epruvete morajo biti prozorne, konične in zaprte s pokrovčkom z navojem (26).

Indikacije za punkcijo: meningitis, subarahnoidalna krvavitev, malignost OŽ, nevrodegenerativne bolezni (5).

Kontraindikacije za punkcijo: okužba mesta punkcije, ker se lahko okužba razširi na možganske ovojnice, zvišan intrakranialni tlak (5).

Lumbalna punkcija je poseg pri katerem se preiskovancu odvzame vzorec likvorja s perkutano punkcijo subarahnoidalnega spinalnega prostora v ledvenem področju. Praviloma se poseg izvede pri pacientu, ki leži na boku. Izvede se lahko tudi pri sedečem pacientu (16).

V ledvenem predelu hrbtenice je hrbtenični kanal najlažje dostopen z zadnje strani. Trni vretenc so skoraj vodoravni, presledki med vretenci so široki, še posebej, če je hrbtenica upognjena naprej (29). Običajno se izvrši med tretjim in četrtem ali četrtem in petim ledvenim vretencem. Na mestu, kjer se vrši punkcija, ni hrbtenjače, ker se le-ta konča v višini prvega ledvenega vretenca. Punkcija se lahko izvede tudi v vsakem drugem medvretenčnem prostoru. Pri otrocih se običajno priporoča čim nižji medvretenčni prostor, ker pri njih hrbtenjača sega do četrtega ledvenega vretenca (16).

V primeru inficiranih kožnih sprememb v ledveni regiji, se priporoča subokcipitalna punkcija (16).

1.5. CELICE V LIKVORJU

V normalnem vzorcu likvorja lahko najdemo do $5 \times 10^6/\text{L}$ levkocitov pri odraslih ter do $30 \times 10^6/\text{L}$ levkocitov pri novorojenčkih (17). Večje koncentracije levkocitov smatramo za patološke vrednosti. Povečane koncentracije levkocitov niso samo posledica okužbe ampak

se lahko njihova koncentracija poveča tudi v primeru nevroloških napadov, možganske krvavitve, malignih procesov OŽ ali v primeru vnetnih procesov (30).

Diferenciranje levkocitov na posamezne vrste je pomemben diagnostični podatek. Pri zdravem odraslem človeku je razmerje med limfociti in monociti 7:3, torej 70 % limfocitov in 30 % monocitov. Občasno so prisotni tudi posamezni polimorfonuklearni levkociti (31). Prisotnost nekaj polimorfonuklearnih levkocitov pri novorojenčkih ni patološka vrednost (32).

Pogosto je v likvorju zdravih preiskovancev prisotnih tudi nekaj eritrocitov. Njihovo prisotnost se načeloma pripisuje kontaminaciji likvorja s krvjo iz perifernih žil, katere se poškodujejo ob sami izvedbi punkcije (6).

V likvorju preiskovancev so lahko prisotne tudi druge vrste celic, ki so posledica različnih bolezenskih stanj: celice mieloične vrste (nevtrofilci, eozinofilci, bazofilci), eritroidne vrste, limfoidne vrste (limfociti, reaktivni limfociti, plazma celice), monojedrne fagocitne celice (monociti, makrofagi), epiteljske celice (ventrikularne, leptomeningealne), maligne celice (hematopoetskega in nehametopoetskega izvora), celice nevronov ter različni mikroorganizmi (bakterije, glivice, paraziti) (9).

1.6. ANALIZA CELIC

Analiza celic v likvorju je pomembna pri zaznavanju poškodb, nevrodegenerativnih bolezni in okužb OŽ, npr. meningitisa, encefalitisa, abscesa možganov, multiple skleroze in možganske krvavitve (33,34).

Mikroskopsko štetje v komorici je zlati standard za določanje številčne koncentracije levkocitov in eritrocitov v likvorju (35). Mikroskopsko določanje koncentracije celic je zelo zamudna metoda z visoko nenatančnostjo, netočnostjo in visoko osebno variabilnostjo med posameznimi štetji in med posameznimi osebami (36).

Mikroskopsko štetje se izvaja v Fuchs-Rosenthalovi komorici. Eritrocite štejemo v nativnem likvorju pri 200-kratni povečavi. Za določanje celokupnega števila levkocitov in diferenciranje, levkocite vitalno obarvamo s kislom raztopino fuksina. Obarvane levkocite preštujemo v Fuchs-Rosenthalovi komorici pri 200- do 400-kratni povečavi (26).

Standard H56-p (vol. 25, No. 20), izdan pri Inštitutu za klinične in laboratorijske standarde CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) priporoča diferenciacijo levkocitov v citološkem sedimentu (9).

Avtomatizirana metoda na Sysmexu XN-1000 za štetje eritrocitov uporablja hidrodinamsko fokusiranje, za štetje in diferenciacijo levkocitov pretočno citometrijo. Poleg števila celic in diferencialno sliko analizator daje informacijo tudi o celicah z visoko fluorescenco (makrofagi, mezotelijske celice) (37,38).

Natančen opis štetja celic v Fuchs-Rosenthalovi komorici in na analizatorju Sysmex XN-1000 je opisan v poglavju Materiali in metode, 3. poglavje, točka 3.3. in 3.4., stran 14-17.

2. IZHODIŠČA IN NAMEN DELA

Namen naloge je primerjati mikroskopsko in avtomatizirano določanje koncentracij celic v likvorju. S statistično metodo, Bland-Altman-ovim prikazom primerjave metod, bomo ocenili ujemanje rezultatov med dvema različnima analitskima metodama.

Namen našega dela je:

- ugotoviti ali se rezultati med ročno in avtomatizirano metodo ujemajo,
- ugotoviti ali sta metodi med seboj primerljivi in medsebojno zamenljivi,
- oceniti uporabnost avtomatizirane metode.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. VZORCI IN POPULACIJA

V raziskavo smo vključili 119 vzorcev likvorja, ki so bili analizirani v Laboratoriju za analitiko telesnih tekočin, Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo, Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani, v obdobju od aprila do julija 2013.

Iz statistične obdelave smo izključili dva vzorca: živalski vzorec, posredovan iz Veterinarske klinike v Ljubljani, in vzorec z razpadlimi levkociti (diferenciacijo celic ni bilo možno izvesti). Vsi pacienti so bili obravnavani na različnih oddelkih UKC Ljubljana.

Informirani pristanek pacientov ni bil potreben, ker smo uporabili material iz rutinske analize. Vzorci so bili zbrani v prozorne sterilne likvorske epruvete in bili analizirani znotraj 2h po sprejemu v laboratorij.

Raziskava je zajela 61 % pacientov moškega in 39 % ženskega spola.

Povprečna starost pacientov je znašala 44,3 leta s standardnim odklonom 24,8. Najmlajši pacient je bil star 14 dni in najstarejši 83 let.

Zastopane so bile naslednje starostne skupine:

Preglednica II: Razdelitev populacije glede na starost

starostna skupina	število pacientov	delež zastopanosti
do 1. leta	10	8,5 %
1. do 4. leta	4	3,4 %
5. do 16. leta	8	6,8 %
17. do 64. leta	66	55,9 %
od 65. leta naprej	33	25,4 %

Število in delež likvorskih vzorcev, razdeljenih po različnih skupinah koncentracij levkocitov:

Preglednica III: Število in delež vzorcev, razdeljenih glede na koncentracije levkocitov

koncentracija levkocitov ($10^6/\text{L}$)	število vzorcev	delež vzorcev
0 – 5	52	44,4 %
6 – 30	19	16,2 %
31 – 200	31	26,5 %
> 200	15	12,8 %

3.2. REAGENTI, INSTRUMENTI IN OPREMA

3.2.1. Mikroskopska metoda

Pri mikroskopskem določanju koncentracije levkocitov in eritrocitov potrebujemo (39):

- raztopino fenolnega fuksina po Deeme-ju (pripravi Lekarna UKC Ljubljana po recepturi):
 - 300,0 g koncentrirane očetne kisline (960 g/L),
 - 20,0 g nasičene raztopine fenola (100 g fenola + 10 mL destilirane vode),
 - 20,0 g vodne raztopine fuksina (100 g/L),
 - dopolnitev z destilirano vodo do 1000 mL;
- fiziološko raztopino (9 g/L NaCl),
- epruvete, Pasteurjeve pipete, 50 μL pipeto, 500 μL pipeto, 50 μL nastavek za pipeto (za enkratno uporabo), 500 μL nastavek za pipeto (za enkratno uporabo), Fuchs-Rosenthalovo komoro, krovna stekla za komoro, valjčni mešalec, mikroskop, števec za diferenciranje celic.

3.2.2. Avtomatizirana metoda

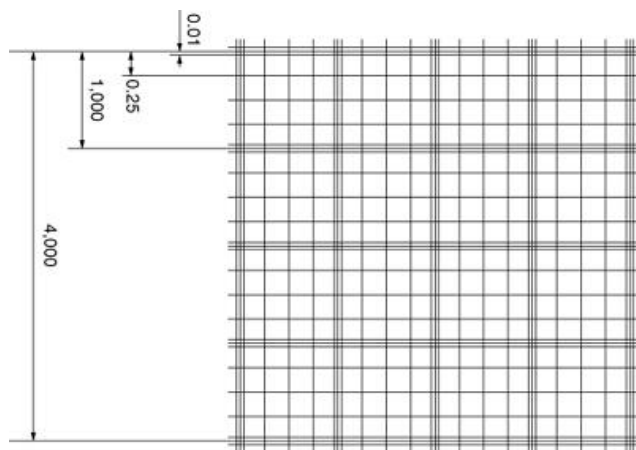
- Sysmex XN-1000 BF mode,
- Cellpack DCL (diluent, kat. št.: CT661628), Lysercell WDF (reagent za lizo eritrocitov, kat. št.: AW993605), Fluorocell WDF (barvilo, kat. št.: CV377552), Cellclean Auto (čistilo, kat. št.: 83401621),
- XN Check BF (kontrolni vzorec, 2 x 3 vial, kat. št.: 213510).

3.3. MIKROSKOPSKO DOLOČANJE

Mikroskopska analiza celic v likvorju se je izvedla po standardnem operativnem postopku Laboratorija za analitiko telesnih tekočin, UKC Ljubljana.

Mikroskopsko določanje koncentracij celic se izvaja v Fuchs-Rosenthal-ovi komori. Mreža komore (Slika 5) s površino $1,6 \text{ mm}^2$ je razdeljena na 16 kvadratov in ima globino $0,2 \text{ mm}$. Vsak kvadrat je dodatno razdeljen še na 16 manjših kvadratov, kar skupaj znesi 256 kvadratov (4,28). Volumen vzorca, ki napolni površino nad mrežo komore, je $3,2 \text{ }\mu\text{L}$ (4).

Enačba 1 (4):



Slika 3: Mreža Fuchs-Rosenthal-ove komore

(prirejeno po viru: http://minatomedical.com/ka_memori.html; dostopano: 31.08.2013)

Eritrocite štejemo v nativnem likvorju pri 200-kratni povečavi. Rezultat izrazimo s številom eritrocitov $\times 10^6/\text{L}$. V primeru močno krvavega vzorca likvorja, vzorec redčimo (26).

Levkocite vitalno barvamo s kisló raztopino fenolnega fuksina po Deemeju - zmešamo 10 delov ($200 \text{ }\mu\text{L}$) likvorja in 1 del ($20 \text{ }\mu\text{L}$) raztopine barvila. Obarvane levkocite preštujemo in diferenciramo na mononuklearne in polimorfonuklearne levkocite pri 200 - 400-kratni povečavi. Rezultat za celokupno število levkocitov dobimo tako, da prešteto število delimo s 3 in rezultat izrazimo z enoto $10^6/\text{L}$ (26).

Pri podajanju koncentracije levkocitov upoštevamo površino in globino komore in razredčitev vzorca z barvilom (10/11).

Enačba 2 (39):

$$y = \frac{x \cdot 16 \times 10^{-4} \text{ dm}^2 \cdot 2 \times 10^{-3} \text{ dm}}{10/11}$$

Legenda: y = koncentracija celic, x = število prešteti celic, $16 \times 10^{-4} \text{ dm}^2$ – površina komore (16 mm^2), $2 \times 10^{-3} \text{ dm}$ – globina komore (0,2 mm), 10/11 – redčitev vzorca z barvilom;

Pri zelo povečani koncentraciji levkocitov, likvor redčimo z fiziološko raztopino in pri izračunu upoštevamo redčitev (26,40).

V primeru prisotnosti spremenjenih ali atipičnih celic v vzorcu likvorja, pripravimo citološki sediment (26,39). Citološki sediment barvamo po Pappenheimu (26). Obarvan citološki sediment mikroskopiramo pod imerzijsko povečavo (1000-kratna povečava) (9). Diferenciramo čim večje število levkocitov (26).

3.4. AVTOMATIZIRANA METODA

3.4.1. Sysmex XN-1000

Analizator Sysmex XN-1000 (BF mode) je hematološki analizator z ločenim modulom za telesne tekočine (BF, ang. »body fluid«) namenjenim analizi celic v telesnih tekočinah. Za celično analizo uporablja pretočno citometrijo in impedanco (hidrodinamsko fokusiranje) (38, 41).

Predpriprava vzorca ni potrebna. Analizator ima odprt ročni sistem in zmogljivost analizirati 40 vzorcev na uro. Analizator aspirira 88 μL vzorca (41). Število prešteti celic v BF modulu je 3-krat večje kot v modulu za kri (38).

Analizator poda naslednje rezultate: koncentracijo levkocitov (WBC-BF; enota $10^6/\text{L}$), koncentracijo in delež mononuklearnih levkocitov (MN#, enota $10^6/\text{L}$; MN%), koncentracijo in delež polimorfonuklearnih levkocitov (PMN#, enota $10^6/\text{L}$; PMN%),

koncentracijo vseh celic z jedrom (TC-BF, enota $10^6/L$) ter koncentracijo eritrocitov (RBC-BF, enota $10^6/\mu L$) v vzorcu. Poda tudi opombo, če je levkocitni razsevni diagram nenormalen (37,38).

V »WDF kanalu« poteka štetje levkocitov in njihova diferenciacija na mononuklearne in polimorfonuklearne levkocite. Surfaktant v reagentu (Lysercell WDF) hemolizira eritrocite in naluknja celično membrano levkocitov. Fluorescentno barvilo (Fluorocell WDF) vstopi v celico preko naluknjane membrane in obarva nukleinske kisline ter druge celične organele. S pol-prevodnim laserjem, ki pri valovni dolžini 633nm obseva celice, se celice razvrstijo na osnovi sprednjega in stranskega sipanja razpršene svetlobe ter s stransko fluorescenčno svetlobo (37,38). »WDF kanal« daje informacijo tudi o visoki fluorescenci celic (HF-BF) kot so makrofagi in mezotelijske celice (40).

Druge celice, ki niso hematopoetskega izvora, npr. mezotelijske, epiteljske celice, se barvajo podobno kot levkociti. Analizo razlik v intenziteti sipane svetlobe in fluorescence posameznih celic omogočajo primerni algoritmi za določanje koncentracije in razvrščanje levkocitov. Algoritmi omogočajo tudi zaznavanje atipičnih celic (38).

»RBC kanal« na analizatorju se uporablja za določanje koncentracije eritrocitov in deluje po principu hidrodinamskega fokusiranja (38).

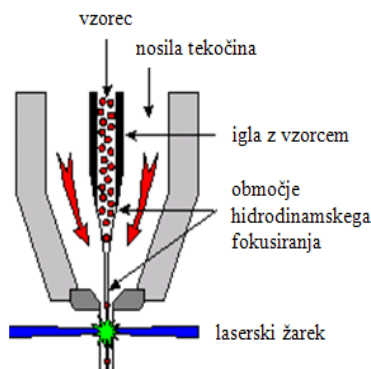
V modulu za telesne tekočine je število prešteti celic v »WDF kanalu« približno 10-krat in v »RBC kanalu« približno 3-krat večje kot pri modulu za polno kri (38).

3.4.2. Hidrodinamsko fokusiranje in impedanca

Osnova hidrodinamskega fokusiranja je pretočna celica. Pretočna celica je zasnovana tako, da je jedro vzorca fokusirano v center nosilne tekočine, kjer laserski žarek interagira s celicami v vzorcu. Pretok nosilne tekočine pospešuje celice v vzorcu in jih omeji na center pretoka jedra vzorca (42).

Impedanca temelji na dejstvu, da celice ne prevajajo električnega toka. Vsaka celica predstavlja izolator, ki prekine električno napetost med elektrodama. Skozi aperturo (kalibrirana odprtina) prehajajo celice in prekinjajo električno napetost. Električno napetost zagotavljata prevodni reagent (raztopina z zmanjšano koncentracijo elektrolitov) in dve

elektrodi, ki se nahajata vsaka na svoji strani aperture. Vsaka prekinitev električne napetosti predstavlja signal. Velikost signala je sorazmerna z volumnom celice. Analizator spremlja spremembe v tokokrogu in tako določa število in vrsto celic, ki prehajajo aperturo (43).



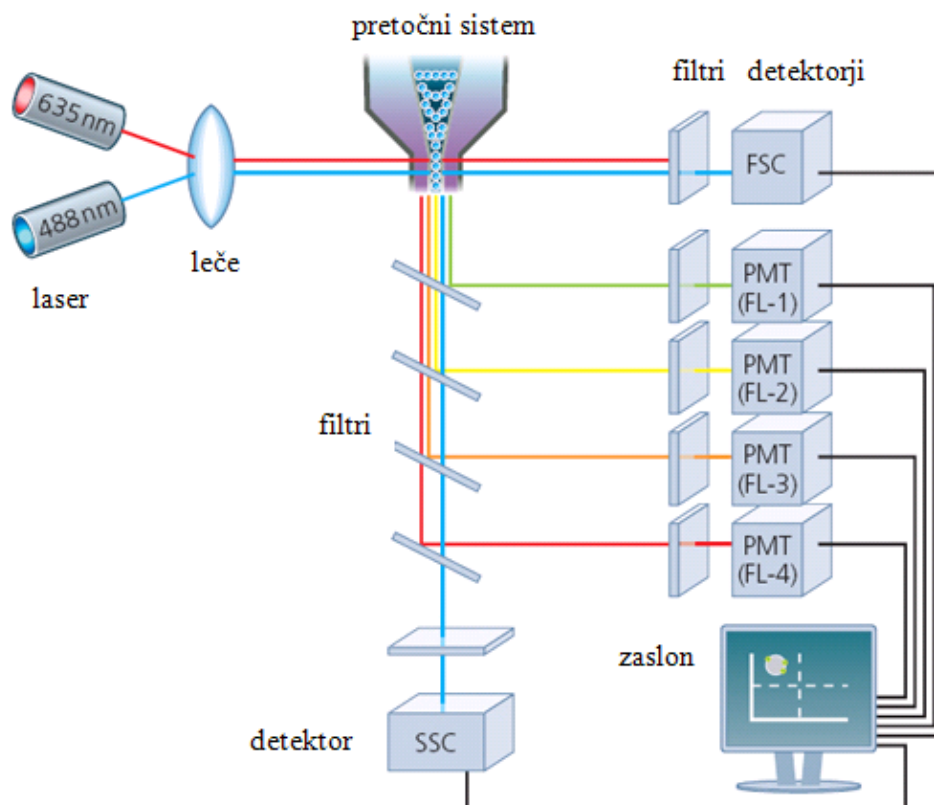
Slika 4: Pretočna celica

(prirejeno po viru: <http://olomouc.ueb.cas.cz/book/export/html/45>, dostopano: 5.11.2013)

3.4.3. Pretočna citometrija

Sestavni del pretočnega citometra je pretočna celica, ki temelji na hidrodinamskem fokusiranju. Pri interogacijski točki žarek laserske svetlobe prečka celico in oddana svetloba se sipa v vse smeri. Sipana svetloba se zbira preko optičnega sistema, ki usmerja posamezne valovne dolžine oddane svetlobe na sistem filtrov in dihroničnih ogledal. Sistem filtrov in ogledal izolira posamezne valovne dolžine. Svetlobne signale zaznajo fotopomnoževalke in jih prevedejo v digitalne vrednosti (44).

Analiziramo »prednje sipanje« (angl. *forward scatter*, FSC), »stransko sipanje« (angl. *side scatter*, SSC) svetlobe ter »stransko sipanje fluorescentne« svetlobe (ang. *side fluorescent scatter*, SFC). Prednje sipanje svetlobe nam poda informacijo o velikosti celice, stransko o granuliranosti celice in fluorescentno o funkcionalnih lastnosti celice. Signal prednjega sipanja je obratno-sorazmeren velikosti celice. Signal stranskega sipanja postane močnejši sorazmerno z znotrajcelično kompleksnostjo (38,42,45,46).



Slika 5: Sistem pretočne citometrije

(prirejeno po viru: <http://www.abdserotec.com/flow-cytometry-signal-processing.html>, dostopano 5.11.2013)

Legenda: FCS – detektor za prednje sipanje, SSC – detektor za stransko sipanje, PMT – fotopomnoževalka, FL – za fluorescenco detektor;

3.5. ZUNANJA KONTROLA KAKOVOSTI

Laboratorij za analitiko telesnih tekočin, KIKKB, UKC Ljubljana, je vključen v zunanjo kontrolo kvalitete nemškega inštituta za bioanalitiko - RfB (Referenzeinstitut für Bioanalytik, Bonn) z analizo levkocitov in eritrocitov v likvorju.

Predstavili bomo rezultate zunanje kontrole kakovosti z oznako ZL1/13. Analiza vzorcev A in B se je izvedla 29.04.2013. Rezultate kontrole smo prejeli v mesecu juniju 2013.

Kontrolni material ni naravnega izvora in se razlikuje od nativnega humanega likvorja. Zaradi tega razloga se lahko rezultat ročnega določanja razlikuje od avtomatiziranega rezultata.

Tarčno vrednost za analit (levkociti, eritrociti) predstavlja mediana rezultatov vseh sodelujočih, ki uporabljajo enako metodo. Tako pridobljene mediane uporabijo le, če imajo

dovolj rezultatov za odgovarjajočo skupino metod. V primerih, kjer ni mogoče uporabiti omenjenih median, upoštevajo mediano vseh rezultatov ali skupno mediano (47).

Certifikat se izda za analit, samo če je osnova za oceno točnosti dana s smernicami Nemškega medicinskega združenja in/ali če je možna ocena v analogiji s temi smernicami in če sta oba rezultata za analit znotraj sprejemljivih mej (47).

Dovoljeno odstopanje od ciljne vrednosti je $\pm 80\%$ (47).

3.6. STATISTIKA

Statistični izračuni so bili izvedeni s programsko opremo Excel Analyse-it verzija 2.30 (Bland-Altmanov diagram) in Microsoft Office Excel 2007 (točnost, natančnost).

Točnost (ang. accuracy) nam pove, kako je izmerjena vrednost blizu dejanski oziroma pravi vrednosti (48). Netočnost metode se določi z odklonom (t.i. bias) izmerjene vrednosti rezultata od prave vrednosti (49).

Računsko določimo (relativno) napako po enačbi (49) – enačba 3:

Rezultate testne metode smo primerjali s podanimi vrednostmi.

Natančnost (ang. precision) pove kako blizu so si izmerjene vrednosti ene količine, merjene pod enakimi pogoji (48). S ponovljivostjo rezultatov prikažemo na natančnost metode (49).

Poznamo ponovljivost rezultatov »v seriji«, »med serijami« in ponovljivost »iz dneva v dan«. Najboljšo oceno natančnosti metode daje ponovljivost »iz dneva v dan« (49). Za prikaz natančnosti metode uporabljamo standardni odklon (SD) in koeficient variacije (KV) (49). Nenatančnost meritev je izključno povezana z naključno napako meritev in nima nobene zveze s resničnostjo (trueness) meritev (50).

Enačbe (51):

- srednja vrednost (enačba 4):

- standardni odklon (enačba 5):

- koeficient variacije (enačba 6):

Točnost in ponovljivost smo izračunali na podlagi rezultatov kontrolnih vzorcev.

Kontrolna vzorca (normalen in visok nivo) smo analizirali vsak dan pred začetkom dela. Zbrali smo 23 meritev.

Bland-Altmanov diagram je statistična metoda za primerjavo dveh metod (51), kjer želimo oceniti za koliko se metodi med seboj razlikujeta (52). Če so razlike med metodama dovolj majhne, da ne vplivajo na klinično odločitev, lahko metodi med seboj zamenjamo (52).

Grafični prikaz je točkasti diagram, kjer se na abscisno (x) os nanašajo povprečne vrednosti meritev istega vzorca merjenega z dvema metodama, na ordinatno (y) os pa razlike meritev tega vzorca, merjenega z dvema metodama (51).

Graf razlik med metodama proti njuni srednji vrednosti predstavlja stopnjo ujemanja in odstopanje med metodama. Ker ne vemo prave vrednosti, je povprečna vrednost dveh meritev najboljša ocena, ki nam je na razpolago. Graf razlik nam daje možnost proučevanja razmerja med napako meritve in pravo vrednostjo (52).

Pomanjkanje ujemanja povzamemo z izračunom povprečnega odklona, t.i. biasa. Povprečni odklon se izračuna iz srednje vrednosti in standardnega odklona razlik med meritvama. Meje ujemanja so edina ocena vrednosti, ki se nanašajo na celo populacijo in se izračunajo iz povprečnega in standardnega odklona (povprečni odklon $\pm 1,96 \cdot SD$). Meje ujemanja zajemajo 95% vseh razlik (50). Če s kliničnega vidika ocenimo, da so meje

ujemanja široke, so rezultati dvoumni. Če so meje ujemanja ozke in je povprečni odklon nizek oziroma zelo blizu 0, dajeta metodi ekvivalentne rezultate (53).

Z izračunom standardne napake in intervalov zaupanja vidimo kako natančne so naše ocene. Standardna napaka in intervali zaupanja za povprečni odklon sta izračunana iz razlik, ki sledijo normalni porazdelitvi (52).

Bland-Altmanov diagram se interpretira s kliničnega vidika. Potrebno je oceniti, če je odstopanje klinično pomembno, ali obstaja trend ali se razlika med metodama večja/manjša, kakšna je razpršenost okrog povprečnega odklon (narašča, pada, konsistentna) in kako široke so meje ujemanja (53).

4. REZULTATI

4.1. TOČNOST

Točnost smo izračunali na podlagi rezultatov kontrolnih vzorcev, za vsak nivo posebej. Za vsak nivo posebej je bilo opravljenih 23 meritev. Prave vrednosti smo nam predstavljale vrednosti podane s strani proizvajalca.

Povprečne vrednosti relativnih napak s standardnim odklonom so povzete v preglednici IV.

Preglednica IV: Povprečne vrednosti relativnih napak (n=23)

parameter	nivo I (LOT: 30701301)		nivo II (LOT: 30701302)		enote
	RE	SD	RE	SD	
levkociti	0,9 %	0,014	-15,2 %	0,043	10 ⁶ /L
eritrociti	2,3 %	0,036	-0,8 %	0,018	10 ⁶ /μL
MN	-8,3 %	0,063	-11,7 %	0,024	10 ⁶ /L
PMN	-13,1 %	0,062	-17,6 %	0,055	10 ⁶ /L
MN%	2,1 %	0,046	4,2 %	0,038	%
PMN%	-1,5 %	0,032	-2,9 %	0,026	%
TC	2,7 %	0,060	1,4 %	0,050	10 ⁶ /L

Legenda: RE - povprečne vrednosti relativnih napak, SD – standardni odklon, MN – mononuklearni levkociti, številčna koncentracija, PMN – polimorfonuklearni levkociti, številčna koncentracija, MN% – mononuklearni levkociti, deleži, PMN% – polimorfonuklearni levkociti, deleži, TC – skupno število celic z jedrom, številčna koncentracija;

4.2. NATANČNOST

Natančnost smo izračunali na podlagi izmerjenih kontrolnih raztopin, za vsak nivo posebej. Za vsak nivo posebej je bilo opravljenih 23 meritev.

Povprečne vrednosti meritev s standardnim odklonom (SD) in koeficientom variacije (KV) so povzete v preglednici V.

Preglednica V: Povprečne vrednosti, standardni odklon in koeficienti variacije za kontrolne meritve (n=23)

	nivo I (LOT:30701301)			nivo II (LOT: 30701302)			
parameter		SD	KV		SD	KV	enote
levkociti	65,7	3,9	5,9 %	261,2	13,2	5,0 %	10 ⁶ /L
eritrociti	0,0	0,0	3,5 %	0,1	0,0	1,9 %	10 ⁶ /μL
MN	27,5	1,9	6,9 %	111,2	5,2	4,7 %	10 ⁶ /L
PMN	38,2	2,7	7,2 %	150,0	10,1	6,7 %	10 ⁶ /L
MN%	41,9	1,9	4,5 %	42,6	1,5	3,6 %	%
PMN%	58,1	1,9	3,2 %	57,4	1,5	2,7 %	%
TC	65,7	3,9	5,9 %	261,2	13,2	5,0 %	10 ⁶ /L
	= 5,3 %			= 4,2 %			

Legenda: - povprečna vrednost meritev, SD – standardni odklon, KV – koeficient variacije, - povprečna vrednost koeficientov variacije, MN – mononuklearni levkociti, številčna koncentracija, PMN – polimorfonuklearni levkociti, številčna koncentracija, MN% – mononuklearni levkociti, deleži, PMN% – polimorfonuklearni levkociti, deleži, TC – skupno število celic z jedrom, številčna koncentracija;

4.3. PRIMERJAVA METOD

Z Bland-Altmanovim diagramom smo primerjali ročno in avtomatizirano metodo. Ročna metoda je predstavljala referenčno metodo, avtomatska metoda je bila testna.

Povzetek statističnih izračunov za posamezne parametre je v preglednici VI.

Preglednica VI: Povzetek statističnih izračunov za Bland – Altmanov diagram

parameter	enote	n	odklon	IZ _{odklon}	UJEMANJE	
					sp. meja	zg. meja
levkociti	10 ⁶ /L	117	178	-159,0 – 515,0	-3429,2	3785,2
levkociti do 5	10 ⁶ /L	52	0,6	0,3 – 1,0	-1,8	3,1
levkociti do 30	10 ⁶ /L	71	1,2	0,3 – 2,1	-6,3	8,8
levkociti do 200	10 ⁶ /L	102	0,2	-1,4 – 1,8	-16,1	16,5
eritrociti	10 ⁶ /L	117	1105,6	-264,1 – 2475,3	-13555,3	15766,5
eritrociti do 1000	10 ⁶ /L	105	24,8	-23,1 – 72,6	-459,8	509,3
MN	10 ⁶ /L	117	14,1	3,4 – 24,8	-100,3	128,5
PMN	10 ⁶ /L	117	6,0	-9,8 – 21,9	-164,0	176,1
MN%	%	117	4,85	-2,09 – 11,79	-69,41	79,12
PMN%	%	117	5,44	0 – 10,88	-52,79	63,68

Legenda: n – število parov meritev, odklon – povprečje razlik, IZ_{odklon} – interval zaupanja za odklon, ujemanje sp./zg. meja – spodnja in zgornja meja ujemanja, »do 5«, »do 30«, »do 200« - izključeni vsi pari meritev, kjer vrednost pri ročni metodi presega vrednosti 5 ali 30 ali 200 x 10⁶/L levkocitov, »do 1000« - izključeni vsi pari meritev, kjer vrednost pri ročni metodi presega vrednost 1000 x 10⁶/L eritrocitov, MN – mononuklearni levkociti, PMN – polimorfonuklearni levkociti, MN% - delež mononuklearnih levkocitov, PMN% - delež polimorfonuklearnih levkocitov;

4.3.1. Levkociti

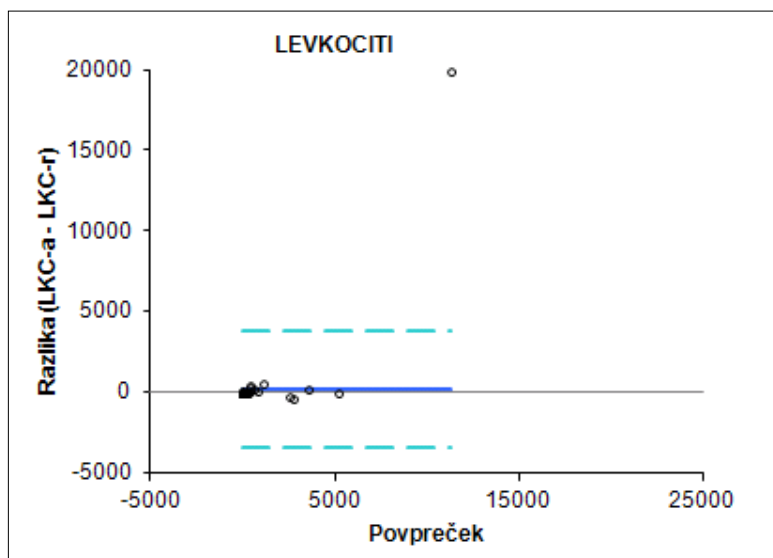


Diagram 1: Bland-Altmanov diagram razlik za levkocite ($10^6/L$)

Legenda: temno modra črta – povprečni odklon, svetlo modra prekinjena črta – meje ujemanja; LKC-a – določanje številčne koncentracije levkocitov z avtomatizirano metodo na Sysmex-u XN-1000, LKC-r – določanje številčne koncentracije levkocitov z ročno metodo.

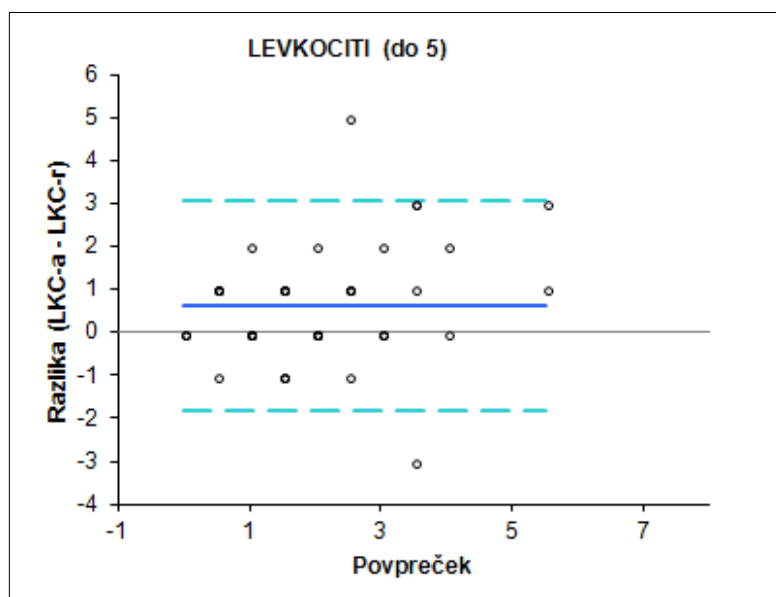


Diagram 2: Bland-Altmanov diagram razlik za levkocite »do 5« ($10^6/L$)

Legenda: temno modra črta – povprečni odklon, svetlo modra prekinjena črta – meje ujemanja, LKC-a – določanje številčne koncentracije levkocitov z avtomatizirano metodo na Sysmex-u XN-1000, LKC-r – določanje številčne koncentracije levkocitov z ročno metodo.

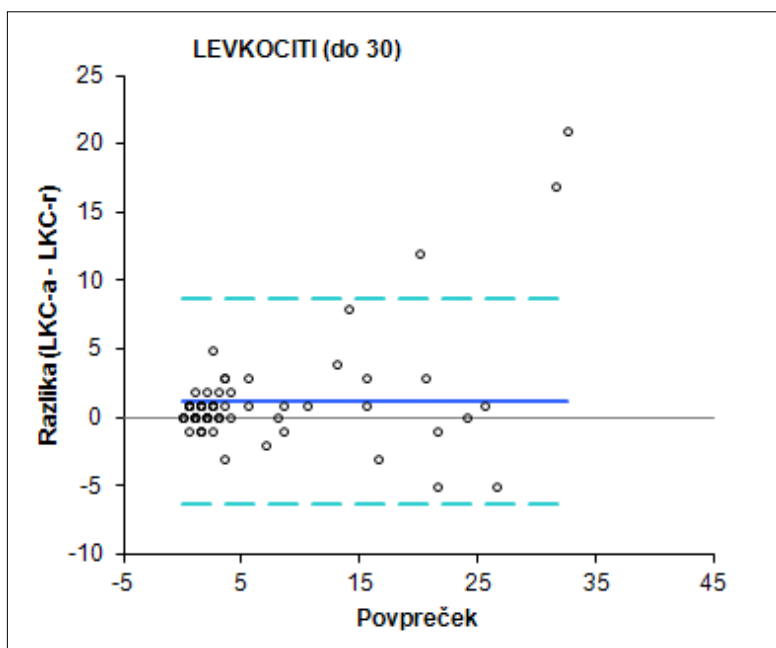


Diagram 3: Bland-Altmanov diagram razlik za levkocite »do 30« ($10^6/L$)

Legenda: temno modra črta – povprečni odklon, svetlo modra prekinjena črta – meje ujemanja, LKC-a – določanje številčne koncentracije levkocitov z avtomatizirano metodo na Sysmex-u XN-1000, LKC-r – določanje številčne koncentracije levkocitov z ročno metodo.

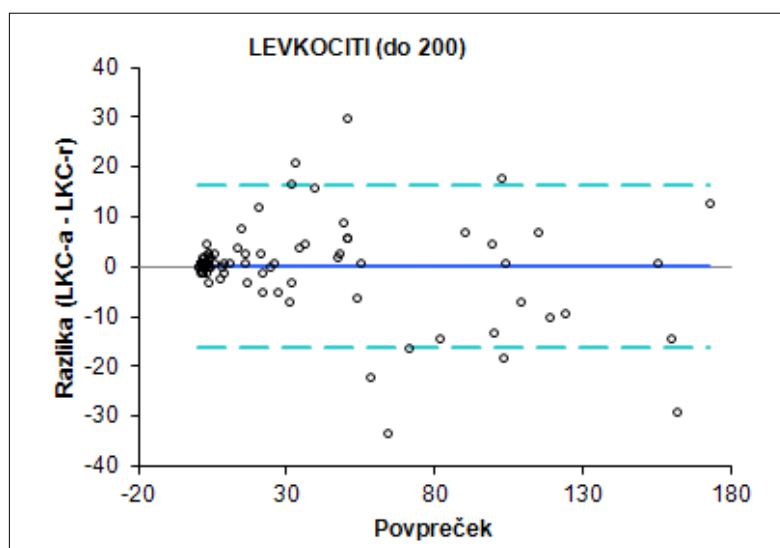


Diagram 4: Bland-Altmanov diagram razlik za levkocite »do 200« ($10^6/L$)

Legenda: temno modra črta – povprečni odklon, svetlo modra prekinjena črta – meje ujemanja, LKC-a – določanje številčne koncentracije levkocitov z avtomatizirano metodo na Sysmex-u XN-1000, LKC-r – določanje številčne koncentracije levkocitov z ročno metodo.

4.3.2. Eritrociti

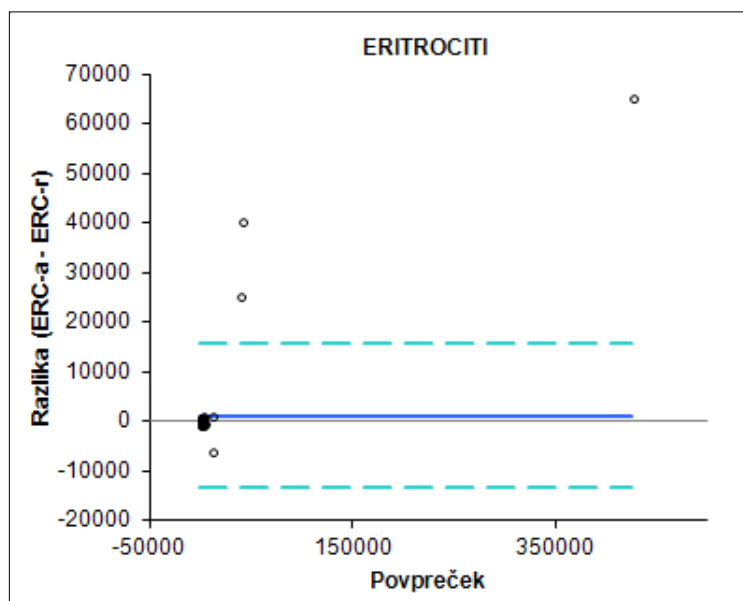


Diagram 5: Bland-Altmanov diagram razlik za meritev eritrocitov ($10^6/\text{L}$)

Legenda: temno modra črta – povprečni odklon, svetlo modra prekinjena črta – meje ujemanja, ERC-a – določanje številčne koncentracije eritrocitov z avtomatizirano metodo na Sysmex-u XN-1000, ERC-r – določanje številčne koncentracije eritrocitov z ročno metodo.

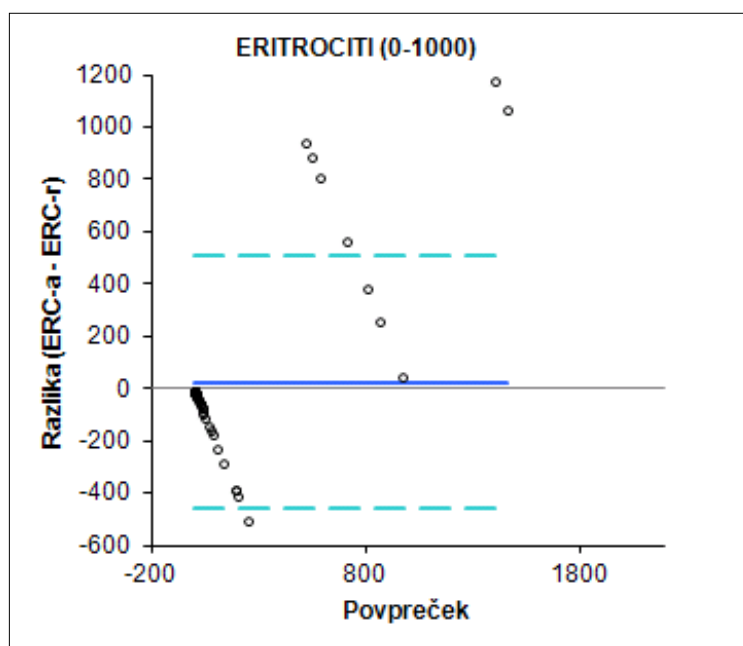


Diagram 6: Bland-Altmanov diagram razlik za meritev eritrocitov »do 1000« ($10^6/\text{L}$)

Legenda: temno modra črta – povprečni odklon, svetlo modra prekinjena črta – meje ujemanja, ERC-a – določanje številčne koncentracije eritrocitov z avtomatizirano metodo na Sysmex-u XN-1000, ERC-r – določanje številčne koncentracije eritrocitov z ročno metodo.

4.3.3. Mononuklearni levkociti

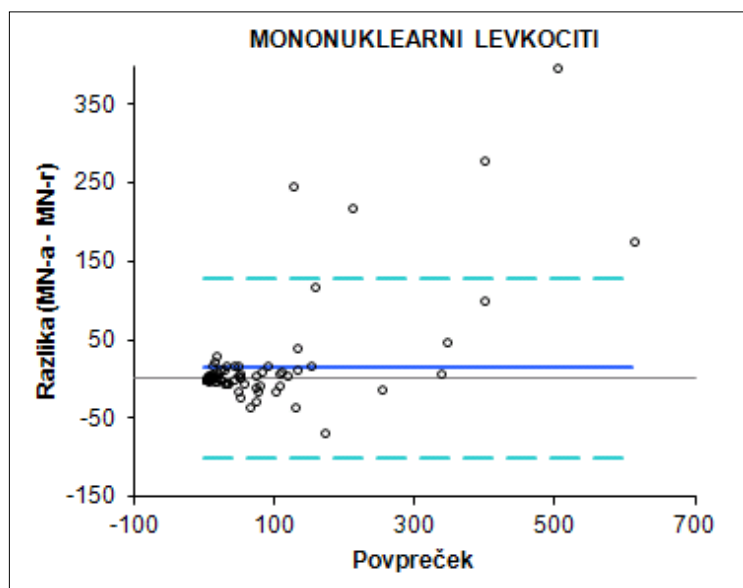


Diagram 7: Bland-Altmanov diagram razlik za mononuklearne celice, koncentracije ($10^6/L$)

Legenda: temno modra črta – povprečni odklon, svetlo modra prekinjena črta – meje ujemanja; MN-a – določanje številčne koncentracije mononuklearnih levkocitov z avtomatizirano metodo na Sysmex-u XN-1000, MN-r – določanje številčne koncentracije mononuklearnih levkocitov z ročno metodo.

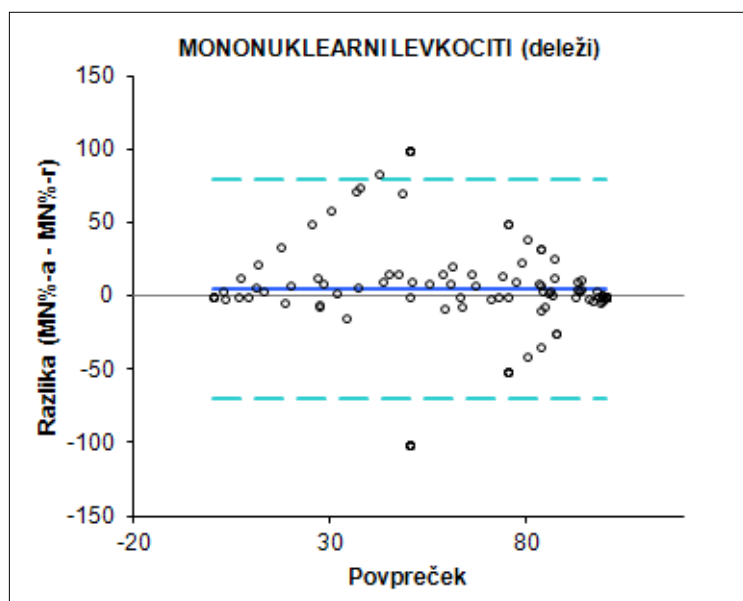


Diagram 8: Bland-Altmanov diagram razlik za mononuklearne celice, deleži (%).

Legenda: temno modra črta – povprečni odklon, svetlo modra prekinjena črta – meje ujemanja, MN%-a – določanje deležev mononuklearnih levkocitov z avtomatizirano metodo na Sysmex-u XN-1000, MN%-r – določanje deležev mononuklearnih levkocitov z ročno metodo.

4.3.4. Polimorfonuklearni levkociti

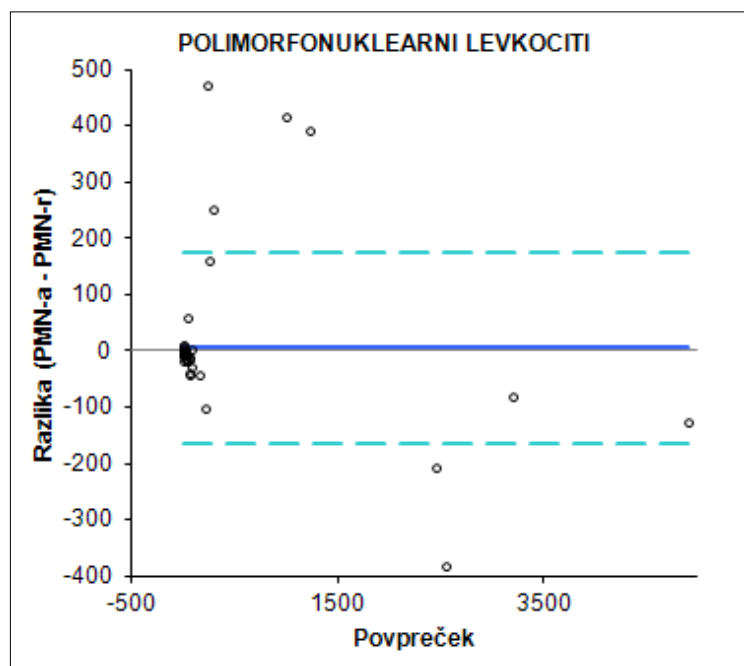


Diagram 9: Bland-Altmanov diagram razlik za polimorfonuklearne celice ($10^6/L$)

Legenda: temno modra črta – povprečni odklon, svetlo modra prekinjena črta – meje ujemanja, PMN-a – določanje številčne koncentracije polimorfonuklearnih levkocitov z avtomatizirano metodo na Sysmex-u XN-1000, PMN-r – določanje številčne koncentracije polimorfonuklearnih levkocitov z ročno metodo.

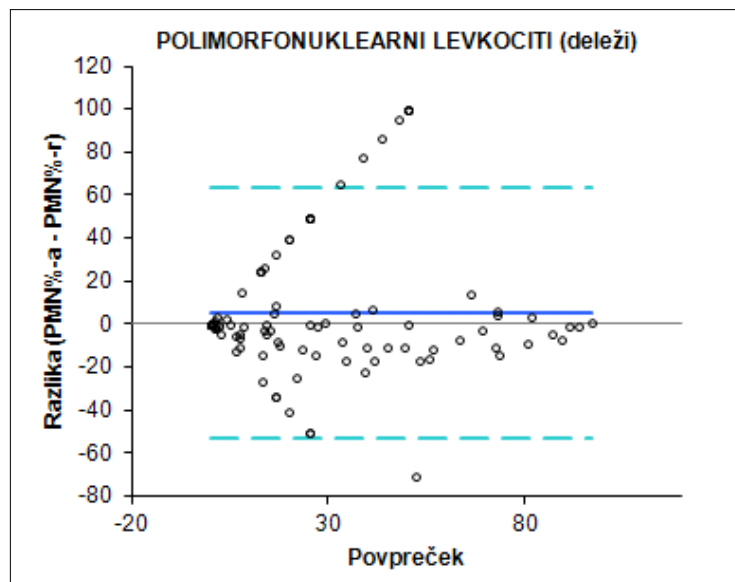


Diagram 10: Bland-Altmanov diagram razlik za polimorfonuklearne celice, delež (%).

Legenda: temno modra črta – povprečni odklon, svetlo modra prekinjena črta – meje ujemanja, PMN%-a – določanje deležev polimorfonuklearnih celic z avtomatizirano metodo na Sysmex-u XN-1000, PMN%-r – določanje deležev polimorfonuklearnih celic z ročno metodo.

4.3.5. Zunanja kontrola kakovosti

V preglednici VII so predstavljeni rezultati zunanje kontrole kakovosti z oznako ZL1/13.

Preglednica VII: Rezultati zunanje kontrole kakovosti, ZL1/13

analit	C	M	R	D/Dmax	T	LL	UL
levkociti ($10^6/L$)	+	1	A 10,0	0,06	9,50	1,90	17,1
			B 80,0	-0,02	81,5	16,3	147
eritrociti ($10^6/L$)	+	1	A 4,00	-0,67	8,67	1,73	15,7
			B 64,0	-0,31	84,8	16,9	153

Legenda: C – certifikat, M – število metod, R – vaš rezultat, D – razlika (R-T), Dmax – največja dovoljena razlika v meritvi, deloma podan z aneksom 1 smernice BÄK (Dt. Ärzteblatt 105, Heft 7, 15.2.2008). T – tarčna vrednost (referenčna ali določen vrednost), LL – spodnja dovoljena meja, UL – zgornja dovoljena meja odstopanja. Certificiranje: + - izpolnjeno (kvocient $|D/Dmax| \leq 1,0$), - - ni izpolnjen pogoj (kvocient $|D/Dmax| > 1,0$), ± - certificiranje je odpovedano zaradi tehničnih in/ali analitičnih razlogov (72).

Preglednica VIII: Rezultati avtomatizirane metode za levkocite za zunanjo kontrolo kakovosti ZL1/13

analit	vzorec	ročna metoda	odstopanje	Sysmex XN-1000	odstopanje	T
levkociti ($10^6/L$)	A	10	5 %	10	5 %	9,50
	B	80	-1,2 %	79	- 3,1 %	81,5

Legenda: T – tarčna vrednost, odstopanje – odstopanje meritve od tarčne vrednosti.

5. RAZPRAVA

Na analizo likvorja vplivajo različni dejavniki kot je omejen volumen vzorca, nestabilnost vzorca – še posebno so nestabilne morebitno prisotne celice (36). K temu se prišteva tudi potreba po hitrih rezultatih, torej čim krajši čas od odvzema vzorca do izvida (36, 54). Omenjeni dejavniki se še posebej nanašajo na štetje celic (36).

Mikroskopska analiza celic v likvorju oziroma »ročna« metoda še vedno velja za »zlati standard« (36,55). Slabe strani ročne metode so: zamudnost, velika nenatančnost, potreben je velik volumen vzorca (200 μ L + dodatnih 500 μ L za citološki sediment), potrebna je predpriprava vzorca (barvanje celic), predhodno redčenje vzorca v primeru zelo povečanih koncentracij celic ter razlike med posameznimi laboratorijskimi delavci zaradi subjektivne ocene pri diferenciaciji celic (36). Med prednosti mikroskopskega štetja prištevamo zelo nizko mejo detekcije ter diferenciranje levkocitov na mononuklearne in polimorfonuklearne levkocite. Za natančnejšo diferenciacijo je potrebno pripraviti citološki sediment (potrebno je dodatnih 500 μ L vzorca, dodatna oprema – citocentrifuga in barvanje po Pappenhaimu) (26), kar še dodatno podaljša čas od sprejema do izdaje izvida.

Prednost avtomatizirane metode je enostavnejši in hitrejši način dela, ni potrebna predpriprava vzorca in potrebna količina vzorca je manjša (88 μ L pri Sysmex-u XN-1000 (38,41)) (36). Druge prednosti so še: kratek čas od sprejema vzorca do izdaje izvida, komercialno dostopna kontrola kvalitete, izključitev subjektivne ocene pri diferenciaciji, ni potrebna posebna izkušnost laboratorijskega delavca.

Na analizatorju Sysmex XN-1000 se celice diferencirajo na mononuklearne in polimorfonuklearne levkocite, vendar v primeru prisotnosti atipičnih celic analizator izda opozorilo (38,40).

Ostali cilji laboratorija vključujejo tudi povečevanje učinkovitosti, poenostavljanje dela, zmanjševanje stroškov in zamenjava »ročnih« metod za avtomatizirane metode, kjer je to smiselno in možno. Neizogibno in zaželeno je, da bi ročne metode zamenjale avtomatizirane metode (56,57).

Zaradi majhnega števila celic in omejenega volumna vzorca likvorja je razvoj analizatorja za avtomatizirano analizo likvorja velik izziv (56).

Proizvajalci laboratorijske opreme skušajo prilagoditi konvencionalne hematološke analizatorje, pretočne citometre in analizatorje za urinske sedimente za avtomatizirano analizo celic v likvorju in drugih telesnih tekočinah (kot so peritonealna, sinovialna, plevralna tekočina, itd.) (27,55).

Pred samo uporabo nove laboratorijske opreme je potrebno opremo oziroma metodo ustrezno validirati. Validacije se v tem primeru največkrat izvajajo kot primerjava med ročno in avtomatizirano metodo.

Točnost

Za določanje točnosti avtomatizirane metode smo uporabili rezultate kontrolnih vzorcev, ker imajo določene ciljne vrednosti. V nivoju I so vrednosti z relativno nizkimi vrednostmi, v nivoju II z visokimi vrednostmi. Iz dnevno izmerjenih kontrolnih vrednosti smo izračunali relativno napako. Za lažjo primerjavo smo iz izračunanih relativnih napak izračunali srednjo oziroma povprečno vrednost napak po analitih.

Vse povprečne vrednosti relativnih napak, razen za absolutne vrednosti PMN in MN, so pod 3 %. Povprečna vrednost relativne napake za MN presega 8 % (8,3 %), za PMN presega 13 % (13,8 %) (glej preglednico IV). Glede na rezultate relativnih napak, daje analizator za PMN v povprečju za 13 %, za MN 8 % manjše vrednosti od deklariranih.

Zanimivo je, da pri deležih PMN in MN ne pride do tako velikih razlik in da so povprečne vrednosti relativnih napak pod 3 %.

Kot se je pokazalo že v nivoju I, imata tudi v nivoju II največje odstopanje absolutnih koncentracij PMN (17,6 %) in MN (11,7 %). V nivoju II odstopajo tudi levkociti (-15,2 %). Levkociti dajejo v nivoju II v povprečju za 15 % manjše vrednosti od ciljnih.

Ostali parametri v drugem nivoju imajo povprečne relativne napake pod 5 %.

Pri pregledu meritev v nivoju II je vidno manjšanje števila levkocitov. Omenjeni trend je viden tudi pri PMN, MN in TC; še posebno v zadnjih 5 meritvah. Enak trend je, sicer v manjši meri, opazen tudi v nivoju I.

Eden od možnih vzrokov za nižanje rezultatov kontrolnih vrednosti je lahko stabilnost kontrolne raztopine in/ali stabilnost celic v kontrolni raztopini – pomemben rok uporabe

odprtih kontrolnih raztopin. Drug vzrok je lahko nepravilno rokovanje s kontrolnimi raztopinami – nepravilno temperiranje kontrolnih raztopin (predolgo, premalo), premalo homogenizirani vzorci – slabo premešani in grobo mešanje, ki lahko povzroči razpad celic.

Če bi za sprejemljivost postavili mejo 5 % odstopanje, v nivoju I zajame vse parametre razen absolutnih vrednosti MN in PMN. Vse ostale vrednosti se nahajajo znotraj postavljenega kriterija. Enak kriterij pri nivoju II ne zajame levkocitov in absolutnih vrednosti MN in PMN.

Točnost bi lahko izboljšali z uporabo razredčene periferne krvi. Vzorec periferne krvi bi ustrezno razredčili, na primer s fiziološko raztopino, in izračunali teoretično vrednost posameznih analitov. Teoretične vrednosti bi nam predstavljale tarčne vrednosti. Vzorec razredčene krvi bi nato analizirali z avtomatizirano metodo. Zaradi statistične obdelave rezultatov bi morali analizo na analizatorju ponoviti vsaj 20-krat. Ob ponovitvah bi morali biti pozorni na stabilnost celic v vzorcu.

Ziebig in sodelavci (58) so za preverjanje točnosti, natančnosti in linearnosti na avtomatskem analizatorju (Abbott CellDyn 3500 in Sysmex UF-100) sami pripravili iz periferne krvi razredčitve, ki so ustrezale koncentracijam, tipičnim za likvor pri encefalitisu in meningitisu.

Predhodne študije so pokazale, da takojšen dodatek medija v obliki seruma, lahko stabilizira celice v vzorcu likvorja za 5 – 24h po vzorčenju (59,60).

Natančnost

Natančnost smo izračunali na podlagi izmerjenih kontrolnih raztopin, za vsak nivo in vsak parameter posebej. Glej preglednico IV.

V nivoju I in nivoju II imajo največji koeficient variacije absolutne vrednosti PMN – v nivoju I - 7,2 % in v nivoju II - 6,7 %. Največji koeficient variacije je 7,2 % (PMN v nivoju I), kar pomeni, da ima PMN najmanjšo natančnost. Natančnost vseh parametrov je bila pod 7,3 %. Ta ugotovitev sovпада z zaključkom primerjave, ki jo je izvedel *Fleming s sodelavci* (40). Njihova natančnost pri kontrolnih vzorcih (nivo I in II) je bila vedno pod 7,5 % (nivo I: levkociti – 5,2 %, MN – 7,4 % in PMN – 7,2 %; nivo II: levkociti – 3,2 %, MN – 4,0 % in PMN – 3,6 %).

Lahko zaključimo, da smo dosegli (približno) enake rezultate kot jih je *Fleming s sodelavci* (40) in da naši rezultati potrdijo njihovo študijo glede natančnosti metode.

Pri primerjavi koeficientov variacije med nivojema smo opazili, da imajo KV v nivoju II nižje vrednosti od nivoja I. Iz tega sklepamo, da variabilnost pada z naraščanjem koncentracije celic. Že pri študijah XE-5000 so raziskovalci prav tako (61,62) ugotavljali, da variabilnost pada z naraščanjem koncentracije celic.

Če bi si postavili kriterij sprejemljivosti 7,5 %, bi bili sprejemljivi vsi parametri.

Ziebig in sodelavci (58) so primerjali hematološki analizator CellDyn 3500 (Abbott) in urinski pretočni citometer UF-100 (Sysmex) z ročno metodo. Ugotovili so visoko stopnjo natančnosti med serijami za levkocite (UF-100: 4,9 % (pri = $28,9 \times 10^6/\text{L}$), 3,8 % (pri = $82,8 \times 10^6/\text{L}$) in 3,5 % (pri = $387,4 \times 10^6/\text{L}$) in za CellDyn 3500: 28 % (pri = $28,1 \times 10^6/\text{L}$), 16 % (pri = $86,6 \times 10^6/\text{L}$) in 3,3 % (pri = $363,7 \times 10^6/\text{L}$). Zaključili so, da je določanje koncentracije celic na UF-100 zanesljivo, še posebej pri nizkih koncentracijah (KV je 4,9 %, v primerjavi z 28 % pri CellDyn).

Naši rezultati natančnosti za levkocite tudi nakažejo nižanje koeficienta variacije z večanjem koncentracije (5,9 % (pri = $65,7 \times 10^6/\text{L}$) in 5,0 % (pri = $261,2 \times 10^6/\text{L}$)), vendar v manjši meri v primerjavi z zgoraj omenjeno raziskavo, ki jo je izvedel *Ziebig s sodelavci* (58). Kljub temu, da so koeficienti variacije pri naši raziskavi izračunani na podlagi drugih koncentracijskih območij (= $65,7 \times 10^6/\text{L}$, = $261,2 \times 10^6/\text{L}$) kot pri raziskavi *Ziebig-a s sodelavci* (58) (UF-100/CellDyn3500: = $28,9/28,1 \times 10^6/\text{L}$, = $82,8/86,6 \times 10^6/\text{L}$, = $387,4/363,7 \times 10^6/\text{L}$), lahko vseeno trdim, da so naši rezultati natančnosti pri Sysmex-u XN-1000 za levkocite primerljivi z rezultati natančnosti za levkocite na urinskem citometru UF-100 in boljši kot rezultati natančnosti za levkocite na hematološkem analizatorju CellDyn 3500.

Naši rezultati natančnosti (Sysmex XN-1000) so prav tako boljši kot pri analizi natančnosti hematološkega analizatorja Advia 120 CSF Assay, katero so izvedli *Aune in sodelavci* (36). V nivoju I kontrolne raztopine imajo naši rezultati znatno nižje koeficiente variacije v primerjavi z Advio (Sysmex/Advia: levkociti 5,9/20,0 %, eritrociti 3,5/19,5 %). Razlika med koeficienti variacije se zmanjša v nivoju II kontrolnih raztopin (Sysmex/Advia:

levkociti 5,0/9,3 %, eritrociti 1,9/10,1 %, MN 4,7/9,9 %, PMN 6,7/7,3 %). Čeprav v manjši meri, so naši rezultati koeficientov variacije v nivoju II še vedno nižji kot pri Advii.

Boljše rezultate natančnosti kot *Aune in sodelavci* (36) so za Advio 120 določili *Tanada in sodelavci* (63). V obeh nivojih kontrolnih raztopin (nivo I in nivo II, s podobnimi koncentracijskimi območji) so njihovi koeficienti variacije boljši (*Tanada/Aune*: $KV_{\text{levkociti}}$ 16,8/20,0 %, $KV_{\text{eritrociti}}$ 19,5/28,9 % pri nivoju I; $KV_{\text{levkociti}}$ 6,9/9,3 %, $KV_{\text{eritrociti}}$ 4,7/10,1 % pri nivoju II). Kljub nižjim koeficientom variacije, ki so jih dosegli *Tanada in sodelavci* (63), so še vedno slabši od naših rezultatov (Sysmex/Advia(*Tanada*(50))): $KV_{\text{levkociti}}$ 5,9/16,8 %, $KV_{\text{eritrociti}}$ 3,5/18,9 % v nivoju I, $KV_{\text{levkociti}}$ 5,0/6,9 %, $KV_{\text{eritrociti}}$ 1,9/4,7 % v nivoju II kontrolne raztopine).

Levkociti in diferencialna slika

Pri primerjavi, ki zajame vse pare meritev **levkocitov** ($n=117$), je povprečni odklon ($178 \times 10^6/\text{L}$) med meritvama klinično nesprejemljiv. Prav tako so nesprejemljive tudi meje ujemanja ($-3419,2$ do $3785,2 \times 10^6/\text{L}$). Ti izračuni nimajo kliničnega pomena, saj zajemajo vrednosti med 0 in $21228 \times 10^6/\text{L}$. Pri vrednostih nad $200 \times 10^6/\text{L}$ ni več klinično pomembna velikost razlike med meritvama, saj je takšen rezultat odraz hude patologije (ročna/avtomatizirana; levkociti 2645 / 2412 $\times 10^6/\text{L}$, MN 3,2 / 2,4 %, PMN 96,8 / 97,6 % ; levkociti 891 / 1428 $\times 10^6/\text{L}$, MN 10,8 / 15,0 %, PMN 89,2 / 85,0 % ; levkociti 5280 / 5204 $\times 10^6/\text{L}$, MN 6,1 / 7,0 %, PMN 93,9 / 93,0 %). S ponovno analizo in izključitvijo določenih koncentracij smo podrobneje preučili klinično pomembna območja.

Skupina 0 – $5 \times 10^6/\text{L}$ levkocitov zajame normalne referenčne vrednosti koncentracij levkocitov v likvorju za odrasle (17), skupina 0 – $30 \times 10^6/\text{L}$ levkocitov zajame normalne referenčne vrednosti koncentracij levkocitov v likvorju za novorojenčke (17). V skupini 0 – $200 \times 10^6/\text{L}$ levkocitov je zajeto večje koncentracijsko območje levkocitov in zajame tudi obe meji referenčnih vrednosti, tj. za odrasle in novorojenčke. Pri vrednostih nad $200 \times 10^6/\text{L}$ je v likvorju že makroskopsko opazna motnost (9,17).

V skupini s koncentracijo 0 – $5 \times 10^6/\text{L}$ levkocitov ($n=52$), je povprečni odklon zelo blizu ničli ($0,6 \times 10^6/\text{L}$) in meje ujemanja se v primerjavi z analizo, ki vključuje vse pare meritev, zelo zožijo ($-1,8$ – $3,1 \times 10^6/\text{L}$). Povprečni odklon je v tem primeru klinično sprejemljiv saj daje avtomatizirana metoda v povprečju za $0,6 \times 10^6/\text{L}$ višje vrednosti kot

ročna metoda. Občutno so se zožile tudi meje ujemanja. Pri primerjavi Sysmex-ovega XE-5000 z ročno metodo so *Zimmermann in sodelavci* (64) prav tako analizirali koncentracijsko območje $0 - 5 \times 10^6/\text{L}$ levkocitov z Bland-Altmanovo analizo. Ugotovili so, da daje avtomatizirana metoda za $2,4 \times 10^6/\text{L}$ višje vrednosti kot ročna. V primerjavi s omenjeno študijo so naši rezultati v tem primeru boljši. Eden od vzrokov za boljši rezultat je novejša in s tem tudi izboljšana verzija BF modula na Sysmex-ovih hematoloških analizatorjih. Leta 2006 je Sysmex predstavil BF modul na avtomatiziranem hematološkem analizatorju XE-5000 (62), leta 2011 so predstavili izboljšan BF modul na XE-5000 in ga poimenovali XN (40).

V drugi skupini s koncentracijskim območjem $0 - 30 \times 10^6/\text{L}$ levkocitov ($n=71$) je sicer povprečni odklon ($1,2 \times 10^6/\text{L}$) malce večji od povprečnega odklona prve skupine ($0,6 \times 10^6/\text{L}$) vendar je še vedno zelo blizu ničli. Meje ujemanja se v primerjavi s prvo skupino ($-1,8 - 3,1 \times 10^6/\text{L}$) malce razširijo ($-6,3 - 8,8 \times 10^6/\text{L}$). Tudi tu je povprečni odklon klinično sprejemljiv saj daje avtomatizirana metoda v povprečju za $1,2 \times 10^6/\text{L}$ večje vrednosti kot ročna metoda. V študiji, ki jo je izvedel *Fleming s sodelavci* (40), so z regresijsko analizo analizirali skupino rezultatov s koncentracijskim območjem $0 - 30 \times 10^6/\text{L}$ levkocitov in ugotovili odlično ujemanje ($y = 1,00x + 0,20$; $n=45$, $R^2=0,94$). Glede na to, da daje avtomatizirana metoda v povprečju za $1,2 \times 10^6/\text{L}$ večje vrednosti od ročne metode, lahko tudi mi zaključimo, da se metodi v območju $0 - 30 \times 10^6/\text{L}$ levkocitov dobro ujemajo.

V zadnji skupini s koncentracijskim območjem $0 - 200 \times 10^6/\text{L}$ levkocitov ($n=102$) je povprečni odklon ($0,2 \times 10^6/\text{L}$) najbližje ničli. Po pričakovanjih se meje ujemanja v primerjavi s prejšnjima skupinama ($0 - 5$ in $0 - 30 \times 10^6/\text{L}$) še malo razširijo ($-16,1 - 16,5 \times 10^6/\text{L}$). V nasprotju s študijo *Zimmermanna s sodelavci* (64), kjer v koncentracijskem območju $0 - 200 \times 10^6/\text{L}$ levkocitov, daje avtomatizirana metoda na XE-5000 za $3,3 \times 10^6/\text{L}$ večje vrednosti kot ročna – torej še rahlo večje vrednosti kot v koncentracijskem območju $0 - 5 \times 10^6/\text{L}$ (odklon $2,4 \times 10^6/\text{L}$). V našem primeru je povprečni odklon ($0,2 \times 10^6/\text{L}$) primerljiv in celo manjši od povprečnega odklona koncentracijskega območja $0 - 5 \times 10^6/\text{L}$ (povprečni odklon $0,6 \times 10^6/\text{L}$). Kot je omenjeno že pri komentarju skupine s koncentracijo $0 - 5 \times 10^6/\text{L}$, je omenjeno izboljšanje verjetno posledica novejšega in izboljšanega »BF« modula.

V splošnem v vseh primerih daje analizator za koncentracijo levkocitov večje rezultate kot ročna metoda. V zadnji skupini, kjer je zajeto koncentracijsko območje $0 - 200 \times 10^6/\text{L}$

levkocitov, je povprečni odklon najmanjši, skoraj enak ničli – kar je cilj Bland-Altmanove analize. Če bi bil povprečni odklon enak ničli, bi metodi dajali identične rezultate (52). Dvome nam lahko vzbudi variabilnost rezultatov do $16,5 \times 10^6/\text{L}$ levkocitov, še posebej pri nizkih koncentracijah. Z dodatnimi analizami drugih koncentracijskih območij smo ugotovili, da je variabilnost pri manjših koncentracijah manjša ($0 - 5 \times 10^6/\text{L}$ levkocitov – variabilnost do $3,1 \times 10^6/\text{L}$; $0 - 30 \times 10^6/\text{L}$ levkocitov – variabilnost do $8,8 \times 10^6/\text{L}$ levkocitov). Idealno bi bilo, da bi bila variabilnost 0.

Perné s sodelavci (65) je v študiji Sysmex-ovega XE-5000 raziskoval pravilno klasificiranje vzorcev v različne skupine levkocitov. Odstotek pravilno klasificiranih vzorcev v skupini $0 - 5 \times 10^6/\text{L}$ levkocitov je 88 %; $n = 88$ (12 % ($n = 12$) napačnih klasifikacij v zgornji razred), v skupini $> 5 - 10 \times 10^6/\text{L}$ levkocitov je 47 %; $n = 17$ (22 % ($n = 8$) je napačno klasificiranih v spodnji razred in 31 % ($n = 11$) v zgornji razred), $> 10 - 50 \times 10^6/\text{L}$ levkocitov 72 %; $n = 28$ (20 % ($n = 8$) je napačno klasificiranih v spodnji razred in 8 % ($n = 8$) v zgornji razred), $> 50 - 200 \times 10^6/\text{L}$ levkocitov je 93 %; $n = 14$ (7 % ($n = 1$) je napačno klasificiranih v spodnji razred) in v skupini nad $200 \times 10^6/\text{L}$ levkocitov je pravilno klasificiranih 100 % vzorcev ($n = 5$).

V naši raziskavi je skupini s koncentracijo $0 - 5 \times 10^6/\text{L}$ levkocitov pravilno klasificiranih 51 (98 %) vzorcev, le 1 (1,9 %) vzorec je napačno klasificiran v zgornji razred (ročna $4 \times 10^6/\text{L}$, avtomatizirana metoda $7 \times 10^6/\text{L}$).

Pri združitvi spodnjih dveh razredov ($0 - 5$ in $> 5 - 10 \times 10^6/\text{L}$) v skupen razred $0 - 10 \times 10^6/\text{L}$ levkocitov je pravilno klasificiranih 95 % ($n = 347$) vzorcev in samo 5 % ($n = 19$) vzorcev se napačno klasificira v zgornji razred. Združitev dveh najnižjih koncentracijskih območij v eno skupino ($0 - 10 \times 10^6/\text{L}$ levkocitov) ima večje ujemanje med primerjavnima metodama.

Zaključili so, da je hematološki analizator XE-5000 sprejemljiva alternativa ročni metodi pri za določanje številčne koncentracije levkocitov.

V nasprotju z našimi ugotovitvami in ugotovitvami *Perné-ja s sodelavci* (65) je *Ziebig s sodelavci* (58) v raziskavi, kjer preučuje CellDyn 3500 in UF-100 na podlagi regresijske analize (levkociti: CellDyn $y=1,11x + 5,68$ in UF-100 $y=1,35x - 1,39$; eritrociti: UF-100 $y=0,873x + 1,518$) po Passing-Bablok metodi, zaključil, da metodi ne zagotavljata primerne uporabnosti za rutinsko analizo.

Mononuklearni levkociti imajo dokaj manjši povprečni odklon ($14,09 \times 10^6/L$) in široke meje ujemanja ($-100,3$ do $128,5 \times 10^6/L$). Primerjava deležev MN ima precej manjši povprečni odklon (4,85 %) vendar so meje ujemanja široke ($-69,4 - 79,1$ %). Pri preučevanju diagrama deležev MN (diagram 8) je opazna porazdelitev točk v obliki puščice ali troblje. Takšna oblika grafa nakazuje, da absolutna razlika med meritvama narašča z naraščanjem povprečka (66).

Kljub majhnemu povprečnemu odklonu, rezultati za MN niso sprejemljivi zaradi širokih mej ujemanja, torej velike variabilnosti. Kar velja za absolutno koncentracijo in za delež MN. Drugi vzrok nesprejemljivosti rezultatov lahko razberemo iz diagrama deležev MN (diagram 8), ki nakazuje, da je vsaj ena metoda odvisna od razsežnosti meritev. Te ugotovitve podpira izračun točnosti za MN. Absolutne koncentracije MN v kontrolnih vzorcih (nivo I 8,3 %, nivo II 11,7 %) imata skupaj z absolutnimi koncentracijami PMN (nivo I 13,1 %, nivo II 17,6 %) najvišji odstotek odstopanja od ciljne vrednosti (v nivoju II se jima pridruži tudi koncentracija levkocitov s 15,2 % odstopanjem). Pri izračunu točnosti ima delež MN (nivo I 2,1 %, nivo II 4,2 %) znatno manjše odstopanje od ciljne vrednosti v primerjavi z odstopanjem absolutne koncentracije MN.

Pri predhodni študiji XN-1000 (*Fleming s sodelavci* (40)) so zaključili, da se koncentracije MN med ročno in avtomatizirano metodo dobro ujemajo ($y = 1,04x + 0,11$; $n=40$, $R^2=0,93$). Naša študija ne podpira ugotovitve predhodne študije XN-1000 glede MN. Možen vzrok je ta, da smo celice diferencirali v komori, kar je manj zanesljivo kot diferenciacija v citološkem sedimentu katero so izvajali v študiji *Fleming-a s sodelavci* (40).

Kleine in sodelavci (61) so zaključili, da je analizatorju XE-5000 in XT-4000i diferenciranje levkocitov v PMN in MN nezanesljivo, ker referenčna metoda daje značilno nižje (MN; pribl. 14 % na obeh analizatorjih) oziroma višje (PMN; pribl. 2,2–krat) vrednosti. Napačna diferenciacija je posledica napačnega razlikovanja levkocitnega jedra (61).

Mononuklearne levkocite vedno interpretiramo skupaj s koncentracijo levkocitov, s koncentracijo PMN ter deležem PMN in deležem MN. Koncentracija levkocitov in deleži MN ter PMN dajejo kliniku pomembne informacije.

Pri absolutnih vrednostih **polimorfonuklearnih celic** je povprečni odklon ($6,0 \times 10^6/L$), kar je manjše od povprečnega odklona za MN ($14,09 \times 10^6/L$). Meje ujemanja ($-164,0 - 176,1 \times 10^6/L$) so še širše kot pri MN ($-100,3 - 128,5 \times 10^6/L$). To pomeni, da pri PMN obstaja še večja variabilnost kot pri MN. Pri deležih PMN se povprečni odklon (5,44 %) nekoliko zmanjša v primerjavi s povprečnim odklonom absolutnih vrednosti PMN. Temu primerno se zožijo tudi meje ujemanja ($-52,79 - 63,68$ %). Možen vzrok je ta, smo diferencirali celice v komori, kar je manj zanesljivo od diferenciacije v citološkem sedimentu.

Podobno kot pri MN tudi rezultati za PMN niso sprejemljivi zaradi širokih mej ujemanja, pri absolutnih koncentracijah in deležih. Tudi v diagramu deležev PMN (diagram 10) je opazen trend troblje, kar pomeni, da je vsaj ena metoda odvisna od razsežnosti meritev.

Te ugotovitve podpira tudi izračun točnosti absolutnih koncentracij. Absolutne koncentracije PMN v kontrolnih vzorcih (nivo I 13,1 %, nivo II 17,6 %) imajo med vsemi analiti največji odstotek odstopanja od ciljne vrednosti. V nasprotju z absolutnimi koncentracijami ima delež PMN v kontrolnih vzorcih pri izračunu točnosti znatno manjše odstopanje (nivo I 1,5 %, nivo II 2,9 %).

Fleming s sodelavci (40) je za PMN ugotovil značilno pozitiven odklon ($y = 1,48x + 0,18$; $n=40$, $R^2=0,99$). Navedli so tudi tri možne vzroke za neskladja pri diferenciaciji: 1. ostanki celic se na razsevnem grafu pojavijo tik pod območjem PMN in jih analizator vključi v koncentracijo PMN; 2. izguba MN celic pri pripravi citološkega sedimenta, kar vodi v precenitev PMN celic; 3. liza celic v nativnem likvorju na račun nizkih koncentracij albumina in lipidov (40,62,67).

Potrebno je poudariti, da smo pri naši študiji celice diferencirali v nativnem likvorju v komori in ne v obarvanem citološkem sedimentu. Slabši rezultati ujemanja pri primerjavi absolutnih koncentracija za MN in PMN so lahko posledica manjše zanesljivosti diferenciacije celic v nativnem likvorju v komori.

Perné in sodelavci (65) so izvedli raziskavo, kjer so podrobneje preučili klasifikacijo PMN na Sysmex-u XE-5000. Med seboj so primerjali deleže PMN katere so razdelili v 4 skupine: 0 – 25 % ($n = 263$), > 25 – 50 % ($n = 7$), > 50 – 75 % ($n = 3$) in > 75 – 100 % ($n = 3$). Med 263 vzorci z mikroskopsko določenim deležem med 0 – 25 % je kar 37 % ($n = 96$) napačno klasificiranih v višji razred in pri več kot polovici primerov je avtomatska metoda

določila več kot 75 % PMN. Koncentracija PMN je največkrat precenjena pri nizkih koncentracijah levkocitov. Opazili so, da je analizator odpad (razpadle celice) klasificiral kot PMN. V skupini > 25 – 50 % ($n = 7$) je avtomatizirana metoda pravilno klasificirala 29 %; $n = 2$ (42 % ($n = 7$) je napačno klasificiranih v spodnji razred in 29 % ($n = 2$) napačno klasificiranih v zgornji razred). V skupini > 50 – 75 % ($n = 3$) je avtomatizirana metoda pravilno klasificirala 33 %; $n = 1$ (67 % ($n = 2$) je napačno klasificiranih v spodnji razred). V skupini > 75 – 100 % ($n = 3$) je avtomatizirana metoda pravilno klasificirala 67 %; $n = 2$ (33 % ($n = 1$) je napačno klasificiranih v spodnji razred).

Zaključili so, da Sysmex XE-5000 ni zanesljiv za diferenciacijo levkocitov, ker metoda ne omogoča zaznavanja podrobnejše morfologije, zato je ločevanje med mononuklearnimi in polimorfonuklearnimi levkociti nezanesljivo.

Težave z diferenciacijo levkocitov so ugotavljali tudi na drugih analizatorjih.

Nanos in Delanghe (55) sta primerjala **Sysmex UF-100** in **Sysmex UF-1000i**. Njihove izkušnje z analizatorjem Sysmex UF-100 so pokazale, da nekatere limfocitne populacije lahko vodijo v podcenjevanje števila levkocitov. Te težave je proizvajalec odpravil z novim analizatorjem UF1000i. Ugotovila sta, da se je pri analizi z UF-1000i analizatorjem močno zmanjšalo število vzorcev, katere je bilo potrebno preveriti pod mikroskopom.

Težave s populacijami limfocitov so imeli tudi pri primerjavi hematološkega analizatorja **CellDyn 3500** in urinskega citometra **UF-100** (*Ziebig s sodelavci* (58)). Vzorci, ki so pokazali odstopanje med rezultati analizatorjev in ročno metodo, so v večini primerov vsebovali velik delež limfocitov (atipični limfociti). Za te vzorce je CellDyn dajal lažno povečane koncentracije levkocitov, UF-100 pa lažno zmanjšane rezultate. Atipičnih limfocitov UF-100 ne uvrsti med levkocite. Zaključili so, da analizatorja nista primerna za rutinsko analizo celic v likvorju.

Za razliko od omenjenih raziskav so *Tanada in sodelavci* (63) zaključili, da daje Advia 120 točne rezultate meritev za koncentracijo levkocitov in točno diferencira levkocite v MN in PMN. Diferenciacija levkocitov je pokazala dobro korelacijo z ročno metodo ($r_{MN} 0,98$, $r_{PMN} 0,98$).

Eritrociti

V prvi primerjavi, kjer so zajeti vsi pari meritev, je povprečni odklon ($1105,6 \times 10^6/\text{L}$) izredno velik. Temu primerno so široke tudi meje ujemanja ($-13555,3 - 15766,5 \times 10^6/\text{L}$). Dobljeni rezultati so nesprejemljivi. S kliničnega vidika ti podatki niso pomembni saj v normalnem likvorju eritrociti niso prisotni (6). Prav tako s kliničnega vidika niso pomembne večje razlike pri meritvah koncentracij eritrocitov. Koncentracije eritrocitov v nativnem likvorju imajo omejeno diagnostično vrednost (17).

Prisotnost eritrocitov načeloma pripisujemo kontaminaciji likvorja s krvjo iz perifernih žil, katere se poškodujejo ob sami izvedbi punkcije (6).

Pri krvavitvah v OŽ so v likvorju prisotni številni eritrociti. Pri krvavitvi iz perifernih žil, katere se poškodujejo ob sami izvedbi punkcije, je število eritrocitov načeloma pod $400 \times 10^6/\text{L}$ in v seriji vzorcev število eritrocitov pada (17). Za razlikovanje patološke krvavitve v OŽ od krvavitve povzročene s punkcijo, si klinik pomaga z drugimi parametri, npr. prisotnost ksantokromije, s prostim očesom viden »krvav« likvor v seriji vzorcev, nastanek krvnega strdka v vzorcu likvorja, prisotnost eritrofagov (6,9,17). Drugi bolj zanesljivi diagnostični metodi za določitev izvora krvavitve v OŽ sta računalniška tomografija (RT) in/ali magnetna resonanca (MR) (28).

Skleпам, da je trend in velika variabilnost razlik posledica omejene občutljivosti avtomatizirane metode, saj analizator zazna eritrocite, ko presežejo koncentracijo $10^9/\text{L}$ oziroma $1000 \times 10^6/\text{L}$. Ročna metoda omogoča določanje 1000-krat manjših vrednosti.

Ponovno smo analizirali podatke in vključili pare meritev, kjer ročna metoda dosega koncentracijo do $1000 \times 10^6/\text{L}$ (izključenih je 11 parov meritev). V primerjavi s povprečnim odklonom »vseh parov meritev« ($1105,6 \times 10^6/\text{L}$) je povprečni odklon »do $1000 \times 10^6/\text{L}$ « nižji ($24,8 \times 10^6/\text{L}$). Meje ujemanja se zožijo ($-459,8 - 509,3 \times 10^6/\text{L}$) vendar ostajajo še vedno široke. V diagramu eritrocitov do $1000 \times 10^6/\text{L}$ (diagram 5) sta najbolj opazna trenda, ki z višanjem koncentracije linearno padata. Menimo, da sta linearna trenda posledica spodnje meje zaznave analizatorja. Analizator namreč podaja koncentracije eritrocitov pod $500 \times 10^6/\text{L}$ kot $0 \times 10^9/\text{L}$, koncentracije nad $500 \times 10^6/\text{L}$ pa $1 \times 10^9/\text{L}$ (40).

Pozitiven predznak biasa kaže na to, da avtomatizirana metoda daje v povprečju za $24,8 \times 10^6/\text{L}$ večje vrednosti kot ročna metoda.

V drugi skupini smo zajeli rezultate, ki so nad spodnjo mejo detekcijo avtomatske metode, tj. rezultate, ki presegajo koncentracijo $1000 \times 10^6/L$. Ker smo izključili 106 parov meritev, je ostalo premalo podatkov ($n=11$) za zanesljivo statistično analizo.

Osrednja tema primerjave v člankih, ki se nanašajo na študije avtomatiziranih metod za celično analizo likvorja, je določanje številčne koncentracije levkocitov in diferenciacija levkocitov. Posamezni avtorji sicer v manjši meri analizirajo tudi primernost avtomatizirane metode za določanje številčne koncentracije eritrocitov. Pomanjkanje teh podatkov je verjetno posledica omejitve analizatorjev (spodnja meja zaznave) in dejstva, da ima koncentracija eritrocitov v likvorju omejeno diagnostično vrednosti (17). Visoko spodnjo mejo zaznave, tj. nad $1000 \times 10^6/L$ eritrocitov, ima poleg Sysmex-a XN-1000 tudi Beckman-Coulter LH750 (56), IRIS iQ200 (56), CellDyn 3500 (58) ter XE-5000 (61). V nasprotju z omenjenimi analizatorji imata UF-100 (58) in Advia 120 (36,61,63) mejo zaznave pod $1000 \times 10^6/L$. Za Advia 120 (36,61,63) poročajo o območju dela metode $0 - 2880 \times 10^6/L$.

Ostale celice

Na izpisu iz analizatorja je tudi parameter TC-BF (ang. total nucleated cell count-body fluid) oziroma »skupno število celic z jedrom«. V to skupino analizator šteje skupaj vse levkocite in vse druge celice z jedrom (40).

Makrofagi in mezotelijske celice imajo visoko fluorescenco (40). Po tej karakteristiki se ločijo od levkocitov. Pri povečanem številu celic z visoko fluorescenco analizator opozori na »nenormalen diagram levkocitov« (38). Ob takšnem opozorilu se priporoča pregled citološkega sedimenta likvorja.

Pri 109 vzorcih (93,2 %) je bila razlika med številom levkocitov in številom »TC« od 0 do $3 \times 10^6/L$. Sedem vzorcev (6,0 %) ima razliko levkociti/»TC« od 4 do $11 \times 10^6/L$.

Med meritvami posebej izstopa meritev, kjer je koncentracija levkocitov $0 \times 10^6/L$, število »TC« pa $1 \times 10^6/L$. V razsevnem diagramu za levkocite bi bilo potrebno preveriti lokacijo te meritve in preveriti opombe analizatorja.

Z nadaljnjo uporabo analizatorja in pridobljenimi praktičnimi izkušnjami bi bilo potrebno določiti »cut off« vrednosti, kdaj naj bi z diferenciacijo v citološkem sedimentu preverjali

razlike v med koncentracijo levkocitov in koncentracijo »TC« v primerih, ko analizator še ne opozori na nenormalen diagram levkocitov.

Za ugotavljanje uporabnosti opozoril analizatorja, bi bilo potrebno analizirati večje število vzorcev z »nenormalnim diagramom za levkocite«. Na podlagi teh primerov bi lahko ocenili uporabnost opozoril analizatorja zaradi katerih je potrebno pripraviti citološki sediment. Med analiziranimi vzorci nismo imeli primera z opozorilom za »nenormalen diagram levkocitov«.

Zunanja kontrola kvalitete

V laboratoriju za analitiko telesnih tekočin, UKC Ljubljana, so vključeni v zunanjo kontrolo kvalitete nemškega inštituta za bioanalitiko - RfB (Referenzeinstitut für Bioanalytik, Bonn).

V kontrolnem vzorcu A naš rezultat (ročna metoda) odstopa od tarčne vrednosti za levkocite za 5 %, za eritrocite – 53,8 %. V kontrolnem vzorcu B naš rezultat (ročna metoda) odstopa od tarčne vrednosti za levkocite za – 1,2 %, za eritrocite – 24,5 %. Vsi rezultati so znotraj mej dovoljenega odstopanja. Dovoljeno odstopanje od tarčne vrednosti je ± 80 % (47). Večja odstopanja je opaziti pri koncentracijah eritrocitov in sicer v obeh kontrolnih vzorcih je naš rezultat manjši od ciljne vrednosti. Vzrok takšnemu odstopanju bi lahko bila nestabilnost eritrocitov v kontrolnem vzorcu. Vzrok za nestabilnost eritrocitov je lahko transport (ni zagotovljena ustrezna temperatura med transportom, nihanje temperature med transportom, stresanje kontrolnih vzorcev pri transportu) ali vpliv dodanih raztopin in kemikalij, ki naj bi stabilizirale in konzervirale celice v vzorcu. Nizke koncentracije lipidov in proteinov ter hipotoničnost likvorja oziroma kontrolne raztopine, ki načeloma stabilizira celične membrane, lahko na celice vpliva tudi destruktivno (17).

Kleine s sodelavci (61) v članku opisuje postopek priprave kontrolnih vzorcev za analizo celic v likvorju pri DGKL. Levkocite in eritrocite izolirajo iz polne krvi zdravih prostovoljcev in jim dodajo različne raztopine s katerimi dosežejo daljšo stabilnost celic in oponašajo/simulirajo likvor. Vzorce shranjujejo v temnem prostoru pri 4 °C. Pri 4 °C naj bi bili eritrociti in levkociti živi/viabilni 3 do 4 dni (61). S štetjem celic v komori preverijo koncentracije levkocitov in eritrocitov na različne dneve po pripravi kontrolne raztopine in ugotavljajo nižanje koncentracij celic v določenih časovnih obdobjih po pripravi vzorca. V

članku je primer, kjer v pripravljenem kontrolnem vzorcu pade koncentracija celic do 30 % med drugim in sedmim dnevom po pripravi vzorca (61).

Vzorci zunanje kontrole kvalitete z oznako ZL1/13 smo analizirali tudi na analizatorju Sysmex XN-1000. Primerjali smo samo koncentracije levkocitov. Koncentracije eritrocitov so v obeh kontrolnih vzorcih zunanje kontrole kvalitete pod spodnjo mejo zaznave, tj. pod $1000 \times 10^6/\text{L}$.

Rezultata za ročno in avtomatizirano metodo za levkocite sta v vzorcu A identična, oba odstopata od tarčne vrednosti za 5 %. V vzorcu B se rezultata med seboj razlikujeta za $1 \times 10^6/\text{L}$ levkocitov. Razlika v odstotkih je 1,9 % v prid ročne metode. Rezultat ročne metode za vzorec B je 1,2 %, za avtomatizirano metodo pa 3,1 %. Oba rezultata sta manjša od ciljne vrednosti. Če upoštevamo dejstvo, da je največje dovoljeno odstopanje od tarčne vrednosti ± 80 %, so omenjeni odstotki odstopanja zanemarljivi. Pri primerjavi absolutnih rezultatov s tarčnimi vrednostmi lahko vidimo, da so absolutne razlike minimalne: vzorec A – rezultata obeh analiz odstopata za $0,5 \times 10^6/\text{L}$, vzorec B – rezultat ročne metode odstopa za $1,5 \times 10^6/\text{L}$ in rezultat avtomatizirane metode za $2,5 \times 10^6/\text{L}$.

Kljub temu, da na »Inštitutu RfB« v spremni besedi kontrolnih vzorcev ZL1/13 posebej opozarjajo, da se lahko rezultat ročnega določanja razlikuje od avtomatiziranega rezultata (68), to v našem primeru ne velja.

6. SKLEPI

- Avtomatizirana metoda daje točne rezultate za koncentracijo levkocitov in eritrocitov v likvorju, vendar je točnost nekoliko slabša pri večjih koncentracijah levkocitov in absolutnih koncentracijah MN in PMN levkocitov.
- Natančnost naše avtomatizirane metode je boljša kot pri študiji na Sysmex-u XE-5000 (*Zimmermann et al. (64)*) in primerljiva s predhodno študijo Sysmex-ovega XN-1000 (*Fleming et al. (40)*).
- Avtomatizirana metoda daje večje koncentracije levkocitov v likvorju v primerjavi z ročno metodo.
- Sysmex-ov XN-1000 daje pri skupinah levkocitov $0 - 5 \times 10^6/\text{L}$ in $0 - 200 \times 10^6/\text{L}$ boljše rezultate v primerjavi s starejšim Sysmex-ovim modelom XE-5000 (*Zimmermann et al. (64)*). Skupina levkocitov $0 - 30 \times 10^6/\text{L}$ daje primerljive rezultate s predhodno študijo Sysmex-ovega XN-1000 (*Fleming et al. (40)*).
- Rezultati diferenciacije levkocitov kažejo slabše ujemanje med metodama, vzroki so lahko prisotni pri obeh metodah.
- Za zanesljivo oceno primerljivosti določanja koncentracije eritrocitov smo imeli premalo vzorcev s koncentracijo nad »cut off« vrednostjo analizatorja ($1000 \times 10^6/\text{L}$).
- Tako z avtomatizirano kot tudi ročno metodo smo z analizo kontrolnih vzorcev dobili rezultate znotraj dovoljenih mej odstopanja. Odstopanja so bila majhna, kar potrjuje točnost obeh metod.

7. LITERATURA

1. Drahtman-Gošnjak R. Ilustrirana anatomija. Tehniška založba Slovenije. 1. Izdaja. Ljubljana 1998; 78-91.
2. Pejković B. Anatomija človeškega telesa: compedium topografske anatomije in navodila za vaje. Univerza v Mariboru, Medicinska fakulteta Maribor 2007; 68-86.
3. Štiblar Martinčič D. Čör A. Cvetko E. Marš T. Legan M. Anatomija, histologija in fiziologija. 2. Izdaja. Ljubljana 2008; 57-70.
4. Čvorišćec D. Čepelak I. Štrausova medicinska biokemija. Medicinska naklada. Zagreb 2009; 558-587.
5. McBride LJ. Textbook of urinalysis and body fluids: A clinical approach. 1st Edition. Lippincott Williams & Wilkins 1998; 195-207.
6. King Strasinger S. Schaub Di Lorenzo M. Urinalysis and body fluids. 5th Edition. FA Davis Company Philadelphia 2008; 177-189.
7. Kaplan LA. Pesce AJ. Clinical chemistry: Theory, analysis, correlation. 5th Edition. Mosby Elsevier St. Luis Missouri 2010; 905-908.
8. Segal MB. The Choroid Plexuses and teh Barriers Between the Blood and the Cerebrospinal Fluid. Cellular and Molecular Neurobiology 2000; 20(2):183-185.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute; International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) (2006). Body Fluid Analyses for Cellurar Composition. Proposed Guideline. vol. 25, No. 20, H56-p.
10. Wolburg H. Paulus W. Choroid plexus: biology and pathology. Acta Neuropathol 2010; 119: 75-88.
11. Siegel GJ. Agranoff BW. Albers RW. et al. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. 6th edition. Philadelphia: Lippincott-Raven 1999. Copyright: 1999, American Society for Neurochemistry.
12. Sukriti N. The Blood-Brain and Other Neural Barriers: Reviews and Protocols. Methods in Molecular Biology, vol. 686.
13. Davson H. Segal MB. Phisiology of the CSF and Blood-Brain Barriers. Boca Raton: CRC Press 1996.
14. Abbott NJ. Ronnback L. Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. Nat Rev Neurosci 2006; 7: 41-53.

15. Brightman MW. Reese TS. Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J Cell Biol* 1969; 40: 648-677.
16. Šercer A. Medicinska enciklopedija 6. Izdanje i naklada leksikografskog zavoda FNRJ. Grafički zavod Hrvatska. Zagreb. 1962.
17. Kjeldsberg CR. Knight JA. Body fluids: Laboratory examination of amniotic, cerebrospinal, seminal, serous and synovial fluids. 3rd Edition. American Society of Clinical Pathologists, Chicago 1993; 65-156.
18. Orešković D. Klarica M. Development of hydracephalus and classical hypothesis of cerebrospinal fluid hydrodynamics: Facts and Illusions. *Progress in Neurobiology* 2011; 94: 238-258.
19. Irani DN. Cerebrospinal fluid in Clinical Practice. Saunders Elsevier, Philadelphia 2009
20. Bechter K. The peripheral cerebrospinal fluid outflow pathway – physiology and pathophysiology of CSF recirculation: A review and hypothesis. *Neurology, Psychiatry and Brain Research* 2011; 17: 51 – 66.
21. Cutler RWP. Spertel RB. Cerebrospinal fluid: a selective review. *Ann Neurol.* 1982; 11: 1-10.
22. Trbojević-Čepe M. Vogrinc Ž. Likvorska diagnostika. Priručnik. Hrvatska komora medicinskih biokemičara. Medicinska naklada. Zagreb 2012.
23. Johanson CE. Duncan JA. Klinge PM. Brinker T. Stopa EG. Silverberg GD. Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: new challenges in health and disease. *Cerebrospinal Fluid Res.* (2008) 5:10.
24. Djuanda E. Lee R. Weller RO. A search for the lymphatic drainage of the human brain? *Neuropath Appl Neurobiol.* (1998) 24:132.
25. Greitz D. Paradigm shift in hydrocephalus research in legacy of Dandy's pioneering work: rationale for third ventriculostomy in communicating hydrocephalus. *Childs Nerv Syst* (2007) 23:487–489.
26. Kobe JM, Flisar Ž: Priporočeni postopki za osnovne laboratorijske preiskave likvorja. knjižica št. 6. Slovensko združenje za klinično kemijo, Ljubljana, 2004.
27. McGing P. O'Kelly R. The Biochemistry of Body Fluids. 1st ed. Version 1.0. Association of Clinical Biochemists in Ireland. October 2009 .
28. Tetičkovič E. et al. Klinična nevrologija. Založba obzorja Maribor 1997; 105-208.

29. Pocajt M. Širca A. Anatomija in fiziologija, za medicinske šole. Državna založba Slovenije, Ljubljana. 1990; 240 – 256.
30. Morgenlander JC. Lumbar puncture and CSF examination. Postgrad Med 1994;. 95(8): 125-131.
31. Fisherman RA. Cerebrospinal fluid in diseases of the nervous system. 2nd Edition. Philadelphia: Saunders, 1992.
32. Ahmed A. Hickey SM. Ehrett S. Trujillo M. Brito F. Goto C. et al. Cerebrospinal fluid values in the term neonate. Pediatr Infect Dis J 1996; 15: 298-303.
33. Paris A. Nhan T. Cornet E. Perol JP. Malet M. Troussard X. Performance evaluation of the body fluid mode on the platform Sysmex XE-5000 series automated hematology analyzer. Int J Lab Hematol 2010; 32: 539-547.
34. de Graaf MT. de Jongste AH. Kraan J. Boonstra JG. Smitt PA. Gratama JW. Flow cytometric characterization of cerebrospinal fluid cells. Cytometry B Clin Cytom 2011; 80: 271-281.
35. Rappaport ES. Helbert B. Beissner RS. Trowbridge A. Automated hematology: where we stand. Southern Med J 1988; 81: 365-370.
36. Aune MW. Becker JL. Brugnara C. Canfield W. Dorfman DM. Fiehn W. et al. Automated flow cytometric analysis of blood cell in cerebrospinal fluid. Am J Clin Path 2004; 121: 690-700.
37. Matsushita H. Tanaka Y. Sakairi K. Tanaka Y. Sysmex XN-Series, Automated Hematology Analyzer, Clinical case report, vol. 1.
38. Matsushita H. Nakazawa N. Gondo K. Tanaka Y. Sysmex XN-Series, Automated Hematology Analyzer, BF Mode, Clinical case report, vol. 3.
39. SOP LAST: Določanje številčne koncentracije levkocitov (in diferenciacija) ter eritrocitov v likvorju (velja od 22.4.2010, dostopano na interni mreži UKC Ljubljana: <http://ukcl.biart.si/>).
40. Fleming C. Brouwer R. Lindemans J. de Jonge R. Validation of the body fluid module on the new Sysmex XN-1000 for counting blood cells in cerebrospinal fluid and other body fluids. Clin Chem Lab Med 2012. 50(10); 1791-1798.
41. 510(k) Summary of Safety and effectiveness (internetni vir: <http://www.captodayonline.com/productguides/instruments/hematology-analyzers-2013/sysmex-america-sysmex-xn-1000-hematology-2013.html> , dostopano 5.2.2013).

42. Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide. Manual Part Number: 11-11032-01. April 2000, BD Biosciences, San Jose, CA.
43. Knapp JZ. Barber TA. Liberman A. Liquid- and surface-borne particle measurement handbook. NY, Maycel Dekker. 1996. Poglavje 4. Lines RW. The electrical sensing zone method (The Coulter principle). 113 – 118.
44. Brown M. Wittwer C. Flow cytometry: Principles and clinical applications in hematology. Clinical Chemistry, 2000. Vol. 46, No.8: 1221-1229.
45. Patrick CW. Clinical flow cytometry: milestones along the pathway of progress. MLO Med Labs Obs. 2002; 34: 0-16.
46. Shapiro HM. Practical flow cytometry. 4th ed. Hoboken. NY: John Wiley & Sons. 2003.
47. RfB <http://www.dgkl-rfb.de/cgi/switchLang?lang=en> (dostopano 21.3.2014).
48. Lajovic J. Ujemanje metod merjenja – praktični pristop. Revija ISIS, oktober 2010; zdravniška zbornica Slovenije ISSN 1581-161.
49. Marc J. Navodila in dnevniki za vaje iz klinične biokemije I. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Visokošolski študij laboratorijske biomedicine. Ljubljana 2001.
50. Burtis CA. Ashwood ER. Bruns DE. Fundamentals of Clinical Chemistry. Tietz Textbook. 6th Ed. Elsevier Saunders, 2006: 215-217.
51. Šimundić AM. Osnove biostatistike u svakodnevnoj praksi. Priručnik. Hrvatska komora medicinskih biokemičara. Medicinska naklada. Zagreb 2008.
52. Bland JM. Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. Lancet. 1986. i:307-310.
53. GraphPad Statistics Guide. GraphPad Software, Inc. 2013. Internetni vir: http://graphpad.com/guides/prism/6/statistics/index.htm?bland-altman_results.htm (dostopano: 09.12.2013).
54. Pratumvinit B. Sivasariyanonds N. Wachirutmangur L. Comparison of Conventional Manual Methods with the Advia 123 Automated Method for Counting of Red and White Blood Cells in Cerebrospinal Fluid. Siriraj Med J, vol 59, No. 2 (2007).
55. Nanos NE. Delanghe JR. Evaluation of Sysmex UF-1000i for use in cerebrospinal fluid analysis. Clinica Chimica Acta 392 (2008); 30-33.

56. Glasser L. Murphy CA. Matchan JT. The Clinical Reliability of Automated Cerebrospinal Fluid Cell Counts on the Beckman-Coulter LH750 and Iris iQ200. *Am J Clin Pathol* 2009; 131:58-63.
57. Van Acker JT. Delanghe JR, Langlois MR. Taes YE. De Buyzere ML. Verstraete AG. Automated flow cytometric analysis of cerebrospinal fluid. *Clin Chem* 2001; 47:556-60.
58. Ziebig R. Lun A. Sinha P. Leukocyte Counts in Cerebrospinal Fluid with the Automated Hematology Analyzer CellDyn 3500 and the Urine Flow Cytometer UF-100. *Clinical Chemistry* 2000; vol. 46, No. 2: 242-247.
59. Graaf MT. Broek PD. Kraan J. Bent RL. Boonstra JG. Schmitz PI. et al. Addition of serum-containing medium to cerebrospinal fluid prevents cellular loss over time. *J Neurol* 2011. 258:1507-12.
60. Dux R. Kindler-Röhrborn A. Annas M. Faustmann P. Lennartz K. Zimmermann CW. A standardized protocol for flow cytometric analysis of cells isolated from cerebrospinal fluid. *J Neuro Sciences* 1994. 121:74-8.
61. Kleine TO. Nebe CT. Löwer C. Geilenkeuser WJ. Dorn-Beineke A. Cell Analysis in Cerebrospinal Fluid (CSF) Using Sysmex Hematology Analyzers XT-4000i and XE-5000: Evaluation with CSF Controls of the Joint German Society for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (DGKL). *Cytometry Part A*. 2012. 81A:255-264.
62. De Jonge R. Brouwer R. de Graaf MT. Luitwieler RL. Fleming C. de Frankrijker-Merkestijn M. et al. Evaluation of the new body fluid mode on Sysmex XE-5000 for counting leukocytes and erythrocytes in cerebrospinal fluid and other body fluids. *ClinChem Lab Med* 2010. 48:665-75.
63. Tanada H. Ikemoto T. Masutani R. Tanaka H. Takubo T. Evaluation of the automated hematology analyzer Advia 120 for cerebrospinal fluid analysis and usage of unique hemolysis reagent. John Wiley & Sons Ltd. *Int. Jnl. Lab. Hem.* 2014, 36:83-91.
64. Zimmermann M. Ruprecht K. Kainzinger F. Heppner FL. Weimann A. Automated vs. Manual cerebrospinal fluid cell counts: a work and cost analysis comparing the Sysmex XE-5000 and the Fuchs-Rosenthal manual counting chamber. Blackwell Publishing Ltd. *Int. Jnl. Lab. Hem.* 2011. 33:629-637.

65. Perné A. Hainfellner JA. Womastek I. Haushofer A. Szekeres T. Schwarzingner I. Performance Evaluation of the Sysmex XE-5000 Hematology Analyzer for White Blood Cell Analysis in Cerebrospinal Fluid. Arch Pathol Lab Med 2012. 136:194-198.
66. Smith MW. Ma J. Stafford RS. Bar Charts Enhance Bland-Altman Plots When Value Ranges are Limited. J Clin Epidemiol. 2010. 63(2):180-184.
67. Aune MW. Dandberg S. Automated counting of white and red blood cells in the cerebrospinal fluid. Clin Lab. Haematol. 2000. 22:203-10.
68. Referenzinstitut für Bioanalytik: Survey for cell count in cerebrospinal fluid ZL 1/13 (Rezultati zunanje kontrole kakovosti ZL 1/13), junij 1013.