

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

GREGA KONDA

**VREDNOTENJE AVTOMATIZIRANEGA SISTEMA ZA IZDELAVO,
BARVANJE IN MIKROSKOPSKI PREGLED KRVNEGA RAZMAZA**

**EVALUATION OF AUTOMATED SYSTEM FOR SMEARING, STAINING AND
MICROSCOPIC EXAMINATION OF BLOOD SMEARS**

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Helene Podgornik, univ. dipl. inž. kem. inž., spec. med. biokem.. Prakti ni del magistrske naloge sem v celoti opravil v Hematološkem laboratoriju Oddelka za laboratorijsko medicino v Splošni bolnišnici Celje.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. Heleni Podgornik, ki si je vedno vzela as zame in me s svojimi nasveti usmerjala pri izvedbi naloge. Zahvaljujem se tudi predstojnici Oddelka za laboratorijsko medicino Splošne bolnišnice Celje mag. Štefki Krivec, mag. farm, spec. med. biokem., ki mi je omogoila opravljanje magistrske naloge na našem oddelku. Za podporo se zahvaljujem tudi vsem sodelavcem, še posebej vodji enote hematološkega laboratorija Marjanu Lorbku, prof. biol., ki mi je bil v veliko pomo pri prakti nem delu, mi svetoval in z menoj delil svoje dolgoletne izkušnje. Hvala tudi mojim najbližnjim, ki so mi ves as stali ob strani.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelal pod vodstvom mentorice doc. dr. Helene Podgornik, univ. dipl. inž. kem. inž., spec. med. biokem..

Ljubljana, junij 2014

Grega Konda

Predsednica komisije za zagovor: izr. prof. dr. Anamarija Zega, mag. farm.
lan komisije za zagovor: asist. dr. Jurij Trontelj, mag. farm.

VSEBINA

POVZETEK	III
ABSTRACT.....	IV
KLJU NE BESEDE	V
KEYWORDS	V
SEZNAM OKRAJŠAV	VI
SEZNAM SLIK.....	VIII
SEZNAM PREGLEDNIC	IX
1. UVOD.....	2
1.1. DIFERENCIALNA KRVNA SLIKA.....	2
1.2. ELEKTRONSKA DOLO ITEV DIFERENCIALNE KRVNE SLIKE	2
1.2.1. PRINCIP DELOVANJA HEMATOŠKEGA ANALIZATORJA ADVIA 2120i	2
1.2.2. PRINCIP DOLO ANJA DKS S CELI NIMI OZNA EVALCI	4
1.3. MIKROSKOPSKA DOLO ITEV DIFERENCIALNE KRVNE SLIKE.....	4
1.3.1. KRITERIJI ZA MIKROSKOPSKO DOLO ITEV DIFERENCIALNE KRVNE SLIKE	5
1.3.2. IZDELAVA KRVNIH RAZMAZOV	5
1.3.3. BARVANJE KRVNIH RAZMAZOV	7
1.3.4. PREGLED KRVNIH RAZMAZOV.....	8
1.3.5. MIKROSKOPSKI PREGLED KRVNEGA RAZMAZA.....	9
1.3.6. SLABOSTI MIKROSKOPSKE DOLO ITVE DIFERENCIALNE KRVNE SLIKE.....	11
1.3.7. AVTOMATIZACIJA MIKROSKOPSKEGA PREGLEDA KRVNEGA RAZMAZA	15
2. NAMEN DELA.....	16
3. MATERIALI IN METODE	17
3.1. ZBIRANJE VZORCEV	17
3.1.1. VRSTA BIOLOŠKEGA VZORCA.....	17
3.2. ANALIZA VZORCEV	17
3.3. ELEKTRONSKA DOLO ITEV KRVNE IN DIFERENCIALNE KRVNE SLIKE ...	18
3.3.1. REAGENTI	18
3.3.2. OPOZORILA ANALIZATORJA O DELOVANJU SISTEMA IN O POSEBNOSTIH V VZORCU	19
3.4. STANDARDNA METODA.....	22
3.4.1. REAGENTI IN POTROŠNI MATERIAL	23
3.4.2. IZDELAVA KRVNEGA RAZMAZA	23
3.4.3. BARVANJE KRVNEGA RAZMAZA.....	24
3.4.4. MIKROSKOPSKI PREGLED KRVNEGA RAZMAZA	24
3.5. AVTOMATSKA IZDELAVA IN BARVANJE KRVNEGA RAZMAZA	24
3.5.1. REAGENTI IN POTROŠNI MATERIAL	25
3.5.2. PRINCIP IZDELAVE IN BARVANJA KRVNEGA RAZMAZA	26
3.5.3. KONTROLA KAKOVOSTI	28
3.6. AVTOMATIZIRAN MIKROSKOPSKI PREGLED KRVNEGA RAZMAZA	28
3.6.1. PRINCIP ANALIZE	29
3.6.2. POTROŠNI MATERIAL	31
3.6.3. DELOVNI POSTOPEK.....	31
3.6.4. KONTROLA KAKOVOSTI	32

3.7. STATISTIČNE METODE.....	32
4. REZULTATI.....	33
 4.1. VZORCI	33
 4.2. VREDNOTENJE ELEKTRONSKE DOLOČITVE DIFERENCIALNE KRVNE SLIKE	33
 4.3. VREDNOTENJE IZDELAVE IN BARVANJA KRVNIH RAZMAZOV Z AVTOMATIZIRANO METODO	37
4.3.1. PRILAGODITEV IZDELAVE KRVNIH RAZMAZOV	37
4.3.2. PRILAGODITEV BARVANJA KRVNIH RAZMAZOV	40
 4.4. PRIMERJAVA REZULTATOV DKS	44
4.4.1 PRIMERJAVA METOD	44
4.4.2. VREDNOTENJE PRE-DIFERENCIACIJE SISTEMA CELLAVISION DM1200	50
4.4.3. VREDNOTENJE OPISA LEVKOCITNE, ERITROCITNE IN TROMBOCITNE KRVNE SLIKE	53
 4.5. VREDNOTENJE ASA ANALIZE	55
5. RAZPRAVA	58
 5.1. ELEKTRONSKA DOLOČITEV DIFERENCIALNE KRVNE SLIKE	58
 5.2. IZDELAVA IN BARVANJE KRVNIH RAZMAZOV Z AVTOMATIZIRANO METODO	58
 5.3. PRIMERJAVA STANDARDNE IN AVTOMATIZIRANE METODE	60
 5.4. PRE-DIFERENCIACIJA SISTEMA CELLAVISION DM1200	60
 5.5. ASA ANALIZE	61
6. SKLEP	64
7. LITERATURA	66
PRILOGA I	71
PRILOGA II	72
PRILOGA III	73

POVZETEK

Hematološki analizatorji imajo še vedno številne pomanjkljivosti pri prepoznavi patoloških krvnih celic ter zaznavi njihovih kvalitativnih sprememb, zato je zlati standard za prepoznavo krvnih celic še vedno mikroskopski pregled krvnega razmaza (MPKR). Klasi na izdelava, barvanje in MPKR je težaven, asovno zamuden proces, izpostavljen vplivu številnih napak. Medtem ko je ve ina preiskav v medicinskih laboratorijsih že avtomatiziranih, je avtomatizacija mikroskopske diferencialne krvne slike (DKS) eden od zadnjih korakov, potrebnih za boljšo produktivnost, standardiziranost, manjše stroške in vejo statistično zanesljivost rezultatov.

V raziskavo smo vključili 300 preiskovancev, pri katerih smo določili DKS s standardno metodo (ročni način priprave in barvanja krvnih razmazov ter MPKR s svetlobnim mikroskopom) ter z avtomatizirano metodo (aparat za izdelavo in barvanje krvnega razmaza ADVIA Autoslides ter sistem za avtomatiziran MPKR CellVision DM1200).

Z določitvijo in nastavitev dodatnih profilov za izdelavo krvnega razmaza ter uporabo Merckovih barvil May-Grünwald in Giemsa (8 % delovna raztopina), v kombinaciji s fosfatnim bufferjem Modified Wright's buffer, smo z aparatom ADVIA Autoslides dosegli standardizirano izdelavo in barvanje krvnih razmazov. V primerjavi s standardno metodo je podrobno je za diferenciranje večje, smo pa opazili večjo pogostost Gumprechtovih senc. Zaradi pomanjkljivosti v programske opreme ADVIA Autoslides je bilo v posameznih izmenah izdelanih in obarvanih kar do 50 % odvečnih krvnih razmazov, pri katerih MPKR ni bil potreben. Koreacijski koeficienti pri primerjavi obeh metod so visoki pri segmentiranih nevtrofilskih granulocitih ($R^2=0,94$), limfocitih ($R^2=0,94$), mielocitih ($R^2=0,89$), promielocitih ($R^2=0,89$) in blastih ($R^2=0,997$). Skupine celic, ki se redkeje pojavljajo, imajo pri akovanju slabše koreacijske koeficiente. Prepoznavna različica vključuje sprememb v razporeditvi eritrocitov s sistemom CellVision DM1200 ni zanesljiva, zato je ob sumi na njihovo prisotnost potreben MPKR. Ob vklopljenemu aparatu ADVIA Autoslides je zmogljivost analizatorja ADVIA 2120i za približno 20 % slabša, je pa bil as analize desetih vzorcev z uporabo avtomatizirane metode krajevi za 35 minut.

ABSTRACT

Hematology analyzers still have many shortcomings for the identification of pathological blood cells and their qualitative changes. The gold standard for the identification of blood cells is still microscopical blood smear examination. Preparing, staining and microscopic examination of blood smear is difficult, time-consuming process, exposed to a number of errors. While most tests in medical laboratories are already automated, the automation of microscopic differential blood cell count is one of the last steps needed to improve productivity and standardization, to lower expenses and to increase the statistical reliability of the results.

300 subjects were included in the study. Microscopic differential blood cell count was determined by the standard method (manual method of preparation and staining of blood smears and microscopic blood smear examination by light microscopy) and the automated method (system for preparing and staining of blood smears ADVIA Autoslides and system for automated blood smear examination Cellavision DM1200).

By determining and adjustment of additional profiles for the preparation of blood smears and the use of Merck dyes May-Grünwald and Giemsa (8% working solution), in combination with phosphate buffered saline Modified Wright's buffer, we achieved standardized preparation and staining of blood smears with ADVIA Autoslides. Compared with the standard method, the area for differentiation was larger, but we observed a higher frequency of smudge cells. 50 % of blood smears which were not necessary were prepared and stained due to deficiencies in the software of ADVIA Autoslides. Correlation of the two methods was good for segmented neutrophil granulocytes ($R^2=0.94$), lymphocytes ($R^2=0.94$), myelocytes ($R^2=0.89$), promyelocytes ($R^2 = 0.89$) and blasts ($R^2 = 0.997$). Groups of cells that are less likely to occur had an expected lower correlation coefficients. Identification of various inclusions and changes in the distribution of erythrocytes with the Cellavision DM1200 is not reliable. Upon switching on ADVIA Autoslides the performance of ADVIA 2120i was about 20 % worse, but the time needed to analyse ten samples was shorter by 35 minutes when using automated method.

KLJU NE BESEDE

Hematološki analizator; diferencialna krvna slika; mikroskopski pregled krvnega razmaza; avtomatizacija; sistem za slikovno analizo.

KEYWORDS

Hematology analyzer; differential blood count; microscopic blood smear examination; automation; digital imaging system.

SEZNAM OKRAJŠAV

ANISO	anizocitoza eritrocitov (anisocytosis)
ATYP	atipi ni limfociti (atypical lymphocytes)
BASO	bazofilni granulociti (basophil granulocytes)
BLASTS	blasti (blasts)
CD	celi ni ozna evalec (cluster of differentiation)
CHC	koncentracija hemoglobina v eritrocitih (corposcular hemoglobin concentration)
DKS	diferencialna krvna slika
EKS	eritrocitna krvna slika
EOS	eozinofilni granulociti (eosinophil granulocytes)
Hb	hemoglobin
HCT	hematokrit (hematocrit)
HCVAR	anizokromija eritrocitov (hemoglobin concentration variance)
HDW	koeficient variacije porazdelitve koncentracije Hb (hemoglobin distribution width)
HYPER	hiperkromni eritrociti (hyperchromia)
HYPO	hipokromni eritrociti (hypochromia)
IG	nezreli granulociti (immature granulocytes)
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
LI	indeks lobuliranosti (lobularity index)
LIS	Laboratorijski informacijski sistem
LPLT	veliki trombociti (large platelets)
LS	pomik v levo (left shift)
LUC	velike neobarvane celice (large unstained cells)
MACRO	makrociti (macrocytes)
MCV	povprečni volumen eritrocitov (mean corpuscular volume)
MGG	May-Grünwald-Giemsa
MICRO	mikrociti (microcytes)
MN	monomorfonuklearni levkociti (monomorphonuclear cells)
MPKR	mikroskopski pregled krvnega razmaza
MPO-D	pomanjkanje mieloperoksidaze (myeloperoxidase deficiency)

NEUT	nevtrofilni granulociti (neutrophil granulocytes)
NRBC	eritroblasti (nucleated red blood cells)
PLT	trombociti (platelets)
PMN	polimorfonuklearni levkociti (polimorphonuclear cells)
PLT-CLM	trombocitni agregati (platelet clumps)
RBCF	fragmentirani eritrociti (red blood cell fragments)
RBCG	izluženi eritrociti (red blood cell ghosts)
RDW	koeficient variacije porazdelitve volumna eritrocitov (red blood cell distribution width)
SZKK	Slovensko združenje za klinično kemijo
TAT	as analize (turn-around time)
WBC	levkociti (white blood cells)

SEZNAM SLIK

SLIKA 1: IZDELAVA KRVNEGA RAZMAZA S TEHNIKO KLINASTEGA POTISKA -----	6
SLIKA 2: IZDELAVA KRVNEGA RAZMAZA S KROVNIMI STEKLI-----	6
SLIKA 3: IZDELAVA KRVNEGA RAZMAZA S POL-AVTOMATIZIRANO APARATURO (PRIREJENO PO 17)-----	7
SLIKA 4: VPLIV ŠTEVILA DIFERENCIRANIH LEVKOCITOVS NA NATAN NOST DOLO ANJA ERITROBLASTOV (PRIREJENO PO 2) -----	13
SLIKA 5: POSTOPEK IZDELAVE KRVNEGA RAZMAZA Z APARATOM ADVIA AUTOSLIDE (PRIREJENO PO 6) -----	26
SLIKA 6: POSTOPEK BARVANJA KRVNIH RAZMAZOV Z APARATOM ADVIA AUTOSLIDE (PRIREJENO PO 6) -----	27
SLIKA 7: CELLAVISION DM1200 (PRIREJENO PO 31)-----	28
SLIKA 8: SESTAVNI DELI V OHIŠJU SISTEMA CELLAVISION DM1200 (PRIREJENO PO 31)-----	29
SLIKA 9: PREIZKUS ISKANJA CELIC (PRIREJENO PO 31)-----	32
SLIKA 10: MAKROSKOPSKI IZGLED USTREZNEGA KRVNEGA RAZMAZA (PRIREJENO PO 31)	38
SLIKA 11: KVANTILNI DIAGRAM DELEŽA GUMPRECHTOVIH SENC PRI STANDARDNI METODI IN AVTOMATIZIRANI METODI PRI PREISKOVANCIH S KRONI NO LIMFOCITNO LEVKEMIJO-----	40
SLIKA 12: PRIKAZ OBARVANOSTI POSAMEZNIH KRVNIH CELIC A) PRED IN B) PO OPTIMIZACIJI BARVANJA-----	42
SLIKA 13: OBARVANOST SEGMENTIRANIH NEVTROFILNIH GRANULOCITOVS Z A) 5 %, B) 8 %, C) 10 % IN D) 15 % DELOVNO RAZTOPINO GIEMSE -----	42
SLIKA 14: KORELACIJA STANDARDNE IN AVTOMATIZIRANE METODE (A - DO 100 LEVKOCITOVS IN B - DO 200 LEVKOCITOVS) PRI SEGMENTIRANIH NEVTROFILNIH GRANULOCITIH, LIMFOCITIH IN MONOCITIH-----	45
SLIKA 15: KORELACIJA STANDARDNE IN AVTOMATIZIRANE METODE (A - DO 100 LEVKOCITOVS IN B - DO 200 LEVKOCITOVS) PRI EOZINOFILNIH, BAZOFILNIH IN NESEGMENTIRANIH NEVTROFILNIH GRANULOCITIH-----	46
SLIKA 16: KORELACIJA STANDARDNE IN AVTOMATIZIRANE METODE (A - DO 100 LEVKOCITOVS IN B - DO 200 LEVKOCITOVS) PRI METAMIELOCITIH, MIELOCITIH IN PROMIELOCITIH-----	47
SLIKA 17: KORELACIJA STANDARDNE IN AVTOMATIZIRANE METODE (A - DO 100 LEVKOCITOVS IN B - DO 200 LEVKOCITOVS) PRI BLASTIH, REAKTIVNIH LIMFOCITIH IN PLAZMATKAH-----	48
SLIKA 18: KORELACIJA STANDARDNE IN AVTOMATIZIRANE METODE (A - DO 100 LEVKOCITOVS IN B - DO 200 LEVKOCITOVS) PRI ERITROBLASTIH -----	49
SLIKA 19: PRIMER NEIDENTIFICIRANIH CELIC - HIPOSEGMENTIRANI NEVTROFILNI GRANULOCITI V VZORCU S PELGER-HUËTOVO NEPRAVILNOSTJO JEDER-----	51
SLIKA 20: SLIKA ZA OCENO ERITROCITNE IN TROMBOCITNE KRVNE SLIKE PRI NORMALNEM VZORCU (A) IN VZORCU Z ROULEAUX FORMACIJAMI (B) -----	54

SEZNAM PREGLEDNIC

PREGLEDNICA I: SKUPINE LEVKOCITOV, KI JIH DIFERENCIRAMO V KRVNEM RAZMAZU (1)	----- 10
PREGLEDNICA II: NATAN NOST REZULTATOV V ODVISNOSTI OD CELOKUPNEGA ŠTEVILA DIFERENCIRANIH LEVKOCITOV PO RUMKEJU (PRIREJENO PO 25)-----	13
PREGLEDNICA III: OBMO JA LINEARNOSTI HEMATOLOŠKEGA ANALIZATORJA ADVIA 2120i (6) -----	18
PREGLEDNICA IV: OPOZORILA O KVANTITATIVNIH IN KVALITATIVNIH SPREMENAH KRVNIH CELIC (6)-----	20
PREGLEDNICA V: KRITERIJI ZA MIKROSKOPSKO DOLO ITEV DKS ODDELKA ZA LABORATORIJSKO MEDICINO SPLOŠNE BOLNIŠNICE CELJE -----	22
PREGLEDNICA VI: KRITERIJI ZA RAZLI NE STOPNJE KVALITATIVNIH SPREMEN ERITROCITNE KRVNE SLIKE (31)-----	30
PREGLEDNICA VII: ŠTEVilo VZORCEV, KI SO IZPOLNJEVALI POSAMEZEN KRITERIJ ZA MPKR -----	34
PREGLEDNICA VIII: KRITERIJI ZA OPREDELITEV POZITIVNEGA REZULTATA MIKROSKOPSKE DOLO ITVE DKS (12, 32)-----	35
PREGLEDNICA IX: OB UTLJIVOST IN SPECIFI NOST POSAMEZNIH OPOZORIL ANALIZATORJA ADVIA 2120i V PRIMERJAVI S STANDARDNO IN AVTOMATIZIRANO METODO-----	36
PREGLEDNICA X: NASTAVITVE POSAMEZNEGA PROFILA ZA IZDELAVO KRVNEGA RAZMAZA-----	39
PREGLEDNICA XI: DELEŽI GUMPRECHTOVIH SENC V KRVNIH RAZMAZIH PRI PREISKOVANCIH S KRONI NO LIMFOCITNO LEVKEMIJO-----	39
PREGLEDNICA XII: TO NOST PRE-DIFERENCIACIJE SISTEMA CELLAVISION DM1200 -----	50
PREGLEDNICA XIII: NEKAJ PRIMEROV NAPA NE PRE-DIFERENCIACIJE SEGMENTIRANIH NEVTROFILNIH GRANULOCITOVS-----	52
PREGLEDNICA XIV: VZORCI, PRI KATERIH CELLAVISION DM1200 NI OPRAVIL PRE-DIFERENCIACIJE DO 200 LEVKOCITOVS-----	53
PREGLEDNICA XV: SEZNAM 10-IH NAKLJU NIH EPRUVET ZA VREDNOTENJE ASA ANALIZE -----	55
PREGLEDNICA XVI: PRIMERJAVA ASA ANALIZE Z ANALIZATORJEM ADVIA 2120i Z IZKLOPLJENIM IN VKLOPLJENIM APARATOM ADVIA AUTOSLIDE -----	56
PREGLEDNICA XVII: PRIMERJAVA TAT S STANDARDNO IN AVTOMATIZIRANO METODO -	57
PREGLEDNICA XVIII: KORELACIJSKI KOEFICIENTI ZA POSAMEZNE VRSTE LEVKOCITOVS V ŠTUDIJAH DRUGIH AVTORJEV (13, 36, 37, 38)-----	60

1. UVOD

Dolo itvi krvne ter diferencialne krvne slike (DKS) sta eni najpogostejših preiskav v medicinskem laboratoriju. Dolo anje v ve ini primerov poteka elektronsko, vendar sodobni hematološki analizatorji še vedno ne zmorejo zanesljivo prepozнатi nezrelih in patoloških krvnih celic. Referen na metoda za prepoznavo vseh krvnih celic je tako mikroskopski pregled krvnega razmaza (MPKR). Proces mikroskopske dolo itve DKS je sestavljen iz izdelave in barvanja krvnega razmaza ter MPKR.

1.1. DIFERENCIALNA KRVNA SLIKA

DKS je razdelitev populacije levkocitov na posamezne podvrste (1). Klini no je uporabna za presejanje, diagnostiko in spremljanje tako hematoloških kot ne-hematoloških bolezenskih stanj (2). DKS opravimo avtomatizirano s pomo jo hematoloških analizatorjev, ki pa v ve ini primerov zmorejo zanesljivo dolo iti "le" 5-delno DKS (nevtrofilne granulocite, limfocite, monocite, eozinofilne granulocite ter bazofilne granulocite), prepoznavajo nenormalnih in nezrelih krvnih celic pa je problemati na (3). V kolikor rezultati odstopajo od vnaprej dolo enih mejnih vrednosti ali e analizator poda opozorila k rezultatom, DKS dolo imo z MPKR (1).

1.2. ELEKTRONSKA DOLO ITVE DIFERENCIALNE KRVNE SLIKE

Hematološki analizatorji omogo ajo dolo anje krvne slike in DKS hitro, zanesljivo in poceni (2, 4, 5). Danes so na voljo razli ni analizatorji, katerim je skupen princip preto ne citometrije, za analizo pa so v uporabi razli ne tehnologije, ki temeljijo na elektri nih ter opti nih na inih zaznave celic in njihovih lastnosti (1).

1.2.1. PRINCIP DELOVANJA HEMATOLOŠKEGA ANALIZATORJA ADVIA 2120i

Analizator ADVIA 2120i (Siemens Healthcare Diagnostics, Združene države Amerike) deluje po principu preto ne citometrije, za analizo pa se uporablja Techniconova

tehnologija, ki temelji na optičnih inih zaznave celic in njihovih lastnosti. Vzorec krvi se po aspiraciji porazdeli na 5 reakcijskih komor, v katerih potekajo citokemi ne reakcije; hemoglobinsko, eritrocitno-trombocitno, peroxydase in retikulocitno komoro. Za določitev DKS se vzorec z reagenti razredči v peroxydase in v baso komori (6).

V **peroxydase komori** se eritrociti in trombociti lizirajo, levkociti pa se obarvajo glede na vsebnost mieloperoksidaze. Največjo peroksidazno aktivnost imajo eozinofilni granulociti, manjšo aktivnost imajo tudi nevtrofilni granulociti; od nezrelih granulocitov imajo najmanj nejšo promielociti, sledijo jim mielociti, metamielociti, nesegmentirani in segmentirani nevtrofilci. Monociti imajo šibko peroksidazno aktivnost, limfociti in blasti pa jih nimajo. Bazofilci se prav tako ne obarvajo, saj vsebujejo drugo vrsto peroksidaze (5). Tako obarvani levkociti potujejo v preto ni celici mimo snopa svetlobe iz halogenske žarnice. Velikost levkocita je sorazmerna z intenziteto razpršene svetlobe pod kotom 5° do 10°, obarvanost mieloperoksidaze v levkocitu pa je sorazmerna z izmerjeno absorbanco (6). Levkociti so v peroxydase citogramu razvrščeni na pet populacij: nevtrofilni granulociti, eozinofilni granulociti, limfociti, monociti ter velike neobarvane celice (LUC - large unstained cells). V skupino LUC so razvrščeni reaktivni limfociti, atipi ni limfociti, plazmatke, bazofilni granulociti ter blasti (5).

V **baso komori** se določi številna koncentracija levkocitov ter številna koncentracija bazofilnih granulocitov. Eritrociti in trombociti se lizirajo, vsem levkocitom razen bazofilnim granulocitom, se odstrani citoplazma. Ob prehodu jedra mimo snopa laserske svetlobe se ta razprši pod različnimi koti. Intenziteta razpršene svetlobe pod kotom 2-3° daje podatek o velikosti jedra, intenziteta razpršene svetlobe pod kotom 5-15° pa podatek o oblikah in gostoti jedra. Levkociti so v baso citogramu razvrščeni na bazofilne granulocite, mononuklearne levkocite (limfocyte, monocyte, nezrele granulocyte), polimorfonuklearne levkocite (nevtrofilni in eozinofilni granulociti) ter na blaste (5, 6).

Številna koncentracija **eritroblastov** se določi z analizo histogramov s štirimi različnimi algoritmi (5). V peroxydase citogramu so eritroblasti uvrščeni med populacijo limfocitov, saj ne vsebujejo peroksidaze, jedro eritroblasta pa je manjše od jedra limfocita. V baso citogramu so eritroblasti uvrščeni med polimorfonuklearne celice, saj je njihov kromatin gostejši od kromatina limfocitov in monocitov (5, 6). Pri zaznavi prisotnosti eritroblastov se številna koncentracija levkocitov avtomatično korigira (7).

1.2.2. PRINCIP DOLO ANJA DKS S CELI NIMI OZNA EVALCI

Med dozorevanjem celic se med drugim spreminjajo tudi antigeni na njihovi površini in v citoplazmi. Celice v dolo eni stopnji razvoja pridobijo nove antigene, izgubijo pa prejšnje. Antigeni niso nujno specifi ni za posamezno celi no vrsto in posamezno razvojno stopnjo celice. Za dolo itev dolo ene celice se tako uporabi mešanica monoklonskih protiteles - CD ozna evalcev (cluster of differentiation) za ve razli nih antigenov. Za imunofenotipizacijo levkemij in malignih limfomov se skupine ozna evalcev uporablja dvostopenjsko, in sicer se s primarno skupino ozna evalcev dolo i celi na linija, s sekundarno skupino ozna evalcev pa stopnja zrelosti celic (8).

Dolo anje DKS s pomo jo celi nih ozna evalcev je predmet številnih raziskav, nekatere znanstvene skupine so jo že predlagale kot referen no metodo (8, 9). V primerjavi z MPKR je dolo anje s to metodo enostavnejše ter bolj zanesljivo, saj ne temelji na subjektivni diferenciaciji krvnih celic na osnovi morfoloških kriterijev (2, 9, 10), omogo a pa tudi zanesljivo dolo anje populacij levkocitov, ki jih z MPKR ne moremo prepoznati (npr. dolo anje podvrst blastov in podvrst limfocitov). Z uporabo te metode je delež MPKR lahko bistveno manjši (8). Ker je število pregledanih levkocitov okoli deset tiso , so rezultati statisti no bolj natan ni, še posebej pri levkopeni nih vzorcih. Ponovljivost ter korelacija rezultatov dolo itve razli nih levkemi nih blastov ter ostalih specifi nih populacij levkocitov je v primerjavi z MPKR dobra, obstajajo pa manjše omejitve pri dolo anju nezrelih granulocitov ter bazofilcev (9, 10, 11).

Z nadaljnji razvojem in vrednotenjem tehnologije bi lahko z njo dopolnili oziroma zamenjali obstoje e tehnologije elektronske dolo itve DKS (9, 10). S tem bi izboljšali ob utljivost in specifi nost elektronskega dolo anja DKS. Omejitev takšnega na ina dolo anja DKS pa je, da vrednotenje morfoloških sprememb krvnih celic ni mogo e, zato metoda ne more popolnoma nadomestiti MPKR (8).

1.3. MIKROSKOPSKA DOLO ITEV DIFERENCIALNE KRVNE SLIKE

Avtomatizirani hematološki analizatorji kljub stalnim izboljšavam tehnologije še vedno ne zmorejo zanesljivo prepoznati vseh levkocitnih populacij v periferni krvi, prav tako ne zaznajo razli nih kvalitativnih sprememb krvnih celic. Zlati standard za prepoznavo krvnih

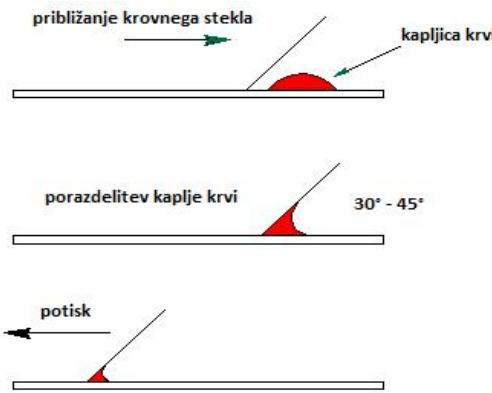
celic v periferni krvi je še vedno MPKR (3, 4). V razli nih laboratorijih je v odvisnosti od obravnavane populacije, analizatorjev v uporabi ter kriterijev za MPKR delež mikroskopsko dolo enih DKS od 10 do 50 % (8), po nekaterih podatkih celo do 95 % (12). V zadnjih dvajsetih letih je zaradi edalje izrazitejših zahtev po ekonomski, kadrovski in asovni u inkovitosti zaželeno im ve je zmanjšanje števila pregledanih krvnih razmazov s prilagoditvijo kriterijev za izdelavo ter avtomatizacija celotnega procesa dolo itve (13).

1.3.1. KRITERIJI ZA MIKROSKOPSKO DOLO ITEV DIFERENCIALNE KRVNE SLIKE

Vsak laboratorij si na osnovi specifi nosti svojega dela oziroma populacije preiskovancev prilagodi kriterije za mikroskopsko dolo itev DKS. Prav tako so ti kriteriji odvisni od modela hematološkega analizatorja, ki je v uporabi, saj razli ni analizatorji dajejo razli na opozorila. Enotnih mednarodno veljavnih priporo il za vrednotenje DKS ni. V Sloveniji so izhodiš ni kriteriji za mikroskopski pregled DKS objavljeni v publikaciji Priporo eni postopki za mikroskopski pregled krvnega razmaza, ki jo je izdalo Slovensko združenje za klini no kemijo (SZKK) (Priloga I) (1).

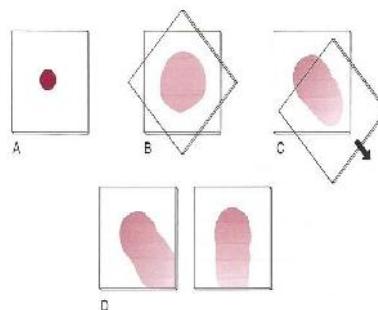
1.3.2. IZDEJAVA KRVNIH RAZMAZOV

Krvne razmaze lahko izdelamo ro no, pol-avtomatizirano ali avtomatizirano s pomo jo aparativ. Najpogostejša tehnika, ki je v uporabi pri vseh treh na inih izvedbe, je tehnika klinastega potiska (ang. wedge-push). Kapljico krvi na predmetnem steklu zajamemo z drugim stekлом, da se porazdeli po celotni širini, nato pa jo potisnemo v nasprotni smeri, da se enakomerno razporedi (Slika 1) (2, 14). Ustrezno izdelan razmaz mora biti tanek, enakomeren in homogen, ne sme biti stopni ast. Dolžina razmaza mora biti 30 do 40 mm, robovi ravni, rep pa rahlo zaokrožen. Ustrezno dolžino in debelino krvnega razmaza dosežemo z uravnavanjem velikosti kaplje krvi, naklona, pod katerim držimo krovno steklo, in hitrosti potiska. Debelina krvnega razmaza je odvisna tudi od vrednosti hematokrita. Če želimo krajsi in debelejši razmaz, pove amo volumen kaplje krvi, pove amo naklon krovnega stekla ali pove amo hitrost potiska. Če želimo daljši in tanjši krvni razmaz zmanjšamo volumen kaplje krvi, zmanjšamo naklon krovnega stekla ali po asnejem potisnemo kapljo (2, 14). Glavna pomanjkljivost te tehnike je neenakomerna razporeditev razli nih vrst celic po razmazu, ki je opisana v nadaljevanju (2).



Slika 1: Izdelava krvnega razmaza s tehniko klinastega potiska

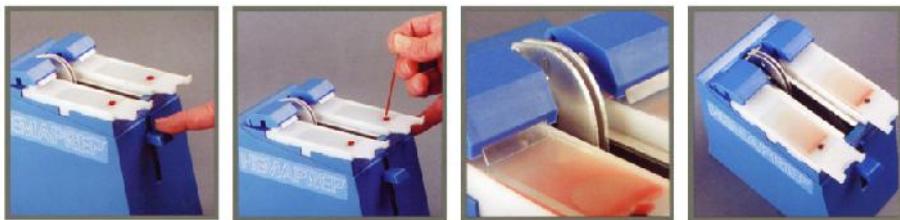
Alternativni tehniki izdelave krvnega razmaza sta izdelava s krovnimi stekli ter izdelava s centrifugiranjem. Pri izdelavi razmaza s krovnimi stekli na sredino krovnega stekla kanemo kapljico krvi, jo prekrijemo z drugim krovnim stekлом tako, da se stekli diagonalno prekrivata, nato pa ju potegnemo narazen (Slika 2). Takšna izdelava razmaza je opuš ena, saj so kljub odli ni razporeditvi levkocitov takšni razmazi preve zahtevni za izdelavo in barvanje (14).



Slika 2: Izdelava krvnega razmaza s krovnimi stekli

Pri izdelavi razmaza s centrifugiranjem pa se krvne celice nanesejo na steklo s pomo jo centrifugalne sile. Kvaliteta tako pripravljenih razmazov je odli na, razporeditev levkocitov je enakomerna, slabost te tehnike je le zahtevnejša priprava vzorca ter ve ja pogostost pojavljanja Gumprechtovih senc (14, 15).

Z uporabo pol-avtomatiziranih in avtomatiziranih aparatov lahko dosežemo ve jo kakovost in standardizacijo izdelave razmazov (14, 16). Pol-avtomatizirani aparati le posnemajo ro ni del izdelave razmaza. Primer takšne aparature je HemaPrep (Slika 3), ki omogo a nadziranje dolžine in debeline razmaza z uravnavanjem hitrosti rezila, razmaz pa se izdela s pritiskom na vzdvod (17).



Slika 3: Izdelava krvnega razmaza s pol-avtomatizirano aparaturom (prirejeno po 17)

Razvoj avtomatiziranih aparatov se je za el okoli leta 1970, kmalu po razvoju sistemov za slikovno analizo. Sistemi za slikovno analizo so namre potrebovali precej veje podroje za diferenciacijo, kot ga je bilo mogoce dose i s klasi no pripravo razmaza s tehniko klinastega potiska. Krvne razmaze so ti aparati izdelovali tako, da se je razred en vzorec krvi nanesel na vrte in se predmetno steklo. Zaradi številnih težav aparatov za avtomatsko izdelavo krvnih razmazov in sistemov za slikovno analizo je njihov razvoj zamrl za dobrejih 20 let (18). Veina proizvajalcev danes ponuja v povezavi s hematološkimi analizatorji različne avtomatizirane aparate za izdelavo in barvanje krvnih razmazov. Vsem aparatom je skupna izdelava razmazov s tehniko klinastega potiska, so popolnoma avtomatizirani in visoko zmogljivi, saj lahko v eni uri izdelajo 80 do 120 krvnih razmazov (19, 20, 21, 22, 23). Podroje za diferenciacijo je veje kot v klasi no izdelanih krvnih razmazih. Objavljenih študij, v katerih avtorji vrednotijo delovanje in prilagoditev avtomatiziranih aparatov za izdelavo in barvanje krvnih razmazov je zelo malo (18).

1.3.3. BARVANJE KRVNIH RAZMAZOV

Za etki MPKR segajo v drugo polovico devetnjstega stoletja, ko so za opazovanje krvnih celic začeli uporabljati anilinska barvila. Med prvimi barvili, ki so bila v uporabi, sta bili barvili eozin in hematoksilin. Leta 1891 so bila iznajdena barvila po Romanowskem. Ta barvila so z nekaj izboljšavami v uporabi še danes, natančen mehanizem obarvanja celic pa še vedno ni pojasnjen (2). Temeljni princip barvanja je elektrostatska interakcija, kar pomeni, da se barvilo z določenim nabojem veže s spojinami z nasprotnim nabojem.

Mednarodni svet za standardizacijo v hematologiji (International Council for Standardization in Haematology - ICSH) je pri opisu referenčne metode za barvanje krvnih razmazov opredelil le, da morajo raztopine za barvanje po Romanowskem temeljiti na bazi nem barvila azur B in kislem barvila eozin Y ustrezne istosti (14). Poznamo več različnih kombinacij teh barvil, metode barvanja pa so poimenovana po avtorjih:

- barvanje po Wrightu,

- barvanje po Giemsi,
- barvanje po May-Grünwald-u ter
- barvanje po Leishman-u (24).

V Severni Ameriki je najpogosteje uporabljeno barvanje po Wrightu ali Wright-Giemsi, medtem ko je v Evropi in drugod bolj priljubljeno barvanje po May-Grünwald-u ter Giemsi (MGG) (2). Enotnih mednarodnih priporo il ter navodil za barvanje ni, zato obi ajno vsak laboratorij prilagodi navodila za pripravo raztopin ter postopek barvanja po eni od metod (1, 14). Na voljo so tudi številna komercialna barvila, ki lahko vsebujejo tudi deset razli nih barvil in razli no koli ino kovinskih soli v raztopini, kar vpliva na kon ni rezultat barvanja. Po vsebnosti barvil se malenkostno razlikujejo že razli ne serije enakih barvil istega proizvajalca. Na rezultat barvanja vplivajo tudi as barvanja s posameznim barvilm, koncentracija barvila in pH vrednost raztopin (15).

BARVANJE PO MGG

Pri barvanju po MGG se uporabita barvili May-Grünwald in Giemsa. Raztopina May-Grünwalda vsebuje poleg barvil eozin in metilensko modro tudi metanol, ki deluje kot fiksacijsko sredstvo, s pomo jo katerega se ohranijo morfološke lastnosti celic. Raztopina Giemsa vsebuje barvilo eozin in dva derivata metilensko modrega, azur I in azur II (1).

Eozin, ki je kislo barvilo in ima negativni naboj, oranžno-rde e obarva bazi ne spojine v molekuli Hb ter granule eozinofilnih granulocitov, z vezavo na bazi ne proteine v jedru celice pa pripomore tudi k obarvanosti kromatina celi nih jeder. Bazi ni barvili metilensko modro in azur obarvata kisle spojine z negativnim nabojem, npr. nukleinske kisline in proteine v jedru in citoplazmi celic ter bazofilne granule, ker vsebujejo heparin. Metilensko modro obarva v modrih odtenkih, azur pa v rde e-vijoli nih odtenkih. Granule v citoplazmi nevtrofilnih granulocitov se delno obarvajo s kislimi, delno pa z bazi nimi barvili. Da je razmaz ustreznih barv in odtenkov je priporo ena pH vrednost raztopin 6,8 (1, 15, 25). Barve posameznih celi nih struktur najpogostejeih celi nih vrst, obarvanih po MGG, so navedene v Prilogi III.

1.3.4. PREGLED KRVNIH RAZMAZOV

Gulati in sodelavci so pregled krvnega razmaza razdelili na tri podtipe: oceno krvnega razmaza, mikroskopski pregled krvnega razmaza (MPKR) ter interpretativni pregled krvnega razmaza (4).

Ocena krvnega razmaza služi za oceno zanesljivosti rezultatov DKS, ki jih je podal analizator ter za odloitev o potrebi po mikroskopskem pregledu. Ocena krvnega razmaza je uporabna tudi za vrednotenje številne koncentracije trombocitov ter ugotavljanje prisotnosti trombocitnih agregatov (4).

Mikroskopski pregled krvnega razmaza vključuje diferenciacijo levkocitov v podrazrede (najpogosteje se differencira 100 levkocitov) in vrednotenje morfoloških sprememb eritrocitne, levkocitne ter trombocitne krvne slike. Za MPKR se odloimo po analizi vzorca s hematološkim analizatorjem, če so izpolnjeni določeni kriteriji (odstopanja od normalnih številnih vrednosti in/ali opozorila hematološkega analizatorja), opravimo pa ga lahko tudi na željo naročnika (4).

Interpretativni pregled krvnega razmaza je MPKR, ki ga opravi klinik s poglobljenim znanjem hematologije in citologije. Klinične indikacije za to vrsto pregleda so običajno sumi na različna hematološka obolenja. Kot rezultat se poda pisno poročilo vseh kvalitativnih sprememb krvnih celic, z ali brez differenciacije levkocitov, v zaključku pa tudi verjetna diagnoza bolezni ozziroma predlagane nadaljnje preiskave (4).

Referenčni določiti DKS

Referenčni določiti DKS opisuje standard H20-A, ki ga je leta 1992 izdal Inštitut za klinično in laboratorijsko standardizacijo (ang. Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI). Namenjena je vrednotenju rezultatov elektronsko določene DKS ter vrednotenju novih hematoloških analizatorjev in postopkov. Poteka tako, da dva neodvisna izvajalca preiskave določita vsak svojo DKS z differenciacijo 200-ih levkocitov s tehniko "cik-cak" na dveh različnih krvnih razmazih. Rezultate seznamimo, da dobimo DKS 400-ih levkocitov. Krvni razmazi morajo biti izdelani ročno s tehniko klinastega potiska ter barvani z barvili po Romanowskem (2, 25, 26).

1.3.5. MIKROSKOPSKI PREGLED KRVNEGA RAZMAZA

Pri vrednotenju krvnega razmaza je potreben sistematičen pristop. Razmaz krvi najprej pregledamo makroskopsko, da ugotovimo ali je razmaz ustrezno izdelan, pobarvan ter pravilno označen. Nato pod mikroskopom pri 100-kratni povečavi ocenimo splošno kakovost preparata ter število in obarvanost celic v repu razmaza. Z objektivom s 40-kratno povečavo izberemo ustrezno področje za differenciacijo (Priloga II), to je področje, kjer so eritrociti porazdeljeni drug ob drugem, brez medsebojnega prekrivanja. Diferenciramo pri veliki povečavi (1000-kratna povečava z imerzijskim objektivom) s

tehniko "cik-cak". S to tehniko diferenciranja se izognemo temu, da bi isto celico diferencirali dvakrat. Pozorni smo na vse kvalitativne in kvantitativne zna ilnosti levkocitne, eritrocitne in trombocitne krvne slike (1, 2).

LEVKOCITNA KRVNA SLIKA

Pri diferenciaciji levkocitov smo pozorni na njihovo velikost, obliko in obarvanost, na strukturo in gostoto kromatina ter na morebitno prisotnost citoplazemskih vklju kov. Pregledamo 100 levkocitov in jih uvrstimo v posamezne skupine levkocitov, ki so navedene v preglednici I (1). Kot rezultat podamo delež posameznih vrst levkocitov v odstotkih ter absolutno število posameznih vrst levkocitov (2). Veji klini ni pomen imajo absolutna števila, saj predstavljajo pravo, absolutno pove anje ali zmanjšanje števil ne koncentracije posameznih vrst levkocitov (4, 27), kljub temu pa kliniki v veini za interpretacijo še vedno uporabljajo rezultate podane v deležih (2). Pri številni koncentraciji levkocitov nižji od $1,0 \times 10^9/L$ lahko diferenciramo tudi manjše število levkocitov (od 50 do 100 levkocitov). Takrat deleže posameznih vrst levkocitov prera unamo na 100 % ter v komentarju DKS navedemo skupno število diferenciranih levkocitov. Morebitne morfološke nepravilnosti jedra in citoplazme levkocitov zapišemo v komentar DKS (1).

Preglednica I: Skupine levkocitov, ki jih diferenciramo v krvnem razmazu (1)

segmentirani nevtrofilni granulociti
limfociti
monociti
eozinofilni granulociti
bazofilni granulociti
nesegmentirani (pali asti) nevtrofilni granulociti
metamielociti
mielociti
promielociti
blasti
reaktivni limfociti
atipi ni limfociti
plazmatke
prolimfociti
limfomske celice
prononociti

ERITROCITNA IN TROMBOCITNA KRVNA SLIKA

Pri vrednotenju eritrocitne krvne slike opišemo spremembe v velikosti, obliku, obarvanosti in porazdelitvi eritrocitov, pozorni smo na morebitno prisotnost vklju kov v eritrocith ter prisotnost eritroblastov in parazitov. Velikost eritrocitov najlaže ocenimo s primerjavo eritrocitov z malimi limfociti, ki so enake velikosti kot normociti. V krvnem razmazu so eritrociti v ustreznem podro ju diferenciacije razporejeni enakomerno (1). Če so v krvnem razmazu prisotni eritroblasti, jih štejemo so asno z diferenciacijo levkocitov. Posameznih podvrst eritroblastov ne lo ujemo med seboj, rezultat pa podamo kot število eritroblastov na 100 diferenciranih levkocitov (1).

Pri vrednotenju trombocitne krvne slike smo pozorni na velikost in granuliranost trombocitov ter na prisotnost trombocitnih agregatov, satelitskih trombocitov in mikromegakariocitov.

1.3.6. SLABOSTI MIKROSKOPSKE DOLOČITVE DIFERENCIALNE KRVNE SLIKE

MPKR je asovno zamuden, zahteven proces, izvajalec preiskave pa mora imeti dobro strokovno znanje ter im ve izkušenj. S tega vidika je ena dražjih laboratorijskih preiskav (2, 8, 13).

TEŽAVNOST POSTOPKA IZDELAVE IN BARVANJA KRVNIH RAZMAZOV

Težavna je že sama standardizacija procesa izdelave in barvanja krvnih razmazov, saj ga v primeru klasi ne izdelave in barvanja krvnih razmazov običajno opravlja ve zaposlenih, postopek pa poteka ročno. Pri ročni nem na inu izdelave mora izvajalec sam prilagoditi velikost kaplje, kot in hitrost potega glede na vrednost hematokrita vzorca. Če so razmazi pretanki, so morfološke lastnosti krvnih celic, še posebej eritrocitov, spremenjene. Prav tako pri predebelih krvnih razmazih krvnih celic ne moremo zanesljivo vrednotiti (2, 15). Krvne razmaze je treba izdelati im prej, najkasneje v štirih urah po odvzemu, saj se sorazmerno s asom več a število razpadlih levkocitov, kot artefakti se pojavijo ehnociti in sferociti (1, 14, 25).

Za ustrezeno obarvanost krvnih celic moramo zagotoviti pravilno pH vrednost barvil in fosfatnega pufra. Če je pH vrednost prenizka, se kisle spojine celic slabo obarvajo, zato so levkociti bledi, eozinofilne granule pa izrazito izstopajo. Če je pH vrednost previsoka, se poveča privzem bazi nih barvil, zato so celice prekomerno obarvane. Tako razlikovanje

med normalnimi in polikromati nimi eritrociti ni mogo e, eozinofilne granule so modro-sive, nevtrofilne granule pa se mo neje obarvajo tako, da so opazne lažne toksi ne granulacije (25). Kot posledica izhlapevanja, nezadostnega spiranja barvil, nezadostne filtracije barvil ali ne isto na predmetnih steklih se lahko med celicami v razmazu pojavijo razli ni artefakti, v glavnem so to izoborine barvila. Paziti je potrebno tudi na morebiten vnos vode v raztopine za barvanje, saj se v tem primeru membrane eritrocitov poškodujejo, pojavijo pa se tudi vakuole v levkocitih (14).

TEŽAVNOST POSTOPKA MIKROSKOPSKEGA PREGLEDA KRVNIH RAZMAZOV

Na to nost in natan nost rezultatov diferenciacije vplivajo trije tipi napak: statisti na napaka, napaka zaradi neenakomerne razporeditve celic ter napaka pri prepoznavi celice (16).

STATISTI NA NAPAKA

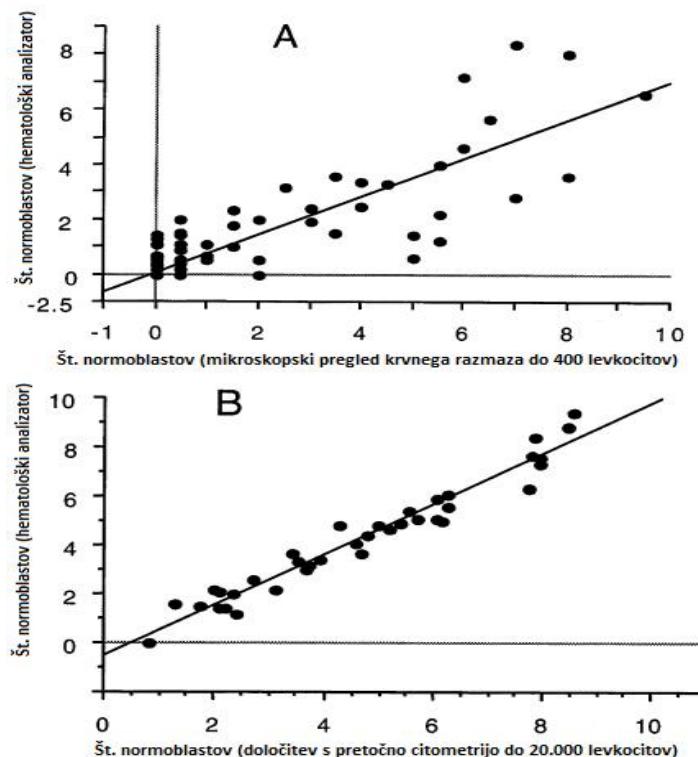
Statisti na napaka je najpomembnejša napaka pri dolo anju DKS, saj ima velik vpliv na natan nost rezultatov in je neposredno povezana s celokupnim številom diferenciranih levkocitov. Vpliv napake lahko zmanjšamo s pove anjem celokupnega števila diferenciranih levkocitov. Vendar tudi, e število diferenciranih levkocitov v krvnem razmazu, ki je obi ajno 100, podvojimo ali po etverimo, je natan nost rezultatov še vedno relativno slaba, še posebej pri celicah, ki so manj pogoste, npr. nezrelih granulocitih ter bazofilnih granulocitih (Preglednica II) (2, 16, 25).

Preglednica II: Natanost rezultatov v odvisnosti od celokupnega števila diferenciranih levkocitov po Rumkeju (prirejeno po 25)

% celic v DKS	celokupno število diferenciranih levkocitov				
	100	200	500	1000	10 000
0	0–4	0–2	0–1	0–1	0–0.04
1	0–6	0–4	0–3	0–2	0.8–1.2
2	0–8	0–6	0–4	1–4	1.7–2.3
3	0–9	1–7	1–5	2–5	2.7–3.3
4	1–10	1–8	2–7	2–6	3.6–4.4
5	1–12	2–10	3–8	3–7	4.6–5.4
6	2–13	3–11	4–9	4–8	5.5–6.5
7	2–14	3–12	4–10	5–9	6.5–7.5
8	3–16	4–13	5–11	6–10	7.4–8.6
9	4–17	5–15	6–12	7–11	8.4–9.6
10	4–18	6–16	7–14	8–13	9.4–10.6
15	8–24	10–21	12–19	12–18	14.6–15.4
20	12–30	14–27	16–24	17–23	19.6–20.4
25	16–35	19–32	21–30	22–28	24.6–25.4
30	21–40	23–37	26–35	27–33	29.5–30.5
35	25–46	28–43	30–40	32–39	34.5–35.5
40	30–51	33–48	35–45	36–44	39.5–40.5
45	35–56	38–53	40–50	41–49	44.5–45.5
50	39–61	42–58	45–55	46–54	49.5–50.5

* rezultati so podani kot 95 % interval zaupanja

Vpliv razlike celokupnega števila diferenciranih levkocitov na natanost rezultatov je prikazan tudi na spodnjih diagramih (Slika 4).



Slika 4: Vpliv števila diferenciranih levkocitov na natanost določanja eritroblastov (prirejeno po 2)

Slika prikazuje korelacijo rezultatov določanja števila eritroblastov s hematološkim analizatorjem, ki differencira približno 8000 levkocitov ter MPKR z differenciacijo 400-ih levkocitov (razsevni diagram A) in s pretočno citometrijo z differenciacijo 20.000-ih levkocitov (razsevni diagram B). Iz razsevnega diagrama B je razvidno, da je korelacija med metodama občutno boljša zaradi večjega števila differenciranih levkocitov (2).

NAPAKA ZARADI NEENAKOMERNE RAZPOREDITVE CELIC

Neenakomerna razporeditev celic v krvnem razmazu vpliva na točnost rezultatov mikroskopske določitve DKS. V repu in ob robovih razmaza se nahaja več segmentiranih nevtrofilnih granulocitov, monocitov in drugih velikih celic ter manj limfocitov kot v gostejšem delu razmaza. Monociti so lahko bolj ali manj enakomerno razporejeni po celotni površini, velikokrat pa so številoma nejši ob robovih razmaza. Neenakomerna razporeditev celic je izrazitejša pri pretankih razmazih. Večje število Gumprechtovih senc in ostalih mehansko poškodovanih celic prav tako lahko vpliva na točnost rezultatov (25). Vpliv napake lahko uinkovito zmanjšamo z differenciranjem s tehniko "cik-cak" (1), deloma pa tudi tako, da uporabimo steklo za potiskanje, ki je malenkost ožje od stekla, na katerem se izdela razmaz (1, 14).

NAPAKA ZARADI NEPRAVILNE PREPOZNAME CELIC

Pomemben vpliv na točnost rezultatov MPKR ima tudi nepravilna differenciacija (2, 13). Pri differenciaciji določajo enih vrst levkocitov prihaja do razlik med posameznimi izvajalcji preiskave zaradi različnih subjektivnih interpretacij morfoloških kriterijev (2, 28), še posebej je to opazno pri differenciaciji reaktivnih oz. atipičnih limfocitov ter nesegmentiranih nevtrofilnih granulocitov (29). Največkrat pride do težav pri prepoznavi celic iste vrste, a različne stopnje zrelosti, npr. razlikovanje nesegmentiranih in segmentiranih nevtrofilnih granulocitov ter razlikovanje metamielocitov, mielocitov ter promielocitov. V nekaterih ustanovah so zaradi težav pri differenciaciji celo opustili takšno razvrstitev, tako da vse nezrele granulocite uvrščajo v eno samo skupino (2). Opušča se tudi razlikovanje med segmentiranimi in nesegmentiranimi nevtrofilnimi granulociti, saj nikoli ni bilo povsem dokazano, da ima prisotnost slednjih klinični ni pomen pri diagnostiki vnetja. Prav tako je za diagnostiko bakterijskih infekcij absolutno število nevtrofilnih granulocitov obenam ob utljivosti bolj specifično (16, 29, 30). Na differenciacijo določene celice vplivajo tudi podatki o preiskovancu ter opozorila, ki jih poda analizator (28, 29).

Van der Meer in sodelavci so ugotovili, da je bil odstotek reaktivnih oz. atipi nih limfocitov pri analizi krvnih razmazov s predhodno znanimi opozorili hematološkega analizatorja o prisotnosti teh celic, zna ilno višji (29).

1.3.7. AVTOMATIZACIJA MIKROSKOPSKEGA PREGLEDA KRVNEGA RAZMAZA

Zaradi omenjenih pomanjkljivosti MPKR so se za eli z razvojem raunalništva in ostale tehnologije v medicinskih laboratorijih že okoli leta 1960 razvijati raunalniško vodeni mikroskopi, ki omogo ajo diferenciacijo celic s slikovno analizo na osnovi raunalniških algoritmov. Ti sistemi so sicer prepoznali vse celice v vzorcih normalnih preiskovancev, pri analizi patoloških vzorcev pa so bili nezanesljivi in po asni (2, 13). Sodobni sistemi za slikovno analizo so v uporabi pretežno na Japonskem in v dolo enih evropskih državah, njihova glavna prednost pred klasi nim mikroskopiranjem pa je krajsi as analize in ve ja statisti na zanesljivost rezultatov (2, 28). Slike celic se analizirajo po modelu umetne nevronske mreže, ki je osnovana na podatkovni bazi, ki vsebuje ve tiso primerov krvnih celic (13, 28). Umetne nevronske mreže pri obdelovanju informacij posnemajo loveške možgane, zato so superiorne v primerjavi z raunalniškimi algoritmi, še posebej pri prepoznavi vzorcev in razvrš anju v skupine. Pri vsaki celici se analizira ve sto njenih zna ilnosti, npr. velikost celice, razmerje med velikostjo jedra in citoplazme, obarvanost celice in tako naprej. Te zna ilnosti predstavljajo vhodne podatke modela, izhodni podatek pa je pre-diferenciacija celice (13, 28). Sistem za slikovno analizo krvne celice prediferencira v razli ne podvrste levkocitov, programska oprema pa nam omogo a pregled vseh zajetih slik in popravo oziroma potrditev diferenciacije ter tudi oceno morfoloških zna ilnosti rde e in trombocitne krvne slike (13, 28).

Ena od prednosti sistemov za slikovno analizo je tudi ta, da omogo ajo "digitalizacijo" krvnega razmaza in s tem enostavno povezljivost med razli nimi izvajalci preiskave tako znotraj ustanove kot med razli nimi ustanovami. Manjšim laboratorijem s sistemi za slikovno analizo je tako omogo eno pošiljanje pre-diferenciranih krvnih razmazov preko elektronskih povezav v centralni laboratorij, kjer rezultate nato vrednotijo izkušeni izvajalci preiskave, s tem pa se doseže njihova ve ja zanesljivost. S sistemi je mogo a tudi analiza punktakov telesnih votlin ter zajem digitalnih slik drugih preparatov, npr. punktakov kostnega mozga (28, 31).

2. NAMEN DELA

Dolo itev krvne slike ter DKS je med najpogostejšimi laboratorijskimi preiskavami v medicinskem laboratoriju. Dolo itev poteka elektronsko s pomojo hematoloških analizatorjev, ki pa kljub vsemu tehnološkemu napredku še vedno ne zmorejo zanesljivo prepozнатi vseh krvnih celic. Zlati standard za dolo itev DKS je pregled krvnega razmaza, ki se kot laboratorijska preiskava uporablja že več kot petdeset let v bolj ali manj nespremenjeni obliki. Izdelava in pregled krvnega razmaza je asovno zamuden, zahteven, slabo standardiziran in ima slabo statistično zanesljivost, zato je smiselna avtomatizacija preiskave.

Namen našega dela bo dolo itev DKS pri 300 preiskovancih ter vrednotenje avtomatiziranega sistema za izdelavo, barvanje in MPKR.

- Za elektronsko dolo itev krvne slike ter DKS bomo uporabili hematološki analizator ADVIA 2120i (Siemens Healthcare Diagnostics, Združene države Amerike).
- Kot standardno metodo za MPKR bomo uporabili rutinsko uveljavljen postopek v Hematološkem laboratoriju, ki zajema redni način priprave krvnega razmaza, redno barvanje krvnih razmazov po metodi MGG ter MPKR s svetlobnim mikroskopom.
- Avtomatizirano metodo sestavlja aparat za izdelavo in barvanje krvnega razmaza ADVIA Autoslides (Siemens Healthcare Diagnostics, Združene države Amerike) ter sistem za avtomatiziran MPKR Cellavision DM1200 (Cellavision AB, Švedska).

V prvem sklopu našega dela bomo prilagodili in vrednotili postopek izdelave in barvanja krvnih razmazov z avtomatizirano metodo, v drugem sklopu pa bomo s statistično obdelavo podatkov vrednotili rezultate dolo itve DKS z obema metodama ter asovni prihranek z uporabo avtomatizirane metode.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. ZBIRANJE VZORCEV

Za analizo smo uporabili vzorce krvi preiskovancev, ki so bili obravnavani v različnih ambulantah ter oddelkih Splošne bolnišnice Celje. Vzorce smo zbirali naključno, v dopoldanskem času od 07:00 do 15:00 ure, v različnih dneh v tednu, tudi med vikendi. S tem smo dosegli veliko raznovrstnost preiskovanih vzorcev. Vzorce krvi je odvzemalo strokovno usposobljeno medicinsko osebje v Enoti za odvzem krvi Oddelka za laboratorijsko medicino ter v ostalih ambulantah in oddelkih Splošne bolnišnice Celje. V raziskavo smo vključili le vzorce, pri katerih je odvzem in transport v laboratorij potekal brez predanalitičnih napak.

3.1.1. VRSTA BIOLOŠKEGA VZORCA

Analize smo opravili iz polne venske, arterijske ali kapilarne krvi. Kri je bila odvzeta v epruvete z antikoagulantom di- ali trikalijeva sol etilendiamintetraocetne kisline (K_2 EDTA ali K_3 EDTA), proizvajalca Beckton Dickinson (Združene države Amerike):

- BD Vacutainer 2,0 mL (3,6 mg K_3 EDTA)
- BD Vacutainer 3,0 mL (5,4 mg K_3 EDTA)
- BD Microtainer 0,5 mL (1,0 mg K_2 EDTA)

Vse epruvete so imele v času analize veljaven rok uporabe.

3.2. ANALIZA VZORCEV

Analiza vzorcev je v celoti potekala v Hematološkem laboratoriju Oddelka za laboratorijsko medicino Splošne bolnišnice Celje. Po sprejetju vzorca smo preverili njegovo homogenost in ustreznost razmerja med krvjo in antikoagulantom. Epruveto smo premešali tako, da smo jo petkrat obrnili. Nato smo z uporabo hematološkega analizatorja ADVIA 2120i elektronsko določili krvno sliko in DKS. So avno z analizo je potekala tudi avtomatska izdelava in barvanje krvnega razmaza z aparatom ADVIA Autoslide. Po pregledu rezultatov analize smo krvni razmaz izdelali in barvali še ročno. MPKR smo izvedli z nekajdnevnim zamikom. Najprej smo s sistemom za slikovno analizo CellVision

DM1200 analizirali vse razmaze izdelane z aparatom ADVIA Autoslide, nato pa smo opravili še mikroskopski pregled vseh ro no izdelanih in obarvanih razmazov.

3.3. ELEKTRONSKA DOLO ČITEV KRVNE IN DIFERENCIALNE KRVNE SLIKE

Vzorce smo z analizatorjem ADVIA 2120i (Siemens Healthcare Diagnostics, Združene države Amerike) analizirali le z avtomatskim podajalcem nosilcev, saj je tako od itavanje rtne kode na epruveti avtomati no, s tem pa je manjša možnost za napa no identifikacijo epruvete. Prav tako avtomsaki podajalec nosilcev pred in med analizo epruvete stalno meša in s tem zagotavlja homogenost vzorca (6). Po konani analizi se rezultati avtomati no prenesejo v laboratorijski informacijski sistem (LIS).

V preglednici III so navedena območja linearnosti posameznega parametra. Vzorce, ki segajo izven področja linearnosti, redimo z reagentom ADVIA 120/2120/2120i SHEATH RINSE v razmerju z 1:1. S faktorjem 2 pomnožimo le številno koncentracijo eritrocitov, levkocitov ter trombocitov, koncentracijo hemoglobina in vrednosti hematokrita in trombokrita, ostalih parametrov ne preračunavamo (6).

Preglednica III: Območja linearnosti hematološkega analizatorja ADVIA 2120i (6)

PARAMETER	OBMOČJE LINEARNOSTI
koncentracija hemoglobina	0 - 225 g/L
številna koncentracija eritrocitov	0,0 - 7,0 x 10 ¹² /L
številna koncentracija levkocitov	0,02 - 400,00 x 10 ⁹ /L
številna koncentracija trombocitov	5,0 - 3500,0 x 10 ⁹ /L
delež retikulocitov	0,2 - 24,5 %

3.3.1. REAGENTI

Proizvajalec vseh reagentov za aparat ADVIA je podjetje Siemens Healthcare Diagnostics (Združene države Amerike). Reagenti so pripravljeni za uporabo.

Reagenti za določitev krvne slike in DKS:

- ADVIA 120/2120/2120i SHEATH RINSE
- ADVIA 120/2120/2120i EZ WASH

- ADVIA 120/2120/2120i DEFOAMER
- ADVIA 120/2120/2120i RBC/PLT
- ADVIA 120/2120/2120i BASO
- ADVIA 120/2120/2120i CN-FREE HGB
- ADVIA 120/2120/2120i PEROX 1
- ADVIA 120/2120/2120i PEROX 2
- ADVIA 120/2120/2120i PEROX 3
- ADVIA 120/2120/2120i PEROX SHEATH
- ADVIA 120/2120/2120i autoRETIC

Kalibracijski reagenti

- ADVIA 120/2120/2120i OPTIpoint
- ADVIA 120/2120/2120i SETpoint Hematology Calibrator

Kalibracijo analizatorja opravi servisna služba v okviru rednega vzdrževalnega servisa vsake tri mesece.

Reagenti za zagotavljanje kakovosti

- ADVIA 120/2120/2120i TESTpoint 3-in1 Hematology Control Abnormal 1
- ADVIA 120/2120/2120i TESTpoint 3-in1 Hematology Control Abnormal 2
- ADVIA 120/2120/2120i TESTpoint 3-in1 Hematology Control Normal

Analizo vseh treh ravni kontrolnih vzorcev smo opravili vsako jutro pred za etkom izmene ter po dnevnem oz. tedenskem vzdrževanju. Uporabili smo kontrolne intervale, ki jih je navedel proizvajalec.

3.3.2. OPOZORILA ANALIZATORJA O DELOVANJU SISTEMA IN O POSEBNOSTIH V VZORCU

Analizator poleg rezultatov analize na podlagi kompleksnih algoritmov poda tudi razli na opozorila o morebitnih kvantitativnih in kvalitativnih spremembah krvnih celic. Ta od izvajalca zahtevajo, da izvede dodatne postopke, najve krat je to MPKR. Ta opozorila so glede na intenziteto razvrš ena v tri stopnje (+, ++ in +++) (Preglednica IV) (6).

Preglednica IV: Opozorila o kvantitativnih in kvalitativnih spremembah krvnih celic (6)

OPOZORILO	OPIS OPOZORILA	KRITERIJI ZA OPOZORILO	STOPNJE INTENZITETE OPOZORILA
ANISO	anizocitoza eritrocitov	RDW 16,0 %	+: RDW = 16,0 – 17,9 % ++: RDW = 18,0 – 22,0 % +++: RDW > 22,0 %
ATYP	atipi ni limfociti, blasti, ostale velike netipi ne celice, ki ne vsebujejo mielo- peroksidaze	LUC 4,5 % ali LUC (% blastov + 1,5)	+: LUC = 4,5 – 7,4 % ++: LUC = 7,5 – 10,0 % +++: LUC > 10,0 %
BLASTS	blasti	od 1,5 % < % blastov < 5,0 % in LUC 4,5 % ali blasti > 5,0 % ali BASO + BASO Susp + BASO Sat 10 %	+: blasti = 1,5 - 5,0 % ++: blasti = 5,1 - 10,0 % +++: blasti > 10,0 %
HCVAR	anizokromija eritrocitov	HDW 34 g/L	+: HDW = 34 - 39 g/L ++: HDW = 40 - 46 g/L +++: HDW > 46 g/L
HYPER	hiperkromni eritrociti (CHC > 410 g/L)	HYPER 4,0 %	+: HYPER = 4,0 - 7,9 % ++: HYPER = 8,0 - 12,0 % +++: HYPER > 12,0 %
HYPO	hipokromni eritrociti (CHC < 280 g/L)	HYPO 4,0 %	+: HYPO = 4,0 - 7,9 % ++: HYPO = 8,0 - 12,0 % +++: HYPO > 12,0 %
IG	nezreli granulociti	[% NEUT + % EOS] - % PMN]* 5,0 %	+*: * = 5,0 - 7,4 % ++*: * = 7,5 - 10,0 % +++: * > 10 %
LPLT	veliki trombociti (volumen > 20 fL)	% LPLT > 10 % PLT	+: LPLT = 10,0 - 11,9 % ++: LPLT = 12,0 - 14,0 % +++: LPLT > 14,0 %

LS	nesegmentirani nevtrofilni granulociti	BASO d/D < 0,15 in NEUT 30 %	+: LI > 1,9 ++: LI = 1,7 - 1,9 +++: LI < 1,7
MACRO	makrociti (volumen > 120 fL)	MACRO 2,5 %	+: MACRO = 2,5 - 6,4 % ++: MACRO = 6,5 - 10,5 % +++: MACRO > 10,5 %
MICRO	mikrociti (volumen < 60 fL)	MICRO 2,5 %	+: MICRO = 2,5 - 6,4 % ++: MICRO = 6,5 - 10,5 % +++: MICRO > 10,5 %
MPO-D	pomanjkanje mielo-peroksidaze v levkocitih	[% PMN - (% NEUT + % EOS)] 25, ni prisotnosti eritroblastov in veljavna MN-PMN dolina (d/D 0,15)	ni stopenj
NRBC	eritroblasti	WBC $3,0 \times 10^9/L$ in NRBC 2,0 % ali število NRBC $0,2 \times 10^9/L$	ni stopenj
PLT-CLM	trombocitni agregati	PLT-CLM > 150	ni stopenj
RBCF	fragmentirani eritrociti (shizociti)	RBCF $> 100 \times 10^9/L$	ni stopenj
RBCG	izluženi eritrociti	RBCG $> 100 \times 10^9/L$	ni stopenj

Po konani analizi posameznih stojal z vzorci, smo na ekranu analizatorja pregledali dobljene rezultate ter morebitna opozorila analizatorja. Za izdelavo krvnega razmaza s standardno metodo smo se odločili na osnovi kriterijev za mikroskopsko določitev DKS Oddelka za laboratorijsko medicino Splošne bolnišnice Celje (Preglednica V). Prav tako smo te kriterije vnesli v programsko opremo analizatorja ADVIA 2120i. Tako je bil ob izpolnitvi posameznega kriterija avtomatsko izdelan tudi krvni razmaz z aparatom ADVIA Autoslides. Kriteriji so osnovani na kriterijih, objavljenih v publikaciji Priporočeni postopki za mikroskopski pregled krvnega razmaza, ki jo je izdal SZKK (Priloga I).

Preglednica V: Kriteriji za mikroskopsko dolo itev DKS Oddelka za laboratorijsko medicino Splošne bolnišnice Celje

ODSTOPANJA OD ŠTEVIL NIH VREDNOSTI	
števil na koncentracija levkocitov	3,0 x 10 ⁹ /L
	20,0 x 10 ⁹ /L
števil na koncentracija nevtrofilnih granulocitov	1,0 x 10 ⁹ /L
	20,0 x 10 ⁹ /L
števil na koncentracija limfocitov	5,0 x 10 ⁹ /L
števil na koncentracija monocitov	1,5 x 10 ⁹ /L
števil na koncentracija eozinofilnih granulocitov	2,0 x 10 ⁹ /L
števil na koncentracija bazofilnih granulocitov	0,5 x 10 ⁹ /L
RDW	20,0 %
MCV	110 fL
števil na koncentracija trombocitov	100 x 10 ⁹ /L
	1000 x 10 ⁹ /L
OPOZORILA HEMATOLOŠKEGA ANALIZATORJA	
ATYP +, ++, +++	
BLASTS +, ++, +++	
LS +, ++, +++	
IG +, ++, +++	
MPO-D +, ++, +++	
LPLT +, ++, +++	
PLT-CLM	
RBCF	
RBCG	
NRBC	

3.4. STANDARDNA METODA

Preparati za MPKR so bili izdelani ro no s tehniko klinastega potiska ter obarvani po MGG. Celoten proces je uveljavljen v rutinski uporabi v Hematološkem laboratoriju Oddelka za laboratorijsko medicino Splošne bolnišnice Celje in temelji na slovenskih in mednarodnih smernicah ter priporo ilih za dolo itev DKS.

3.4.1. REAGENTI IN POTROŠNI MATERIAL

Reagenti:

- May-Grünwald – modified (Merck KGaA, Nemčija)

- Giemsa (Merck KGaA, Nemčija)

priprava delovne raztopine: 10 mL Giemse dodamo 90 mL destilirane vode

- osnovna raztopina fosfatnega pufra (pH vrednost = 7,1):

raztopina A: 9,1 g KH₂PO₄ (Merck KGaA) do 1000 mL destilirane vode

raztopina B: 11,9 g Na₂HPO₄ · 2H₂O (Merck KGaA) do 1000 mL destilirane vode

Skupaj zmešamo 508 mL raztopine A in 492 mL raztopine B.

- delovna raztopina fosfatnega pufra (pH vrednost 6,8): 80 mL osnove raztopine razredimo z destilirano vodo do skupnega volumena 1000 mL.

- destilirana voda

Potrošni material in oprema:

- predmetna stekla: Menzel-Gläser Cut edges, 76 x 25 x 1 mm (Thermo Scientific, Združene države Amerike)

- krovna stekla: VitroGnost Super white cover glass, 24 x 24 mm (BioGnost, Hrvaška)

- kapalni nastavek: Diff-Safe Blood Dispenser (Alpha Scientific, Združene države Amerike)

- stekleni merilni valji

- 1000 mL steklene buke

- rokavice iz lateksa za enkratno uporabo, nesterilne, brez pudra

- posodice za barvanje s pokrovom in nosilcem krvnih razmazov

- štoparica

- imerzijsko olje: Olympus Immersion Oil Type-F (Olympus, Japonska)

- svetlobni mikroskop: Axioskop 20, z objektivi z 20-kratno, 40-kratno in 100x povečavo ter z okularjem z 10-kratno povečavo (Opton, Nemčija).

3.4.2. IZDELAVA KRVNEGA RAZMAZA

V zamašek epruvete zapišimo kapalni nastavek Diff-safe Blood Dispenser. Na začetek predmetnega stekla kanemo kapljo krvi in jo zajamemo s krovnim stekлом, da se porazdeli po celotni širini objektnega stekla. Nato hitro in enakomerno potisnemo v nasprotni smeri

tako, da krovno steklo držimo pod naklonom 30° do 45° . Na matirani del predmetnega stekla zapišemo potrebne podatke o preiskovancu in ga v vodoravnem položaju sušimo na zraku 30 minut (1). Pri vzorcih s števil no koncentracijo levkocitov pod $2,0 \times 10^9/L$ smo izdelali dva razmaza, saj smo tako lažje dosegli želeno celokupno število diferenciranih levkocitov.

Predmetna stekla, ki smo jih uporabili, so iz kvalitetnega stekla visoke istosti in odporna proti koroziji. Imajo bel brušen del (matirani rob) za zapis podatkov o preiskovancu. Do uporabe so bila hranjena v originalni kartonski embalaži, ovita v celofan. Po odprtju smo preverili ali so stekla ista, suha ter brez prask. Pri rokovanju z njimi smo uporabili zaš itne rokavice iz lateksa, saj smo s tem prepre ili nanos umazanje oz. maš obe na stekla. Krovna stekla, s katerimi smo izdelali razmaz, so malenkost ožja od predmetnih stekel. Do uporabe so bila hranjena v originalni kartonski embalaži, ovita v plasti en ovoj. Vsako krovno steklo smo uporabili le enkrat in s tem prepre ili morebiten prenos krvnih celic na drug razmaz.

3.4.3. BARVANJE KRVNEGA RAZMAZA

Posušene krvne razmaze vložimo v nosilec tako, da je brušen del predmetnega stekla obrnjen navzgor. Nosilec z razmazi potopimo v prvo kadi ko z barvilo May-Grünwald za 4 minute. Nato nosilec za dve minuti potopimo v drugo kadi ko, ki je napolnjena z raztopino barvila May-Grünwald in fosfatnega pufra v razmerju 1:1. V tretji kadi ki, kjer je delovna raztopina barvila Giemsa, barvamo 10 minut, na koncu pa razmaze speremo v etri kadi ki z delovno raztopino fosfatnega pufra. Razmaze odcedimo na papirnatih brisa ah in jih v pokon nem položaju pustimo 5 minut na zraku, da se posušijo.

3.4.4. MIKROSKOPSKI PREGLED KRVNEGA RAZMAZA

Princip analize in delovni postopek MPKR je opisan v uvodnem poglavju.

3.5. AVTOMATSKA IZDELAVA IN BARVANJE KRVNEGA RAZMAZA

Avtomatska izdelava in barvanje krvnih razmazov je potekalo s pomojo aparata ADVIA Autoslides (Siemens Healthcare Diagnostics, Združene države Amerike). Aparat je

neposredno povezan s hematološkim analizatorjem ADVIA 2120i, ista je tudi programska oprema, s katero ju upravljamo. Aparat ADVIA Autoslide so asno z analizo s hematološkim analizatorjem ADVIA 2120i izdeluje krvne razmaze s tehniko klinastega potiska, omogo a pa tudi barvanje razmazov po MGG (6).

3.5.1. REAGENTI IN POTROŠNI MATERIAL

Reagenti:

- May-Grünwald Stain 1 (Siemens Healthcare Diagnostics, Združene države Amerike)
- May-Grünwald - modified (Merck KGaA, Nem ija)
- Giemsa Stain 2 (Siemens Healthcare Diagnostics, Združene države Amerike)
- Merck Giemsa (Merck KGaA, Nem ija)
- May-Grünwald Giemsa buffer (Siemens Healthcare Diagnostics, Združene države Amerike)
- Modified Wright's buffer (Siemens Healthcare Diagnostics, Združene države Amerike)
- ADVIA Autoslide Methanol (Siemens Healthcare Diagnostics, Združene države Amerike)
- ADVIA Autoslide Rinse (Siemens Healthcare Diagnostics, Združene države Amerike)
- destilirana voda

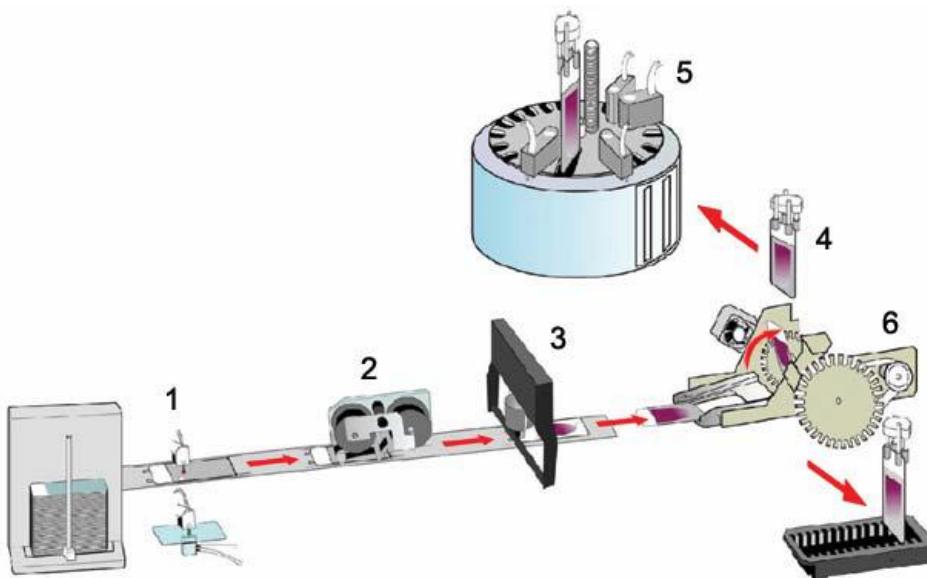
Potrošni material:

- predmetna stekla: Menzel-Gläser Superfrost 5040S, 76 x 25 x 1 mm (Thermo Scientific, Združene države Amerike)
- trak za izdelavo krvnega razmaza: ADVIA Autoslide Smearing tape (Siemens Healthcare Diagnostics, Združene države Amerike)
- trak za tiskanje na predmetna stekla: ADVIA Autoslide Printer ribbon (Siemens Healthcare Diagnostics, Združene države Amerike)
- posodice za barvanje: ADVIA Autoslide Staining wells (Siemens Healthcare Diagnostics, Združene države Amerike)
- zaš itne rokavice iz lateksa za enkratno uporabo, nesterilne, brez pudra

Predmetna stekla, ki smo jih uporabili, so iz kvalitetnega stekla visoke istosti in odpornega proti koroziji. Uporabili smo stekla s prirezanimi robovi pod kotom 45° , saj je možnost za poškodbo s takšnim steklom manjša, prav tako je manjša možnost, da bi se steklo v aparatu zagozdilo. Predmetna stekla so bila do uporabe hranjena v originalni kartonski embalaži, ovita v celofan. Po odprtju smo preverili ali so stekla ista, suha ter brez prask. Pri rokovovanju z njimi smo uporabili zašitne rokavice iz lateksa, saj smo s tem preprečili nanos umazanije oz. mašobe na stekla.

3.5.2. PRINCIP IZDELAVE IN BARVANJA KRVNEGA RAZMAZA

Za uporabo ADVIA Autoslide aparata je vzorce krvi potrebno analizirati s hematološkim analizatorjem ADVIA 2120i preko avtomatskega podajalca, saj se tam nahaja dodatna odvzemna igla za aspiracijo vzorca. Aparat je izdelal krvne razmaze le iz vzorcev, ki so izpolnjevali vnaprej določene kriterije (Preglednica V). Obstaja tudi možnost, da se krvni razmazi izdelajo iz vseh analiziranih vzorcev. Slednjo smo uporabili za izdelavo krvnih razmazov iz normalnih vzorcev.

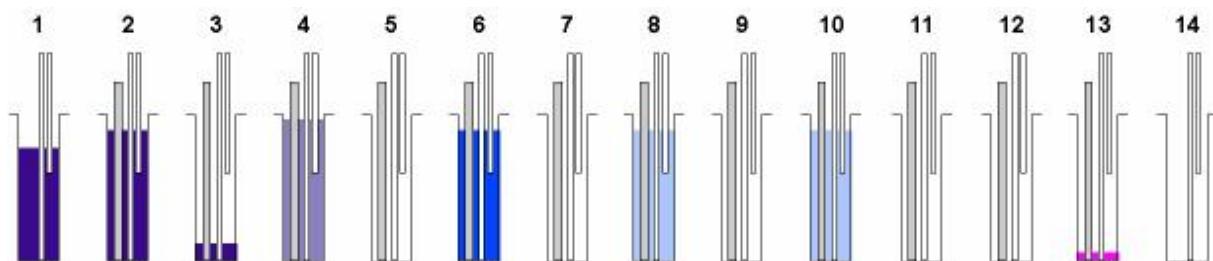


Slika 5: Postopek izdelave krvnega razmaza z aparatom ADVIA Autoslide (prijezeno po 6)

Aspirira se $75 \mu\text{L}$ vzorca, ki nato potuje do igle, ki nanese kapljo krvi na predmetno steklo (Slika 5, točka 1). Igla se nato spere z reagentom ADVIA Autoslide Rinse. Nato predmetno steklo potuje do plastične traku, ki kapljo krvi s tehniko klinastega potiska razvleče v razmaz z ustrezno dolžino in obliko (Slika 5, točka 2). Uporabnik lahko predhodno s programsko opremo glede na vrednost hematokrita ter številne koncentracije levkocitov določi kot, pod katerim trak izdela razmaz, velikost kaplje, askanja, da se

kaplja razleze ter hitrost potega traku. Uporabljen trak se nato navije za nekaj centimetrov naprej in s tem prepre i morebitno kontaminacijo naslednjega krvnega razmaza. Tiskalnik na brušen del predmetnega stekla natisne datum in as izdelave krvnega razmaza, številko LIS ter priimek in ime preiskovanca (Slika 5, to ka 3). Krvni razmaz potuje naprej do vertikalizatorja, kjer se razmazi posušijo s pomo jo ventilatorja (Slika 5, to ka 4). Priprava krvnega razmaza od aspiracije vzorca krvi do te to ke traja 5 minut. Stekla se nato prenesejo v modul za barvanje (Slika 5, to ka 5) (6).

Modul za barvanje je rotor z 32 posodicami za barvanje. V vsaki posodici je prostora za eno predmetno steklo. Krvni razmaz se prenese v prosto posodico in nato krožno potuje. Na dolo enih položajih v rotorjih so nameš ene igle za dodajanje in aspiracijo reagentov (Slika 6). Celoten postopek barvanja traja 16 minut. Ko je krvni razmaz pobarvan, se prenese v stojalo za kon ane krvne razmaze (Slika 5, to ka 6) (6).



- 1 Dodajanje barvila May-Grünwald.
- 2 Vnos predmetnega stekla v posodico za barvanje.
- 3 Delna aspiracija barvila May-Grünwald.
- 4 Dodajanje fosfatnega pufra za razred itev barvila May-Grünwald.
- 5 Aspiracija.
- 6 Dodajanje razred ene raztopine Giemse.
- 7 Aspiracija.
- 8 Dodajanje destilirane vode.
- 9 Aspiracija.
- 10 Dodajanje destilirane vode.
- 11 Aspiracija.
- 12 Aspiracija.
- 13 Dodajanje metanola.
- 14 Odstranitev objektnega stekla iz posodice za barvanje.

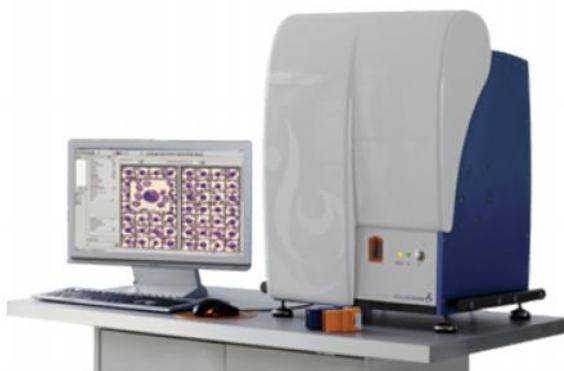
Slika 6: Postopek barvanja krvnih razmazov z aparatom ADVIA Autoslide (prirejeno po 6)

3.5.3. KONTROLA KAKOVOSTI

Za kontrolo kakovosti smo pred pri etkom dela z aparatom ADVIA Autoslides izdelali in obarvali krvni razmaz iz naklju nega vzorca krvi. Najprej smo vizualno preverili ali je krvni razmaz ustrezne dolžine in oblike, kakšna je njegova obarvanost ter ali je pravilno ozna en. Nato smo še pod svetlobnim mikroskopom preverili, ali je razporeditev in obarvanost celic v razmazu enakomerna.

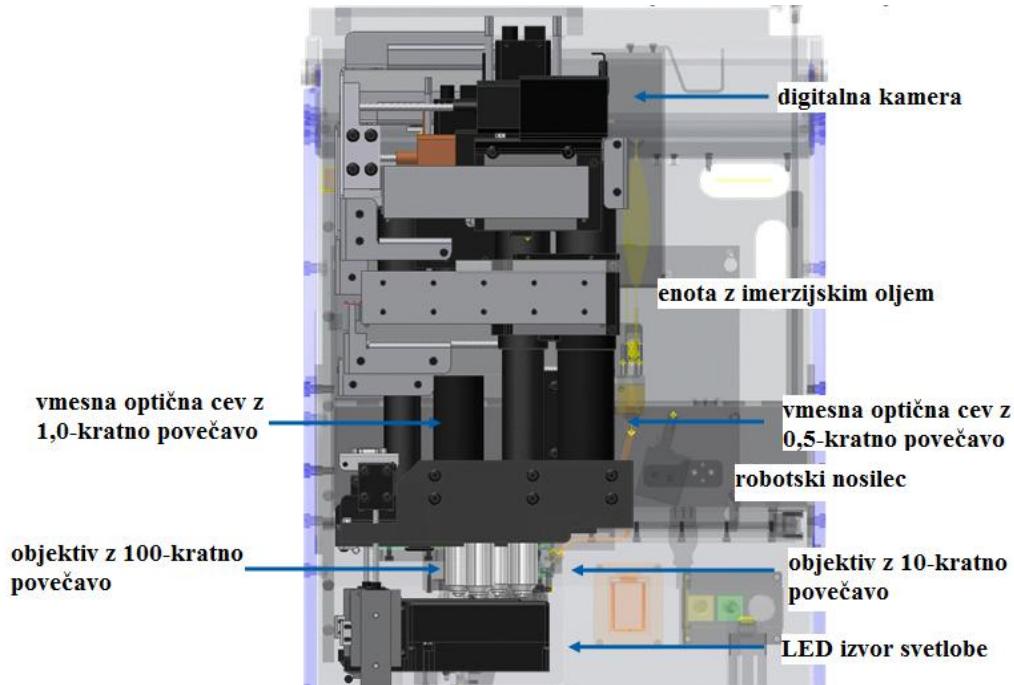
3.6. AVTOMATIZIRAN MIKROSKOPSKI PREGLED KRVNEGA RAZMAZA

Avtomatiziran MPKR smo opravili z analizatorjem Cellavision DM1200 (Cellavision AB, Švedska). Sistem je bil razvit leta 2009 in uporablja enako programsko opremo kot Cellavision DM96, ki je nekoliko starejši model istega proizvajalca (31).



Slika 7: Cellavision DM1200 (prirejeno po 31)

Sistem sestavlja motoriziran mikroskop z objektivoma z 10-kratno in 100-kratno pove avo ter vmesno optiko s preklopom med 0,5-kratno in 1,0-kratno pove avo. V ohišju je tudi robotski nosilec krvnih razmazov, enota z imerzijskim oljem in visoko zmogljiva kamera (Slika 8), sistem pa sestavlja še bralnik in tiskalnik rdnih kod za ozna evanje krvnih razmazov ter raunalniški sistem s programsko opremo za vrednotenje rezultatov (31).



Slika 8: Sestavni deli v ohišju sistema CellaVision DM1200 (prirejeno po 31)

3.6.1. PRINCIP ANALIZE

Robotski nosilec predmetnih stekel vzame predmetno steklo ter prebere QR kodo na brušenem delu stekla, nato ga odloži na mikroskopsko mizico. Z objektivom z 10-kratno povečavo in vmesno optično cevjo z 1,0-kratno povečavo (skupno 10-kratna povečava) analizator poišče podroje, primerno za diferenciacijo, ki vsebuje vsaj trikratnik naro enega števila diferenciranih levkocitov (če je naro ena diferenciacija 100 levkocitov, poišče podroje, ki vsebuje vsaj 300 levkocitov) (31).

Nato na predmetno steklo nanese 2 kaplji imerzijskega olja in z objektivom z 100-kratno povečavo in vmesno optično cevjo z 0,5-kratno povečavo (skupno 50-kratna povečava) poišče in posname podroje, primerno za vrednotenje eritrocitne krvne slike ter s stopnjami od 0 do 3 ovrednoti kvalitativne spremembe eritrocitne krvne slike, podane v preglednici VI (31).

Preglednica VI: Kriteriji za različne stopnje kvalitativnih sprememb eritrocitne krvne slike (31)

kvalitativna sprememba EKS*	stopnja 1 (blaga)	stopnja 2 (zmerna)	stopnja 3 (izrazita)
polikromazija	1,5 %	2,5 %	3,5 %
hipokromija	6 %	15 %	30 %
anizocitoza	6 %	15 %	30 %
mikrocitoza ($< 6,5 \mu\text{m}$)	6 %	15 %	30 %
makrocitoza ($> 8,5 \mu\text{m}$)	6 %	15 %	30 %
poikilocitoza	2 %	6 %	15 %

*EKS - eritrocitna krvna slika

Uporabnik lahko predlagano ovrednotenje sprejme ali popravi ter dodatno s stopnjami od 0 do 3 ovrednoti posamezne spremembe v obliki eritrocitov, prisotnost vključno ter parazitov, 10 lastnosti pa lahko določi tudi uporabnik sam (31).

Analizator nato z objektivom z 100-kratno povečavo in z vmesno optično cevjo z 1,0-kratno povečavo (skupno 100-kratna povečava) posname vnaprej določeno število levkocitov, in sicer se pomika od tanjšega dela krvnega razmaza proti gostejšemu. So asno opravi tudi pre-diferenciacijo levkocitov v 13 skupin krvnih celic:

- segmentirani nevtrofilni granulociti
- limfociti
- monociti
- eozinofilni granulociti
- bazofilni granulociti
- nesegmentirani nevtrofilni granulociti
- metamielociti
- mielociti
- promielociti
- blasti
- variantni limfociti (reaktivni in atipi ni limfociti)
- plazmatke
- neidentificirano (celice in elementi, ki jih je analizator pre-diferenciral z nizko stopnjo zaupanja) (31)

Sistem pre-diferencira tudi naslednje celice oz. elemente:

- eritroblasti
- veliki trombociti
- trombocitni agregati
- zbrisane celice (Gumprechtove sence in ostale zbrisane celice)
- artefakti (31)

Pre-diferenciacija se določi po modelu umetne nevronske mreže. Pri razvoju modela je bilo uporabljeno več tisoč primerov krvnih celic. Pri analizi se upošteva več kot 300 lastnosti posamezne celice, ki so razdeljene v 6 glavnih skupin: oblika, obarvanost, struktura (granuliranost,...), zaznavanje (vakuoliziranost,...), Markov verige (funkcije verjetnosti) ter "Wavelets" (matematične funkcije za transformacijo signala). Analizator nato zajete slike obdela s programsko opremo in jih pre-diferencirane prikaže na monitorju. Ponovna diferenciacija levkocitov je mogoča v 25 dodatnih skupin krvnih celic, ki jih lahko določi uporabnik (31).

3.6.2. POTROŠNI MATERIAL

- imerzijsko olje: Oil Bag Trak 300 (CellaVision AB, Švedska)
- nalepke za tiskanje QR kod: Barcode labels, 22x18 mm (CellaVision AB, Švedska)
- nalepke s QR kodami za kontrola kakovosti: Pre-printed QC labels, 22x18 mm (CellaVision AB, Švedska)
- nosilec za 12 krvnih razmazov: Magazines (CellaVision AB, Švedska)

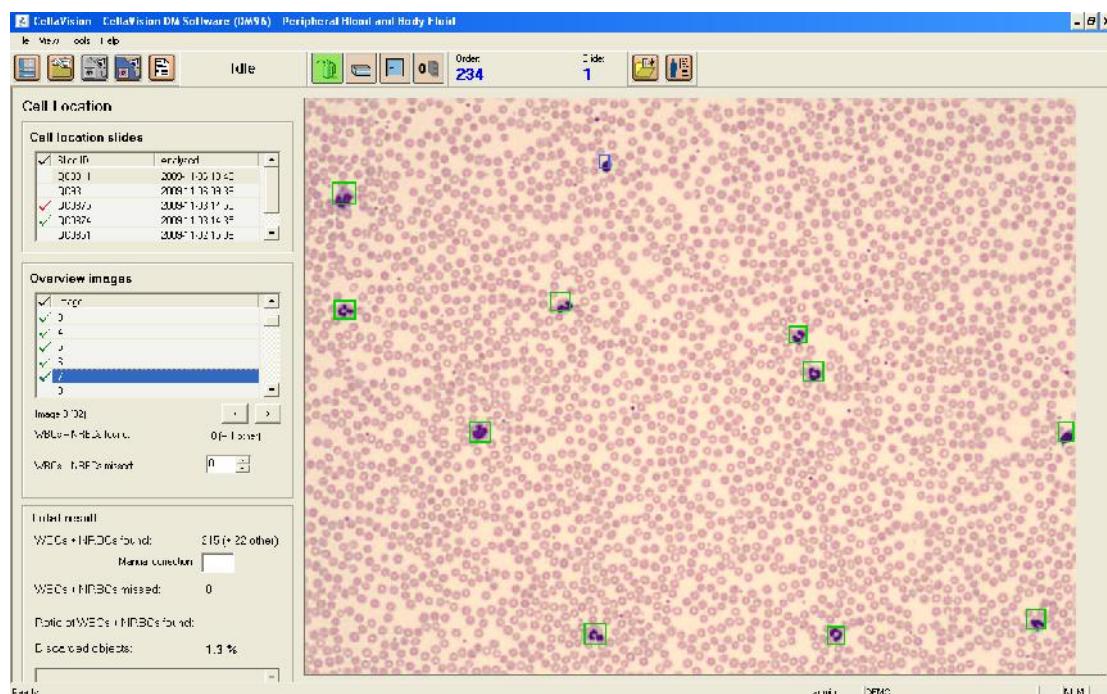
3.6.3. DELOVNI POSTOPEK

Prvno kodo na epruveti, iz katere je bil izdelan krvni razmaz, preberemo s italcem, tiskalnik pa natisne ustrezno dvo-dimenzionalno QR kodo z 10-mestno laboratorijsko številko vzorca. To nalepimo na brušen del predmetnega stekla in steklo vložimo v nosilec. Ko smo nosilec vložili v analizator, se analiza prične avtomatično, na ekranu pa lahko spremljamo njen potek. Analizator ovrednoti kvalitativne spremembe eritrocitne krvne slike ter opravi pre-diferenciacijo levkocitov. Ocene števil ne koncentracije trombocitov nismo vrednotili. Po končani analizi s pomočjo programske opreme najprej pregledamo predlagano diferenciacijo krvnih celic in jo ustrezno popravimo. Pri popravljanju diferenciacije levkocite diferenciramo v enake skupine kot pri standardni metodi

(Preglednica I). Zabeležili smo si tudi morebitne kvalitativne in kvantitativne spremembe krvnih celic, in sicer po enakem postopku oz. kriterijih kot pri standardni metodi. Po konani analizi serije vzorcev smo previdno obrisali imerzijsko olje s krvnih razmazov ter po enakem postopku določili še diferenciacijo 200-ih levkocitov.

3.6.4. KONTROLA KAKOVOSTI

Za kontrolo kakovosti smo pred prietkom analize vsake serije vzorcev izvedli preizkus iskanja celic z naključnim krvnim razmazom, pripravljenim iz vzorca krvi s številno koncentracijo levkocitov vsaj $7,0 \times 10^9/L$. Preizkus je namenjen preverjanju točnosti prepoznavanja celic in preverjanju ustreznosti postopka barvanja. Analizator posname 10 slik krvnega razmaza in označi celice z jedri ter artefakte, ki jih je zaznal (Slika 9). Z natančnim pregledom slik nato preverimo, ali je katero od celic spregledal. Točnost zaznave celic mora biti 99 - 100 % (31).



Slika 9: Preizkus iskanja celic (prirejeno po 31)

3.7. STATISTIČNE METODE

Rezultate smo statistično obdelali s programsko opremo Microsoft Excel 2010, podjetja Microsoft. Rezultate smo prikazali tabelami in grafi.

4. REZULTATI

4.1. VZORCI

V raziskavo smo vključili 300 vzorcev krvi preiskovancev (142 moških in 158 žensk), ki so bili obravnavani v Splošni bolnišnici Celje. Starost preiskovancev je bila od enega dne do 94 let, povprečna starost pa je bila 50 let.

165 preiskovancev je bilo obravnavanih ambulantno, 135 preiskovancev pa je bilo hospitaliziranih. Pri akutnih boleznih so bili trije najpogosteji naročniki Oddelek za hematologijo in onkologijo s pripadajočimi ambulantama (124 preiskovancev), Otroški oddelek z ambulanto (63 preiskovancev) ter Oddelek za infekcijske bolezni in vročinska stanja s sprejemno ambulanto (42 preiskovancev). Preiskovancev, obravnavanih v Urgentnem centru, je bilo 9.

230 analiziranih vzorcev krvi je imelo po elektronski določitvi krvne slike in DKS izpolnjene vsaj enega od kriterijev za MPKR, analizirali pa smo tudi 70 domnevno normalnih vzorcev, ki teh kriterijev niso izpolnjevali. Številna koncentracija levkocitov v vzorcih je bila od $0,3 \times 10^9/L$ do $367,8 \times 10^9/L$. Številna koncentracija levkocitov $3,0 \times 10^9/L$ je imelo 35 vzorcev. Vrednosti hematokrita so bile od 17,7 % do 60,1 %, številna koncentracija trombocitov pa od $4 \times 10^9/L$ do $1408 \times 10^9/L$.

4.2. VREDNOTENJE ELEKTRONSKE DOLOČITVE DIFERENCIALNE KRVNE SLIKE

Po elektronski določitvi DKS smo MPKR opravili v primeru izpolnitve posameznih predhodno določenih kriterijev (Preglednica V). Stirje najpogosteje izpolnjeni kriteriji za MPKR so bili številna koncentracija limfocitov $5,0 \times 10^9/L$ (53 vzorcev), številna koncentracija trombocitov $100 \times 10^9/L$ (50 vzorcev) ter opozorili ATYP+ (58 vzorcev) in LS+ (54 vzorcev) (Preglednica VII). 125 od 230 vzorcev (54 %) je izpolnjevalo več kriterijev hkrati.

Preglednica VII: Število vzorcev, ki so izpolnjevali posamezen kriterij za MPKR

odstopanja od številnih vrednosti	št. vzorcev
št. konc. levkocitov $3,0 \times 10^9/\text{L}$	36
št. konc. levkocitov $20,0 \times 10^9/\text{L}$	32
št. konc. nevtrofilnih granulocitov $1,0 \times 10^9/\text{L}$	24
št. konc. nevtrofilnih granulocitov $20,0 \times 10^9/\text{L}$	11
št. konc. limfocitov $5,0 \times 10^9/\text{L}$	53
št. konc. monocitov $1,5 \times 10^9/\text{L}$	19
št. konc. eozinofilnih granulocitov $2,0 \times 10^9/\text{L}$	3
št. konc. bazofilnih granulocitov $0,5 \times 10^9/\text{L}$	3
RDW 20,0 %	26
MCV 110 fL	6
št. konc. trombocitov $100 \times 10^9/\text{L}$	50
št. konc. trombocitov $1000 \times 10^9/\text{L}$	2
opozorila hematološkega analizatorja	št. vzorcev
ATYP+	58
ATYP++	11
ATYP+++	18
BLASTS+	5
BLASTS++	4
BLASTS+++	7
LS+	54
LS++	2
LS+++	15
IG+	12
IG++	1
IG+++	17
MPO-D+	1
MPO-D++	0
MPO-D+++	0
LPLT+	6
LPLT++	2
LPLT+++	4
PLT-CLM	2
RBCF	1
RBCG	0
NRBC	27

Za izra un ob utljivosti in specifi nosti ter pozitivne in negativne napovedne vrednosti opozoril hematološkega analizatorja smo rezultate DKS, pridobljene z dolo itvijo z analizatorjem ADVIA 2120i opredelili kot pozitivne, e je analizator podal katero od posameznih opozoril, in kot negativne, e opozorila ni podal. Prav tako smo rezultate mikroskopske dolo itve DKS, pridobljene s standardno metodo in avtomatizirano metodo, opredelili kot pozitivne, e je bil izpolnjen posamezni kriterij za pozitiven rezultat (Preglednica VIII) in kot negativen, e kriterij ni bil izpolnjen.

Preglednica VIII: Kriteriji za opredelitev pozitivnega rezultata mikroskopske dolo itve DKS (12, 32)

vrsta celice	opozorilo ADVIA 2120i	delež v DKS
nesegmentirani nevtrofilni granulociti	LS+, LS++, LS+++	5 %
metamielociti, mielociti, promielociti	IG+, IG++, IG+++	metamielociti 2 %, mielociti 1 %, promielociti 1 %
blasti	BLASTS+, BLASTS++, BLASTS+++	1 %
reaktivni/atipi ni limfociti, prolimfociti, plazmatke	ATYP+, ATYP++, ATYP+++	5 %, prolimfociti 1 % plazmatke 2 %
eritroblasti	NRBC	1 %

Preglednica IX: Ob utljivost in specifi nost posameznih opozoril analizatorja ADVIA 2120i v primerjavi s standardno in avtomatizirano metodo

opozorilo	standardna metoda	avtomatizirana metoda (po reklassifikaciji)
LS+, LS++, LS+++		
RN	221 (73,7 %)	224 (74,7 %)
LN	9 (3,0 %)	6 (2,0 %)
RP	19 (6,3 %)	22 (7,3 %)
LP	51 (17,0 %)	48 (16,0 %)
ob utljivost	67,9 %	78,6 %
specifi nost	81,3 %	82,4 %
IG+, IG++, IG+++		
RN	256 (85,3 %)	263 (87,7 %)
LN	14 (4,7 %)	7 (2,3 %)
RP	22 (7,3 %)	19 (6,3 %)
LP	8 (2,7 %)	11 (3,7 %)
ob utljivost	61,1 %	75,9 %
specifi nost	97,0 %	96,0 %
ATYP+, ATYP++, ATYP+++		
RN	205 (68,3 %)	207 (69,0 %)
LN	8 (2,7 %)	6 (2,0 %)
RP	31 (10,3 %)	23 (7,7 %)
LP	56 (18,7 %)	64 (21,3 %)
ob utljivost	79,5 %	79,3 %
specifi nost	78,5 %	76,4 %
BLASTS+, BLASTS++, BLASTS+++		
RN	273 (91,0 %)	277 (92,3 %)
LN	11 (3,7 %)	7 (2,3 %)
RP	8 (2,7 %)	8 (2,7 %)
LP	8 (2,7 %)	8 (2,7 %)
ob utljivost	42,1 %	53,3 %
specifi nost	97,2 %	97,2 %
NRBC		
RN	277 (92,3 %)	269 (89,7 %)
LN	7 (2,3 %)	4 (1,3 %)
RP	8 (2,7 %)	8 (2,7 %)
LP	8 (2,7 %)	19 (6,3 %)
ob utljivost	53,3 %	66,7 %
specifi nost	97,2 %	93,4 %

* RN - resni no negativen; LN - lažno negativen; RP - resni no pozitiven; LP - lažno pozitiven.

Deleži lažno pozitivnih rezultatov so bili pri opozorilih LS in ATYP malenkost višji kot pri ostalih opozorilih, vendar niso presegali 22,0 %. Deleži lažno negativnih rezultatov za vsa opozorila so bili nizki, saj niso presegali 5,0 %. Deleži lažno negativnih rezultatov so bili

pri primerjavi z avtomatizirano metodo malenkost nižji (povpre je 2,0 %), kot pri primerjavi s standardno metodo (povpre je 3,3 %). Ob utljivost opozoril je bila pri primerjavi z avtomatizirano metodo, ob praktično enaki specifinosti kot pri standardni metodi, boljša, saj je bila višja za 10 do 15 %. Izjema je bilo le opozorilo ATYP, kjer je bila ob utljivosti in specifinosti opozorila enaka, tako pri primerjavi s standardno, kot z avtomatizirano metodo.

4.3. VREDNOTENJE IZDELAVE IN BARVANJA KRVNIH RAZMAZOV Z AVTOMATIZIRANO METODO

4.3.1. PRILAGODITEV IZDELAVE KRVNIH RAZMAZOV

V programske opremi aparata ADVIA Autoslide smo poleg osnovnega profila, ki ga je določil proizvajalec, ustvarili štiri dodatne profile za izdelovanje krvnih razmazov:

- profil za vzorce z nizko vrednostjo hematokrita - Low HCT
- profil za vzorce z visoko vrednostjo hematokrita - High HCT
- profil za vzorce z nizko številno koncentracijo levkocitov - Low WBC
- profil za vzorce z visoko številno koncentracijo levkocitov - High WBC

Nadalje smo določili kriterije, ki opredeljujejo posamezen profil ter njihovo prioriteto:

- Low HCT: hematokrit 30,0 %; prioriteta 1
- High HCT: hematokrit 46,0 %; prioriteta 3
- Low WBC: številna koncentracija levkocitov $3,0 \times 10^9/L$; prioriteta 2
- High WBC: številna koncentracija levkocitov $25,0 \times 10^9/L$; prioriteta 4

Za številne vrednosti hematokrita smo uporabili vrednosti, ki jih priporoča tudi proizvajalec. Če je pri posameznem vzorcu bilo izpolnjenih več kriterijev za izbiro profila, je aparat izbral profil z nižjo številko prioritete (6).

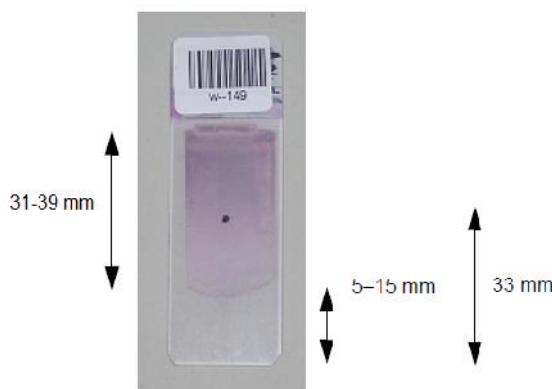
Za vsakega od štirih profilov smo preizkusili razlike ne nastavitev, ki jih omogoča programska oprema:

- kot, pod katerim trak izdela razmaz: $0 = 40^\circ$, $1 = 45^\circ$,
- velikost kaplje: $1,0 - 5,0 \mu L$,
- časakanja, da se kaplja razleže: 100 - 2000 ms,
- hitrost potega traku: 500-5000 korakov/s.

Pri preizkušanju smo izhajali iz osnovnega profila, ki ga je določil proizvajalec. Natančnih priporočil, katere nastavitev uporabiti za posamezen profil, proizvajalec ni navedel, prav tako v literaturi in na svetovnem spletu nismo našli niti ene javno objavljene študije o prilagoditvi aparata ADVIA Autoslide. Razlike ne nastavitev za posamezen profil smo preizkušali z izdelavo krvnih razmazov iz naključnih vzorcev, ki so izpolnjevali kriterije za izbiro posameznega profila. Nastavitev osnovnega profila se ne da spremenjati. Pri izdelavi razmazov z osnovnim profilom smo ugotovili, da so bili razmazi, izdelani iz vzorcev s hematokritom okrog 35 %, približno 3 mm dolži, kot razmazi iz vzorcev s hematokritom okrog 45 %. V kolikor smo pove ali zmanjšali velikost kaplje za 1,0 µL se je dolžina razmaza podaljšala oz. skrajšala za 2 do 3 mm. Razlike ne ustrezajo, da se kaplja razleže, smo vrednotili s svetlobnim mikroskopom; pod 400-kratno in 1000-kratno povečavo smo ocenjevali razporeditev celic in količino celic v repu in ob robovih razmaza. Da bi lažje opazili razlike v razporeditvi, smo testirali tudi vzorec z 90 % blastov. Razlik med razmazi izdelanimi z različnimi sistemami nismo opazili. Nadalje smo ugotovili, da je razmaz, izdelan pod kotom 40°, približno 5 do 7 mm dolži od razmaza, izdelanega pod kotom 45°, razlik v porazdelitvi celic nismo opazili.

Kriteriji za ustrezno izdelan krvni razmaz, ki smo jih opredelili, so (Slika 10):

- enakomeren, homogen razmaz z rahlo zaokroženim repom,
- dolžina razmaza od 31 do 39 mm,
- konec razmaza od 5 do 15 mm pred koncem stekla,
- na toki 33 mm od konca stekla (kjer se zavaja za analizo s CellVision DM1200) eritrociti enakomerno razporejeni, brez medsebojnega prekrivanja,
- morfologija levkocitov primerna za diferenciacijo.



Slika 10: Makroskopski izgled ustreznega krvnega razmaza (prirejeno po 31)

Kon ne nastavite, ki smo jih uporabili za posamezen profil so navedene v preglednici X:

Preglednica X: Nastavite posameznega profila za izdelavo krvnega razmaza

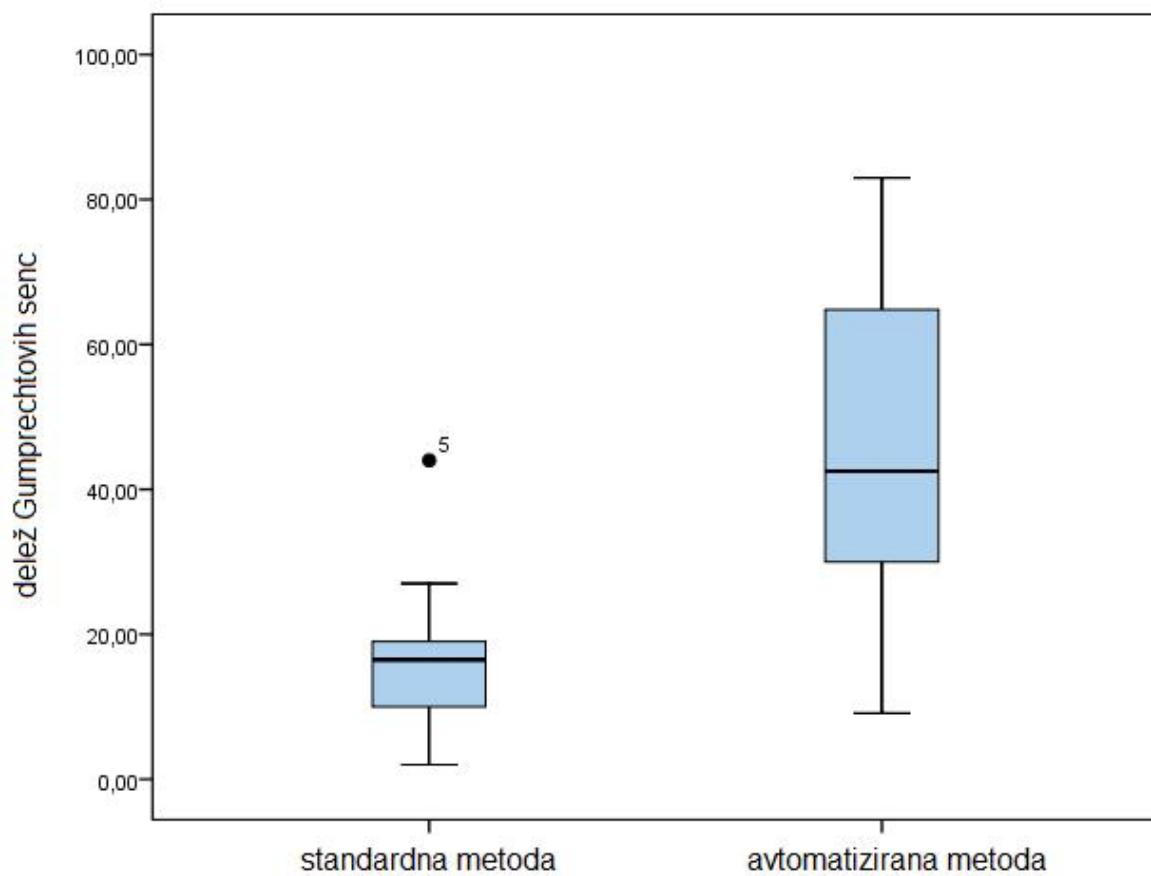
PROFIL	VELIKOST KAPLJE (µL)	AS AKANJA, DA SE KAPLJA RAZLEZE (ms)	HITROST POTEGA TRAKU (koraki/s)	KOT, POD KATERIM TRAK IZDELA RAZMAZ (°)
osnovni	4	500	3500	1
Low HCT	4	500	4500	1
High HCT	4	500	2500	1
Low WBC	4	500	4500	1
High WBC	4	500	3000	1

Ugotovili smo tudi, da so v krvnih razmazih, izdelanih z aparatom ADVIA Autoslide, nekatere celice nekoliko bolj razvle ene, ve je Gumprechtovih senc in ostalih mehansko poškodovanih celic. Število Gumprechtovih senc in ostalih mehansko poškodovanih celic v analiziranih krvnih razmazih je bilo povpre no 7,0 % (mediana 4,0 %, minimalna vrednost 0,0 %, maksimalna vrednost 49,5 %; vzorce s kroni no limfocitno levkemijo, kjer so Gumprechtove sence števil nejše, smo izvzeli iz izra unov). 206 vzorcev (69 %) je presegalo priporo eno mejo do 2 %, ve kot 10 % Gumprechtovih senc in ostalih mehansko poškodovanih celic pa je vsebovalo kar 71 vzorcev (24 %).

Preglednica XI: Deleži Gumprechtovih senc v krvnih razmazih pri preiskovancih s kroni no limfocitno levkemijo

zap. št. vzorca	% Gumprechtovih senc v krvnem razmazu, izdelanem z ro no metodo	% Gumprechtovih senc v krvnem razmazu, izdelanem z avtomatizirano metodo
8	23,0	15,1
17	27,0	14,8
21	19,0	50,0
28	17,0	60,2
32	44,0	64,8
42	8,0	30,0
43	16,0	83,0
45	9,0	66,1

64	11,0	42,0
88	10,0	34,9
132	17,0	75,0
180	18,0	40,2
192	2,0	9,1
250	14,0	43,0
povpre je	16,8	44,9

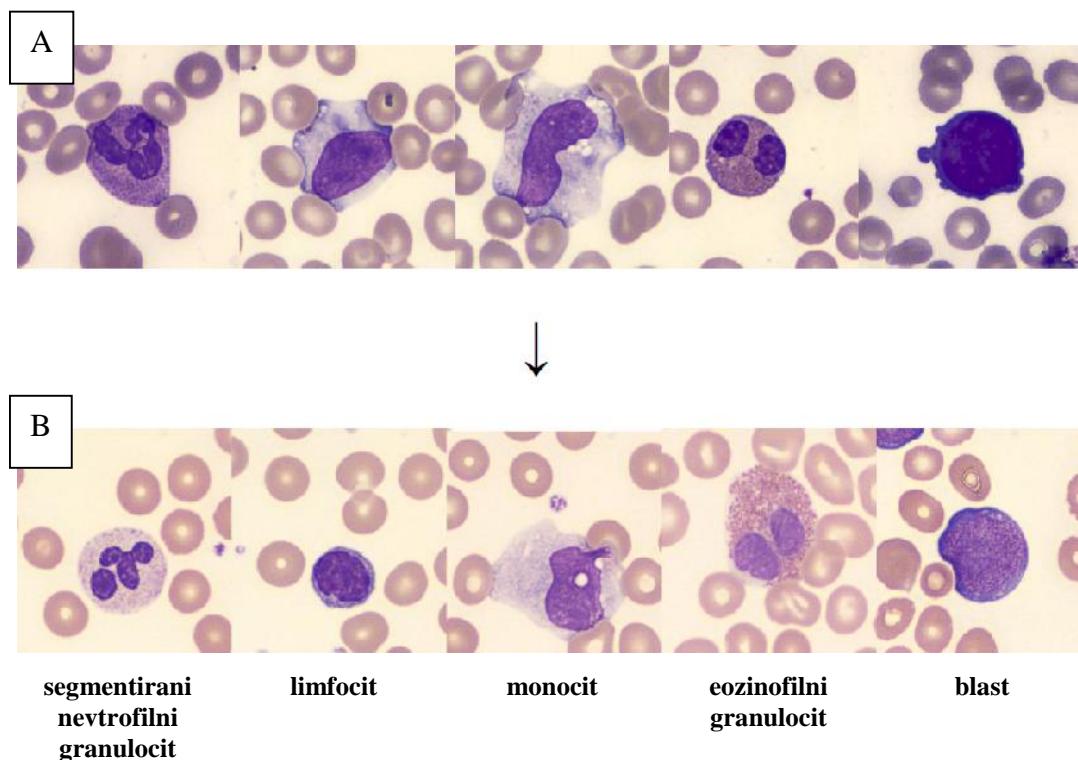


Slika 11: Kvantilni diagram deleža Gumprechtovih senc pri standardni metodi in avtomatizirani metodi pri preiskovancih s kroni no limfocitno levkemijo

4.3.2. PRILAGODITEV BARVANJA KRVNIH RAZMAZOV

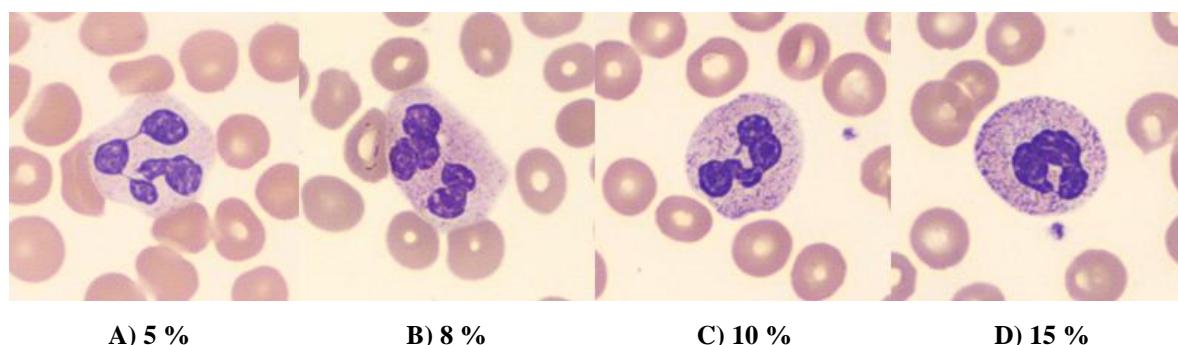
Ustrezna obarvanost krvnih razmazov je zelo pomembna za pravilno diferenciacijo celic, še posebej pa pri uporabi avtomatiziranih sistemov za slikovno analizo, kjer je uspešnost pre-diferenciacije v veliki meri odvisna od ustreznosti barv posameznih celnih struktur. Proizvajalec zagotavlja lastna barvila ter fosfatni pufer, omogočena pa je tudi uporaba drugih barvil in fosfatnega pufra ter prilagoditev postopka barvanja.

Najprej smo preizkusili barvili May-Grünwald in Giemsa, ki jih dobavlja proizvajalec, v kombinaciji z MGG fosfatnim pufrom. Eritrociti so imeli ustrezne morfološke zna ilnosti, vendar so bili obarvani sivo rožnato, zato jih je Cellavision DM1200 ve krat prepozna kot artefakte. Zaradi prevelikega števila artefaktov velikokrat tudi ni dokon al prediferenciacije. Trombociti so bili obarvani preve temno, zato granulacije niso bile vidne. Levkociti so bili v splošnem obarvani precej bazofilno, zgoš enost kromatina pa je bilo težko oceniti zaradi pretemne obarvanosti. Nevtrofilni granulociti so imeli lažne toksi ne granulacije, Cellavision DM1200 jih je velikokrat prepozna kot bazofilne granulocite. Veliki limfociti ter limfociti s citoplazmo, uvhano med eritrocite, so izgledali kot reaktivni limfociti. Granule v citoplazmi eozinofilnih granulocitov so bile neizrazito, sivkasto obarvane, Cellavision DM1200 jih je velikokrat uvrstil med segmentirane nevtrofilne granulocite. Atipi ne celice in blasti so bili pretemno obarvani za zanesljivo prepoznavo (Slika 12). Na podlagi teh ugotovitev smo zamenjali barvili proizvajalca Siemens Healthcare Diagnostics z barvili proizvajalca Merck, da smo dosegli bolj rožnato obarvanost eritrocitov, pa smo fosfatni pufer May-Grünwald Giemsa buffer zamenjali s fosfatnim pufrom Modified Wright's buffer. Prednost Merckovih barvil je tudi manjši volumen, saj je zaradi izhlapevanja metanola, le-ta priporo eno menjati im pogosteje. Opazili smo, da je odprto barvilo May-Grünwald, proizvajalca Merck, obstojno le približno 3 dni, saj so se po tem asu za eli pojavljati vakuolizirani eritrociti, te spremembe pa so bile zelo podobne tistim pri kontaminaciji barvila May-Grünwald z vodo (14, 25). Opazili smo tudi, da je sistem dovajanja reagentov slabo zaš iten pred izhlapevanjem, zato smo odprtine na reagentih po vsaki menjavi dodatno zaš itili s parafilmom.



Slika 12: Prikaz obarvanosti posameznih krvnih celic A) pred in B) po optimizaciji barvanja

Preizkusili smo tudi razlike v koncentracije delovne raztopine Giemse, in sicer 5 %, 8 %, 10 % in 15 % (Slika 13). Aparat ADVIA Autoslides samodejno pripravi želeno koncentracijo. S svetlobnim mikroskopom smo ocenjevali obarvanost krvnih celic, še posebej smo bili pozorni na obarvanost eritrocitov, obarvanost kromatina celic ter intenziteto eozinofilnih in nevtrofilnih granulacij. Nato smo s Cellavision DM1200 opravili še preizkus iskanja celic za potrjevanje ustreznosti postopka barvanja ter vrednotili delež artefaktov (morebitnih izoborin barvila) v razmazu.



Slika 13: Obarvanost segmentiranih nevtrofilnih granulocitov z A) 5 %, B) 8 %, C) 10 % in D) 15 % delovno raztopino Giemse

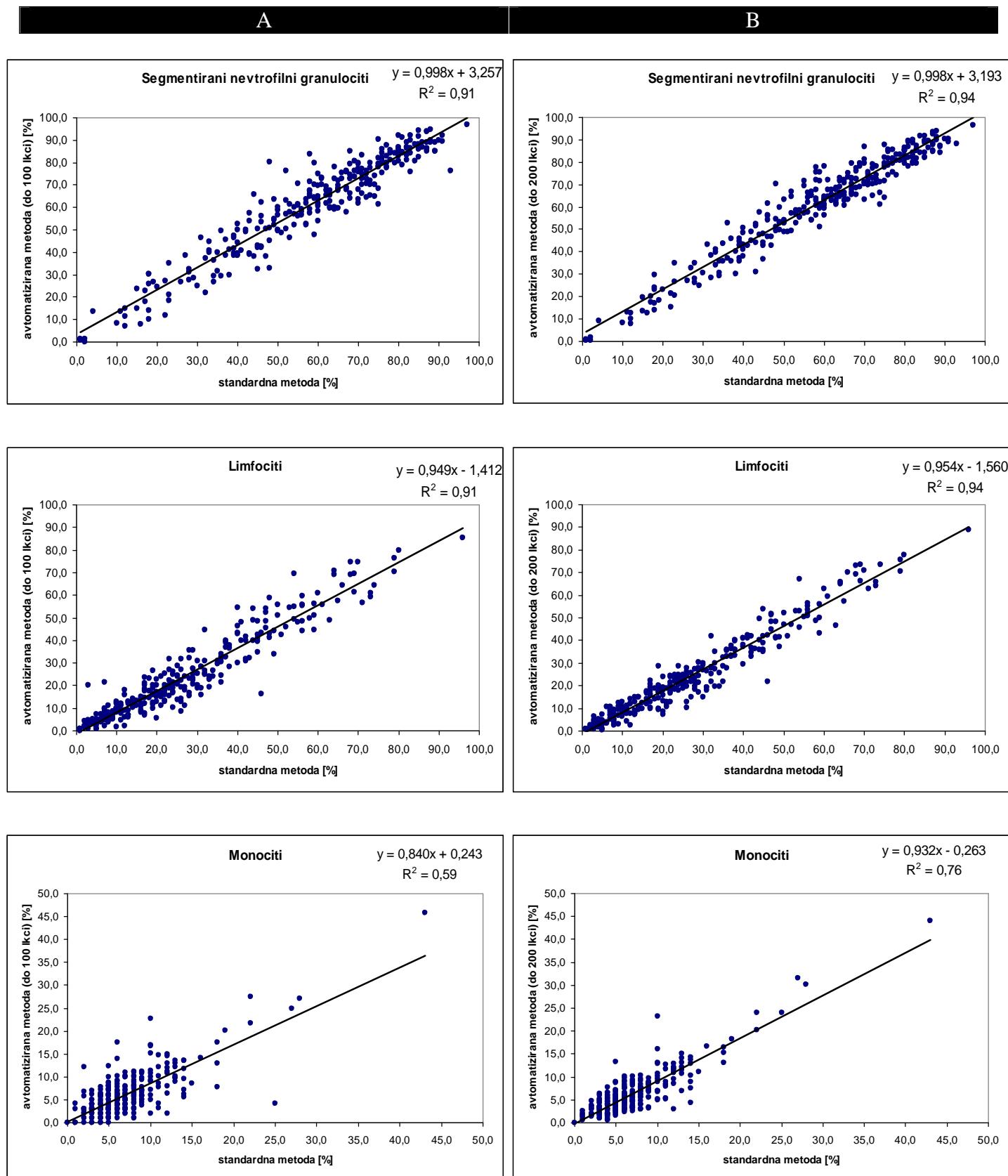
Z naraš ajo o koncentracijo Giemse smo opazili nekoliko bolj sivkasto obarvanost eritrocitov, vendar razlike v odtenkih niso bile velike. Kromatin celic je bil s 5 % Giemso bledo obarvan, kontrast med posameznimi celi nimi strukturami je bil slabši. Nevtrofilne granulacije so bile komaj opazne. Kromatin celic, obarvan s 15 % Giemso, je bil pretemno obarvan, zato je bilo pri nekaterih celicah težko oceniti zgoš enost kromatina, nevtrofilne granulacije pa so bile izrazite, zato bi granule lahko prepoznali kot toksi ne granulacije. Odlo ili smo se za 8 % delovno raztopino Giemse, saj je bila v primerjavi z 10 % obarvanost hipogranuliranih in nevtrofilnih granulocitov s toksi nimi granulacijami boljše vidna. Preizkus iskanja celic na Cellavision DM1200 je bil v vseh primerih uspešen (rezultat 99 %). Delež artefaktov (izoborin barvila) je bil razli en (od 1 do 10 %) in ni bil sorazmerno povezan z naraš ajo o koncentracijo Giemse.

Proizvajalec omogo a uporabo drugih barvil in fosfatnega pufra, zato je namesto vnosa preko rtnih kod, podatke potrebno vnesti ro no. Slabost tega je, da moramo za vsak reagent pri menjavi ro no vpisati lot številko reagenta, koli ino in rok uporabe, s tem pa je ve ja možnost za napako. V enim primeru smo tako vnesli napa no previsoko koli ino barvila May-Grünwald, zato nas aparat ni opozoril, ko je barvila zmanjkalo.

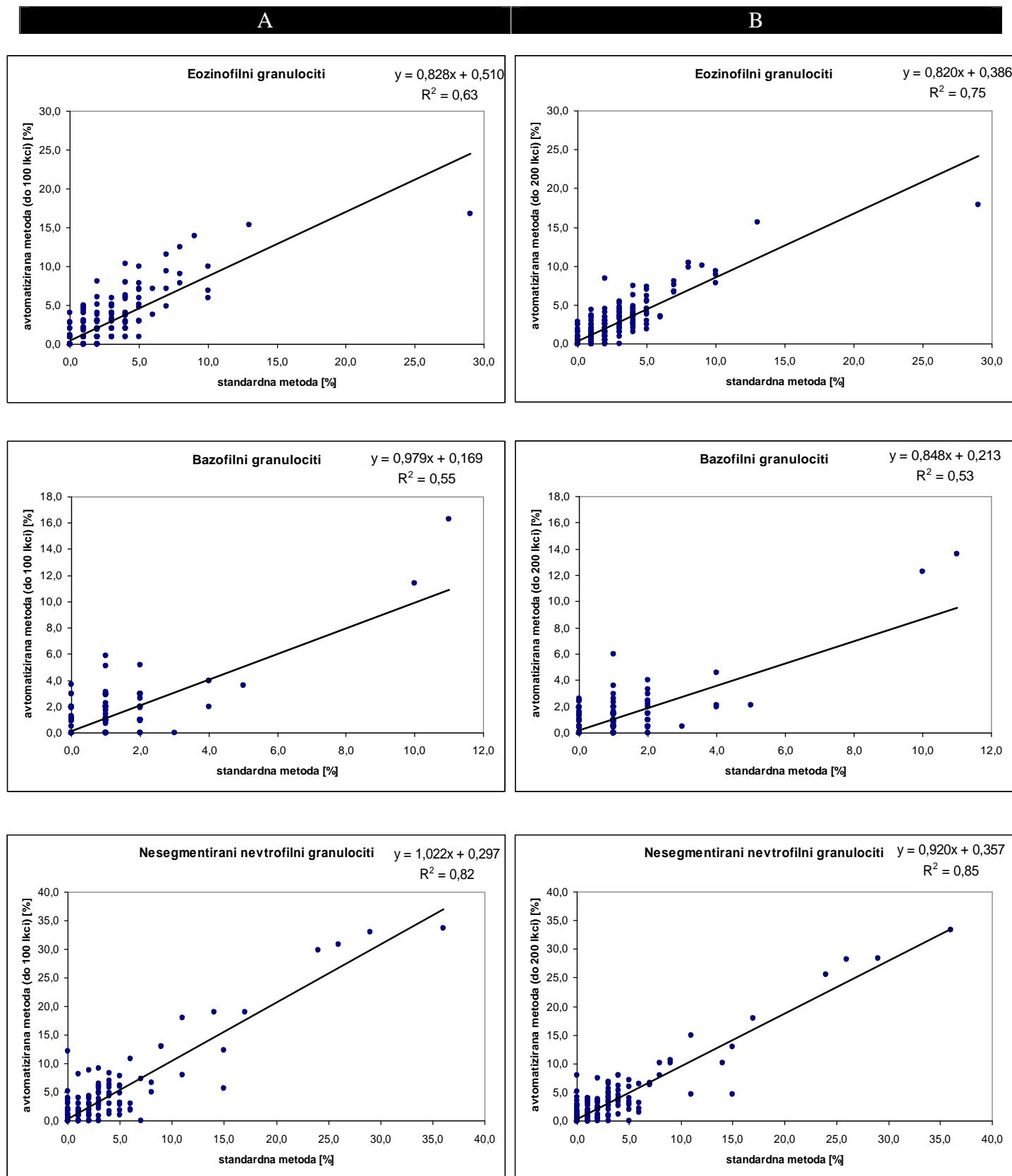
4.4. PRIMERJAVA REZULTATOV DKS

4.4.1 PRIMERJAVA METOD

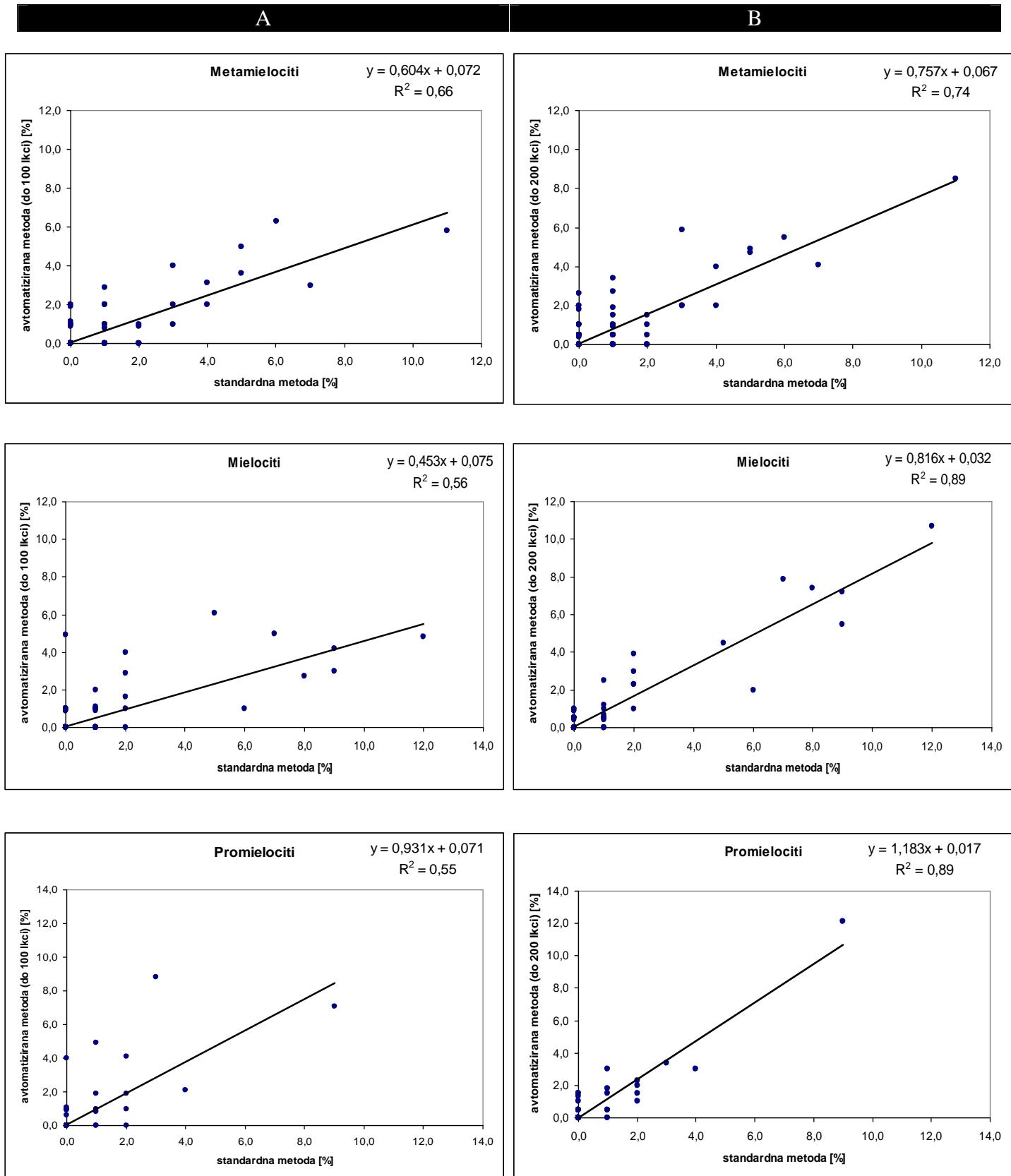
Medsebojno povezavo metod smo vrednotili z izra unom Pearsonovega koeficiente korelacije (R^2) ter ena be linearne regresije. Kot referen no vrednost smo upoštevali rezultate mikroskopske dolo itve DKS s standardno metodo z diferenciacijo do 100 levkocitov in jih primerjali z rezultati dolo itve DKS z avtomatizirano metodo, in sicer lo eno z diferenciacijo do 100 levkocitov in do 200 levkocitov. Rezultate smo vrednotili po posameznih vrstah levkocitov.



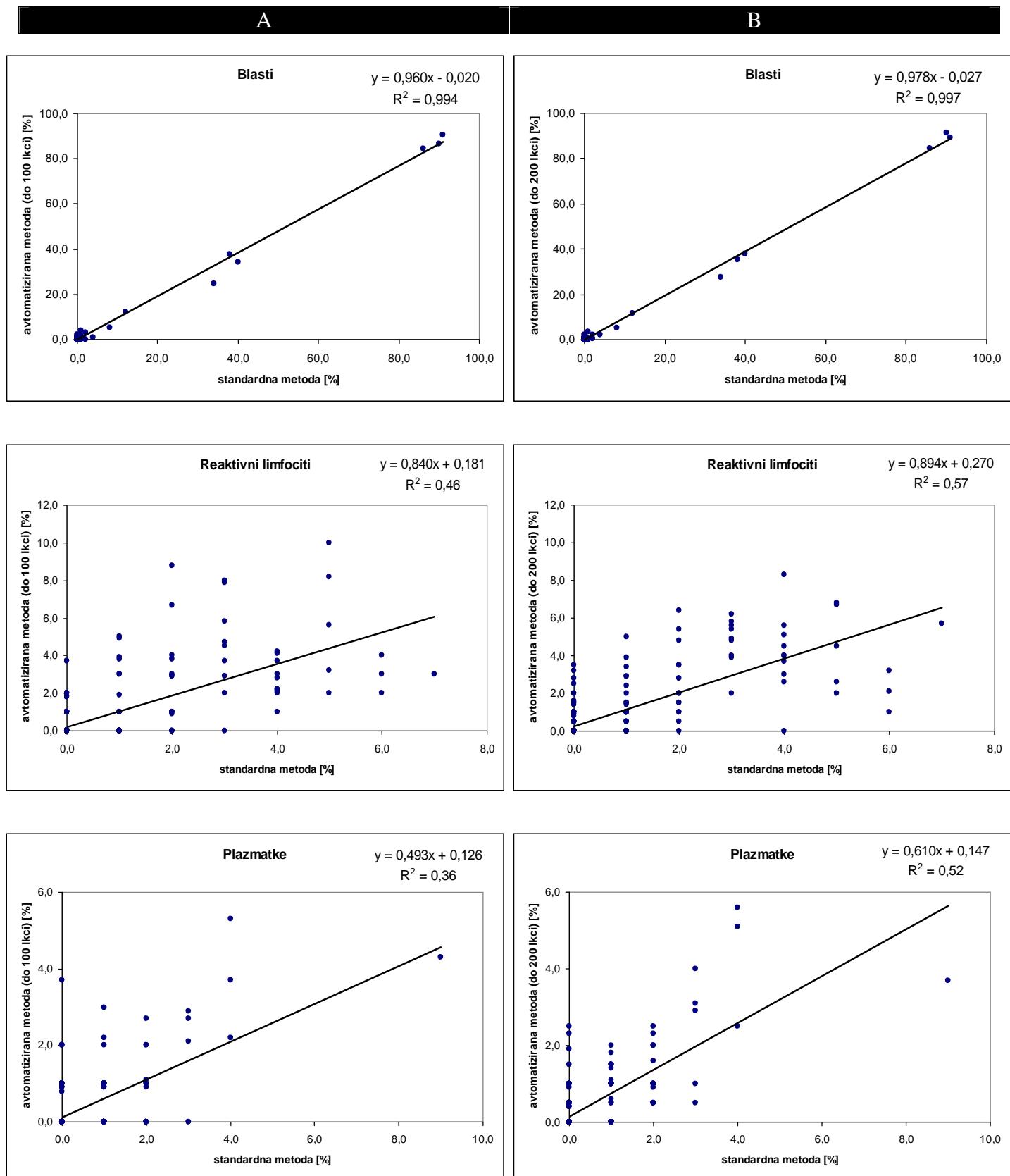
Slika 14: Korelacija standardne in avtomatizirane metode (A - do 100 levkocitov in B - do 200 levkocitov) pri segmentiranih nevtrofilnih granulocitih, limfocitih in monocitih



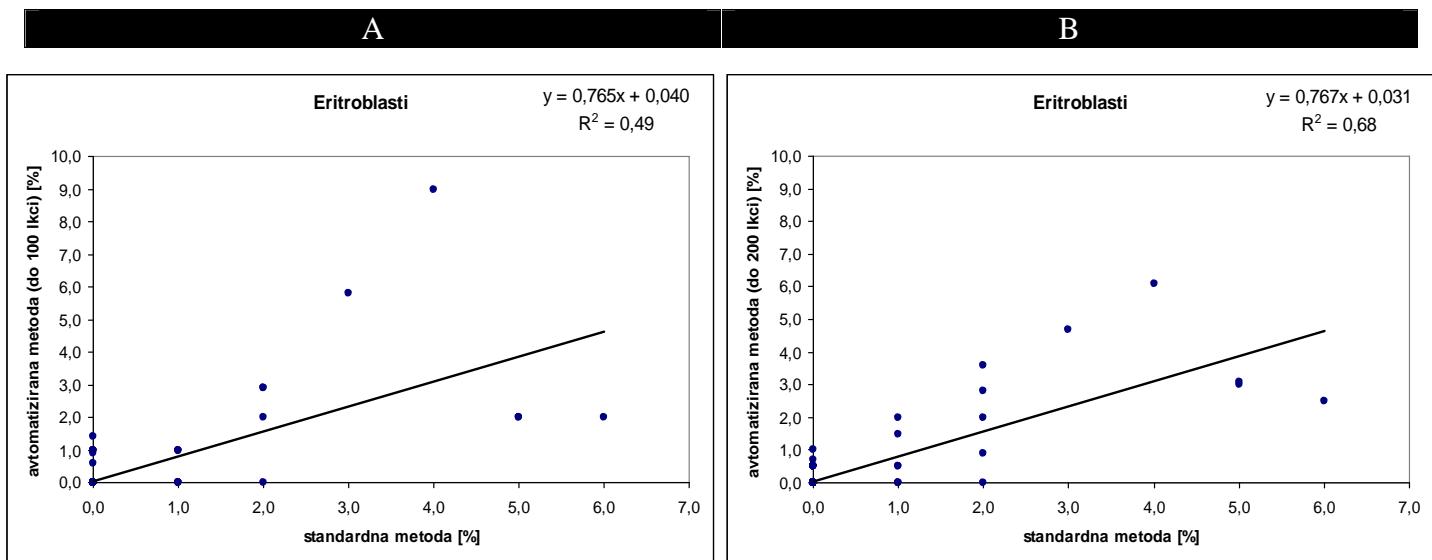
Slika 15: Korelacija standardne in avtomatizirane metode (A - do 100 levkocitov in B - do 200 levkocitov) pri eozinofilnih, bazofilnih in nesegmentiranih nevtronofilnih granulocitih



Slika 16: Korelacija standardne in avtomatizirane metode (A - do 100 levkocitov in B - do 200 levkocitov) pri metamielocitih, mielocitih in promielocitih



Slika 17: Korelacija standardne in avtomatizirane metode (A - do 100 levkocitov in B - do 200 levkocitov) pri blastih, reaktivnih limfocitih in plazmatkah



Slika 18: Korelacija standardne in avtomatizirane metode (A - do 100 levkocitov in B - do 200 levkocitov) pri eritroblastih

Koreacijski koeficienti pri posameznih skupinah celic so pri akovano višji pri ve jem celokupnem številu diferenciranih levkocitov z avtomatizirano metodo. Le pri primerjavi korelacije bazofilnih granulocitov, kjer je koreacijski koeficient nizek, smo ugotovili, da je le-ta neodvisen od celokupnega števila diferenciranih levkocitov ($R^2 = 0,55$ in $R^2 = 0,53$).

Vzrok je verjetno v majhni pogostosti teh celic v krvi (13). Koreacijski koeficienti so visoki pri segmentiranih nevtrofilnih granulocitih ($R^2 = 0,91$ in $R^2 = 0,94$) ter limfocitih ($R^2 = 0,91$ in $R^2 = 0,94$). Korelacija pri monocitih in eozinofilnih granulocitih je pri diferenciaciji z avtomatizirano metodo do 100 levkocitov slabša (monociti $R^2 = 0,59$ in eozinofilni granulociti $R^2 = 0,63$), se pa koeficiente ob utno zvišata pri ve jem številu diferenciranih levkocitov (monociti $R^2 = 0,76$ in eozinofilni granulociti $R^2 = 0,75$). Do podobnih ugotovitev smo prišli pri primerjavi nezrelih granulocitov, kjer so koeficienti pri diferenciaciji do 100 levkocitov slabši (metamielociti $R^2 = 0,66$, mielociti $R^2 = 0,56$ in promielociti $R^2 = 0,55$), pri diferenciaciji do 200 levkocitov pa boljši (metamielociti $R^2 = 0,74$, mielociti $R^2 = 0,89$ in promielociti $R^2 = 0,89$). Koreacijski koeficient pri nesegmentiranih nevtrofilnih granulocitih je sorazmerno dober ($R^2 = 0,82$ in $R^2 = 0,85$). Pri blastih je korelacija obeh metod skoraj popolna ($R^2 = 0,994$ in $R^2 = 0,997$). Korelacija pri reaktivnih limfocitih, plazmatkah in eritroblastih je zaradi manjše pogostosti teh celic v vzorcih slaba tudi pri diferenciaciji do 200 levkocitov (reaktivni limfociti $R^2 = 0,57$, plazmatke $R^2 = 0,52$ in eritroblasti $R^2 = 0,68$). Korelacija vzorcev pri atipi nih limfocitih

($R^2 = 0,77$) in prolimfocitih ($R^2 = 0,69$) je slabša, vendar je bilo takšnih vzorcev premalo za zanesljivo vrednotenje.

Zaradi zelo številnih Gumprechtovih senc smo 14 preiskovancev s kroni no limfocitno levkemijo obravnavali posebej, saj je bil pri dolo itvi DKS z avtomatizirano metodo delež segmentiranih nevtrofilnih granulocitov lažno previsok, delež limfocitov pa lažno prenizek. Gumprechtove sence v teh primerih nismo diferencirali kot svojo skupino celic, kot je priporo eno (1), ampak smo jih prišteli limfocitom. Ujemanje segmentiranih nevtrofilnih granulocitov ($R^2 = 0,95$) in limfocitov ($R^2 = 0,91$) je bilo zelo visoko, ujemanje monocitov pa zmerno ($R^2 = 0,73$).

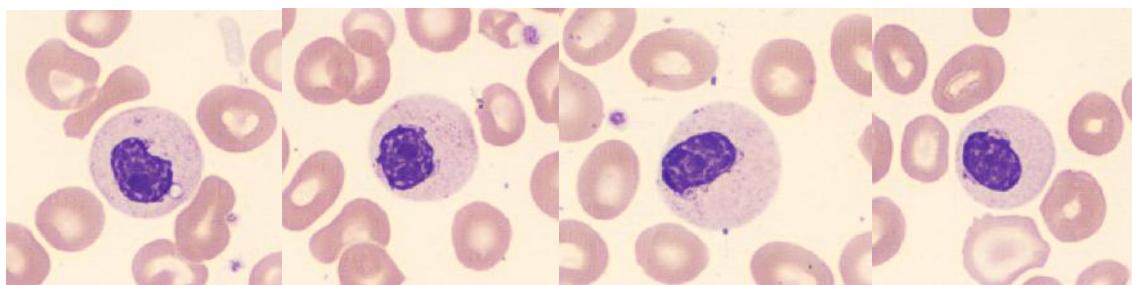
4.4.2. VREDNOTENJE PRE-DIFERENCIACIJE SISTEMA CELLAVISION DM1200

To nost pre-diferenciacije sistema CellaVision DM1200 smo vrednotili z izra unom Pearsonovega koeficiente korelacije (Preglednica XII). Rezultate pre-diferenciacije do 200 levkocitov smo primerjali z rezultati po ponovni diferenciaciji.

Preglednica XII: To nost pre-diferenciacije sistema CellaVision DM1200

	R^2
segmentirani nevtrofilni granulociti	0,87
limfociti	0,97
monociti	0,85
eozinofilni granulociti	0,59
bazofilni granulociti	0,88
nesegmentirani nevtrofilni granulociti	0,65
metamielociti	0,38
mielociti	0,64
promielociti	0,64
blasti	0,97
reaktivni / atipi ni limfociti	0,04
plazmatke	0,02
eritroblasti	0,73

Celokupno število diferenciranih levkocitov se je po potrditvi pre-diferenciacije do 200 levkocitov spremenilo tudi za +/- 10 levkocitov, in sicer v primerih, ko je Cellavision DM1200 levkocite diferenciral kot ne-levkocite (Gumprechtove sence, artefakte,...) in obratno. Povprečno število celic, ki jih sistem ni prepoznal (skupina "neidentificirano"), je bilo nizko; 2,3 %, z razponom od 0,0 % do 20,5 %. V to skupino je Cellavision DM1200 največkrat razvrstil različne artefakte, posamezne celice z razvlečeno citoplazmo, višje deležne neidentificiranih celic pa je podal tudi pri vzorcih s Pelger-Huetovo nepravilnostjo jeder (Slika 19).



Slika 19: Primer neidentificiranih celic - hiposegmentirani nevtrofilni granulociti v vzorcu s Pelger-Huetovo nepravilnostjo jeder

Koreacijski koeficient za segmentirane nevtrofilne granulocite je sicer visok ($R^2 = 0,87$), vendar je Cellavision DM1200 pri kar 130 vzorcih segmentirane nevtrofilne granulocite uvrstil tudi med nesegmentirane, vendar le-ti niso bili prisotni. Tudi kadar so bili prisotni, je bilo njihovo število precenjeno ($R^2 = 0,65$, ena ba regresijske premice $y = 0,37x - 1,39$). Nekaj najizrazitejših primerov smo zbrali v preglednici XIII. Slabo pre-diferenciacijo segmentiranih nevtrofilnih granulocitov lahko odpravimo z ukazom sistema Cellavision DM1200, da vse nesegmentirane in segmentirane nevtrofilne granulocite uvrsti med segmentirane, izvajalec pa nato sam poiščem morebitne nesegmentirane.

Preglednica XIII: Nekaj primerov napa ne pre-diferenciacije segmentiranih nevtronofilnih granulocitov

zap. št. vz.

vrsta celice	2	107	150	154	173	197	232	242	246
segmentirani n.g. (pre-diferenciacija)	76,5	41,5	21,0	15,0	10,0	64,0	28,0	20,0	10,5
segmentirani n.g. (potrjeni rezultati)	93,3	61,5	46,8	67,6	61,3	87,7	57,1	56,4	44,7
nesegmentirani n.g. (pre-diferenciacija)	13,0	19,0	50,5	31,0	31,0	27,5	53,5	56,5	33,0
nesegmentirani n.g. (potrjeni rezultati)	1,0	2,6	28,2	0,9	0,0	4,6	28,3	25,6	4,7

* n.g. - nevtronfilni granulociti

Pre-diferenciacija limfocitov je bila odli na ($R^2 = 0,97$), je pa Cellavision DM1200 velike limfocite pri 105-ih vzorcih uvrstil med reaktivne/atipi ne limfocite, vendar le-ti niso bili prisotni. Slabo pre-diferenciacijo lahko odpravimo z ukazom v programske opreme na enak na in kot pri pre-diferenciaciji segmentiranih in nesegmentiranih nevtronafilnih granulocitov. Kljub zna ilnim morfološkim lastnostim eozinofilnih granulocitov je bila njihova pre-diferenciacija slabša ($R^2 = 0,59$), saj jih je Cellavision DM1200 uvrš al tudi med Gumprechtove sence, verjetno zaradi bolj razvle ene citoplazme nekaterih celic. Pre-diferenciacija blastov je odli na ($R^2 = 0,97$), izstopa le primer, pri katerem je Cellavision pre-diferenciral 1,5 % blastov, ostale pa uvrstil med monocite. Po ponovni diferenciaciji je bil delež blastov 27,7 %.

Vrednotili smo tudi sposobnost sistema Cellavision DM1200, da v krvnih razmazih, izdelanih z avtomatizirano metodo iz levkopeni nih vzorcev ($3,0 \times 10^9/L$) opravi pre-diferenciacijo 200-ih levkocitov. Od 36-ih levkopeni nih vzorcev je sistem uspešno pre-diferenciral 29 vzorcev, preostalih 7 vzorcev pa je navedenih v preglednici XIV. V teh sedmih primerih smo isti krvni razmaz s Cellavision DM1200 morali analizirati ve krat zaporedoma, dokler nismo dosegli želenega celokupnega števila levkocitov (tj. 200). Rezultate posameznih analiz Cellavision DM1200 avtomatsko združi ter prera una deleže.

Preglednica XIV: Vzorci, pri katerih Cellavision DM1200 ni opravil pre-diferenciacije do 200 levkocitov

	števil na koncentracija levkocitov ($\times 10^9/L$)	hematokrit (%)	celokupno število pre-diferenciranih levkocitov
1	0,3	21,0	36
2	0,5	24,2	63
3	0,6	21,5	42
4	0,6	26,2	102
5	0,9	17,7	85
6	1,5	18,2	126
7	1,5	23,9	172

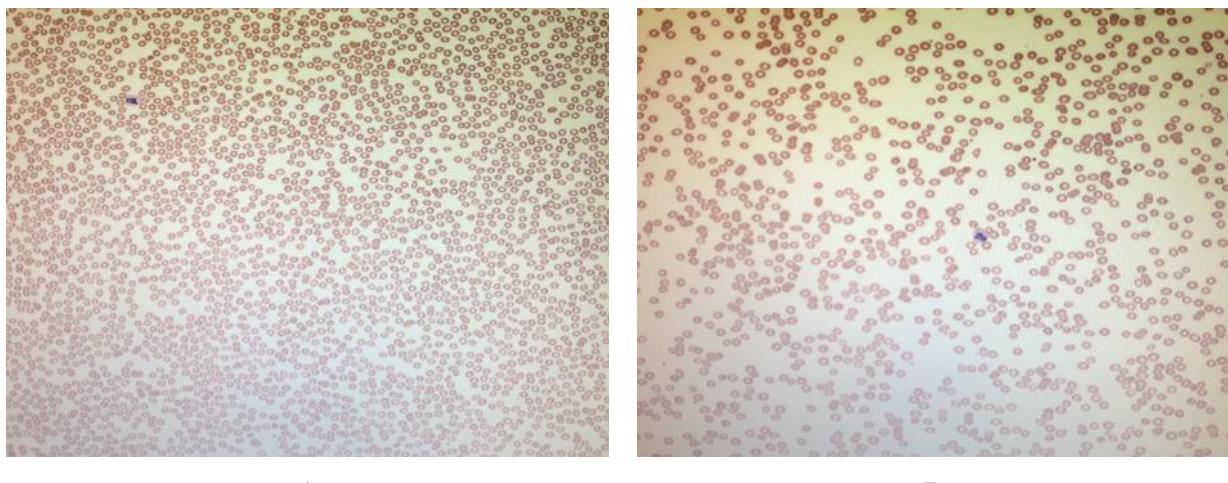
4.4.3. VREDNOTENJE OPISA LEVKOCITNE, ERITROCITNE IN TROMBOCITNE KRVNE SLIKE

V razmazih, izdelanih in analiziranih s standardno in avtomatizirano metodo, smo med seboj primerjali opise morebitnih morfoloških nepravilnosti levkocitne, eritrocitne in trombocitne krvne slike. Neposredne statisti ne obravnave posameznih zna ilnosti zaradi številnosti razli nih nepravilnosti, njihove nizke frekvence pojavljanja ter subjektivnosti ocene nismo izvedli, ampak smo le povzeli ugotovitve.

Morfološke nepravilnosti jedra levkocitov, kot so hiposegmentacija in hipersegmentacija, smo s sistemom Cellavision DM1200 pravilno prepoznali v vseh primerih. Ker so vse celice dolo ene vrste zbrane na kupu, je prepoznavna in semi-kvantitativna ocena nepravilnosti veliko lažja kot pri MPKR s standardno metodo. Vakuolizacije citoplazme monocitov pri posameznih primerih nismo omenili, pri nekaterih vzorcih pa se je semi-kvantitativna ocena razlikovala za eno stopnjo. Do enakih ugotovitev smo prišli tudi pri analizi s standardno metodo. Toksi ne granulacije, hipogranulacijo in druge nepravilnosti citoplazme levkocitov smo pravilno prepoznali pri vseh vzorcih, se je pa semi-kvantitativna ocena pri posameznih vzorcih razlikovala za eno stopnjo.

Opisi sprememb velikosti, oblik in obarvanosti eritrocitov ter trombocitov so bili skladni z opisi, pridobljenimi s standardno metodo. Opazili smo, da je bila ocena intenzivnosti polikromazije v razmazih, izdelanih z avtomatizirano metodo, v nekaj primerih višja za

eno oceno. Možen razlog za ta pojav je nekoliko bolj rožnata obarvanost eritrocitov v razmazih, izdelanih z avtomatizirano metodo, zaradi tega pa morebitna polikromazija bolj izstopa. Prepoznavanje različnih vključkov in sprememb v razporeditvi eritrocitov s sistemom CellVision DM1200 ni zanesljiva. Bazofilne punktacije smo pravilno prepoznali v 9-ih vzorcih, v 8-ih vzorcih pa jih nismo zasledili. Prav tako smo Howell-Jollyeva telesca zasledili le v dveh vzorcih, v 7-ih vzorcih pa ne. Razlog je slabša lokacija slike, ki je na voljo za vrednotenje, poleg tega pa tudi ni možno pomikanje po različnih delih krvnega razmaza. Tudi prepoznavanje rouleaux formacij je bila težavna, saj sistem CellVision DM1200 za oceno eritrocitne in trombocitne krvne slike posname predel v krvnem razmazu, kjer se eritrociti med seboj ne prekrivajo. Tako je pri vzorcih z rouleaux formacijami sistem posnel slike v precej tankem področju krvnega razmaza, kjer rouleaux formacije niso tako očitne, eritrocitna krvna slika pa je podobna tisti pri vzorcih z zelo nizko številno koncentracijo eritrocitov (Slika 20).



Slika 20: Slika za oceno eritrocitne in trombocitne krvne slike pri normalnem vzorcu (A) in vzorcu z rouleaux formacijami (B)

Rouleaux formacije smo pravilno prepoznali v 8-ih vzorcih, v 6-ih vzorcih pa smo jih spregledali. Pri sumu na vključke v eritrocitih ter sumu na nenormalno razporeditev eritrocitov je zato potreben še pregled krvnega razmaza pod svetlobnim mikroskopom.

4.5. VREDNOTENJE ASA ANALIZE

as analize je eden glavnih dejavnikov stroškovne u inkovitosti (33). Ob vklopu aparata ADVIA Autoslide se v avtomatskem podajalcu nosilcev v analizatorju ADVIA 2120i aktivira dodatna aspiracijska igla za odvzem vzorca krvi, potrebnega za izdelavo krvnega razmaza. ADVIA 2120i tako po analizi vsakega vzorca krvi vrednoti rezultate analize in v primeru izpolnitve kriterijev za MPKR ponovi postopek aspiracije še z dodatno aspiracijsko iglo. Zanimalo nas je, v kolikšni meri to vpliva na zmogljivost analizatorja ADVIA 2120i, zato smo analizirali poln nosilec z 10 naklju nimi epruvetami (Preglednica XV) in merili as analize z izklopljenim ter z vklopljenim aparatom ADVIA Autoslide.

Preglednica XV: seznam 10-ih naklju nih epruvet za vrednotenje asa analize

zap. št. vzorca	naro ene preiskave	izpolnjen kriterij za MPKR*
1	KS	ne
2	KS	ne
3	KS	ne
4	KS	LKCI $20,0 \times 10^9/L$
5	KS + DKS + RTC	ne
6	KS + DKS + RTC	LS+
7	KS + DKS	LS+
8	KS + DKS + RTC	LS+
9	KS + DKS + RTC	ATYP+
10	KS	LKCI $20,0 \times 10^9/L$

Iz preglednice XVI je razvidno, da dodatni aspiracijski postopki za izdelavo krvnega razmaza vplivajo na zmogljivost analizatorja ADVIA 2120i. Proizvajalec navaja, da je njegova zmogljivost ob izklopljenem aparatu ADVIA Autoslide približno 120 vzorcev/uro, e sta naro eni preiskavi krvna slika in DKS oz. približno 74 vzorcev/uro, e je pri vseh vzorcih naro ena še dolo itev retikulocitnih parametrov (6). Ugotovili smo, da je bil as analize desetih testiranih epruvet ob vklopljenemu aparatu ADVIA Autoslide, daljši za dobri dve minuti, kar zmanjša zmogljivost analizatorja ADVIA 2120i za približno 20 % (iz prib. 80-ih vzorcev/uro na prib. 63 vzorcev/uro).

Preglednica XVI: Primerjava časa analize z analizatorjem ADVIA 2120i z izklopljenim in vklopljenim aparatom ADVIA Autoslide

izklopljen ADVIA Autoslide		vklopljen ADVIA Autoslide	
	čas od začetka analize [min:s]		čas od začetka analize [min:s]
začetek analize	0:00	začetek analize	0:00
aspiracija vz. 1	1:34	aspiracija vz. 1	1:33
aspiracija vz. 2	2:06	aspiracija vz. 2	2:06
aspiracija vz. 3	2:35	aspiracija vz. 3	2:35
aspiracija vz. 4	3:05	aspiracija vz. 4	3:07
aspiracija vz. 5	3:39	aspiracija vz. 5	3:36
aspiracija vz. 6	4:08	aspiracija vz. 6	4:26
aspiracija vz. 7	4:55	aspiracija vz. 4 za DKS	5:10
aspiracija vz. 8	5:44	aspiracija vz. 7	5:18
aspiracija vz. 9	6:36	aspiracija vz. 8	5:48
aspiracija vz. 10	7:21	aspiracija vz. 9	6:33
zaključek analize	7:46	aspiracija vz. 6 za DKS	6:38
zmogljivost analizatorja ADVIA 2120i	prib. 80 vzorcev/uro	aspiracija vz. 10	7:32
		aspiracija vz. 7 za DKS	8:08
		aspiracija vz. 8 za DKS	8:40
		aspiracija vz. 9 za DKS	9:10
		aspiracija vz. 10 za DKS	9:38
		zaključek analize	9:55
		zmogljivost analizatorja ADVIA 2120i	prib. 63 vzorcev/uro

Vrednotili smo tudi celotni čas analize (ang. turn-around time - TAT). V TAT smo zajeli čas elektronske določitve krvne slike in DKS ter čas izdelave, barvanja in MPKR s standardno in avtomatizirano metodo. Za analizo smo izbrali 10 naključnih vzorcev, z razponom števil nekoncentracije levkocitov od $6,1$ do $41,8 \times 10^9/L$, vsi vzorci pa so tudi izpolnjevali kriterije za MPKR. Pri treh vzorcih je bila potrebna še kontrolna določitev krvne slike zaradi visoke številne koncentracije levkocitov.

Preglednica XVII: Primerjava TAT s standardno in avtomatizirano metodo

analiza s standardno metodo		analiza z avtomatizirano metodo	
	as od za etka analize [min]		as od za etka analize [min]
za etek elektronske dolo itve KS in DKS	0	za etek elektronske dolo itve KS in DKS	0
zaklju ek elektronske dolo itve KS in DKS	7	za etek izdelave krvnih razmazov	4
potrditev rezultatov v LIS in za etek kontrolne dolo itve KS pri treh vzorcih	16	za etek barvanja krvnih razmazov	8
za etek izdelave krvnih razmazov	16	zaklju ek elektronske dolo itve KS in DKS	10
zaklju ek izdelave krvnih razmazov	20	zaklju ek izdelave krvnih razmazov	14
zaklju ek kontrolnih dolo itev KS in potrditev rezultatov v LIS	25	potrditev rezultatov v LIS in za etek kontrolne dolo itve KS pri treh vzorcih	19
za etek izdelave krvnih razmazov iz kontroliranih vzorcev	25	zaklju ek kontrolnih dolo itev KS in potrditev rezultatov v LIS	28
zaklju ek izdelave krvnih razmazov iz kontroliranih vzorcev in za etek sušenja krvnih razmazov	27	tiskanje QR kod	28
za etek barvanja krvnih razmazov	57	zaklju ek barvanja in za etek sušenja krvnih razmazov ter lepljenja QR kod	31
zaklju ek barvanja in za etek sušenja krvnih razmazov	77	za etek MPKR	39
za etek MPKR	82	zaklju ek MPKR	86
zaklju ek MPKR	121		
as elektronske dolo itve KS in DKS [min]	25	28	
as izdelave in barvanja krvnih razmazov [min]	82	39	
as MPKR [min]	39	47	
TAT [min]	121	86	

5. RAZPRAVA

5.1. ELEKTRONSKA DOLOITEV DIFERENCIALNE KRVNE SLIKE

Delež MPKR je v najveji meri odvisen od opozoril, ki jih poda hematološki analizator (34). Več kot 62 % MPKR naj bi bilo nepotrebnih zaradi lažno pozitivnih opozoril analizatorja (8), zato je potrebna prilagoditev kriterijev za mikroskopsko doloitev DKS do te mere, da se ob imanju manjšem številu lažno negativnih rezultatov doseže imanje manjše števila pregledanih krvnih razmazov (13). Kriteriji za izpolnitev posameznega opozorila analizatorja ADVIA 2120i bi bili idealni, v kolikor bi vsi rezultati bili resni no pozitivni in resni no negativni (30). Hematološki analizatorji so zasnovani tako, da podajo imanje manjši delež lažno negativnih rezultatov, da ne spregledamo morebitnih kvalitativnih sprememb krvnih celic (12). Visoka ob utljivost je pomembna predvsem za zdravstvene ustanove na primarni ravni, kjer je potrebno presejanje prebivalstva, v ustanovah na sekundarni in terciarni ravni pa je zaradi večjega števila obolelih preiskovancev in zahtevanih krajskih asov analize bolj zaželena višja specifičnost opozoril (34). Pri opredelitvi kriterijev za posamezno opozorilo je priporočeno zvišanje kriterija, v kolikor delež lažno pozitivnih rezultatov presegne 40 %, pri deležu lažno negativnih rezultatov, več jem od 35 %, pa je priporočeno znižanje kriterija za izpolnitev opozorila (30). Ugotovili smo, da so kriteriji za izpolnitev posameznega opozorila hematološkega analizatorja ustrezni, saj imajo opozorila zadostno ob utljivost in visoko specifičnost.

5.2. IZDELAVA IN BARVANJE KRVNIH RAZMAZOV Z AVTOMATIZIRANO METODO

Pri prilaganju izdelave krvnih razmazov z aparatom ADVIA Autoslide smo z uporabo dodatnih profilov dosegli dokaj standardizirano izdelavo ustreznih krvnih razmazov. Vsi razmazi so imeli v primerjavi z ročno narejenimi razmazi opazno večje področje ustrezno za diferenciacijo. Pri vzorcih z nizkim in visokim hematokritom smo z ustreznim zvišanjem oz. znižanjem hitrosti potega sicer dosegli želeno dolžino razmazov med 31 in 39 mm, vendar bi bile smiselne določene nadgradnje programske opreme s strani

proizvajalca. Vsi vzorci s hematokritom 30,0 % so namre izdelani z enakimi nastavivami (profil Low HCT), eprav je lahko hematokrit pri enem vzorcu 18 %, pri drugem pa 28 %. Posledica tega so razli no dolgi oz. razli no debeli krvni razmazi. Boljša rešitev bi bila individualna prilagoditev nastavitev profila za vsak vzorec posebej, glede na izmerjeno vrednost hematokrita ter števil no koncentracijo levkocitov ali pa vsaj razdelitev vsakega posameznega profila na podrazrede (npr. profil Low HCT dodatno razdeljen na podrazrede z razli nimi vrednostmi hematokrita 15-20 %, 21-25 %, 26-30 %,...).

Standard H20-A opredeljuje, da naj bi bilo v ustrezeno izdelanem krvnem razmazu do 2 % Gumprechtovih senc in ostalih mehansko poškodovanih celic, razen pri limfoproliferativnih obolenjih, kjer so Gumprechtove sence številnejše (26). Ker smo v veini primerov kot mehansko poškodovane celice prepoznali limfocite, bi lahko ta pojav vplival na lažno prenizek delež limfocitov v DKS. Še posebej je bilo veje število Gumprechtovih senc opazno pri preiskovancih s krono no limfocitno levkemijo, kjer je v krvnih razmazih, izdelanih z aparatom ADVIA Autoslide povprečno 2,7-krat več Gumprechtovih senc kot v razmazih, izdelanih s standardno metodo. Tudi Bron in sodelavci so pri vrednotenju avtomatiziranega sistema za izdelavo in barvanje krvnih razmazov drugega proizvajalca ugotovili, da je število Gumprechtovih senc v izdelanih krvnih razmazih tudi do trikrat višje (35). Smiselno bi bilo, da bi proizvajalec omogočil nastavitev moči pritiska traku za izdelavo razmazov, saj bi s tem lahko omejili pretirano mehansko poškodbo celic.

Velika pomanjkljivost programske opreme analizatorja ADVIA 2120i in aparata ADVIA Autoslide je, da ADVIA Autoslide izdela krvni razmaz na osnovi izpolnjenega kriterija za MPKR (vzorci z znižano ali povišano številno koncentracijo levkocitov ali trombocitov ter povišanim RDW ali MCV), tudi kadar DKS v LIS ni naročena in zato MPKR ni potreben. Tako je bilo v dopoldanski izmeni izdelanih in obarvanih kar do 50 % odveznih krvnih razmazov. Posledica so nepotrebitno nastali stroški ter veja obremenjenost analizatorja in aparata.

5.3. PRIMERJAVA STANDARDNE IN AVTOMATIZIRANE METODE

Preglednica XVIII: Korelacijski koeficienti za posamezne vrste levkocitov v študijah drugih avtorjev (13, 36, 37, 38)

	korelacijski koeficienti (R^2)				
	naši rezultati (do 200 levkocitov)	Yu in sod.	Briggs in sod.	Ceelie in sod.	Kratz in sod.
segmentirani nevtrofilni granulociti	0,94	0,91	0,99	0,95	0,88
limfociti	0,94	0,90	0,96	0,94	0,94
monociti	0,76	0,82	0,81	0,70	0,67
eozinofilni granulociti	0,75	0,77	0,67	0,85	0,73
bazofilni granulociti	0,53	0,56	0,05	/	/
nesegmentirani nevtrofilni granulociti	0,85	0,89	/	0,80	0,69
blasti	0,997	0,977	0,995	0,984	/

Pri primerjavi korelacijskih koeficientov s študijami drugih avtorjev (Preglednica XVIII) smo ugotovili, da so korelacijski koeficienti za posamezne vrste levkocitov med seboj precej podobni, kljub temu, da je imelo na rezultate različnih študij vpliv zelo veliko dejavnikov (število preiskovancev, preiskovana populacija, statistične omejitve zaradi različnih izvajalcev in celokupnega števila diferenciranih levkocitov, različni postopki analize, aparati za izdelavo krvnih razmazov in mikroskopske pregled,...).

5.4. PRE-DIFERENCIACIJA SISTEMA CELLAVISION DM1200

CellaVision DM1200 pri sedmih levkopenih vzorcih ni opravil pre-diferenciacije do 200 levkocitov, zato smo krvne razmaze analizirali večkrat zaporedoma. Sistem pri ponovni analizi istega krvnega razmaza sicer ne izbere popolnoma enakega področja za

diferenciacijo, je pa lahko določen delež celic ponovno diferenciran, kar vpliva na zanesljivost rezultatov. Ustreznejša rešitev bi bila, da bi aparat ADVIA Autosite pri levkopeni nih vzorcih samodejno izdelal dva oz. več krvnih razmazov, ki bi jih nato analizirali s sistemom Cellavision. Glavni razlog za nedoseženo celokupno število prediferenciranih levkocitov so verjetno bili pretanki razmazi, saj je bil poleg zelo nizke številne koncentracije levkocitov zelo nizek tudi hematokrit. Vpliv hematokrita je opazen pri vzorcih 3 in 4 ter 6 in 7, navedenih v preglednici XIV, pri katerih je ob enaki številni koncentraciji levkocitov število prediferenciranih levkocitov sorazmerno višje z višjo vrednostjo hematokrita.

5.5. AS ANALIZE

Iz preglednice XVII je razvidno, da je bil TAT za analizo desetih testiranih vzorcev z uporabo avtomatizirane metode krajši za 35 minut. Glavna prednost avtomatizirane metode je, da se krvni razmazi za nejo izdelovati in barvati že takoj po elektronski določitvi krvne slike, in sicer že po 4 oz. 8 minutah od začetka analize. Tako je bil krvni razmaz iz prvega vzorca izdelan in pobaran že po 25 minutah od začetka analize, MPKR pa so se z uporabo avtomatizirane metode pričakovali 43 minut prej. Zaradi zaključka barvanja krvnih razmazov do začetka MPKR je lahko v določenih okoliših tudi ob utnočju daljši, saj v dopoldanski izmeni, ko je število analiz največje, avtomatski podajalec hematološkega analizatorja običajno deluje neprekinjeno, stojalo s pobarvanimi krvnimi razmazi pa se samodejno izvrže šele, ko je povsem napolnjeno. Stojalo z razmazi lahko z ukazom preko programske opreme sicer lahko izvržemo tudi ročno, vendar le, če je hematološki analizator v mirovanju, kar pa vpliva na prečinkost delovanja hematološkega analizatorja. Smiselna bi bila prilagoditev izhoda za izdelane krvne razmaze, skozi katerega bi lahko pobaran krvni razmaz takoj vzeli ali pa prilagoditev programske opreme do temer, da bi bilo izvrženje stojala z razmazi omogočeno neodvisno od delovanja hematološkega analizatorja.

Uporaba analizatorja Cellavision DM1200 ni pripomogla k krajšemu TAT, saj je bil potreben za prediferenciacijo in ponovno diferenciacijo vseh desetih vzorcev celo za 8 minut doljši od standardne metode. Potrebno pa je poudariti, da je bil Cellavision DM1200 nastavljen na prediferenciacijo 200-ih levkocitov, torej dvakrat več kot pri analizi s standardno metodo. V primeru, da bi Cellavision DM1200 nastavili na prediferenciacijo 100-ih levkocitov, bi bil potreben za MPKR desetih krvnih razmazov namesto 47

minut (povprečno 4,7 min/razmaz, zmogljivost 12 razmazov/uro) predvidoma le 28 minut (povprečno 2,8 min/razmaz, zmogljivost 21 razmazov/uro). Pre-diferenciacijo je upoštevila tudi prisotnost artefaktov v krvnih razmazih. Povprečno število artefaktov v krvnem razmazu je bilo 12,5 %, z vrednostmi od 0 % do kar 147 %. Vzroka za relativno visoko povprečno število artefaktov nismo odkrili, je pa njihov pojav povsem naključen (npr. v seriji izdelanih razmazov je bilo v prvem razmazu 3 % artefaktov, v drugem 90 %, v tretjem spet 2 %).

Izmerjene čase za MPKR z aparatom Cellavision DM1200 smo primerjali tudi s študijami drugih avtorjev. Briggs in sodelavci so za razmaz mikroskopsko določili DKS desetih vzorcev do 100 levkocitov potrebovali v povprečju 5,8 min/razmaz (analiziranih 10 razmazov/uro), z uporabo sistema Cellavision pa 2,7 min/razmaz (zmogljivost 22 razmazov/uro) (13). Ceele in sodelavci so za razmaz mikroskopsko določili DKS osmih vzorcev do 100 levkocitov potrebovali v povprečju 4,2 min/razmaz (analiziranih 14 razmazov/uro), z uporabo sistema Cellavision pa 3,2 min/razmaz (zmogljivost 18 razmazov/uro). Vrednotili so tudi hitrost pre-diferenciacije v odvisnosti od celokupnega števila diferenciranih levkocitov; za pre-diferenciacijo 100 levkocitov je sistem potreboval 1,51 min/razmaz (zmogljivost 40 razmazov/uro), za pre-diferenciacijo 200 levkocitov je sistem potreboval 1,95 min/razmaz (zmogljivost 31 razmazov/uro), za pre-diferenciacijo 400 levkocitov pa je sistem potreboval 2,80 min/razmaz (zmogljivost 21 razmazov/uro) (38). S tem so potrdili naše ugotovitve, da čas pre-diferenciacije ni sorazmerno daljši s celokupnim številom diferenciranih levkocitov, saj je bil čas pre-diferenciacije ob štirikratnem povišanju celokupnega števila diferenciranih levkocitov le približno dvakrat daljši. Kratz in sodelavci pa pri uporabi sistema Cellavision niso zabeležili krajevih asov analize; povprečen čas analize s standardno metodo je bil 5,1 min/razmaz (zmogljivost 11 razmazov/uro), čas analize s sistemom Cellavision pa 6,4 min/razmaz (zmogljivost 9 razmazov/uro). Domnevajo, da je razlog neizkušenost pri delu s sistemom, medtem ko so imeli pri uporabi standardne metode izvajalci dolgoletne izkušnje (33). Nekateri avtorji so ugotovili tudi, da so neizkušeni izvajalci preiskave z uporabo sistema Cellavision prihranili veliko večas kot z uporabo standardne metode, medtem ko razlike v asovnih prihrankih niso bile tako velike pri izvajalcih z dolgoletnimi izkušnjami (13, 33). Pri interpretaciji zgornjih rezultatov je potrebno poudariti, da načine analize vplivajo številni dejavniki, med pomembnejšimi števil na koncentracija levkocitov, zahtevnost vzorca, izkušenost izvajalca ter uporabljeni analizatorji. Proizvajalec navaja, da je zmogljivost

sistema Cellavision DM1200 pri pre-diferenciaciji do 100 levkocitov ter oceni eritrocitne krvne slike in števil ne koncentracije trombocitov 20 krvnih razmazov/uro, zmogljivost sistema Cellavision DM96, ki je bil uporabljen v zgoraj omenjenih študijah, pa je skoraj dvakrat veja, in sicer 35 krvnih razmazov/uro.

6. SKLEP

1. Kriteriji za izvedbo MPKR glede na posamezna opozorila hematološkega analizatorja so ustrezni, saj imajo opozorila zadostno ob utljivost in visoko specifi nost. Ob utljivost opozoril (razen opozorila ATYP) je bila v primerjavi z avtomatizirano metodo, ob praktično enaki specifi nosti kot pri standardni metodi, višja za 10 do 15 %.
2. Z določitvijo in nastavitev dodatnih profilov za izdelavo krvnega razmaza v programski opremi aparata ADVIA Autosite smo dosegli dokaj standardizirano izdelavo krvnih razmazov iz vzorcev z različnim hematokritom in številno koncentracijo levkocitov. Idealna bi bila avtomska individualna prilagoditev nastavitev profila za vsak vzorec posebej. Proizvajalec bi moral odpraviti tudi pomanjkljivost v programski opremi aparata ADVIA Autosite, saj je bilo v posamezni izmeni izdelanih in obarvanih kar do 50 % odveznih krvnih razmazov, pri katerih MPKR ni bil potreben.
3. V krvnih razmazih, izdelanih z aparatom ADVIA Autosite, je več Gumprechtovih senc in ostalih mehansko poškodovanih celic. Pri preiskovancih s krono no limfocitno levkemijo je v krvnih razmazih, izdelanih z aparatom ADVIA Autosite, povprečno 2,7-krat več Gumprechtovih senc kot v razmazih izdelanih s standardno metodo.
4. Ustrezno obarvanost celic v krvnih razmazih smo dosegli z uporabo Merckovih barvil May-Grünwald in Giemsa ter s fosfatnim pufom Modified Wright's buffer, proizvajalca Siemens Healthcare Diagnostics. Najustreznejša koncentracija delovne raztopine Giemse je 8 %.
5. Koreacijski koeficienti pri primerjavi rezultatov DKS, pridobljenih s standardno in avtomatizirano metodo, so pri akutno višji, e s sistemom CellVision izvedemo diferenciacijo do 200 levkocitov, namesto do 100. Skupine celic, ki imajo nizko frekvenco pojavljanja, imajo slabše koreacijske koeficiente. Razlog so statistične omejitve ter vpliv napake zaradi neenakomerne razporeditve celic in napake zaradi nepravilne prepoznavane celic.

6. To nost pre-diferenciacije sistema Cellavision DM1200 je velika pri segmentiranih nevtrofilnih granulocitih, limfocitih, monocitih, bazofilnih granulocitih in blastih. To nost pre-diferenciacije segmentiranih nevtrofilnih granulocitov in limfocitov lahko še izboljšamo z izklopom pre-diferenciacije nesegmentiranih nevtrofilnih granulocitov in reaktivnih/atipi nih limfocitov. Sistem je uspešno opravil pre-diferenciacijo 200-ih levkocitov v vseh vzorcih s števil no koncentracijo levkocitov $> 1,5 \times 10^9/L$. Pri levkopeni nih vzorcih bi bila smiselna samodejna izdelava ve krvnih razmazov naenkrat.

7. Z uporabo avtomatizirane metode smo pravilno prepoznali veino morebitnih morfoloških nepravilnosti levkocitne, eritrocitne in trombocitne krvne slike, le v nekaterih primerih se je semi-kvantitativna ocena nepravilnosti razlikovala za eno stopnjo. Prepoznavanje različnih vključkov in rouleaux formacij s sistemom Cellavision DM1200 ni zanesljiva, zato je ob sumu na njihovo prisotnost potreben MPKR s svetlobnim mikroskopom.

8. Ob vklopljenemu aparatu ADVIA Autoslides je zmogljivost analizatorja ADVIA 2120i za približno 20 % manjša. TAT za analizo desetih testiranih vzorcev je bil z uporabo avtomatizirane metode krajši za 35 minut. Glavna prednost avtomatizirane metode je, da se krvni razmazi za nejo izdelovati in barvati že takoj po elektronski določitvi krvne slike.

9. Avtomatiziran sistem za izdelavo, barvanje in mikroskopski pregled krvnega razmaza daje primerljive rezultate s standardno metodo, as analize pa je krajši, kar ima pozitiven vpliv na stroškovno inkovitost. Za natančnejše vrednotenje stroškovne inkovitosti bi v raziskavi morali upoštevati tudi cene reagentov in potrošnega materiala. Laboratorijsko osebje sistem razbremeniti deloma, saj je pri MPKR še vedno potrebno pregledati vse krvne celice in jih po potrebi prerazporediti, zaradi omenjenih omejitev pa avtomatiziran sistem v medicinskem laboratoriju ne more v celoti nadomestiti standardne metode.

7. LITERATURA

1. Berce K, Božnar Ali E, Podgornik H, Trampuš Bakija A, Žontar D: Priporo eni postopki za mikroskopski pregled krvnega razmaza, Slovensko združenje za klinično kemijo (SZKK), Ljubljana, 2012: 3-20.
2. Houwen B: The differential cell count. Laboratory Hematology 2001; 7: 89-100.
3. Kim JE, Kim BR, Woo KS, Han JY: Evaluation of the leukocyte differential on a new automated flow cytometry hematology analyzer. Int J Lab Hematol 2012; 34: 547-550.
4. Gulati G, Song J, Florea AD, Gong J: Purpose and criteria for blood smear scan, blood smear examination and blood smear review. Ann Lab Med 2013; 33: 1-7.
5. Božnar Ali E: Hematološki analizatorji Advia - zbornik predavanj, Hematološko laboratorijsko združenje, Ljubljana, 2013: 25-26.
6. ADVIA 2120/2120i hematology systems - operator's guide, Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, New York, Združene države Amerike, 2010: 12-15, 26-31, 121-140, 145, 149, 274-342, 364-375, 388-405, 410, 417-420, 428-439, 460.
7. 510(k) substantial equivalence determination - decision summary, U.S. Food and Drug Administration, Silver Spring, Maryland, Združene države Amerike, 2006: 1, 5.
8. Roussel M, Benard C, Ly-Sunnaram B, Fest T: Refining the white blood cell differential: the first flow cytometry routine application. Cytometry Part A 2010; 77A: 552-563.
9. Cherian S: Flow cytometry in the hematology lab: the flow cytometry WBC differential. International Clinical Cytometry Society 2011; 2: 1-4.
10. Jo Y: Reliable, accurate determination of the leukocyte differential of leukopenic samples by using Hematoflow method. Korean J Lab Med 2011; 31: 131-137.

11. Park BG, Park CJ, Kim S, Yoon CH, Kim DH, Jang S, Chi HS: Comparison of the Cytodiff flow cytometric leucocyte differential count system with the Sysmex XE-2100 and Beckman Coulter UniCel DxH 800. *Int J Lab Hematol* 2012; 34: 584-593.
12. Barnes PW, McFadden SL, Machin SJ, Simson E. The international consensus group for hematology review: Suggested criteria for action following automated CBC and WBC differential analysis. *Laboratory Hematology* 2005; 11: 83-90.
13. Briggs C, Longair I, Slavik M, Thwaite K, Mills R, Thavaraja V, Foster A, Romanin D, Machin SJ: Can automated blood film analysis replace the manual differential? An evaluation of the Cellavision DM96 automated image analysis system. *Int J Lab Hematol* 2009; 31: 48-60.
14. Houwen B: Blood film preparation and staining procedures. *Laboratory Hematology* 2000; 6: 1-7.
15. Dacie JV: Practical hematology, 6. izdaja, Churchill Livingstone, New York, Združene države Amerike, 1984: 39, 50-52.
16. Buttarello M, Plebani M. Automated blood cell counts. *Am J Clin Pathol* 2008; 130: 104-116.
17. HemaPrep - product details. J.P. Gilbert, Boyertown, Pennsylvania, Združene države Amerike, 2014. Dostopno na: <http://www.hemaprep.com/contact/> <24.01.2014>
18. Simson E, Gascon-Lema MG, Brown DL. Performance of automated-slidemakers and stainers in a working laboratory environment - routine operation and quality control. *Int J Lab Hematol* 2009; 32: 64-76.
19. ADVIA 2120i Hematology system with Autoslide. Siemens AG, München, Nemija, 2014. Dostopno na povezavi:
<http://www.healthcare.siemens.com/hematology/systems/advia-2120-hematology-system-with-autoslide> <24.01.2014>

20. Sysmex SP-1000i Automated hematology slide preparation unit. Sysmex America, Lincolnshire, Illinois, Združene države Amerike, 2014. Dostopno na povezavi:
<https://www.sysmex.com/US/en/Products/Hematology/Sysmex-Hematology-Automation/Pages/SP-1000-Side-Maker-Stainer.aspx> <24.01.2014>
21. Horiba SPS Evolution. Horiba, Kyoto, Japonska, 2014. Dostopno na povezavi:
<http://www.horiba.com/medical/products/hematology/abx-pentra-120/abx-pentra-120-retic-sps-details/sps-evolution/> <24.01.2014>
22. Beckman Coulter DxH SMS. Beckman Coulter, Brea, Kalifornija, Združene države Amerike, 2014. Dostopno na povezavi:
https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/wsrportal.portal?_nfpb=true&_windowLabel=UCM_RENDERER&_urlType=render&wlpUCM_RENDERER_path=%2Fwsr%2Fdiagnostics%2Fclinical-products%2Fhematology%2Funicel-dxh-slidemaker-stainer-coulter-cellular-analysis-system%2Findex.htm <24.01.2014>
23. Cell-Dyn SlideMaker/Stainer. Abbott Diagnostics, Abbott Park, Illionis, Združene države Amerike, 2014. Dostopno na povezavi:
http://www.abbottdiagnostics.com.au/products/instruments_by_platform/default.cfm?sys_id=20 <24.01.2014>
24. Lewis SM, Rousoe U: Standardized Romanowsky staining of blood and bone marrow films, World Health Organization, 1986: 1.
25. Bain BJ: Blood cells - A practical guide, 4. izdaja, Blackwell publishing, Oxford, Velika Britanija, 2006: 13-14, 28-30, 63.
26. Koepke JA, Bentley SA, Pierre RV, Richardson-Jones A, Ross DW, Saunders AM, Simson E, van Assendfelt OW, Wilding P: Approved standard H20-A; Reference leukocyte differential count (proportional) and evaluation of instrumental methods. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pennsylvania, Združene države Amerike, 1992: 1, 4-8, 13, 14, 17, 35-37.

27. Jones AR, Twedt D, Hellman R: Absolute versus proportional differential leucocyte counts. *Clin Lab Haematol* 1995; 17: 115-123.
28. Hagner R: The manual differential enters the digital age. *Medical laboratory observer*, Sarasota, Florida, Združene države Amerike, 2012. Dostopno na povezavi:
<http://www.mlo-online.com/articles/201205/the-manual-differential-enters-the-digital-age.php>. <24.01.2014>
29. Hoffman H: How useful are haematology analyzer flags? *Clin Chem Lab Med* 2004; 42(4): 357-358.
30. Merritt P: To diff or not to diff - a guide to truth table analysis. Beckman Coulter, Miami, Florida, Združene države Amerike, 2013. Dostopno na povezavi:
http://c.ymcdn.com/sites/www.clma.org/resource/group/31D2EB56-F567-40B3-98E1-DE3CF2371997/to_diff_or_not_to_diff_feb20.pdf <24.01.2014>
31. Cellavision DM1200 - Navodila za uporabo, Cellavision AB, Lund, Švedska, 2012: 10-15, 25-28, 44-45, 118-120, 141-142, 154-155.
32. Kang SH, Kim HK, Ham CK, Lee DS, Cho HI. Comparison of four hematology analyzers, CELL-SYN Sapphire, ADVIA 120, Coulter LH 750 and Sysmex XE-2100, in terms of clinical usefulness. *Int J Lab Hematol* 2008; 30: 480-486.
33. Kratz A, Bengtsson HI, Casey JE, Keefe JM, Beatrice GH, Grzybek DY, Lewandrowski KB, Van Cott EM. Performance evaluation of the Cellavision DM96 system. *Am J Clin Pathol* 2005; 124: 770-781.
34. Kim SJ, Kim Y, Shin S, Song J, Rak Choi J. Comparison study of the rates of manual peripheral blood smear review from 3 automated hematology analyzers, Unicel DxH 800, ADVIA 2120i, and XE 2100, using international consensus group guidelines. *Arch Pathol Lab Med* 2012; 136: 1408-1413.

35. Bron JW, Jellema G, Noordervliet R, Reymer F, Baelde HA, Paauwe J, den Ottolander GJ, Kluin-Nelemans HC. Improved performance of the automated slide preparation unit, Sysmex SP-100. *Sysmex Journal International* 2000; 10: 71-76.
36. Yu H, Young Ok C, Hesse A, Nordell P, Connor D, Sjostedt E, Pechet L, Snyder M. Evaluation of an automated digital imaging system, Nextslide digital review network, for examination of peripheral blood smears. *Arch Pathol Lab Med* 2012; 136: 660-667.
37. Park SH, Park CJ, Choi MO, Kim MJ, Cho YU, Jang S, Chi HS. Automated digital cell morphology identification system (CellaVision DM96) is very useful for leukocyte differentials in specimens with qualitative or quantitative abnormalities. *Int J Lab Hematol* 2013; 35: 517-527.
38. Ceelie H, Dinkelaar RB, van Gelder W. Examination of peripheral blood films using automated microscopy; evaluation of Diffmaster Octavia and Cellavision DM96. *J Clin Pathol* 2006; 60: 72-79.

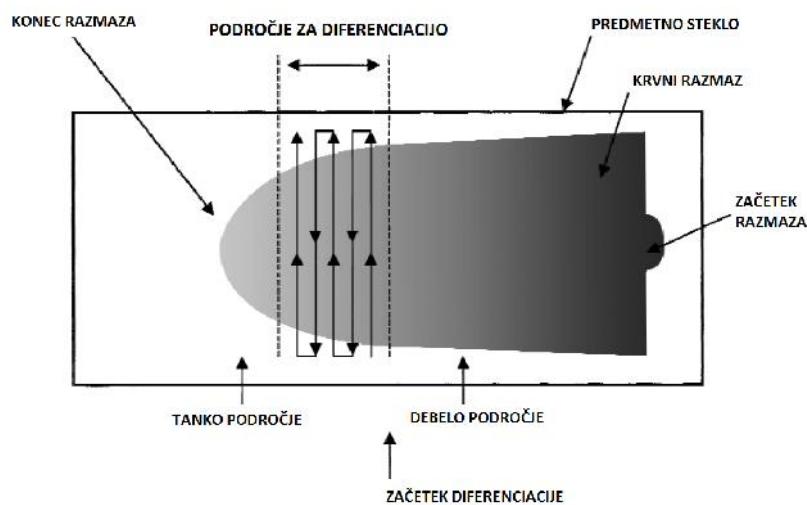
PRILOGA I

IZHODIŠ NI KRITERIJI ZA MIKROSKOPSKO DOLOITEV DKS (1)

ODSTOPANJA OD ŠTEVIL NIH VREDNOSTI	
št. konc. levkocitov	$< 3,0 \times 10^9/L$
	$> 20 \times 10^9/L$
št. konc. nevtrofilnih granulocitov	$< 1,0 \times 10^9/L$
	$> 20 \times 10^9/L$
št. konc. limfocitov	$> 5,0 \times 10^9/L$
št. konc. monocitov	$> 1,5 \times 10^9/L$
št. konc. eozinofilnih granulocitov	$> 2,0 \times 10^9/L$
št. konc. bazofilnih granulocitov	$> 0,5 \times 10^9/L$
št. konc. trombocitov	$< 100 \times 10^9/L$
	$> 1000 \times 10^9/L$
OPOZORILA HEMATOLOŠKEGA ANALIZATORJA	
nezna ilni ali nezreli levkociti	
eritroblasti	
spremenjene morfološke lastnosti eritrocitov	
veliki trombociti ali trombocitni agregati	

PRILOGA II

KRVNI RAZMAZ Z OZNA ENIM USTREZNIM PODRO JEM ZA
DIFERENCIACIJO (prijejeno po 5)



PRILOGA III

**OBARVANOST POSAMEZNIH CELI NIH STRUKTUR NAJPOGOSTEJŠIH
CELI NIH VRST, OBARVANIH PO MGG (32)**

CELI NA VRSTA	STRUKTURA CELICE	BARVA
nevtrofilni granulociti	jedro citoplazma granulacija	temno vijoli na rožnata svetlo vijoli na
limfociti	jedro citoplazma	temno vijoli no svetlo modra
monociti	jedro citoplazma granulacija	svetlo vijoli na sivo modra rožnato vijoli na
eozinofilni granulociti	jedro citoplazma granulacija	svetlo modro vijoli na modro rožnata oranžna
bazofilni granulociti	jedro citoplazma granulacija	modro vijoli na svetlo rožnata temno vijoli na
trombociti	citoplazma granulacija	svetlo modra modra do modro vijoli na
eritrociti		rožnata