

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MIA ŠPIRANEC

## **DIPLOMSKA NALOGA**

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MIA ŠPIRANEC

**PRIMERJALNO VREDNOTENJE ŠTEVILA TROMBOCITOV V  
VZORCIH VENSKE IN KAPILARNE KRVI KOT NAPOVEDNIH  
KAZALNIKOV IZPLENA TROMBOFEREZ**

Ljubljana, 2014

Diplomsko delo sem opravljala na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino pod mentorstvom izr. prof. dr. Matjaža Jerasa, mag. farm., in somentorstvom mag. Marka Cukjatija, dr. med. spec. transf. med.

### **Zahvale**

Zahvaljujem se mentorju izr. prof. dr. Matjažu Jerasu, mag. farm., za koristne nasvete pri praktičnem in pisnem delu. Zahvala gre tudi vsem zaposlenim na Zavodu za transfuzijsko medicino, predvsem Sonji Schweiger za pomoč pri laboratorijskem delu.

Posebno zahvalo posvečam svoji družini, ki me je spodbujala skozi celoten študij. Zahvaljujem se fantu Romanu, ki mi je stal ob strani in me spodbujal pri pripravi diplomske naloge.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Matjaža Jerasa, mag. farm.

Mia Špiranec

Ljubljana, 2014

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Janko Kos

Član diplomske komisije: doc. dr. Simon Žakelj

# VSEBINA

KAZALO SLIK .....	III
KAZALO PREGLEDNIC.....	VI
POVZETEK.....	IX
SEZNAM OKRAJŠAV .....	XII
1 UVOD .....	1
1.1 KRI .....	1
1.1.1 VENSKA KRI.....	1
1.1.2 ARTERIJSKA IN KAPILARNA KRI.....	1
1.2 TROMBOCITI.....	2
1.2.1 ŠTEVILO TROMBOCITOV V KRVI .....	3
1.2.2 METABOLIZEM TROMBOCITOV.....	4
1.2.3 FUNKCIJE TROMBOCITOV.....	4
1.2.4 FIZIOLOGIJA IN PATOFIZIOLOGIJA HEMOSTAZE.....	5
1.3 PRIDOBIVANJE TROMBOCITOV .....	7
1.3.1 AFEREZA .....	8
1.4 TERAPEVTSKA UPORABA TROMBOCITOV .....	9
1.5 HEMATOLOŠKI ANALIZATOR CELL-DYN RUBY.....	10
1.5.1 DELOVANJE.....	10
1.5.2 HEMOGRAM.....	11
2 NAMEN DELA.....	16
3 MATERIALI IN METODE .....	17
3.1 MATERIALI .....	17
3.1.1 BIOLOŠKI VZORCI.....	17
3.1.2 REAGENTI .....	17

LABORATORIJSKA OPREMA IN MATERIALI.....	19
3.2 METODE .....	19
3.2.1 PRIPOROČILA ZA ODVZEM VZORCEV KAPILARNE KRVI.....	19
3.2.2 PRIPOROČILA ZA ODVZEM VZORCEV VENSKE KRVI .....	20
3.2.3 MERJENJE VZORCEV KRVI S HEMATOLOŠKIM ANALIZATORJEM CELL-DYN RUBY ...	22
3.2.4 STATISTIČNE ANALIZE.....	25
4 REZULTATI IN RAZPRAVA .....	27
4.1 REZULTATI MERITEV ŠTEVILA TROMBOCITOV V VZORCIH VENSKE IN KAPILARNE KRVI, ODVZETIH PO USTALJENEM POSTOPKU .....	27
4.2 REZULTATI MERITEV ŠTEVILA ERITROCITOV V VZORCIH VENSKE IN KAPILARNE KRVI, ODVZETIH PO USTALJENEM POSTOPKU .....	32
4.3 REZULTATI MERITEV ŠTEVILA LEVKOCITOV V VZORCIH VENSKE IN KAPILARNE KRVI, ODVZETIH PO USTALJENEM POSTOPKU .....	36
4.4 REZULTATI MERITEV ŠTEVILA TROMBOCITOV V VZORCIH VENSKE IN KAPILARNE KRVI PO OPTIMIZIRANEM POSTOPKU.....	40
4.4.1 REZULTATI MERITEV V NERAZREDČENIH KRVNIH VZORCIH .....	40
4.4.2 REZULTATI MERITEV V RAZREDČENIH KRVNIH VZORCIH.....	44
4.5 REZULTATI MERITEV ŠTEVILA ERITROCITOV V VZORCIH VENSKE IN KAPILARNE KRVI PO OPTIMIZIRANEM POSTOPKU.....	49
4.5.1 REZULTATI MERITEV V NERAZREDČENIH KRVNIH VZORCIH .....	49
4.5.2 REZULTATI MERITEV V RAZREDČENIH KRVNIH VZORCIH.....	53
4.6 REZULTATI MERITEV ŠTEVILA LEVKOCITOV V VZORCIH VENSKE IN KAPILARNE KRVI PO OPTIMIZIRANEM POSTOPKU.....	57
4.6.1 REZULTATI MERITEV V NERAZREDČENIH KRVNIH VZORCIH .....	57
4.6.2 REZULTATI MERITEV V RAZREDČENIH KRVNIH VZORCIH.....	61
5 SKLEP.....	65
6 LITERATURA.....	67

## KAZALO SLIK

Slika 1: Trombociti v krvnem razmazu, obarvani po Pappenheimu (May-Grünwald Giemsa) .....	3
Slika 2: Shematski prikaz fiziologije hemostaze .....	7
Slika 3: Celični ločevalec Amicus Cell Separator (Fenwal) .....	9
Slika 4: Hematološki analizator CELL-DYN Ruby (Abbott) .....	11
Slika 5: Prikaz odvzema kapilarne krvi .....	20
Slika 6: Prikaz venskega odvzema krvi .....	22
Slika 7: Epruveta za kapilarni odvzem z volumnom 200 $\mu$ L in z dodanim $K_3EDTA$ . .....	24
Slika 8: Epruveta za odvzem kapilarne krvi z volumnom 500 $\mu$ L in dodanim $K_2EDTA$ . .....	25
Slika 9: Grafični prikaz primerjave povprečnih vrednosti števila trombocitov, izmerjenih v vzorcih venske in kapilarne krvi; rezultata se med seboj statistično značilno razlikujeta ( $p < 0,0001$ ) (parametrični parni t-test).....	28
Slika 10: Poteka in enačbi premic linearne in Demingove regresije za trombocite. Vrednost $R^2 = 0,4292$ označuje srednje dobro prileganje premice (linearna regresija).....	29
Slika 11: Bland-Altmanov graf primerjave izmerjenega števila trombocitov v venski in kapilarni krvi. Razlike vrednosti so precej razpršene znotraj 95 % ujemanja, nekaj pa jih je celo nad njegovo zgornjo mejo ujemanja. ....	31
Slika 12: Grafični prikaz primerjave povprečnih vrednosti števila eritrocitov, izmerjenih v vzorcih venske in kapilarne krvi. Rezultati se med seboj statistično značilno razlikujejo ( $p = 0,0032$ ).....	33
Slika 13: Poteka in enačbi premic, določenih z linearno in Demingovo regresijo za eritrocite; vrednost $R^2 = 0,8867$ (linearna regresija).....	34
Slika 14: Grafični prikaz Bland-Altmanovega testa. Vidimo, da ni velikega sipanja razlik števila eritrocitov, določenih v venski in kapilarni krvi, in da je večji del rezultatov enakomerno razdeljen znotraj 95 % intervala ujemanja.....	35
Slika 15: Grafični prikaz primerjave povprečnih vrednosti števila levkocitov, izmerjenih v vzorcih venske in kapilarne krvi; rezultati se med seboj ne razlikujejo statistično značilno ( $p = 0,1433$ ). .	37
Slika 16: Poteka in enačbi premic, določenih z linearno in Demingovo regresijo za levkocite; $R^2 = 0,9464$ (linearna regresija).....	38
Slika 17: Bland-Altmanov graf. Vidimo, da znotraj 95 % intervala ujemanja ni velikega sipanja razlik števila levkocitov, določenih v venski in kapilarni krvi, glede na povečanje povprečnega števila celic.....	39

Slika 18: Grafični prikaz primerjave povprečnih vrednosti števila trombocitov, izmerjenih v vzorcih venske in kapilarne krvi; rezultati se med seboj ne razlikujejo statistično značilno ( $p = 0,0623$ ). .....	42
Slika 19: Poteka in enačbi premic, določenih z linearno in Demingovo regresijo za trombocite (nerazredčeni krvni vzorci); $R^2 = 0,8351$ kaže na dovolj dobro povezanost med spremenljivkama (linearna regresija). .....	43
Slika 20: Bland-Altmanov graf prikazuje razmeroma majhno sipanje vrednosti razlik števila trombocitov, določenih v nerazredčeni venski in kapilarni krvi, znotraj 95 % intervala ujemanja. 44	44
Slika 21: Grafični prikaz primerjave povprečnih vrednosti števila trombocitov, določenih v vzorcih razredčene venske in kapilarne krvi; rezultati so na meji statistično značilne razlike ( $p = 0,0482$ ). 46	46
Slika 22: Poteka in enačbi premic, določenih z linearno in Demingovo regresijo, za trombocite (razredčeni krvni vzorci). $R^2 = 0,6392$ je delež variance, ki si ga delita spremenljivki. Vidimo tudi precejššo razliko v poteku premic, pri čemer je tista, ki smo jo določili z Demingovo regresijo, ustrežnejša. ....	47
Slika 23: Bland-Altmanov graf: sipanje razlik vrednosti števila trombocitov v razredčeni venski in kapilarni krvi znotraj 95 % intervala ujemanja je večje kot v primeru nerazredčenih vzorcev. ....	48
Slika 24: Grafični prikaz primerjave povprečnih vrednosti števila eritrocitov, določenih v vzorcih nerazredčene krvi ( $p = 0,0160$ ). .....	50
Slika 25: Poteka in enačbi premic, določenih z linearno in Demingovo regresijo, za eritrocite (nerazredčeni krvni vzorci). $R^2 = 0,9071$ , kar kaže na veliko stopnjo skupne variance, ki si jo delita spremenljivki. ....	51
Slika 26: Bland-Altmanov graf: sipanje razlik vrednosti števila eritrocitov v nerazredčenih vzorcih venske in kapilarne krvi znotraj 95 % intervala ujemanja je enakomerno, kar kaže na primerljivost obeh vrst rezultatov. ....	52
Slika 27: Grafični prikaz primerjave povprečnih vrednosti števila eritrocitov, določenih v vzorcih razredčene krvi. Rezultati se med seboj statistično značilno razlikujejo ( $p < 0,0001$ ). ....	54
Slika 28: Poteka in enačbi premic, določenih z linearno in Demingovo regresijo, za eritrocite (razredčeni krvni vzorci); vrednost $R^2 = 0,1237$ , kar pomeni, da si spremenljivki delita le malo variance, poleg tega pa sta poteka premic zelo različna. ....	55
Slika 29: Bland-Altmanov graf: sipanje razlik vrednosti števila eritrocitov v razredčenih vzorcih venske in kapilarne krvi. Znotraj 95 % intervala ujemanja je izrazito nesimetrično in kaže na slabo primerljivost rezultatov. ....	56
Slika 30: Grafični prikaz primerjave povprečnih vrednosti števila levkocitov, določenih v vzorcih nerazredčene krvi. Rezultati se med seboj ne razlikujejo statistično značilno ( $p = 0,1178$ ). ....	58
Slika 31: Poteka in enačbi premic, določenih z linearno in Demingovo regresijo, za levkocite (nerazredčeni krvni vzorci); vrednost $R^2 = 0,7967$ (linearna regresija). ....	59

Slika 32: Grafični prikaz Bland-Altmanovega testa. Vidimo, da je sipanje razlik vrednosti števila levkocitov med nerazredčeno vensko in kapilarno krvjo enakomerno porazdeljeno znotraj 95 % intervala ujemanja. ....	60
Slika 33: Grafični prikaz primerjave povprečnih vrednosti števila levkocitov, določenih v vzorcih razredčene venske in kapilarne krvi. Rezultati se med seboj statistično značilno razlikujejo ( $p = 0,0003$ ). ....	62
Slika 34: Poteka in enačbi premic, določenih z linearno in Demingovo regresijo, za levkocite (razredčeni krvni vzorci); vrednost $R^2 = 0,5948$ (linearna regresija). ....	63
Slika 35: Bland-Altmanov graf, ki prikazuje majhno sipanje oziroma precej enakomerno porazdelitev v številu levkocitov, določenih v razredčenih vzorcih venske in kapilarne krvi. ....	64



## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Referenčne vrednosti hemograma .....	12
Preglednica 2: Kritične vrednosti hemograma .....	13
Preglednica 3a: Rezultati meritev števila trombocitov v venski in kapilarni krvi; navedene so povprečne vrednosti dvojnih meritev (n = 87). .....	27
Preglednica 3b: Prikaz osnovnih statističnih parametrov za meritev števila trombocitov. ....	28
Preglednica 4a: Izračun povprečja in razlike meritev števila trombocitov v venski in kapilarni krvi (n = 87). .....	30
Preglednica 4b: Povprečna vrednost odstopanja, njegove SD in 95 % intervala ujemanja, določenega z Bland-Altmanovim testom števila trombocitov, določenih v venski in kapilarni krvi. ....	30
Preglednica 5a: Rezultati meritev števila eritrocitov v venski in kapilarni krvi; prikazane so povprečne vrednosti dvojnih meritev (n = 91). .....	32
Preglednica 5b: Prikaz osnovnih statističnih parametrov za meritev števila eritrocitov. ....	32
Preglednica 6a: Povprečne vrednosti in razlike meritev števila eritrocitov v venski in kapilarni krvi (n = 91). .....	34
Preglednica 6b: Povprečna vrednost odstopanja, njegove SD in 95 % intervala ujemanja določenega z Bland-Altmanovim testom. ....	35
Preglednica 7a: Rezultati meritev števila levkocitov v venski in kapilarni krvi; prikazane so povprečne vrednosti dvojnih meritev (n = 90). .....	36
Preglednica 7b: Osnovni statistični parametri meritev števila levkocitov. ....	36
Preglednica 8a: Povprečne vrednosti in razlike meritev števila levkocitov v venski in kapilarni krvi, s katerimi smo izvedli Bland-Altmanov test in izrisali ustrezen graf (n = 90). .....	38
Preglednica 8b: Povprečna vrednost odstopanja, njegove SD in 95 % intervala ujemanja, določenega z Bland-Altmanovim testom. ....	39
Preglednica 9a: Rezultati meritev števila trombocitov v nerazredčenih vzorcih venske in kapilarne krvi; prikazane so povprečne vrednosti dvojnih meritev (n = 80). .....	40
Preglednica 9b: Osnovni statistični parametri meritev števila trombocitov v nerazredčenih vzorcih krvi. ....	41
Preglednica 10a: Povprečne vrednosti in razlike meritev števila trombocitov v nerazredčenih vzorcih venske in kapilarne krvi, potrebne za izvedbo Bland-Altmanovega testa (n = 80). .....	43
Preglednica 10b: Povprečna vrednost odstopanja, njegove SD in 95 % intervala ujemanja, določenega z Bland-Altmanovim testom. ....	44

Preglednica 11a: Rezultati meritev števila trombocitov v razredčenih (1:1) vzorcih venske in kapilarne krvi; prikazane so povprečne vrednosti dvojnih meritev (n = 80).....	44
Preglednica 11b: Osnovni statistični parametri meritev števila trombocitov v razredčenih vzorcih krvi. ....	45
Preglednica 12a: Povprečna vrednost in razlike meritev števila trombocitov v razredčenih vzorcih venske in kapilarne krvi (n = 80). ....	47
Preglednica 12b: Rezultati Bland-Altmanovega testa.....	48
Preglednica 13a: Rezultati meritev števila eritrocitov v nerazredčenih vzorcih venske in kapilarne krvi; prikazane so povprečne vrednosti dvojnih meritev (n = 80). ....	49
Preglednica 13b: Osnovni statistični parametri meritev števila eritrocitov v nerazredčenih vzorcih krvi. ....	50
Preglednica 14a: Povprečne vrednosti in razlike meritev števila eritrocitov, ki smo jih uporabili za izvedbo Bland-Altmanovega testa (n = 80).....	51
Preglednica 14b: Rezultati Bland-Altmanovega testa: povprečna vrednost biasa in njegove SD ter 95 % interval ujemanja.....	52
Preglednica 15a : Rezultati meritev števila eritrocitov v razredčenih vzorcih venske in kapilarne krvi; prikazane so povprečne vrednosti dvojnih meritev (n = 80). ....	53
Preglednica 15b: Osnovni statistični parametri meritev števila eritrocitov v razredčenih vzorcih krvi. ....	53
Preglednica 16a: Povprečne vrednosti in razlike meritev števila eritrocitov v razredčenih vzorcih krvi, s katerimi smo izvedli Bland-Altmanov test (n = 80).....	55
Preglednica 16b: Rezultati Bland-Altmanovega testa, in sicer povprečna vrednost odstopanja in njegove SD ter 95 % interval ujemanja.....	56
Preglednica 17a: Rezultati meritev števila levkocitov v nerazredčenih vzorcih venske in kapilarne krvi; prikazane so povprečne vrednosti dvojnih meritev (n = 80). ....	57
Preglednica 17b: Osnovni statistični parametri levkocitov, določenih v nerazredčenih vzorcih krvi. ....	58
Preglednica 18a: Povprečne vrednosti in razlike meritev števila levkocitov v nerazredčenih vzorcih krvi, ki so osnova za izvedbo Bland-Altmanovega test (n = 80).....	59
Preglednica 18b: Rezultati Bland-Altmanovega testa: povprečna vrednost odstopanja in njegove SD ter 95 % interval ujemanja. ....	60
Preglednica 19a: Rezultati meritev števila levkocitov v razredčenih vzorcih venske in kapilarne krvi; prikazane so povprečne vrednosti dvojnih meritev (n = 80). ....	61
Preglednica 19b: Osnovni statistični parametri meritev števila levkocitov v razredčenih vzorcih krvi. ....	61

Preglednica 20a: Povprečne vrednosti in razlike meritev števila levkocitov v razredčeni venski in kapilarni krvi, s katerim smo izvedli Bland-Altmanov test (n = 80).....	63
Preglednica 20b: Rezultati Bland-Altmanovega testa: povprečna vrednost odstopanja in njegove SD ter 95 % interval ujemanja. ....	64

## POVZETEK

Trombociti imajo zelo pomembno vlogo v našem organizmu, saj sodelujejo v procesu primarne hemostaze oziroma koagulacije krvi.

Krvne vzorce lahko odvzamemo na različne načine in z različnih odvzemnih mest. Pri našem delu smo za odvzem venske krvi uporabili vakuumske epruvete z antikoagulantom EDTA, za kapilarni odvzem pa posebne epruvete prav tako z EDTA in z nastavkom za zbiranje kapljic krvi s punkcijskega mesta. Znano je, da obstajajo razlike v številu trombocitov, določenih v venski in kapilarni krvi. Na to vplivajo številni dejavniki pri kapilarnem odvzemu, na primer: trda koža, hladni prsti, in podobno. Tako smo pri nekaterih krvodajalcih ob tovrstnem odvzemu morali močneje stiskati prst, da so pritekale kapljice krvi, kar je posledično vplivalo na vrednosti trombocitov, ki so bile bistveno drugačne od tistih, določenih v vzorcih venske krvi.

Postopek darovanja trombocitov z aferezo je invaziven, saj morajo krvodajalci obiskati laboratorij dan pred odvzemom ali celo na dan odvzema, kjer jim določijo število trombocitov in drugih krvnih celic v vzorcu venske krvi. Ob tromboferezi je krvodajalec ponovno izpostavljen venopunkciji, kar je zanj lahko precej nelagodno. Število trombocitov, ki so jih določili v vzorcu venske krvi, nato vnesejo v aparat za aferezo. Na podlagi tega aparat sam izračuna količino trombocitov, ki jo lahko odvzame iz človeškega telesa, pri čemer vse preostale celice vrača nazaj v krvni obtok.

Namen našega dela je bil narediti primerjavo vrednosti trombocitov, izmerjenih v vzorcih, odvzetih z venskim in kapilarnim odvzemom. Želeli smo dokazati, da lahko ob upoštevanju določenih parametrov kapilarni odvzem nadomesti invazivnejšo venopunkcijo za določitev števila trombocitov pred tromboferezo. Meritve smo opravili pri 80 krvodajalcih, od katerih je bilo 10 darovalcev plazme, 70 pa za trombocite. Odvzete vzorce krvi smo analizirali s hematološkim analizatorjem Cell-Dyn Ruby. Z vsakim vzorcem smo izvedli po dve zaporedni meritvi. Poleg tega smo jih redčili tudi v razmerju 1:1 z diluentom ter z vsakim razredčenim vzorcem prav tako izvedli dve zaporedni meritvi.

Ugotovili smo, da je ob uporabi epruвет z večjim volumnom (500  $\mu$ L) in standardiziranim odvzemu, kapilarni vzorec krvi enako ustrezen za določanje trombocitov kot venski.

## **ABSTRACT**

Thrombocytes have important roles in our organisms, since they cooperate in the process of primary haemostasis or coagulation of blood.

Blood samples can be obtained in various ways and from various puncture sites. For the venous blood collection we used vacuum tubes containing EDTA. Special tubes with the same anticoagulant and appropriate accessories were applied in case of capillary blood collection. It is well known that variations in numbers of thrombocytes determined in the venous and capillary blood exist. The reasons for that are being mainly attributed to various factors influencing the collection of capillary blood, like: rough skin, cold fingers, etc. That is the reason why we, in certain cases, had to press fingers from which the capillary blood was drawn, harder in order to get enough drops of blood. This intervention however influenced the evaluation of thrombocyte numbers, as they were often found to be significantly different from those determined in venous blood.

The apheresis used for thrombocyte donation (thrombopheresis) is an invasive procedure. Namely, blood donors must first visit the laboratory either on the day before the collection or even on the same day, where a sample of their venous blood is taken and numbers of thrombocytes and other blood cells are determined. When thrombopheresis is performed, each donor is once again exposed to the median cubital vein puncture, which is quite annoying. The previously determined number of thrombocytes is obligatorily inserted into the apheresis apparatus, which then automatically calculates the number of cycles needed for the collection of desired amount of platelets. During the process all other blood cells except thrombocytes, which are separated and collected in a special bag, are being continuously returned into the blood circle.

The aim of our work was to make a comparison between the numbers of thrombocytes determined in the samples of venous and capillary blood samples, taken from individual blood donors simultaneously. We wanted to prove, that by taking into consideration some important parameters, capillary blood collection can adequately replace the more invasive venepuncture, needed for determination of the number of thrombocytes prior to thrombopheresis. The measurements were performed on 80 donors, out of which ten were plasma and the rest thrombocyte donors. Venous and capillary blood samples of each donor were analyzed by the Cell-Dyn Ruby automatic hematology analyzer. Additionally,

each sample was diluted with a diluent in a 1:1 ratio. Each, undiluted as well as diluted sample was then sequentially measured twice. The results obtained were statistically analyzed, using the GraphPad<sup>®</sup> Prism version 6.05 software.

We found that by using bigger (500  $\mu$ L) instead of smaller (200  $\mu$ L) capillary blood collection tubes and a standardized blood drawing procedure, the capillary sample is equally appropriate for the determination of thrombocytes as the venous one.

## SEZNAM OKRAJŠAV

ATP	adenozin trifosfat
K <sub>3</sub> EDTA	trikalijeva etilendiamintetraočetna kislina
K <sub>2</sub> EDTA	dikalijeva etilendiamintetraočetna kislina
EDTA	etilendiamintetraočetna kislina
ADP	adenozin difosfat

# 1 UVOD

## **1.1 KRI**

Kri je tekoče tkivo oziroma suspenzija celic v plazmi. Človeški organizem odraslega vsebuje v povprečju okoli 5 litrov krvi. V krvi je največ rdečih krvnih celic eritrocitov, sam volumski delež teh celic pa imenujemo hematokrit (1). Eritrociti so tisti, ki dajejo krvi značilno barvo zaradi hemoglobina, prenašalca kisika po telesu. Bele krvne celice ali levkociti, ki jih je več vrst, sodelujejo pri obrambnih vnetnih procesih v telesu. Krvne ploščice ali trombociti pa skupaj s posebnimi beljakovinami v plazmi omogočajo zaustavljanje krvavitev oziroma hemostazo (2). Glede na to, v katerih krvnih žilah se nahaja, razlikujemo vensko, kapilarno in arterijsko kri. Glede na njeno vsebnost kisika pa govorimo o venski in arterijski krvi. Kapilarno kri lahko uporabimo namesto arterijske, saj je bistveno lažje dostopna. Za krvne preiskave je sicer najprimernejša venska kri, pri čemer je za točnost analiz ključen njen pravilni odvzem (1).

### **1.1.1 VENSKA KRI**

Vensko kri uporabljamo za večino hematoloških in biokemičnih preiskav. Je temnejše barve, ker vsebuje manj kisika. Večinoma vsebuje 2/3 oksihemoglobina, v katerem je vezan kisik, in 1/3 reduciranega hemoglobina, ki kisika ne vsebuje (1). Nahaja se v prevodnih žilah, ki vračajo kri iz systemskega obtoka nazaj v srce. Odvzamemo jo s punkcijo vene, pri odraslih najpogosteje v komolčni kotanji ali izjemoma na hrbtišču roke, pri majhnih otrocih pa iz velike vene na temenu glave (2).

### **1.1.2 ARTERIJSKA IN KAPILARNA KRI**

Arterijska kri je svetla, saj je nasičena s kisikom. Teče po žilah stran od srca, torej je odvodnica. Odvzem se izvaja samostojno z igelnim vbodom, s pomočjo brizgalke, ki vsebuje antikoagulantno sredstvo. Najpogostejša mesta odvzema so: a. radialis, a. brachialis in a. femoralis (3). Uporabljamo jo za plinske analize in ugotavljanje deleža oksihemoglobina. En mL arterijske krvi moramo odvzeti v 1000 enot heparina.

Kot smo že omenili je kapilarna kri po sestavi zelo podobna arterijski. Vsebuje 90% arterijske in 10 % venske krvi (1). Kot že samo ime pove se nahaja v kapilarah. Odvzamemo jo s punkcijo konice prstanca na roki, lahko tudi ušesne mečice, pri



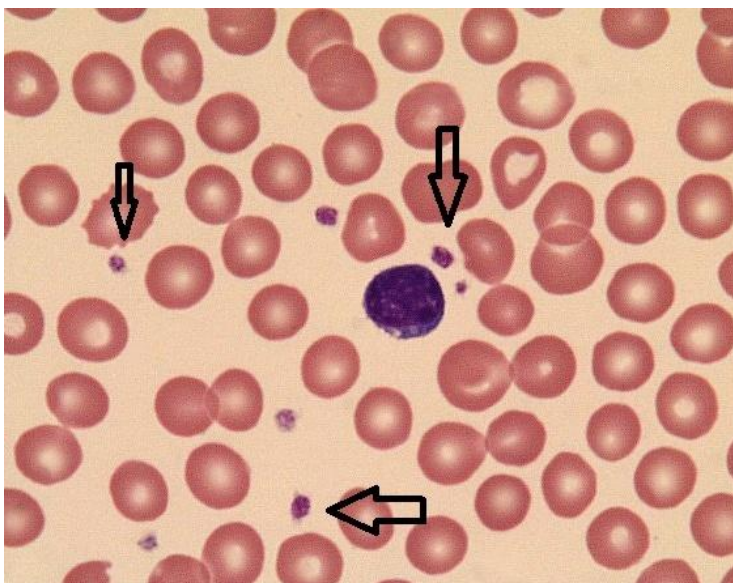
novorojenčkih oziroma majhnih otrocih pa tudi iz pete (2). Kapilarna kri se uporablja pri odraslih najpogosteje za preiskave pri sladkornih bolnikih.

## ***1.2 TROMBOCITI***

Trombociti ali krvne ploščice imajo ovalno okroglo obliko in premer 2-4  $\mu\text{m}$ . Včasih so lahko tudi večji, 25-50  $\mu\text{m}$ , in imajo drugačno obliko, npr. valja, vejice, flagel toksoplazmoz in podobno. Nekateri jih razvrščajo glede na obliko in velikost in na osnovi tega ocenjujejo njihovo starost in aktivnost.

Trombocit je v sredini granuliran, granuloma. Okrog tega dela vsebuje svetlomoder pas, tako imenovani hialomer. V rožnati ali rahlo bazofilni citoplazmi so prisotna azurofilna zrnca. Včasih je granulacija obarvana temneje in zbrana ekscentrično, citoplazma pa je še precej modra. Trombociti zelo aktivno presnavljajo. Druge celice imajo podobno sestavo. Številne snovi, ki jih vsebujejo, so potrebne za strjevanje krvi oziroma hemostazo. Nekaterne med njimi so izražene na njihovi površini, druge se nahajajo v notranjosti celic (4).

Prva naloga trombocitov pri zaustavljanju krvavitve je, da se prilepijo na poškodovano površino in zberejo v večje skupke. Pri tem izločajo serotonin, ki deluje na mišične sloje žil tako, da se skrčijo, s čimer se zmanjša krvavitev. Nato sprožijo proces strjevanja krvi. Pri tem nastane fibrin in se zbira okrog trombocitnega zamaška, ta pa z izločenim retraktocinom povzroči krčenje fibrina. Antifibrinolizin skrbi, da strdek ne razpade prehitro (4).



Slika 1: Trombociti v krvnem razmazu, obarvani po Pappenheimu (May-Grünwald Giemsa) (5).

### **1.2.1 ŠTEVILO TROMBOCITOV V KRVI**

Normalno število trombocitov v človeškem organizmu je  $140-340 \times 10^9$  trombocitov/L.

Vrednosti se razlikujejo glede na spol in starost.

Povečano število trombocitov ali trombocitoza se pojavi, kadar v kostnem mozgu nastaja več trombocitov ali če se jih v vranici premalo odstrani. Hitreje nastajajo ob akutnih krvavitvah. Po kroničnih pa lahko pride do trombopenije. Tako je med masovno gastrointestinalno krvavitvijo in nekaj dni za tem njihovo število nizko, nato pa postopno naraste. Tudi pri nekaterih akutnih boleznih lahko izmerimo visoke vrednosti, na primer pri sklepnem revmatizmu, v primeru gnojenja, občasno po večjih prelomih kosti, po pljučnici, med sedmim in desetim dnevom po obsežnejših operacijah, še posebej pa po odstranitvi vranice. Trombocitozo ugotavljamo tudi pri nekaterih krvnih boleznih, kot so mieloična levkemija, linfo granulomatoza in policitemija (4).

Zmanjšano število trombocitov ali trombocitopenijo ugotovimo takrat ko jih v kostnem mozgu nastaja manj ali jih v vranici več propade oziroma, če hkrati delujeta oba vzroka. Manj trombocitov lahko nastaja zaradi dveh razlogov: bodisi da nastanek megakariocitov preprečujejo razni toksini in strupi ali v primeru, ko se v germinativne centre kostnega mozga razrašča rakavo ali levkozno tkivo. Včasih pride do trombocitopenije, kljub temu,

da je v kostnem mozgu dovolj megakariocitov. Razlog za to je nenormalno dozorevanje, ki preprečuje, da bi iz megakariocitov nastali trombociti. Ta proces sicer uravnava vranica. Če se patološko spremeni (hipersplenizem), pa te funkcije ne more več opravljati. V krvi ugotovimo nizko število trombocitov tudi takrat, ko jih sicer nastaja dovolj, vendar se morajo iz krvnega obtoka v velikem številu pomakniti tja, kjer jih organizem nujno potrebuje npr. pri notranjih krvavitvah (4).

### **1.2.2 METABOLIZEM TROMBOCITOV**

Čeprav nimajo jedra, imajo trombociti zaradi tega, ker vsebujejo mitohondrije, veliko bolj izražen metabolizem od eritrocitov. V njih je namreč glikolizna pot glukoze kar 13-krat večja kot v eritrocitih. Ker imajo trombociti mitohondrije lahko tvorijo ATP tudi z oksidativno fosforilacijo. Od vseh metabolnih procesov je zanje najznačilnejši metabolizem ogljikovih hidratov, ki poteka vzporedno z metabolizmom adeninskih nukleotidov ter metabolizmom prostaglandina. Slednji je zelo pomemben za agregacijo trombocitov (6). Presnova trombocitov je aerobna, pri tem se porablja kisik, tako se posledično zmanjša pH.

### **1.2.3 FUNKCIJE TROMBOCITOV**

Osnovna funkcija trombocitov je sodelovanje v procesih primarne hemostaze in koagulacije krvi. Sodelujejo tudi v vnetnih procesih in imajo sposobnost fagocitoze. Fagocitirajo lahko majhne delce in bakterije, povezani pa so tudi z naslednjimi patofiziološkimi procesi (1):

- vplivajo na razvoj ateroskleroze z vezavo na bazalno membrano poškodovane žile in s sproščanjem ravnega dejavnika PDGF (pletlet derived growth factor), ki spodbudi migriranje celic gladkih mišic proti notranjemu delu krvne žile;
- prispevajo k razvoju tumorskih metastaz, saj omogočajo prodiranje tumorskih celic v ekstravaskularni prostor;
- sodelovali naj bi tudi pri nastajanju vaskulopatij.

#### **1.2.4 FIZIOLOGIJA IN PATOFIZIOLOGIJA HEMOSTAZE**

Hemostaza je kaskada reakcij, ki se sprožijo v trenutku, ko se poškoduje krvna žila. Njihov cilj je zaustavitev krvavitve in ohranitev celovitega žilnega endotelija. V hemostazi delujejo številne biokemične reakcije. V procesu sodelujejo tako trombociti kot prizadete žile (žilni endotelij). Hemostazo razdelimo v dve obdobji oziroma fazi:

- žilno in trombocitno obdobje ali primarno hemostazo,
- obdobje strjevanja krvi (koagulacijo) in učvrstitve fibrinskega strdka ali sekundarno hemostazo.

##### **1.2.4.1 PRIMARNA HEMOSTAZA**

Ob poškodbi se žila refleksno skrči. Tako skrčenje je lahko popolno, pri čemer se začasno prekine dotok krvi. V drobnih žilah je kratkotrajno in traja k večjemu kakih 5 do 10 minut, v večjih arterijah in venah pa je bolj izraženo in traja dalj časa. Vzrok za skrčenje žile ni popolnoma jasen. Verjetno gre za neposreden učinek na mišičje in živčevje v žilni steni. Pri večjih žilah to ne zadostuje, da bi se krvavitev dokončno ustavila. Manjši tlak krvi na krvaveče mesto pa olajša nastanek trombocitnega »čepa« in nadaljnji potek strjevanja krvi. Nepravilna gradnja ali vnetje sten drobnih žil sta tudi lahko vzroka za krvavitve na mestu tovrstnih patoloških sprememb, in sicer kljub normalni hemostazi. Poleg skrčenja žilne stene so pomembne tudi lastnosti okoliškega tkiva. Tam, kjer je to ohlapno, je tlak že izlite krvi na krvaveče mesto manjši in je zato iztekanje krvi lažje. Nekaj sekund po poškodbi se na tkivo pod razgaljenim žilnim endotelijem začnejo lepiti (adherirati) trombociti. Pritrjujejo se predvsem na kolagenska vlakna. Pri tem se iz okroglih ploščic spremenijo v kroglice z drobnimi izrastki v obliki psevdopodijev. Sočasno se vsebina zrn in gostih celic v njihovi citoplazmi izprazni skozi drobne citoplazemske cevčice v okolico. Gosta telesca vsebujejo predvsem adenzindifosfat (ADP), serotonin in adenzintrifosfat (ATP). Sproščeni ADP učinkuje na dotikajoče se trombocite tako, da se ti začnejo lepiti med seboj (agregacija). Iz njih se namreč sprošča ADP, s tem pa se agregacija nadaljuje v obliki verižne reakcije. Aktivira se encim fosfolipaza, ki iz trombocitne membrane sprosti arahidonsko kislino. Pod vplivom trombocitne ciklooksigenaze iz nje nastaneta ciklična endoperoksida PGG<sub>2</sub> in PGH<sub>2</sub>. Oba kratkotrajno, a močno pospešita agregacijo

trombocitov. Nastanek endoperoksidov zavreta nesteroidna antirevmatika aspirin in indometacin. Iz cikličnih endoperoksidov lahko nastane tudi majhna količina prostaglandinov PGE<sub>2</sub> in PGF<sub>2</sub>alfa, ali večja količina tromboksana A<sub>2</sub> (TXA). Slednji za kratek čas pospeši agregacijo. Pri izpraznjevanju trombocitov se omenjeni dejavniki izločijo skupaj z ADP in pospešijo verižno reakcijo agregacije (7).

Trombociti vsebujejo tudi fosfolipoprotein oziroma trombocitni faktor 3 (F-3), ki sodeluje v intrinzični poti strjevanja krvi. Z lepljenjem trombocitov na razgaljeno žilno tkivo pod endotelijskimi celicami (adhezija) in med samimi seboj (agregacija) nastane nekakšen »čep«, ki začasno zapre krvaveče mesto (beli čep). Agregacija trombocitov je sprva še povratna. Pod vplivom trombina, ki nastane po aktivaciji ekstrinzične poti strjevanja krvi, pa se trombociti čvrsteje in nepovratno zlepijo med seboj. Pri tem se sprosti F-3. Trombocitni čep pa vsaj pri poškodbi večjih žil ne zadostuje za dokončno ustavitev krvavitve. Šele po strditvi plazme namreč nastane zadostna količina fibrina, ki preplete trombocitni čep in ga učvrsti. Trombociti vsebujejo tudi kontraktilno beljakovino trombostenin, ki povzroči skrčenje fibrinskega strdka (7).

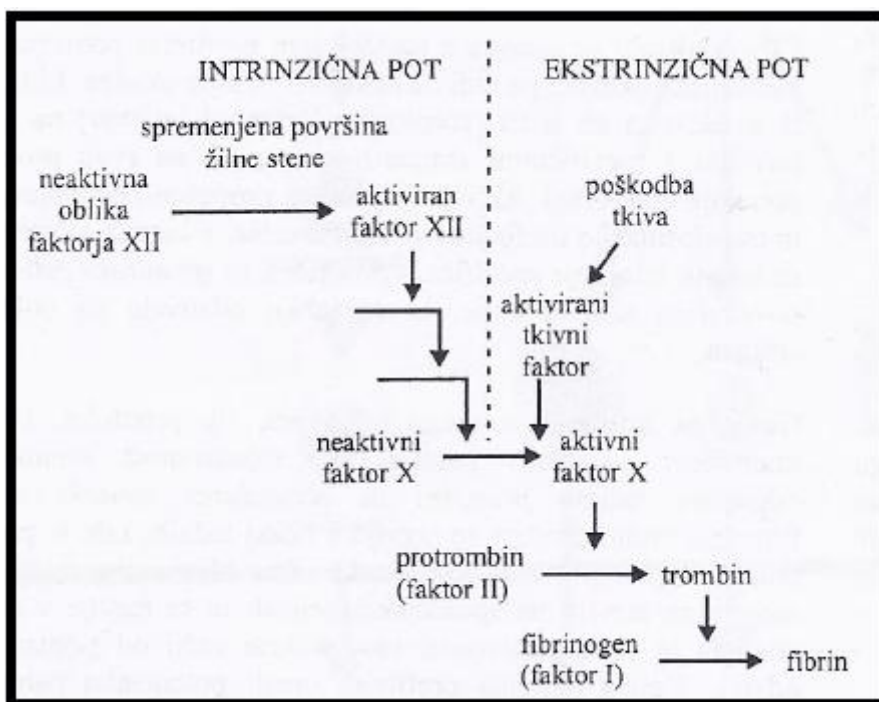
#### 1.2.4.2 SEKUNDARNA HEMOSTAZA

Kri je v tekočem stanju, dokler kroži v ožilju, ki ga omejuje nepoškodovan endotelij. V trenutku, ko pride v stik z nenormalno površino, ki predstavlja tudi razgaljeno tkivo poškodovane žile ali tujkih, pa se prične strjevati. Ta proces poteka vzporedno s prvim obdobjem hemostaze in se z njim dopolnjuje.

V strjevanju krvi je udeleženih več dejavnikov (faktorji-F). Z izjemo tkivnega tromboplastina in kalcija so vse sodelujoče beljakovine raztopljene v krvni plazmi. Med njimi je največ fibrinogena, ki je osnovno gradivo strdka. Ostali dejavniki so neaktivni encimi in so v plazmi le v majhnih količinah. Faktorje strjevanja krvi označujemo z rimskimi številkami od I do XIII. Večina jih nastaja v jetrnih celicah, izjema je F VIII, ki verjetno izvira iz žilnih endotelijskih celic. Nekateri od teh se pri strjevanju porabijo in jih nato v serumu ne moremo zaslediti (7).

**Potek strjevanja:** Strjevanje krvi poteka po dveh poteh, ekstrinzični in intrinzični, obe pa se končata s pretvorbo protrombina v trombin. Trombin je aktivni encim, ki odcepi fibrinopeptida A in B z molekule fibrinogena. S tem nastane netopni fibrin, ki je končni proizvod strjevanja krvi. Strjevanje poteka v nizu zaporednih reakcij, pri čemer se neaktivni faktorji spremenijo v aktivne.

Intrinzično pot strjevanja sproži dotik krvi s hrapavo površino, ki ima negativen električni naboj. Takšne lastnosti imajo tkiva poškodovanih žil pod endotelijem ter steklo, kaolin in druge snovi. Ekstrinzični sistem koagulacije je enostavnejši. Obide namreč dve fazi intrinzičnega in poteka hitreje. Pri poškodbi tkiva se iz celic sprosti tkivni tromboplastin in tvori kompleks s faktorjem VII. Ta nato v prisotnosti kalcijevih ionov aktivira faktor X v faktor Xa. Od tu dalje sta intrinzična in ekstrinzična pot strjevanja krvi enaki (7).



Slika 2: Shematski prikaz fiziologije hemostaze (8).

### 1.3 PRIDOBIVANJE TROMBOCITOV

Trombocite dobimo na različne načine od krvodajalcev. Lahko uporabimo polno kri, ali pa jih pridobimo s postopki afereze.

### **1.3.1 AFEREZA**

Aferenza je zbiranje posameznih komponent krvi, pri katerem se odvzeta venska kri avtomatsko ločuje v zelene sestavine, ki jih zadržimo zunaj telesa, preostale pa vrnemo darovalcu. Faze afereznega postopka (odvzem, ločevanje krvi, zadrževanje zelenih sestavin in vračanje preostalih sestavin krvi) se ponavljajo, dokler ne zberemo predvidene količine krvne sestavine. Z aferezo lahko zbiramo plazmo ali posamezne vrste krvnih celic. Afereze izvajamo s posebnimi aparati, tako imenovanimi plazemskimi ali celičnimi ločevalci.

#### **1.3.1.1 CITAFEREZA**

Kri teče iz ene vene darovalca po sistemu cevk skozi aparat, kjer se pomeša z antikoagulantom in se v pretočni centrifugi skladno s specifično gostoto in velikostjo zelenih sestavin krvi celice ločujejo in nato zbirajo v zbiralni vrečki. Ostale komponente pa se po določenem času vračajo skozi isti žilni kanal ali pa se vračajo v veno na drugi roki. Aparate lahko programiramo za zbiranje različnih krvnih celic. Celoten postopek citafereze traja približno 90 minut (9).

##### *1.3.1.1.1 TROMBOFEREZA*

Pri tem postopku mora imeti darovalec najmanj  $150 \times 10^9$  trombocitov/L, poleg tega pa mora izpolnjevati pogoj, da je med tem daroval polno kri vsaj dvakrat. Zaželeno je tudi, da je bil vsaj enkrat podvržen plazmaferezi. Anamnestično moramo posebej preveriti morebitne krvavitve v kontekstu motenj strjevanja krvi, alergije, ulkuse, uporabo zdravil (Aspirin, Ibuprofen...). Načeloma trombofereze ne izvajamo pogosteje kot enkrat na dva tedna, možne izjeme pa so v primeru posebnih potreb oziroma zahtev.

Zbranim koncentriranim trombocitom dodamo ohranitveno raztopino (npr. Intersol) oziroma jih hranimo v vrečkah, ki so prepustne za pline, in sicer za 5 dni. Lahko jih še dodatno obdelamo s fotoinaktivacijo, ki neposredno inaktivira mikrobo in levkocite v pripravku. Enote fotoinaktiviranih trombocitov lahko hranimo 7 dni med stalnim mešanjem pri 20-24°C. Terapevtska doza je vsaj  $200 \times 10^9$  trombocitov/L, v povprečju pa  $300 \times 10^9$  trombocitov/L.

#### ***1.4 TERAPEVTSKA UPORABA TROMBOCITOV***

Transfuzija trombocitov se uporablja za terapevtske namene ob krvavitvah, kot preventiva ob trombocitopenijah in pri stanjih zaradi motene funkcije trombocitov. Zaradi kratke življenjske dobe, je učinek kratkotrajen, zato so potrebne pogoste transfuzije, običajno vsak drugi dan. Pri dolgotrajnejšem zdravljenju se pogosto razvijejo protitelesa proti antigenom poglobitnega kompleksa tkivne skladnosti HLA (Human Leukocyte Antigens), ki zmanjšajo učinkovitost nadaljnjih transfuzij (10).

Trombocite lahko aplicirajo tudi profilaktično, in sicer pacientom, pri katerih obstajajo velika tveganja za spontane krvavitve.



Slika 3: Celični ločevalec Amicus Cell Separator (Fenwal) (11).



## **1.5 HEMATOLOŠKI ANALIZATOR CELL-DYN RUBY**

### **1.5.1 DELOVANJE**

Hematološki analizator CELL-DYN Ruby je kvantitativen, avtomatski hematološki analizator in levkocitni diferencialni števec, ki se uporablja v kliničnem laboratoriju za diagnostiko *in vitro*. Sistem deluje na osnovi dveh operacijskih načinov. Primarni sistem je popolnoma avtomatiziran in uporablja v kasete vložene zamašene epruvete, ki so označene s črtnimi kodami. Sekundarnega pa aktiviramo sami in uporablja enako označene odprte epruvete, iz katerih aspirira kri. Ko pride epruveta v kaseti na mesto za aspiracijo, igla prebode njen zamašek in aspirira vzorec krvi v razdelilno glavo (SHEAR VALVE), kjer se razdeli na tri dele: 20 $\mu$ L za levkocitno komoro (WBC), 1,67  $\mu$ L za eritrocitno/trombocitno komoro (RBC/PLT) in 12  $\mu$ L za hemoglobinsko komoro (HGB).

Analizator deluje na principu pretočne citometrije. Celice oziroma delci posamično in zaporedno prehajajo skozi pretočno celico, kjer jih presvetli laserski žarek. Odbita oziroma prepuščena svetloba je odvisna od fizikalnih in kemijskih lastnosti posamezne celice oziroma delca. Svetlobni signali se pretvorijo v električne in izrazijo kot številčne vrednosti izmerjenih in izračunanih parametrov posamezne populacije krvnih celic oziroma delcev (12).



Slika 4: Hematološki analizator CELL-DYN Ruby (Abbott) (13).

### 1.5.2 **HEMOGRAM**

Hemogram je rezultat določitve krvne slike, in sicer rdeče, bele in trombocitne. Diferencialna krvna slika pa nam poda relativni delež posameznih vrst levkocitov in normoblastov v krvi ter značilnosti nekaterih patogenih celic. S hematološkim analizatorjem CELL-DYN Ruby lahko določamo naslednje hematološke parametre:

- WBC - koncentracijo levkocitov
- RBC - koncentracijo eritrocitov
- HGB - koncentracijo hemoglobina
- HCT - vrednost hematokrita
- MCV - povprečni volumen eritrocitov
- MCH - povprečno količino hemoglobina v eritrocitih
- MCHC - povprečno koncentracijo hemoglobina v eritrocitih
- RDW - razporeditveno krivuljo eritrocitne populacije (po volumnu) s koeficienti variacije
- RETC in % R - absolutno število retikulocitov in njihov odstotek

- PLT - koncentracijo trombocitov
- MPV - povprečni volumen trombocitov
- PDW - razporeditveno krivuljo trombocitne populacije (po volumnu) s koeficienti variacije
- NEU in % N - absolutno in relativno število nevtrofilcev
- LYM in % L - absolutno in relativno število limfocitov
- MONO in % M - absolutno in relativno število monocitov
- EOS in % E - absolutno in relativno število eozinofilcev
- BAS in % B - absolutno in relativno število bazofilcev
- ALY in % - absolutno in relativno število atipičnih limfocitov
- LIC in % - absolutno in relativno število velikih nezrelih celic (12)

#### 1.5.2.1 REFERENČNE IN KRITIČNE VREDNOSTI

Preglednica 1: Referenčne vrednosti hemograma

<b>PREISKAVA</b>	<b>ORIENTACIJSKE REFERENČNE VREDNOSTI</b>	<b>ENOTA</b>
LEVKOCITI	4,0-10,0	10 <sup>9</sup> /L
ERITROCITI	4,0-5,4	10 <sup>12</sup> /L
HEMOGLOBIN	120-160	g/L
HEMATOKRIT	0,37-0,47	L
MCV	81,0-94,0	fL
MCH	26,0-32,0	pg
MCHC	310-350	g/L
RDW	11,5-15,0	%
TROMBOCITI	140-340	10 <sup>9</sup> /L
MPV	6,0-11,0	fL
<b><i>DIFERENCIALNA KRVNA SLIKA</i></b>		
NEVTROFILCI	40,00-70,00	%
LIMFOCITI	20,00-50,00	%
MONOCITI	do 10,00	%
EOZINOFILCI	do 6,00	%
BAZOFILCI	do 2,0	%
NEVTROFILCI	1,6-7,5	10 <sup>9</sup> /L
LIMFOCITI	0,8-5,0	10 <sup>9</sup> /L
MONOCITI	do 1,0	10 <sup>9</sup> /L

EOZINOFILCI	do 0,6	10 <sup>9</sup> /L
BAZOFILCI	do 2,0	10 <sup>9</sup> /L

Preglednica 2: Kritične vrednosti hemograma

PREISKAVA	SPODNJA MEJA	ZGORNJA MEJA	ENOTA
LEVKOCITI	1,5	30	10 <sup>9</sup> /L
HEMATOKRIT	0,15	0,6	%
HEMOGLOBIN	50	180	g/L
TROMBOCITI	30	1000	10 <sup>9</sup> /L
DIFERENCIALNA KRVNA SLIKA	prisotnost blastov, na novo odkrita levkemija		

#### 1.5.2.2 INTERFERENCE IN OMEJITVE

- ❖ WBC: nezrele celice rdeče vrste z jedrom se vštejejo v levkocitno populacijo. Proteini multiplega mieloma oziroma proteinski precipitat lahko lažno poviša število levkocitov, enako tudi hemoliza. Pri levkemiji je število levkocitov nizko zaradi prehitrega razpada celic v vzorcu. Krioglobulini in kriofibrinogen povzročajo povišane vrednosti levkocitov, eritrocitov, hemoglobina in trombocitov.
- ❖ RBC: če je število levkocitov izredno oziroma ekstremno visoko in so hkrati eritrociti zelo nizki, lahko povzročijo lažno povišanje. Aglutinacija eritrocitov da lažno nizke eritrocite, abnormalno visoke vrednosti MCH in MCHC, RDW in nepravilen HCT in MCV. Hemoliza da lažne rezultate.
- ❖ HGB: lipemični vzorci dajejo lažno nizke rezultate.
- ❖ MCV: hiperglikemija, hemoliza *in vitro*, veliko število abnormalno velikih trombocitov in povišani levkociti motijo določitev MCV.
- ❖ PLT: mikrociti, shizociti (fragmentirani eritrociti) in fragmenti levkocitov so lahko vzrok za lažno visoke izmerjene vrednosti trombocitov. Aglutinacija eritrocitov pa je lahko vzrok za lažno znižane vrednosti. Veliki trombociti so lahko izključeni iz

štetja in tako dobimo lažno prenizek rezultat. Hemoliza da lažno previsoke rezultate in aglutinacija trombocitov da lažno znižane rezultate (12).

### 1.5.2.3 ANALIZA ERITROCITOV IN TROMBOCITOV (RBC/PLT)

Razdelilna komora pošlje 1,67  $\mu\text{L}$  vzorca krvi v mešalno komoro RBC/PLT, kjer se ta razredči z 2,79 mL diluenta. Slednji stabilizira celične membrane, služi za redčenje in za spiranje sistema. Končno redčenje vzorca je 1 : 1675. Posebne črpalke nato dispensirajo točno določen volumen razredčenega vzorca in reagenta (24  $\mu\text{L}$ ), ki je pod pritiskom, v pretočno celico, kjer se celice preštejejo. Pri prehodu celic skozi vir svetlobe vsaka posamezna celica odda svetlobne signale, ki so odvisni od njenih lastnosti. Vir svetlobe je laserski žarek usmerjen v tok celic. Žarek seka tok vzorca in razpršena svetloba se meri pod kotom 0, 10 in 90 stopinj v primeru eritrocitov ter 0 in 10 stopinj pri trombocitih (12).

### 1.5.2.4 ANALIZA LEVKOCITOV (WBC)

Razdelilna komora aparata pošlje 20  $\mu\text{L}$  vzorca v mešalno komoro WBC/WOC, v katero se pod pritiskom prenese še 0,973 mL reagenta WBC Lyse 0,973 mL. Ta služi za redčenje levkocitov, osmotsko lizo eritrocitov, vzdrževanje lastnosti levkocitov v času merjenja, preprečevanje nastanka mehurčkov v pretočni celici, spiranje levkocitne mešalne komore in redčenje pri določanju retikulocitov.

Razredčeni vzorec se močno premeša, končno redčenje pa je 1:50. V pretočno celico se vbrizga zelo močan curek diluenta, v njegovo sredino pa aparat aplicira vzorec iz mešalne komore. Laminarni tok vodi vzorec skozi sredino pretočne celice. Vsak levkocit, tako potuje skozi senzorsko področje, pri čemer seka laserski žarek, razpršeno svetlobo pa merijo štiri različni detektorji, ki se nahajajo v sprednjem (0 in 10 stopinj) in stranskem kotu (10 in 90 stopinj). Diferencialna analiza levkocitov in njihovo razvrščanje temeljita na merjenju volumna celic. S tehnologijo treh parametrov pretočne citometrije (volumen,

prevodnost in sipanje svetlobe) določimo volumen, obliko in zunanje lastnosti posamezne celice (12).

## 2 NAMEN DELA

Določanje trombocitov na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino je vezano na odvzem vzorca venske krvi, kar je za krvodajalce neprijetno, saj so pri aferezi ponovno podvrženi venopunkciji.

Namen našega dela bo primerjati določanje števila trombocitov v vzorcih venske in kapilarne krvi z uporabo hematološkega analizatorja Cell-Dyn Ruby. Sočasno bomo primerjali tudi izmerjene vrednosti eritrocitov in levkocitov, ki predstavljajo za hematološko analizo stabilnejše vrste celic.

Cilj našega dela je torej:

- Ugotoviti, ali lahko za krvodajalca manj invaziven kapilarni odvzem krvi nadomesti venskega za zanesljivo in povsem primerljivo določanje števila trombocitov, potrebnega za učinkovito izvedbo trombofereze.
- Določiti kritične dejavnike pri odvzemu kapilarne krvi in optimirati celoten postopek za njegovo uvedbo v rutinsko prakso.

## 3 MATERIALI IN METODE

### 3.1 MATERIALI

#### 3.1.1 BIOLOŠKI VZORCI

- Vzorci venske in kapilarne krvi, odvzeti v epruvete z EDTA, ter dnevne kontrole CELL-DYN 26 Plus Tri-Level Control (Abbott, ZDA).
  - 87 vzorcev za meritev števila trombocitov, 91 vzorcev za meritev eritrocitov in 90 vzorcev za meritev levkocitov z uporabo 200 µL epruвет za kapilarni in običajnih 3mL vakuumskih epruвет za venski odvzem.
  - 80 vzorcev za meritev števila trombocitov, eritrocitov in levkocitov z uporabo 500 µL epruвет za kapilarni odvzem in običajnih 3 mL za venski odvzem.
- Stabilnost vzorcev: EDTA kri je stabilna pri 2-8°C do 7 dni in pri sobni temperaturi do 12 ur.

#### 3.1.2 REAGENTI

- CELL-DYN CN-Free Hgb/Noc Lyse reagent (Abbott, ZDA):
  - kvarterne amonijeve soli
  - natrijev klorid < 10 %
  - sol hidroksilamina < 3 %
- CELL-DYN WBC Lyse reagent (Abbott, ZDA):
  - pufer < 1,00 %
  - aromatični oksialkohol < 1,00 %
  - polioksietilenski eter < 0,10 %
- CELL-DYN Diulent/ Sheat reagent (Abbott, ZDA):
  - natrijev fosfat < 0,3 %
  - kalijev fosfat < 0,05 %
  - Na<sub>2</sub>EDTA < 0,03 %
  - natrijev klorid < 1,0 %
  - kalijev klorid < 0,05 %
  - površinsko aktivne snovi < 0,002 %



- konzervansi < 0,04 %
  - Kontrolni vzorci CELL-DYN 26 Plus control (H-high, N-normal, L-low)
  - Encimsko čistilo CELL-DYN (Abbott, ZDA)
  - Intersol (Fenwal):
    - natrijev citrat dihidrat ( $C_6H_7NaO_7 \times 2H_2O$ )
    - brezvodni dinatrijev fosfat ( $Na_2HPO_4$ )
    - natrijev dihidrogenfosfat dihidrat ( $NaH_2PO_4 \times 2H_2O$ )
    - natrijev acetat trihidrat ( $CH_3COONa \times 3H_2O$ )
    - natrijev klorid (NaCl)
    - voda za injekcije
- Stabilnost reagentov: Reagente moramo hraniti pri sobni temperaturi, stabilni pa so do datuma preteka uporabnosti, označenega na etiketi na njihovi ovojnici.

## **LABORATORIJSKA OPREMA IN MATERIALI**

- Igle (Becton Dickinson, ZDA)
- Lancete (Wellion, Nemčija)
- Plastični nosilec (Becton Dickinson, ZDA)
- Žilna preveza (Becton Dickinson, ZDA)
- Sterilizirani tamponi iz gaze
- Mikropor (3M Company)
- 70 % izopropilni alkohol (Braun, Nemčija)
- Epruvete z vakuumom (Becton Dickinson, ZDA)
- Epruvete za kapilarni odvzem 500 µL (Becton Dickinson, ZDA)
- Stojalo za epruvete (Becton Dickinson, ZDA)
- Valjčni mešalec za kri (Stuart, Francija)
- Posoda za efektivne odpadke
- Lateks rokavice za enkratno uporabo (Simp's)
- Papir za tiskalnik
- Pipeta Eppendorf 10-100 µL (Biohit)
- Nastavki za pipeto (Biohit)
- Aparat CELL-DYN Ruby (Abbott, ZDA)

### **3.2 METODE**

#### **3.2.1 PRIPOROČILA ZA ODVZEM VZORCEV KAPILARNE KRVI**

Kapilarni odvzem krvi izvajamo pri novorojenčkih, dojenčkih in majhnih otrocih, pri katerih je venski odvzem tehnično zahteven ali celo tvegan. Vbodi v velike vene namreč lahko povzročijo srčni zastoj, vensko trombozo, krvavitev, refleksni spazem arterij ali celo gangreno okončin. Odvzem večje količine krvi pa lahko povzroči anemijo.

Pri odraslih priporočajo kapilarni odvzem v primerih, ko so površinske vene težko dostopne ali poškodovane (pri zelo debelih ljudeh, obsežnih opeklinah, malignih obolenjih, nagnjenju k trombozam, zelo starih ljudeh).

Kapilarnega odvzema ne izvajamo pri dehidriranih osebah ali osebah v šoku, ker zaradi slabe periferne cirkulacije ne moremo dobiti reprezentativnega vzorca krvi. Kapilarna kri

ni primerna za koagulacijske teste, SR in vse tiste analize, pri katerih je potreben večji volumen krvi, plazme ali seruma.

Kapilarna kri je mešanica venske in arterijske krvi ter medcelične in celične tekočine. Sestava vzorca krvi, odvzetega s kapilarnim odvzedom, je odvisna od pretoka krvi v podkožju v trenutku njegovega odvzema. Vbodno mesto mora biti dobro ogreto, saj je le v tem primeru arterijska kri podobna venski in so rezultati krvnih analiz primerljivi s tistimi, ki bi jih dobili iz vzorca venske krvi. Po vbodu z lanceto v prst, prvo kapljico vedno odstranimo, ker vsebuje preveč tkivne tekočine ter delčkov kože in je zato preveč razredčena. Šele druga kapljica je primerna za vzorčenje. Z uspelim vbodom lahko dobimo od 0,5 do 1 mL krvi.

Koncentracije analitov v kapilarni krvi naj bi bile sicer načeloma dobro primerljive s tistimi v venski krvi. Kljub temu pa obstajajo določene majhne razlike, in sicer: v kapilarni krvi so prisotne nekoliko nižje koncentracije kalija, kalcija, proteinov, eritrocitov, hemoglobina, hematokrita in trombocitov, koncentracija glukoze, število levkocitov, deleži nevtrofilcev in monocitov pa so nekoliko višji (14).



Slika 5: Prikaz odvzema kapilarne krvi (15).

### **3.2.2 PRIPOROČILA ZA ODVZEM VZORCEV VENSKE KRVI**

Pri odvzemu venske krvi moramo dobiti biološko reprezentativen vzorec, primeren za laboratorijsko analizo. Odvzem moramo zato izvesti pravilno. Pogoste napake pri tem so: nepravilna identifikacija preiskovanca ali odvzetega vzorca, uporaba napačnega

antikoagulantna, odvzem neustrezne količine krvi, hemoliza in neustrezna hemokonzentracija odvzetega vzorca.

Kri vedno odvajamo skladno priporočenim postopkom. Uporabljamo samo zaprte sisteme za odvzem krvi. S tem zmanjšamo verjetnost okužbe, odvajamo pravilno količino krvi in zagotovimo uporabo prave epruvete. Klasičnih in navadnih igel ne uporabljamo. Pri odvzemu krvi obvezno upoštevamo predpisane načine zaščite pred okužbo in z vsemi vzorci ravnamo tako, kot da so kužni.

Priporočen čas za odvzem krvi je med 7. in 9. uro zjutraj.

Odvzem krvi mora potekati po točno določenih zaporednih korakih:

1. Preiskovanca pripravimo na odvzem krvi.
2. Pred odvzemom ga pravilno identificiramo.
3. Preverimo zahtevano dieto, predpisano antikoagulantno terapijo, alergijo na lateks.
4. Pripravimo ustrezne pripomočke in pribor za odvzem krvi.
5. Preiskovanca udobno namestimo.
6. Namestimo žilno prevezo in preiskovanca prosimo, naj stisne pest, ter izberemo veno za odvzem.
7. Natakne rokavice.
8. Mesto vboda očistimo in razkužimo.
9. Vbodem v veno in v nosilec vstavimo epruveto, pri čemer preiskovanec razpre pest.
10. Kri odvajamo v epruvete po predpisanem vrstnem redu.
11. Sprostimo in odstranimo žilno prevezo.
12. Na vbodno mesto namestimo tampon.
13. Izvlečemo iglo iz žile in aktiviramo zaščitni sistem na igli.
14. Tampon močno pritisnemo na vbodno mesto ter preverimo, ali se je krvavitev zaustavila in vbodno mesto prevežemo ali prelepimo.
15. Epruvete z odvzeto krvjo ustrezno označimo, pri čemer zapišemo tudi čas odvzema.
16. Če laboratorijski test to zahteva, epruvete postavimo na led ali v termostat.
17. Pravilno označene epruvete čim prej prenesemo v analizni laboratorij.

Po čiščenju in razkuževanju vbodnega mesta pazimo, da je to pred vbodom v veno popolnoma suho. Ostanke razkužila lahko namreč povzročijo hemolizo odvzete krvi. Žilno prevezo namestimo pred vbodom v veno, sprostimo pa jo takoj, ko kri priteče v prvo epruveto. Preveza ne sme biti nameščena več kot minuto. Zaradi predolgo podvezane žile se lahko pojavi hemokoncentracija odvzetega vzorca, kri pa se lahko izlije v okoliško tkivo, pri čemer nastane hematoma. Vse epruvete moramo takoj po odvzemu dobro premešati z nežnim obračanjem. Če epruvete po odvzemu pretirano stresamo, lahko pride do hemolize. Količina odvzete krvi je določena z vakuumom, ki je v epruveti. Vse epruvete z vzorci, v katerih ni zahtevane količine krvi, so za laboratorijsko analizo neuporabne. Rezultati analiz nepravilno odvzetega vzorca so napačni, zato take vzorce v laboratoriju zavrnamo. Zavrnamo pa tudi vse tiste, ki niso pravilno označeni (16).



Slika 6: Prikaz venskega odvzema krvi (17).

### **3.2.3 MERJENJE VZORCEV KRVI S HEMATOLOŠKIM ANALIZATORJEM CELL-DYN RUBY**

#### **3.2.3.1 MERJENJE DNEVNIH KONTROLNIH VZORCEV KRVI**

Kontrolne vzorce krvi, in sicer H-high, N-normal in L-low, analiziramo vsako jutro pred rutinskim merjenjem vzorcev. Preden jih pričnemo uporabljati, vse tri epruvete označimo z datumom pričetka uporabe. Preverimo številko serije, tip kontrole in datum uporabe. Iz hladilnika jih vedno vzamemo 15 minut pred analizo.

Epruvete s kontrolno krvjo ročno premešamo z rahlim obračanjem.

V meniju »Specimen ID or QCID« izberemo vrsto kontrole in izvedemo meritve vseh treh kontrol. Najkasneje 30 minut po uporabi jih moramo vrniti v hladilnik.

Dobljene rezultate primerjamo z izpisanimi referenčnimi vrednostmi za vsako posamezno vrsto kontrole. V kolikor so rezultati izven dovoljenih odstopanj, moramo meritve ponoviti.

Na izpise rezultatov dnevnih kontrol se izvajalec podpiše in jih shrani v posebnem registratorju (12).

### 3.2.3.2 MERJENJE VZORCEV VENSKE KRVI

Določitev diferencialne krvne slike v venski krvi: vzorec krvi odvzamemo v označeno 3 mL vakuumsko epruveto z antiokoagulantom K<sub>3</sub>EDTA in ga takoj po odvzemu dobro premešamo.

V meniju »Specimen ID or QCID« vpišemo dogovorjene oznake glede na vrsto preiskovanega vzorca (KLT za tromboferezo, PLAZMA za plazmaferezo). V okence »More Spec Info« vpišemo še ostale podatke, kot so: ime in priimek preiskovanca, datum rojstva, številka krvi itd.

Dobro premešano epruveto s krvjo odpremo in jo podložimo pod aspiracijsko iglo. Nato s pritiskom na gumb aktiviramo iglo, ki posrka vzorec v aparat.

Ko se na zaslonu pojavijo rezultati, jih s pritiskom na okence »Print« natisnemo v dvojniku. Na en izvod izpisa rezultatov se podpišemo in ga vložimo v registrator »Izvidi Ruby«, drugega pa oddamo naročniku (12).

### NADALJNI POSTOPEK Z ODVZETIMI VZORCI VENSKE KRVI

Del vzorca venske krvi (200 µL) smo tudi redčili z diluentom v razmerju 1:1, in sicer v mikroeprevetah brez antikoagulanta.

Razredčeno kri smo premešali z rahlim obračanjem in mikroepreveto podstavili pod aspiracijsko iglo, ki jo aktiviramo s pritiskom na gumb.

Vsako meritev smo izvedli dvakrat.

### 3.2.3.3 MERJENJE VZORCEV KAPILARNE KRVI-USTALJENI POSTOPEK

Določitev diferencialne krvne slike v kapilarni krvi: vzorec krvi odvzamemo v epruveto za kapilarni odvzem z dodanim  $K_3EDTA$  (slika 7) in ga takoj po odvzemu dobro premešamo.

V okence »More Spec Info« poleg podatkov o preiskovancu vpišemo kratico KAPIL. KRI.

Dobro premešano epruveto s krvjo odpremo in jo podložimo pod aspiracijsko iglo. Nato s pritiskom na gumb aktiviramo iglo, ki posrka vzorec v aparat.

Ko se na zaslonu pojavijo rezultati, jih s pritiskom na okence »Print« natisnemo v dvojniku. Na en izvod izpisa rezultatov se podpišemo in ga vložimo v registrator »Izvidi Ruby«, drugega pa oddamo naročniku (12).



Slika 7: Epruveta za kapilarni odvzem z volumnom  $200\ \mu\text{L}$  in z dodanim  $K_3EDTA$ .

### 3.2.3.4 MERJENJE VZORCEV KAPILARNE KRVI-OPTIMIZIRANI POSTOPEK

Določitev diferencialne krvne slike v kapilarni krvi: vzorec krvi odvzamemo v epruveto za kapilarni odvzem, z volumnom  $500\ \mu\text{L}$  in dodanim  $K_2EDTA$  (slika 8) in ga nato dobro premešamo.

V okence »More Spec Info« poleg podatkov o preiskovancu vpišemo tudi kratico KAPIL. KRI.

Epruveto s krvjo dobro premešamo, jo odpremo in podstavimo pod aspiracijsko iglo. Pritisnemo na gumb za iglo, ki nato posrka vzorec v aparat.

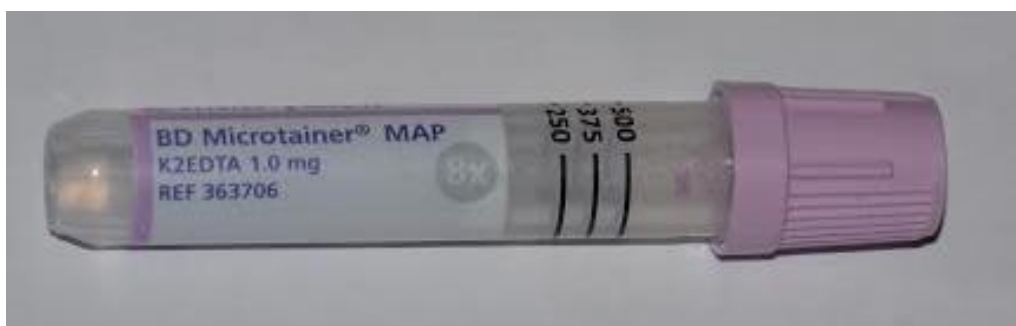
Ko se na zaslonu pojavijo rezultati, jih s pritiskom na okence »Print« natisnemo v dvojniku. Na en izvod izpisa rezultatov se podpišemo in ga vložimo v registrator »Izvidi Ruby«, drugega pa oddamo naročniku (12).

#### NADALJNI POSTOPEK Z ODVZETIMI VZORCI KAPILARNE KRVI

Vzorci kapilarne krvi (200  $\mu$ L) smo nato tudi redčili z diluentom v razmerju 1:1, in sicer v mikroeprevetah brez antikoagulanta.

Razredčeni vzorec smo premešali z rahlim obračanjem in mikroepreveto nato podstavili pod aspiracijsko iglo, ki smo jo aktivirali s pritiskom na gumb.

Vsako meritev smo izvedli dvakrat.



Slika 8: Epruveta za odvzem kapilarne krvi z volumnom 500  $\mu$ L in dodanim K<sub>2</sub>EDTA.

#### 3.2.4 STATISTIČNE ANALIZE

Izvedli smo naslednje statistične analize:

- parametrični parni t-test, s katerim smo primerjali neodvisne pare povprečnih vrednosti števila krvnih celic, določenih v vzorcih venske in kapilarne krvi, ob ugotovitvi, da se njihove razlike porazdeljujejo normalno.
- Korelacijo, s katero smo ugotavljali stopnjo ujemanja srednjih vrednosti števila krvnih celic, določenih v vzorcih venske in kapilarne krvi; smer in moč omenjene povezanosti smo opredelili s Pearsonovim korelacijskim koeficientom.



- Linearno regresijo na osnovi najmanjših kvadratov in Demingovo regresijo; z linearno regresijo prilagodimo vrednosti naklona in presečišča ( $x = 0$ ) premice tako, da poiščemo potek premice, ki kar najbolj napoveduje vrednost spremenljivke  $y$  od  $x$ . Z linearno regresijo določimo ustreznost ujemanja, ki jo podamo v obliki vrednosti  $R^2$ . Za naš primer, kjer sta tako spremenljivki  $x$  kot  $y$  povprečni napaki, je veliko primernejša Demingova regresija (ortogonalna regresija), pri kateri določimo le enačbo premice, ne pa tudi vrednosti  $R^2$ .
- Bland-Altmanov test in graf; narišemo graf, v katerega vnesemo razlike povprečnih vrednosti števila celic v vzorcih venske in kapilarne krvi ( $y$ ) proti povprečnim vrednostim omenjenih meritev ( $x$ ). Razlike med meritvami naj bi ležale znotraj 95 % intervala ujemanja in kazale kar najmanj sipanja okoli linije biasa (povprečnega neujemanja med primerjanimi meritvami).
- Rezultate meritev smo statistično obdelali s programom GraphPad Prism® V. 6.04. V vseh statističnih analizah smo vrednost  $p \leq 0.05$  opredelili kot statistično značilno.



## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 REZULTATI MERITEV ŠTEVILA TROMBOCITOV V VZORCIH VENSKE IN KAPILARNE KRVI, ODVZETIH PO USTALJENEM POSTOPKU

Najprej smo za kapilarni odvzem uporabili epruvete z manjšim volumnom (200  $\mu$ L). Vzorce krvodajalcev je zbiralo in testiralo več oseb. Z vsakim vzorcem venske in kapilarne krvi smo izvedli po dve zaporedni meritvi. Rezultate smo nato statistično analizirali.

Preglednica 3a: Rezultati meritev števila trombocitov v venski in kapilarni krvi; navedene so povprečne vrednosti dvojnih meritev ( $n = 87$ ).

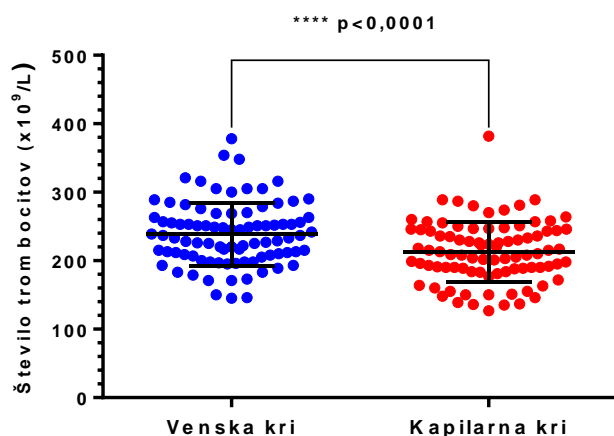
183	139	189	193	270	257	248	244	200	204	245	184
179	146	198	188	215	230	255	260	289	281	251	250
197	160	171	127	233	243	208	199	279	270	305	201
196	135	237	233	213	235	227	248	217	209	321	243
150	155	222	190	253	251	233	210	269	247	316	189
173	155	251	246	205	208	212	177	251	215	316	255
145	151	210	228	249	236	263	246	226	150	354	226
195	196	287	274	229	198	249	163	285	289	300	258
198	183	253	213	245	226	212	217	225	181	305	191
198	208	213	215	269	202	228	192	209	190	305	289
193	195	239	223	225	230	256	205	257	228	348	382
193	136	220	190	284	280	253	224	207	190	378	220
183	184	276	189	252	287	263	264	251	236		
171	172	242	245	282	257	237	218	290	203		
146	148	217	137	220	150	253	247	215	164		

- Število trombocitov v venski krvi ( $10^9/L$ ) 
- Število trombocitov v kapilarni krvi ( $10^9/L$ ) 

Preglednica 3b: Prikaz osnovnih statističnih parametrov za meritev števila trombocitov.

	Venska kri	Kapilarna kri
Aritmetična sredina in SD	238,9 ± 46,06	212,7 ± 44,35
Mediana (25. in 75. percentil)	237 (208-263)	210 (188-245)
Minimum	145	127
Maksimum	378	382

Za primerjavo števila trombocitov, določenih v venski in kapilarni krvi, smo uporabili parametrični parni t-test, ki temelji na normalni porazdelitvi razlik povprečnih vrednosti (slika 9). Pri tem smo določili p vrednost  $< 0,0001$ , kar nam pove, da je povprečno število trombocitov, določenih v venski in kapilarni krvi, statistično značilno različno.

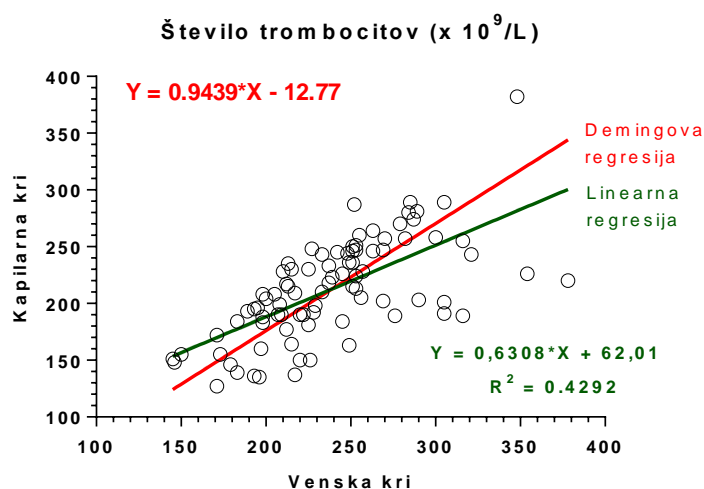


Slika 9: Grafični prikaz primerjave povprečnih vrednosti števila trombocitov, izmerjenih v vzorcih venske in kapilarne krvi; rezultata se med seboj statistično značilno razlikujeta ( $p < 0,0001$ ) (parametrični parni t-test).

Za ugotavljanje povezanosti oziroma ujemanj med številom trombocitov, določenih v vzorcih venske in kapilarne krvi posameznikov, smo določili Pearsonov koeficient korelacije ( $r$ ), ki ga lahko uporabimo, kadar imamo normalno porazdeljene rezultate. Kadar je vrednost  $r$  nad 0,5 to kaže na tendenco pozitivne povezave. Vrednost  $r$  je bila v našem primeru 0,6551, kar kaže na srednje dobro ujemanje med rezultati, določenimi v venski in kapilarni krvi.

Za določitev poteka premice med spremenljivkama smo uporabili tako linearno regresijo, kjer smo parametra  $a$  in  $b$  izračunali z metodo najmanjših kvadratov, s čimer smo

zagotovili, da je bila vsota kvadratov razlik vseh parov meritev čim manjša, kot tudi Demingovo regresijo. Ugotovili smo, da je v našem primeru slednja primernejša, saj minimalizira rezultate v obeh smereh (x in y). Ob izvedbi linearne regresije smo izračunali tudi vrednost  $R^2$  oziroma koeficienta determinacije, ki nam pove, kakšen delež varianc si med seboj delita spremenljivki x in y (čim bližje vrednosti 1 je najboljše).



Slika 10: Poteka in enačbi premic linearne in Demingove regresije za trombocite. Vrednost  $R^2 = 0,4292$  označuje srednje dobro prileganje premice (linearna regresija).

Z Bland-Altmanovim testom in grafom smo ugotavljali razlike med uporabo venske in kapilarne krvi za določanje trombocitov, eritrocitov in levkocitov. Za izvedbo te statistične analize smo izračunali razlike med posameznimi pari meritev (število celic v vzorcu venske in kapilarne krvi iste osebe) in njihove povprečne vrednosti (preglednica 4a). V obliki grafa pa smo prikazali odnos med razlikami (ordinata) in povprečnimi vrednostmi (abscisa) parnih meritev. Določili smo povprečno vrednost odstopanja oziroma povprečje razlik med parnima meritvama in s tem velikost povprečne razlike med uporabo venske in kapilarne krvi. Opredelili smo tudi 95 % meji ujemanja. Kadar sta ti ozki, vrednost odstopanja pa majhna, to pomeni, da sta primerjani metodi praktično enakovredni. Z Bland-Altmanovim grafom lahko spremljamo tudi določene trende, npr. ali se razlika (bias) med metodama povečuje ali zmanjšuje, ko se povečajo povprečne vrednosti; ali je variabilnost enakomerna in ali se razpršenost točk v grafu ob premici odstopanja povečuje s povečanjem povprečne vrednosti.

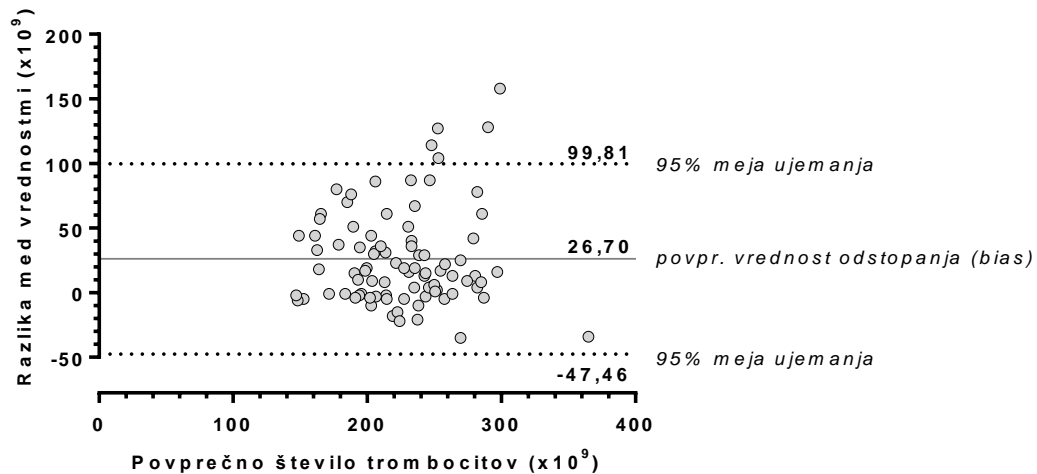
Preglednica 4a: Izračun povprečja in razlike meritev števila trombocitov v venski in kapilarni krvi (n = 87).

POVPREČJE	RAZLIKA								
161	44	149	44	252	2	254,5	17	203	44
162,5	33	235	4	206,5	-3	206	86	199,5	19
178,5	37	206	32	242,5	13	214,5	-5	242,5	29
165,5	61	248,5	5	213,5	31	210	36	198,5	17
152,5	-5	219	-18	235,5	19	230,5	51	243,5	15
164	18	280,5	13	235,5	67	238,5	29	246,5	87
148	-6	233	40	227,5	-5	263,5	-1	189,5	51
195,5	-1	214	-2	282	4	227,5	19	214,5	61
190,5	15	231	16	269,5	-35	250	6	250,5	1
203	-10	205	30	269,5	25	202	-4	253	104
194	-2	232,5	87	185	70	285	8	282	78
164,5	57	243,5	-3	246	4	274,5	9	252,5	127
183,5	-1	177	80	257,5	-5	213	8	285,5	61
171,5	-1	263,5	13	203,5	9	258	22	290	128
147	-2	222,5	-15	237,5	-21	233	36	279	42
191	-4	238	-10	221,5	23	188	76	248	114
193	10	224	-22	194,5	35	287	-4	297	16
								365	-34
								299	158

Preglednica 4b: Povprečna vrednost odstopanja, njegove SD in 95 % interval ujemanja določenega z Bland-Altmanovim testom števila trombocitov, določenih v venski in kapilarni krvi.

Odstopanje	26,70
SD odstopanja	37,57
95 % interval ujemanja	
Od	-47,46
Do	99,81

Vidimo, da je povprečna vrednost odstopanja, ki opredeljuje velikost in smer od pravega rezultata, precej velika, in sicer 26,70, prav tako pa je velik tudi razpon 95 % meje ujemanja, kar kaže na različnost rezultatov, določenih v venski in kapilarni krvi.



Slika 11: Bland-Altmanov graf primerjave izmerjenega števila trombocitov v venski in kapilarni krvi. Razlike vrednosti so precej razpršene znotraj 95 % ujemanja, nekaj pa jih je celo nad njegovo zgornjo mejo ujemanja.

Ker z rezultati ugotovljenega števila trombocitov nismo bili najbolj zadovoljni, smo statistično obdelali še rezultate določanja števila bolj stabilnih celic, torej eritrocitov in levkocitov. Pri tem smo uporabili enake statistične metode.

Trombociti se namreč lahko dokaj hitro aktivirajo in začnejo tvoriti skupke, to pa je seveda lahko vzrok za nepravilen rezultat.

## 4.2 REZULTATI MERITEV ŠTEVILA ERITROCITOV V VZORCIH VENSKE IN KAPILARNE KRVI, ODVZETIH PO USTALJENEM POSTOPKU

Preglednica 5a: Rezultati meritev števila eritrocitov v venski in kapilarni krvi; prikazane so povprečne vrednosti dvojnih meritev (n = 91).

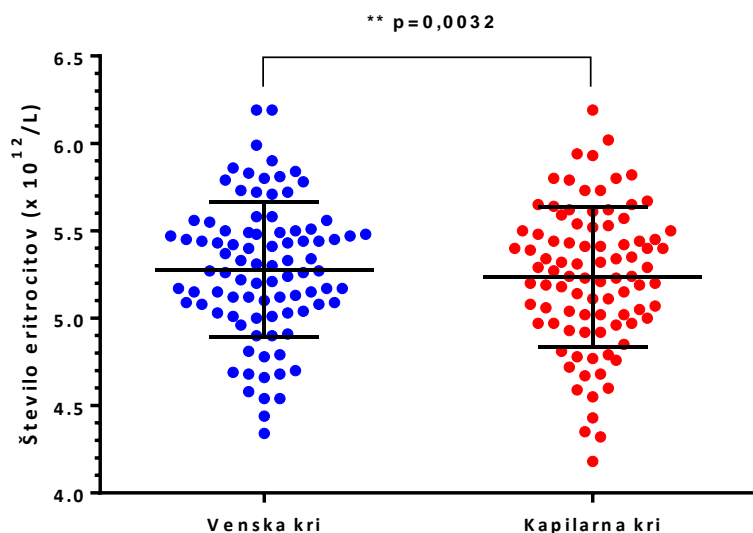
5,31	5,23	5,3	5,24	5,27	5,29	5,08	4,97	4,81	4,85
4,54	4,32	5,73	5,73	5,04	5,24	5,27	5,19	5,22	5
5,81	5,65	5,56	5,61	5,01	4,79	5,09	5,15	5,08	4,97
5,48	5,23	5,51	5,5	4,79	4,93	6,19	6,02	5,26	5,06
5,55	5,53	5	5,04	5,12	5,07	5,33	5,2	5,45	5,39
5,84	5,67	5,43	5,31	5,12	5,19	6,19	6,19	5,49	5,45
5,49	5,41	4,58	4,55	4,68	4,68	5,5	5,34	5,12	5,08
5,03	5,05	5,15	4,72	4,78	4,78	5,34	5,44	5,13	5,2
5,44	5,48	5,21	5,02	5,15	5,21	4,69	4,43	5,5	5,4
5,43	5,35	5,15	4,96	5,33	5,79	5,44	5,29	5,58	5,64
5,72	5,65	5,01	5,02	4,44	4,35	4,68	4,77	5,17	5,11
5,58	5,73	4,96	5,02	5,4	5,42	5,03	4,97	4,91	4,81
5,79	5,62	5,8	5,62	5,78	5,57	5,1	4,92	5,26	5,18
5,72	5,43	4,54	4,6	4,9	4,76	5,41	5,32	4,7	4,67
5,42	5,27	5,86	5,8	5,9	5,82	5,47	5,54	5,99	5,93
5,47	5,5	5,83	5,94	5,24	5,14	5,44	5,4		
5,17	5,32	5,45	5,52	5,48	5,41	4,34	4,18		
5,17	5,34	5,56	5,4	5,71	5,8	5,37	5,44		
5,09	5,11	5,2	5,59	4,66	4,59	4,9	4,92		

- Število eritrocitov v venski krvi ( $10^{12}/L$ ) ■
- Število eritrocitov v kapilarni krvi ( $10^{12}/L$ ) ■

Preglednica 5b: Prikaz osnovnih statističnih parametrov za meritev števila eritrocitov.

	Venska kri	Kapilarna kri
Aritmetična sredina in SD	5,277 ± 0,3855	5,234 ± 0,3983
Mediana (25. in 75. percentil)	5,27 (5,04-5,5)	5,24 (4,97-5,5)
Minimum	4,34	4,18
Maksimum	6,19	6,19

Za primerjavo števila celic, določenih v venski in kapilarni krvi, smo uporabili parametrični parni t-test. Pri tem smo določili p vrednost 0,0032, kar nam pove, da je razlika med vensko in kapilarno krvjo statistično značilno različna.

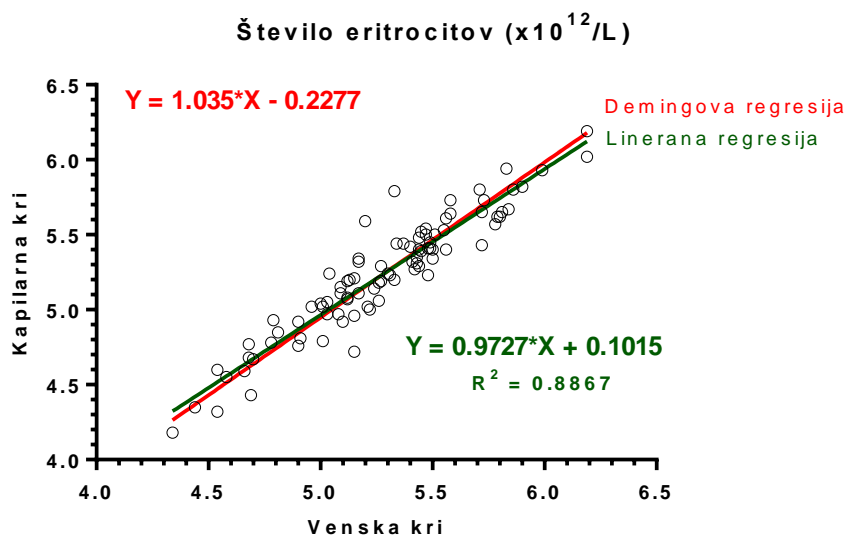


Slika 12: Grafični prikaz primerjave povprečnih vrednosti števila eritrocitov, izmerjenih v vzorcih venske in kapilarne krvi. Rezultati se med seboj statistično značilno razlikujejo (  $p = 0,0032$ ).

Izračunali smo tudi Pearsonov koeficient korelacije ( $r$ ), ki pa je bil v tem primeru 0,9416, kar kaže na visoko stopnjo ujemanja med primerjanimi rezultati.

S pomočjo linearne in Demingove regresije, smo določili optimalni potek premice med primerjanimi vrednostmi obeh spremenljivk. Vrednost koeficienta determinacije  $R^2$ , ki smo ga izračunali pri linearni regresiji (metoda najmanjših kvadratov razlik), je bila 0,8867, kar kaže na to, da spremenljivki delita velik delež variance oziroma, da sta v veliki meri povezani.





Slika 13: Poteka in enačbi premic, določenih z linearno in Demingovo regresijo za eritrocite; vrednost  $R^2 = 0,8867$  (linearna regresija).

Bland -Altmanov test smo izvedli na osnovi vrednosti, prikazanih v preglednici 6a.

Preglednica 6a: Povprečne vrednosti in razlike meritev števila eritrocitov v venski in kapilarni krvi (n = 91).

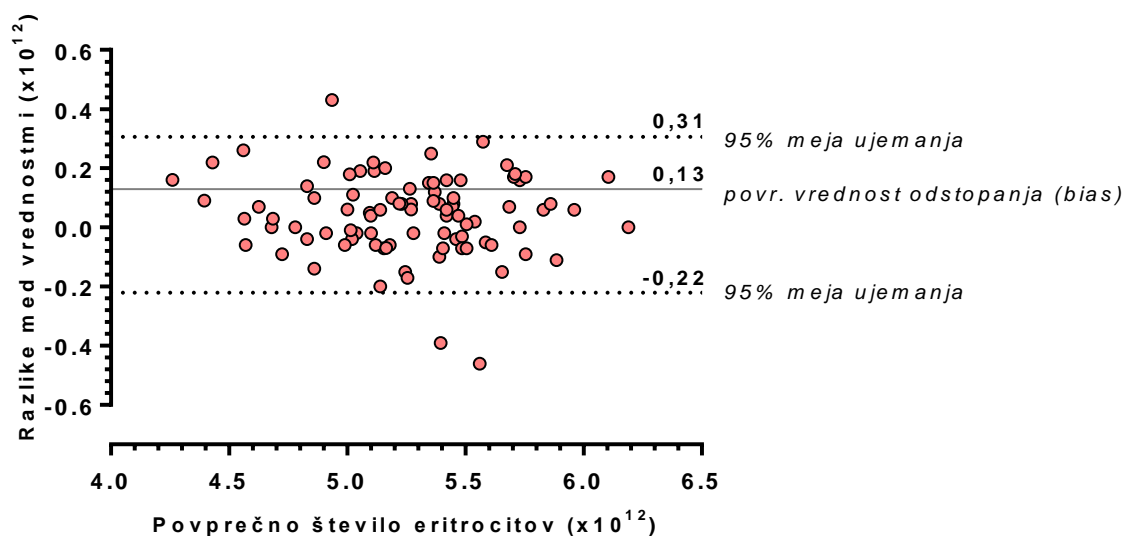
POVPREČJE	RAZLIKA								
5,27	0,08	5,1	-0,02	5,48	0,16	5,445	0,07	5,42	0,04
4,43	0,22	5,27	0,06	5,395	-0,39	5,755	-0,09	4,26	0,16
5,73	0,16	5,73	0	5,28	-0,02	4,625	0,07	5,405	-0,07
5,355	0,25	5,585	-0,05	5,14	-0,2	5,025	0,11	4,91	-0,02
5,54	0,02	5,505	0,01	4,9	0,22	5,23	0,08	4,83	-0,04
5,755	0,17	5,02	-0,04	4,86	-0,14	5,12	-0,06	5,11	0,22
5,45	0,08	5,37	0,12	5,095	0,05	6,105	0,17	5,025	0,11
5,04	-0,02	4,565	0,03	5,155	-0,07	5,265	0,13	5,16	0,2
5,46	-0,04	4,935	0,43	4,68	0	6,19	0	5,42	0,06
5,39	0,08	5,115	0,19	4,78	0	5,42	0,16	5,47	0,04
5,685	0,07	5,055	0,19	5,18	-0,06	5,39	-0,1	5,1	0,04
5,655	-0,15	5,015	-0,01	5,56	-0,46	4,56	0,26	5,165	-0,07
5,705	0,17	4,99	-0,06	4,395	0,09	5,365	0,15	5,45	0,1
5,575	0,29	5,71	0,18	5,41	-0,02	4,725	-0,09	5,61	-0,06

5,345	0,15	4,57	-0,06	5,675	0,21	5	0,06	5,14	0,06
5,485	-0,03	5,83	0,06	4,83	0,14	5,01	0,18	4,86	0,1
5,245	-0,15	5,885	-0,11	5,86	0,08	5,365	0,09	5,22	0,08
5,255	-0,17	5,485	-0,07	5,19	0,1	5,505	-0,07	4,685	0,03
								5,96	0,06

Preglednica 6b: Povprečna vrednost odstopanja, njegove SD in 95 % intervala ujemanja, določenih z Bland-Altmanovim testom.

Odstopanje	0,04264
SD odstopanja	0,1345
95 % interval ujemanja	
Od	-0,2210
Do	0,3063

Vidimo, da je odstopanje majhno, in sicer 0,04264, prav tako pa je ozek tudi interval ujemanja, kar pomeni, da smo z uporabo venske in kapilarne krvi dobili primerljive vrednosti števila eritrocitov.



Slika 14: Grafični prikaz Bland-Altmanovega testa. Vidimo, da ni velikega sipanja razlik števila eritrocitov, določenih v venski in kapilarni krvi, in da je večji del rezultatov enakomerno razdeljen znotraj 95 % intervala ujemanja.

### 4.3 REZULTATI MERITEV ŠTEVILA LEVKOCITOV V VZORCIH VENSKE IN KAPILARNE KRVİ, ODVZETIH PO USTALJENEM POSTOPKU

Preglednica 7a: Rezultati meritev števila levkocitov v venski in kapilarni krvi; prikazane so povprečne vrednosti dvojnih meritev (n = 90).

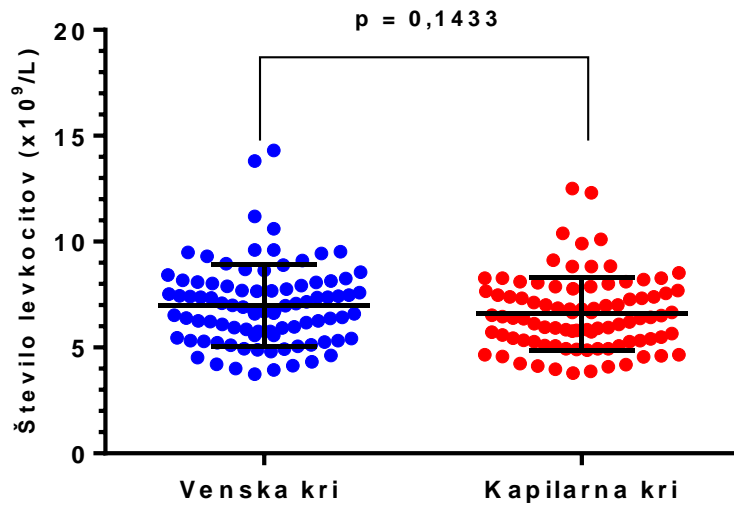
7,1	6,81	6,9	6,39	7,75	6,97	6,97	7,48	7,34	6,65
3,74	3,87	5,98	6,21	8,96	8,52	5,46	5,07	6,75	6,86
6,39	5,95	11,2	10,4	5,32	5,32	5,57	4,95	7,92	7,56
8,55	8,27	5,42	5,59	9,49	9,13	3,94	4,55	8,03	7,66
4,52	4,19	7,38	6,8	5,58	5,28	5,11	4,66	6,37	6,51
8,17	8,28	8,65	8	4,8	4,12	4,95	4,95	5,95	5,65
8,26	8,05	6,26	5,96	14,3	12,3	7,68	7,13	4,32	4,57
4,01	4,09	5,75	5,27	8,15	7,39	6,23	6,12	9,61	7,88
6,52	6,42	6,75	5,8	5,76	5,74	6,26	5,4	7,36	7,39
8,08	7,77	5,22	4,9	13,8	12,5	9,45	8,83	5,12	5,34
7,66	7,33	8,89	8,21	7,47	6,66	4,21	3,79	4,89	4,61
5,93	5,44	6,6	6,66	4,63	3,97	5,25	5,07	7,38	7,01
7,08	6,52	7,4	6,85	9,6	8,83	8,42	7,69	4,14	4,24
5,06	5,09	10,6	10,1	9,11	8,84	6,62	5,93	6,99	6,38
7,42	6,36	8,09	8,28	9,53	7,88	6,6	5,72		
6,42	5,78	7,89	7,27	8,7	8,11	5,32	4,87		
5,29	4,95	6,17	5,85	6,7	5,91	7,45	8,11		
5,86	5,49	7,59	7	9,3	9,91	4,92	4,66		
7,16	6,1	7,7	7,33	7,53	6,46	6,09	5,84		

- Število levkocitov v venski krvi ( $10^9/L$ ) ■
- Število levkocitov v kapilarni krvi ( $10^9/L$ ) ■

Preglednica 7b: Osnovni statistični parametri meritev števila levkocitov.

	Venska kri	Kapilarna kri
Aritmetična sredina in SD	6,987 ± 1,931	6,584 ± 1,736
Mediana (25. in 75. percentil)	6,825 (5,543-8,043)	6,405 (5,31-7,668)
Minimum	3,74	3,79
Maksimum	14,3	12,5

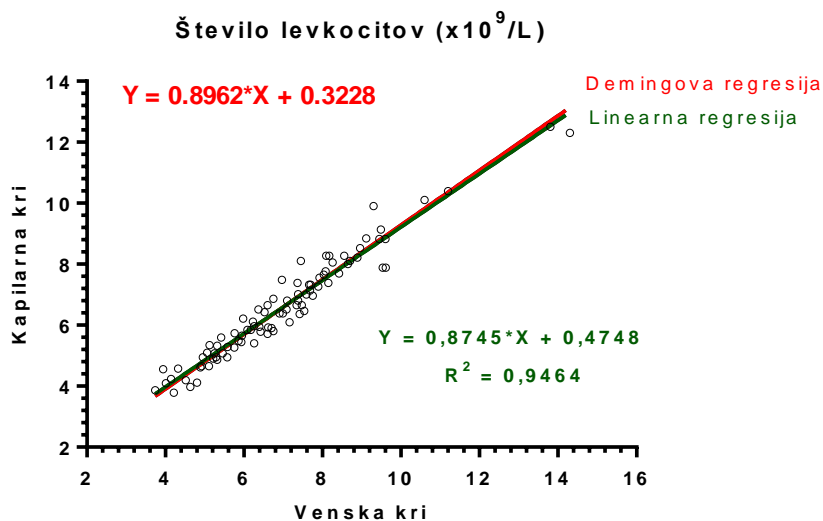
S parametričnim t-testom smo ugotovili, da so izmerjene vrednosti števila levkocitov v venski in kapilarni krvi med seboj statistično nesignifikantne ( $p = 0,1433$ ), torej primerljive.



Slika 15: Grafični prikaz primerjave povprečnih vrednosti števila levkocitov, izmerjenih v vzorcih venske in kapilarne krvi; rezultati se med seboj ne razlikujejo statistično značilno ( $p = 0,1433$ ).

S statistično analizo, s katero smo izračunali Pearsonov koeficient korelacije  $r = 0,9728$ , smo potrdili visoko stopnjo ujemanja med primerjanimi rezultati.

Tudi linearna in Demingova regresija sta pokazali, da so si meritve levkocitov v venski in kapilarni krvi zelo podobne, saj si delijo velik del variance ( $R^2 = 0,9464$ ).



Slika 16: Poteka in enačbi premic, določenih z linearno in Demingovo regresijo za levkocite;  $R^2 = 0,9464$  (linearna regresija).

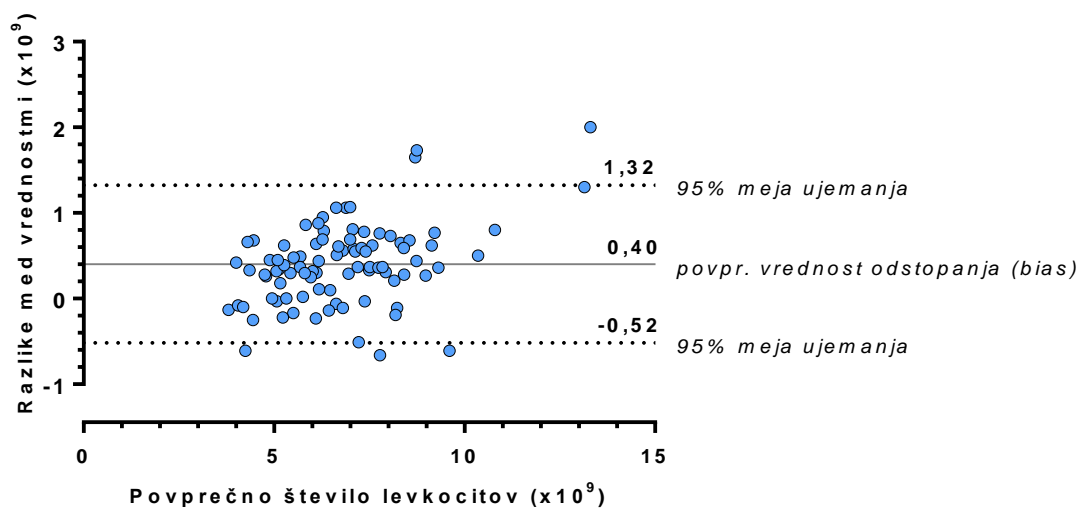
Preglednica 8a: Povprečne vrednosti in razlike meritev števila levkocitov v venski in kapilarni krvi, s katerimi smo izvedli Bland-Altmanov test in izrisali ustrezen graf ( $n = 90$ ).

POVPREČJE	RAZLIKA								
6,955	0,29	6,63	1,06	7,295	0,59	6,305	0,79	5,095	0,45
3,805	-0,13	6,645	0,51	7,515	0,37	9,605	-0,61	7,78	-0,66
6,17	0,44	6,095	-0,23	7,36	0,78	6,995	1,07	4,79	0,26
8,41	0,28	10,8	0,8	8,74	0,44	7,225	-0,51	5,965	0,25
4,355	0,33	5,505	-0,17	5,32	0	5,265	0,39	6,995	0,69
8,225	-0,11	7,09	0,58	9,31	0,36	5,26	0,62	6,805	-0,11
8,155	0,21	8,325	0,65	5,43	0,3	4,245	-0,61	7,74	0,36
4,05	-0,08	6,11	0,3	4,46	0,68	4,885	0,45	7,845	0,37
6,47	0,1	5,51	0,48	13,3	2	4,95	0	6,44	-0,14
7,925	0,31	6,275	0,95	7,77	0,76	7,405	0,55	5,8	0,3
7,495	0,33	5,06	0,32	5,75	0,02	6,175	0,11	4,445	-0,25
5,685	0,49	8,55	0,68	13,15	1,3	5,83	0,86	8,745	1,73
6,8	0,56	6,63	-0,06	7,065	0,81	9,14	0,62	7,375	-0,03
5,075	-0,03	7,125	0,55	4,3	0,66	4	0,42	5,23	-0,22
6,89	1,06	10,35	0,5	9,215	0,77	5,16	0,18	4,75	0,28
6,1	0,64	8,185	-0,19	8,975	0,27	8,055	0,73	7,195	0,37
5,12	0,34	7,58	0,62	8,705	1,65	6,275	0,69	4,19	-0,1
5,675	0,37	6,01	0,32	8,405	0,59	6,16	0,88	6,685	0,61

Preglednica 8b: Povprečna vrednost odstopanja, njegove SD in 95 % intervala ujemanja, določenih z Bland-Altmanovim testom.

Odstopanje	0,4023
SD odstopanja	0,4693
95 % interval ujemanja	
Od	-0,5176
Do	1,322

Povprečna vrednost odstopanja (0,4023) je majhna, ozek pa je tudi 95 % interval ujemanja.



Slika 17: Bland-Altmanov graf. Vidimo, da znotraj 95 % intervala ujemanja ni velikega sipanja razlik števila levkocitov, določenih v venski in kapilarni krvi, glede na povečanje povprečnega števila celic.

S primerjalno analizo vzorcev venske in kapilarne krvi nismo bili zadovoljni, saj smo dobili dovolj dobre rezultate samo pri štetju levkocitov in delno eritrocitov. Predvidevali smo, da je lahko na rezultate vplivala količina odvzetega vzorca kapilarne krvi, zato smo se odločili za uporabo mikroeprevet z večjim volumnom. Pomemben dejavnik bi lahko bilo tudi število oseb, ki so jemale kapilarno kri, zato smo sklenili, da jo bo v nadaljevanju odzemale le ena oseba.

#### **4.4 REZULTATI MERITEV ŠTEVILA TROMBOCITOV V VZORCIH VENSKE IN KAPILARNE KRVI PO OPTIMIZIRANEM POSTOPKU**

V drugem sklopu našega dela smo uporabili mikroeprovete za odvzem kapilarne krvi z večjim volumnom (500  $\mu$ L). Kot smo že omenili, je vzorce zbirala samo ena oseba. Pred vsakim odvzemom smo preverili, ali imajo krvodajalci ogrete roke, kar je pogoj, da kri lepo teče in da prsta ni potrebno preveč stiskati. Pozorni smo bili na trdoto kože na prstu, pri čemer smo po potrebi uporabili lancete z večjim rezilom. Pozorni smo bili tudi na to, da odvzem vzorca ni trajal predolgo, saj bi se lahko v tem primeru kri začela strjevati.

Tako kot v prvem sklopu smo z vsakim vzorcem venske in kapilarne krvi izvedli po dve zaporedni meritvi. Ker bi lahko med manipulacijo vzorcev med merjenjem prišlo do aktivacije trombocitov in njihovega zlepljenja, smo, da bi to možnost zmanjšali vsak vzorec venske in kapilarne krvi razredčili z 200  $\mu$ L diluenta v razmerju 1:1 in prav tako izvedli po dve zaporedni meritvi. Rezultate smo statistično analizirali na enak način kot v prejšnjem sklopu.

##### **4.4.1 REZULTATI MERITEV V NERAZREDČENIH KRVNIH VZORCIH**

Preglednica 9a: Rezultati meritev števila trombocitov v nerazredčenih vzorcih venske in kapilarne krvi; prikazane so povprečne vrednosti dvojnih meritev (n = 80).

174,5	180	345	347	242,5	245	239	233,5
233,5	235,5	335,5	340	290	292	221,5	213
321,5	314	286	289	263,5	269,5	247,5	241,5
250	243	186,5	172,5	323	316	222	171
393,5	388	266,5	256	182	198,5	291	304
250	258	293	303,5	243,5	263,5	245,5	255,5
244,5	259	246,5	212	221	198,5	226	224
315,5	314,5	243	228,5	280,5	283,5	225	221,5
270,5	241,5	266	270	251	250,5	269	307
262	248,5	262	262	253,5	265	283	264,5
310	304,5	280	284	270	264	246,5	258,5
208,5	209	234	233	217	214,5	240	196,5

248	228	265,5	263	236,5	243,5	244	228,5
300	312	225,5	227,5	182	175	174,5	149
298	285	261,5	241,5	214	228,5	239	238,5
278,5	259,5	244	146	306	312,5	286	287
270,5	279,5	232,5	186	283	263	173	170,5
423,5	430	254,5	180	301	315,5	257	273
283,5	312,5	204,5	230,5	227	248	259	253,5
274,5	266,5	269,5	258	213	210	248	255

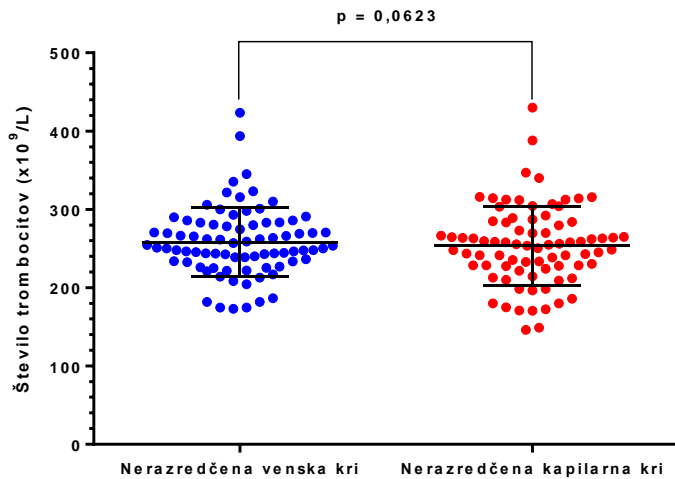
- Povprečno število trombocitov v nerazredčeni venski krvi ( $10^9/L$ ) ■
- Povprečno število trombocitov v nerazredčeni kapilarni krvi ( $10^9/L$ ) ■

Preglednica 9b: Osnovni statistični parametri meritev števila trombocitov v nerazredčenih vzorcih krvi.

	Nerazredčena venska kri	Nerazredčena kapilarna kri
Aritmetična sredina in SD	258,1 ± 44,01	253,8 ± 50,43
Mediana (25. in 75. percentil)	252,3 (233,6-282,4)	255,3 (227,6-283,9)
Minimum	173	146
Maksimum	423,5	430

Parametrični parni t-test je pokazal, da so rezultati določanja števila trombocitov v vzorcih venske in kapilarne krvi med seboj primerljivi ( $p = 0,0623$ ).

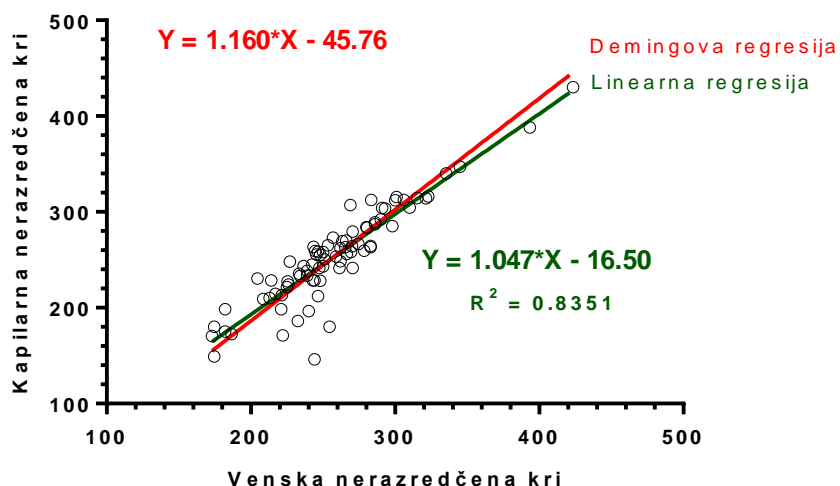




Slika 18: Grafični prikaz primerjave povprečnih vrednosti števila trombocitov, izmerjenih v vzorcih venske in kapilarne krvi; rezultati se med seboj ne razlikujejo statistično značilno ( $p = 0,0623$ ).

Vrednost Pearsonovega koeficienta korelacije  $r = 0,9139$  prav tako kaže na visoko stopnjo ujemanja oziroma moči povezave med vrednostmi trombocitov v vzorcih.

Primerljivost dveh spremenljivk, smo prav tako vrednotili z linearno in Demingovo regresijo.



Slika 19: Poteka in enačbi premic, določenih z linearno in Demingovo regresijo za trombocite (nerazredčeni krvni vzorci);  $R^2 = 0,8351$  kaže na dovolj dobro povezanost med spremenljivkama (linearna regresija).

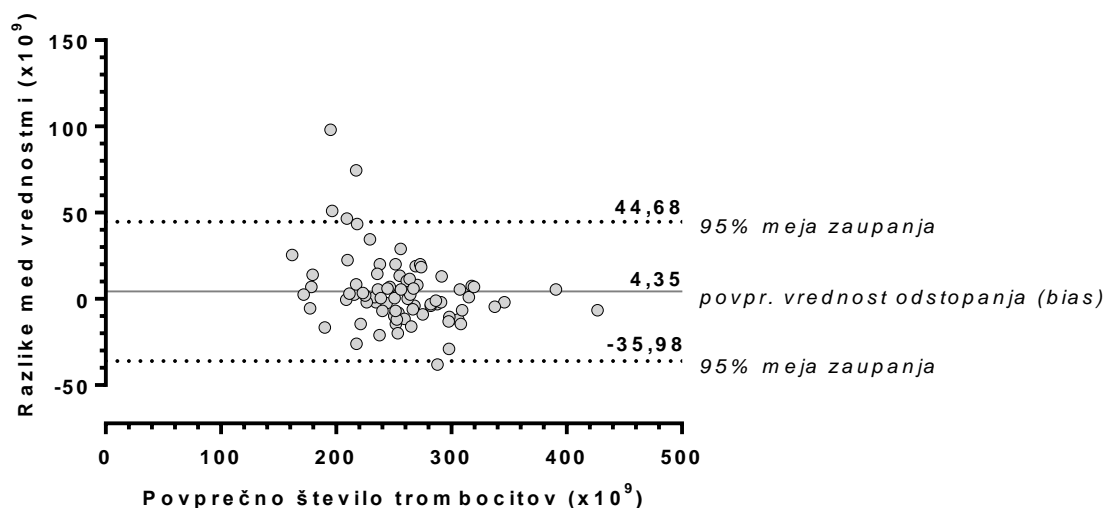
Preglednica 10a: Povprečne vrednosti in razlike meritev števila trombocitov v nerazredčenih vzorcih venske in kapilarne krvi, potrebne za izvedbo Bland-Altmanovega testa ( $n = 80$ ).

POVPREČJE	RAZLIKA								
177,25	-5,5	275	-9	264,25	2,5	250,75	0,5	297,5	-13
234,5	-2	426,75	-6,5	226,5	-2	259,25	-11,5	250,5	-10
317,75	7,5	298	-29	251,5	20	267	6	225	2
246,5	7	270,5	8	195	98	215,75	2,5	223,25	3,5
390,75	5,5	346	-2	209,25	46,5	240	-7	288	-38
254	-8	337,75	-4,5	217,25	74,5	178,5	7	273,75	18,5
251,75	-14,5	287,5	-3	217,5	-26	221,25	-14,5	252,5	-12
315	1	179,5	14	263,75	11,5	309,25	-6,5	218,25	43,5
256	29	261,25	10,5	243,75	-2,5	273	20	236,25	15,5
255,25	13,5	298,25	-10,5	291	-2	308,25	-14,5	161,75	25,5
307,25	5,5	229,25	34,5	266,5	-6	237,5	-21	238,75	0,5
208,75	-0,5	235,75	14,5	319,5	7	211,5	3	286,5	-1
238	20	268	-4	190,25	-16,5	236,25	5,5	171,75	2,5
306	-12	262	0	253,5	-20	217,25	8,5	265	-16
291,5	13	282	-4	209,75	22,5	244,5	6	256,25	5,5
269	19	233,5	1	282	-3	196,5	51	251,5	-7

Preglednica 10b: Povprečna vrednost odstopanja, njegove SD in 95 % intervala ujemanja, določenih z Bland-Altmanovim testom.

Odstopanje	4,350
SD odstopanja	20,58
95 % interval ujemanja	
Od	-35,98
Do	44,68

Povprečna vrednost odstopanja je 4,350, 95 % interval ujemanja pa je razmeroma širok.





Slika 20: Bland-Altmanov graf prikazuje razmeroma majhno sipanje vrednosti razlik števila trombocitov, določenih v nerazredčeni venski in kapilarni krvi, znotraj 95 % intervala ujemanja.

#### 4.4.2 REZULTATI MERITEV V RAZREDČENIH KRVNIH VZORCIH

Preglednica 11a: Rezultati meritev števila trombocitov v razredčenih (1:1) vzorcih venske in kapilarne krvi; prikazane so povprečne vrednosti dvojnih meritev (n = 80).

84,65	87,6	155	167,5	105,5	106,5	108	70
110	105	163,5	168	129	132,5	88,45	79,95
145,5	124	132	136,5	119	89	107	113,5

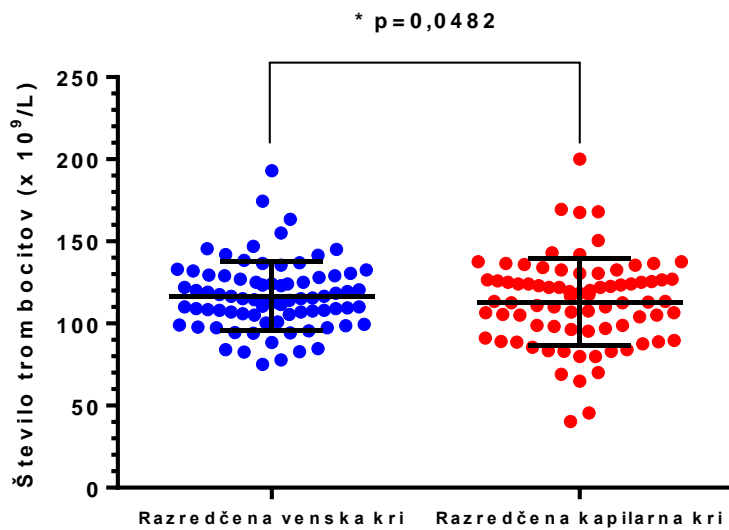
109	113	84,05	85,45	147	150,5	97,9	84
174,5	169,5	123	125,5	82,8	64,9	129,5	122
110	123,5	135,5	137,5	114,5	118,5	107,5	116,5
109	122	106	105	94,05	95,3	101	98,85
145	142	115	110	127	130,5	99	98,25
119,5	126	120,5	123	115,5	125	114	104
115	111	117,5	124	124	136,5	124	83
142	126,5	125	132,5	123,5	127	116,5	137,5
95,6	96,35	105	110	94,5	97,05	108	83,35
120	107	116,5	119,5	107	112,5	97,45	106,5
138,5	134	98,65	107,5	75,15	88,75	82,65	69
130,5	136	112,5	89,65	94,35	98,75	108,5	122,5
132,5	124	110,5	40,4	137	143	133	117,5
129	125	97,35	83	128	126,5	77,85	88,6
193	200	118,5	91,15	141,5	130,5	112,5	112,5
136,5	135,5	99,5	79,85	109,5	45,55	111,5	120
122	105,5	125	122	100,35	113,5	110	125

- Povprečno število trombocitov v razredčeni venski krvi ( $10^9/L$ ) 
- Povprečno število trombocitov v razredčeni kapilarni krvi ( $10^9/L$ ) 

Preglednica 11b: Osnovni statistični parametri meritev števila trombocitov v razredčenih vzorcih krvi.

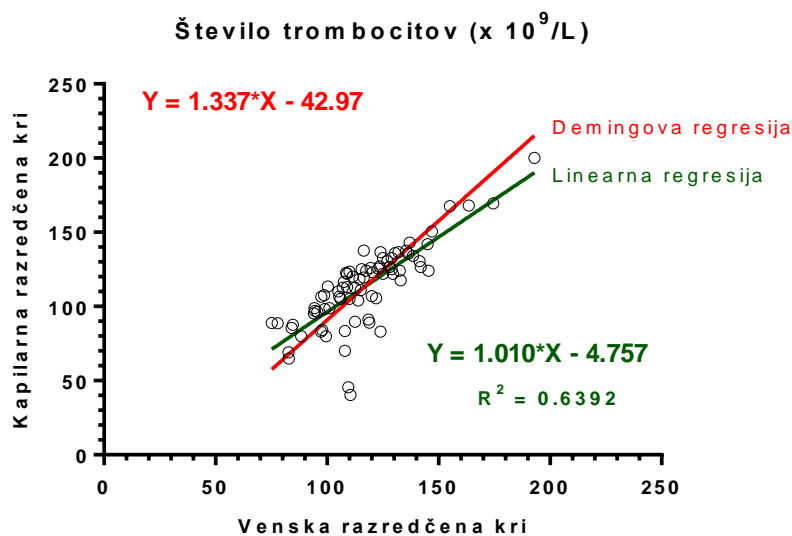
	Razredčena venska kri	Razredčena kapilarna kri
Aritmetična sredina in SD	116,7 ± 21,02	113,1 ± 26,56
Mediana (25. in 75. percentil)	115 (105-129)	113,5 (96,35-126,5)
Minimum	75,15	40,4
Maksimum	193	200

S parametričnim t-testom smo ugotovili, da je razlika med številom trombocitov v razredčenih vzorcih venske in kapilarne krvi na meji statistično značilne različnosti, kar pomeni, da smo z redčenjem vzorcev dobili slabše rezultate v primerjavi z nerazredčenimi.



Slika 21: Grafični prikaz primerjave povprečnih vrednosti števila trombocitov, določenih v vzorcih razredčene venske in kapilarne krvi; rezultati so na meji statistično značilne razlike ( $p = 0,0482$ ).

Za izračun Pearsonovega koeficienta korelacije  $r = 0,7995$  smo ugotovili srednjo stopnjo ujemanja oziroma moči povezave med vrednostmi, izmerjenimi v razredčenih vzorcih venske in kapilarne krvi.



Slika 22: Poteka in enačbi premic, določenih z linearno in Demingovo regresijo, za trombocite (razredčeni krvni vzorci).  $R^2 = 0,6392$  je delež variance, ki si ga delita spremenljivki. Vidimo tudi precejšnjo razliko v poteku premic, pri čemer je tista, ki smo jo določili z Demingovo regresijo, ustrežnejša.

To ugotovitev smo potrdili z linearno in Demingovo regresijo. Vrednost koeficienta determinacije  $R^2$  je bila v tem primeru 0,6392.

Za izvedbo Bland-Altmanovega testa smo izmerjene rezultate ustrezno statistično uredili, kar prikazuje preglednica 12a.

Preglednica 12a: Povprečna vrednost in razlike meritev števila trombocitov v razredčenih vzorcih venske in kapilarne krvi (n = 80).

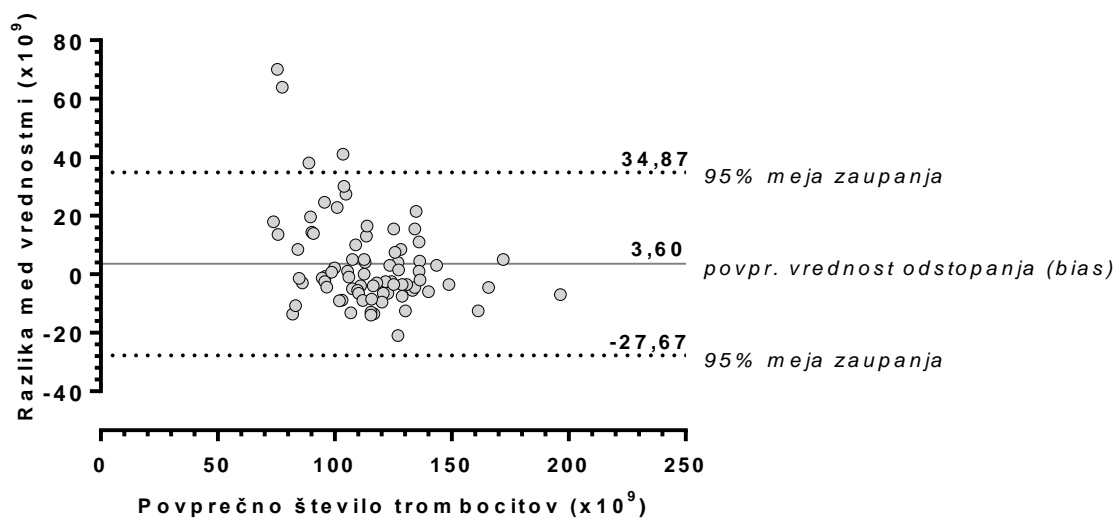
POVPREČJE	RAZLIKA								
86,125	-2,95	127	4	118	-3	120,25	-9,5	125,75	7,5
107,5	5	196,5	-7	103,075	-8,85	130,25	-12,5	112	-9
134,75	21,5	136	1	101,075	22,85	125,25	-3,5	99,925	2,15
111	-4	113,75	16,5	75,45	70,1	95,775	-2,55	98,625	0,75
172	5	161,25	-12,5	90,175	14,35	109,75	-5,5	109	10
116,75	-13,5	165,75	-4,5	104,825	27,35	81,95	-13,6	103,5	41
115,5	-13	134,25	-4,5	89,675	19,65	96,55	-4,4	127	-21

143,5	3	84,75	-1,4	123,5	3	140	-6	95,675	24,65
122,75	-6,5	124,25	-2,5	106	-1	127,25	1,5	101,975	-9,05
113	4	136,5	-2	130,75	-3,5	136	11	75,825	13,65
134,25	15,5	105,5	1	104	30	77,525	63,95	115,5	-14
95,975	-0,75	112,5	5	148,75	-3,5	106,925	-13,15	125,25	15,5
113,5	13	121,75	-2,5	73,85	17,9	89	38	83,225	-10,75
136,25	4,5	120,75	-6,5	116,5	-4	84,2	8,5	112,5	0
133,25	-5,5	128,75	-7,5	94,675	-1,25	110,25	-6,5	115,75	-8,5
128,25	8,5	107,5	-5	128,75	-3,5	90,95	13,9	117,5	-15

Preglednica 12b: Rezultati Bland-Altmanovega testa.

Odstopanje	3,602
SD odstopanja	15,95
95 % interval ujemanja	
Od	-27,67
Do	34,87

Tako povprečna vrednost odstopanja (3,602) kot 95 % interval ujemanja sta razmeroma velika, kar kaže na določeno stopnjo različnosti med spremenljivkama.





Slika 23: Bland-Altmanov graf: sipanje razlik vrednosti števila trombocitov v razredčeni venski in kapilarni krvi znotraj 95 % intervala ujemanja je večje kot v primeru nerazredčenih vzorcev.

## 4.5 REZULTATI MERITEV ŠTEVILA ERITROCITOV V VZORCIH VENSKE IN KAPILARNE KRVI PO OPTIMIZIRANEM POSTOPKU

### 4.5.1 REZULTATI MERITEV V NERAZREDČENIH KRVNIH VZORCIH

Preglednica 13a: Rezultati meritev števila eritrocitov v nerazredčenih vzorcih venske in kapilarne krvi; prikazane so povprečne vrednosti dvojnih meritev (n = 80).

5,24	5,31	5,45	5,36	5,55	5,53	4,92	5,01
4,3	4,27	5,35	5,4	4,51	4,55	5,58	5,47
5,63	5,54	4,61	4,57	5,42	5,34	6,09	6,02
5,29	5,26	4,64	4,67	5,43	5,23	5,12	5,04
5,16	5,24	4,45	4,53	5,3	5,23	5,61	5,38
5,22	5,23	4,87	4,89	5,03	4,95	5,52	5,79
5,19	5,1	5,06	5,07	5,25	5,22	5,3	5,25
5,37	5,49	4,54	4,48	5,11	5,13	5,61	5,45
5,31	5,36	4,87	4,8	5,85	5,71	6,22	6,01
5,76	5,88	5,75	5,71	4,96	4,9	5,33	5,2
5,44	5,3	5,03	4,98	5,18	5,11	5,2	5,32
5,65	5,57	5,14	5,17	5,82	5,84	6,02	6,12
5,26	5,16	5,33	5,33	5,67	5,55	5,2	5,11
5,56	5,59	5,43	5,6	5,5	5,24	5,4	5,44
5,63	5,52	6,05	5,96	5,15	5,12	5,23	5,28
4,91	5	4,88	4,52	5,23	4,93	5,08	5,08
4,87	4,94	5,23	5,23	5,46	5,54	4,13	4,19
4,85	4,85	4,62	4,56	5,68	5,68	5,36	5,4
4,99	5,33	5,82	5,34	5,55	5,37	5,33	5,27
5,29	5,26	5,03	4,89	5,51	5,55	5,05	5,01

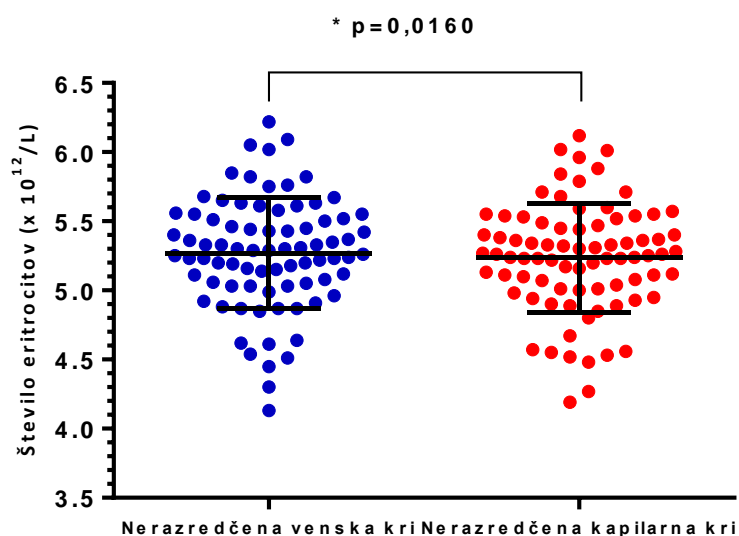
- Povprečno število eritrocitov v nerazredčeni venski krvi ( $10^{12}/L$ ) 
- Povprečno število eritrocitov v nerazredčeni kapilarni krvi ( $10^{12}/L$ ) 



Preglednica 13b: Osnovni statistični parametri meritev števila eritrocitov v nerazredčenih vzorcih krvi.

	Nerazredčena venska kri	Nerazredčena kapilarna kri
Aritmetična sredina in SD	5,269 ± 0,4025	5,235 ± 0,3933
Mediana (25. in 75. percentil)	5,29 (5,035-5,543)	5,255 (5,01-5,485)
Minimum	4,13	4,19
Maksimum	6,22	6,12

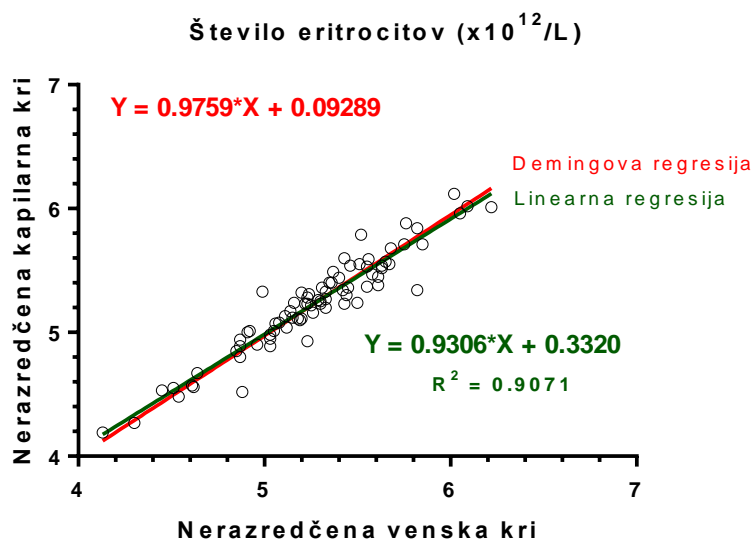
Parametrični parni t-test dobljenih rezultatov je pokazal, da se povprečni števili eritrocitov, določenih v nerazredčenih vzorcih venske in kapilarne krvi, sicer statistično značilno razlikujeta, pri čemer pa je vrednost  $p = 0,0160$  blizu mejne vrednosti 0,05.



Slika 24: Grafični prikaz primerjave povprečnih vrednosti števila eritrocitov, določenih v vzorcih nerazredčene krvi ( $p = 0,0160$ ).

Pearsonov koeficient korelacije  $r = 0,9524$  kaže na visoko stopnjo ujemanja oziroma moči povezave med rezultati, izmerjenimi v nerazredčenih vzorcih venske in kapilarne krvi.

Dobro stopnjo povezanosti med spremenljivkama, smo potrdili tudi z linearno ( $R^2 = 0,9071$ ) in Demingovo regresijo.



Slika 25: Poteka in enačbi premic, določenih z linearno in Demingovo regresijo, za eritrocite (nerazredčeni krvni vzorci).  $R^2 = 0,9071$ , kar kaže na veliko stopnjo skupne variance, ki si jo delita spremenljivki.

Izvedli smo še Bland-Altmanov test in dobljene rezultate predstavili tudi grafično (slika 26).

Preglednica 14a: Povprečne vrednosti in razlike meritev števila eritrocitov, ki smo jih uporabili za izvedbo Bland-Altmanovega testa ( $n = 80$ ).

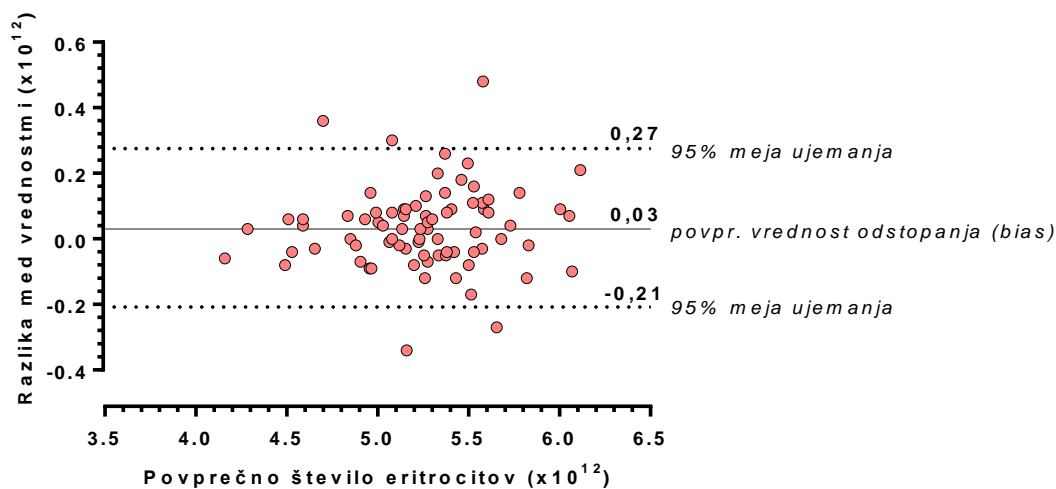
POVPREČJE	RAZLIKA								
5,275	-0,07	4,905	-0,07	5,33	0	5,78	0,14	5,495	0,23
4,285	0,03	4,85	0	5,515	-0,17	4,93	0,06	5,655	-0,27
5,585	0,09	5,16	-0,34	6,005	0,09	5,145	0,07	5,275	0,05
5,275	0,03	5,275	0,03	4,7	0,36	5,83	-0,02	5,53	0,16
5,2	-0,08	5,405	0,09	5,23	0	5,61	0,12	6,115	0,21
5,225	-0,01	5,375	-0,05	4,59	0,06	5,37	0,26	5,265	0,13
5,145	0,09	4,59	0,04	5,58	0,48	5,135	0,03	5,26	-0,12
5,43	-0,12	4,655	-0,03	4,96	0,14	5,08	0,3	6,07	-0,1
5,335	-0,05	4,49	-0,08	5,54	0,02	5,5	-0,08	5,155	0,09
5,82	-0,12	4,88	-0,02	4,53	-0,04	5,68	0	5,42	-0,04

5,37	0,14	5,065	-0,01	5,38	0,08	5,46	0,18	5,255	-0,05
5,61	0,08	4,51	0,06	5,33	0,2	5,53	-0,04	5,08	0
5,21	0,1	4,835	0,07	5,265	0,07	4,965	-0,09	4,16	-0,06
5,575	-0,03	5,73	0,04	4,99	0,08	5,525	0,11	5,38	-0,04
5,575	0,11	5,005	0,05	5,235	0,03	6,055	0,07	5,3	0,06
4,955	-0,09	5,155	-0,03	5,12	-0,02	5,08	0,08	5,03	0,04

Preglednica 14b: Rezultati Bland-Altmanovega testa: povprečna vrednost odstopanja in njegove SD ter 95 % interval ujemanja.

Odstopanje	0,03387
SD odstopanja	0,1231
95 % interval ujemanja	
Od	-0,2074
Do	0,2752

Povprečna vrednost odstopanja je majhna (0,03387), prav tako sta ozki tudi meji 95 % intervala ujemanja.



Slika 26: Bland-Altmanov graf: sipanje razlik vrednosti števila eritrocitov v nerazredčenih vzorcih venske in kapilarne krvi znotraj 95 % intervala ujemanja je enakomerno, kar kaže na primerljivost obeh vrst rezultatov.

#### 4.5.2 REZULTATI MERITEV V RAZREDČENIH KRVNIH VZORCIH

Preglednica 15a: Rezultati meritev števila eritrocitov v razredčenih vzorcih venske in kapilarne krvi; prikazane so povprečne vrednosti dvojnih meritev (n = 80).

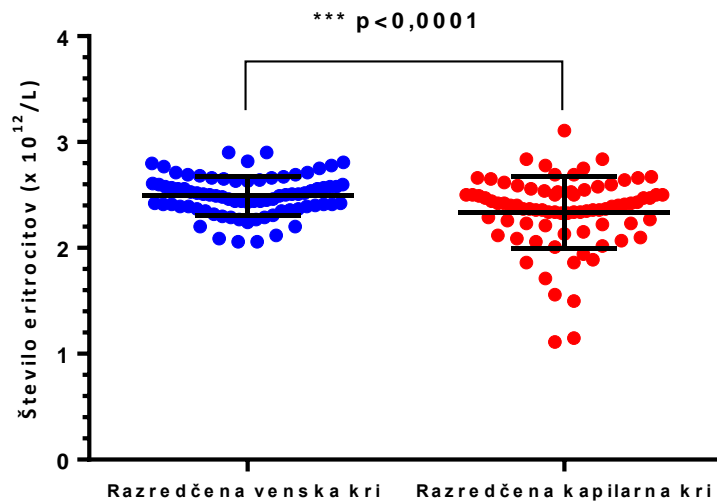
2,64	2,54	2,58	2,69	2,56	2,6	2,36	1,5
2,06	2,06	2,57	2,64	2,06	2,01	2,69	1,94
2,58	2,35	2,2	2,23	2,56	1,89	2,81	2,84
2,46	2,5	2,24	2,26	2,63	2,53	2,44	2,37
2,42	2,33	2,12	2,13	2,5	1,71	2,66	2,33
2,43	2,5	2,35	2,36	2,39	2,39	2,58	2,69
2,39	2,47	2,31	2,37	2,35	2,4	2,48	2,36
2,49	2,5	2,2	2,02	2,44	2,47	2,6	2,5
2,51	2,58	2,27	2,34	2,71	2,75	2,9	2,12
2,69	2,78	2,68	2,66	2,45	2,66	2,41	1,56
2,67	2,34	2,37	2,34	2,44	2,41	2,37	2,36
2,78	2,44	2,41	2,42	2,77	2,84	2,9	2,4
2,42	2,4	2,5	2,5	2,66	2,65	2,71	2,42
2,61	2,67	2,56	2,62	2,51	2,53	2,54	2,43
2,65	2,59	2,8	2,37	2,44	2,5	2,63	2,47
2,27	2,36	2,3	1,15	2,49	2,23	2,41	2,09
2,29	2,34	2,82	2,07	2,57	2,55	2,09	2,15
2,32	2,29	2,29	1,86	2,75	2,27	2,52	2,21
2,51	2,49	2,41	1,86	2,53	1,11	2,46	2,56
2,52	2,22	2,4	2,1	2,6	3,11	2,39	2,42

- Povprečno število eritrocitov v razredčeni venski krvi ( $10^{12}/L$ )
- Povprečno število eritrocitov v razredčeni kapilarni krvi ( $10^{12}/L$ )

Preglednica 15b: Osnovni statistični parametri meritev števila eritrocitov v razredčenih vzorcih krvi.

	Razredčena venska kri	Razredčena kapilarna kri
Aritmetična sredina in SD	2,493 ± 0,1851	2,338 ± 0,3394
Mediana (25. in 75. percentil)	2,495 (2,39-2,625)	2,395 (2,223-2,53)
Minimum	2,06	1,11
Maksimum	2,9	3,11

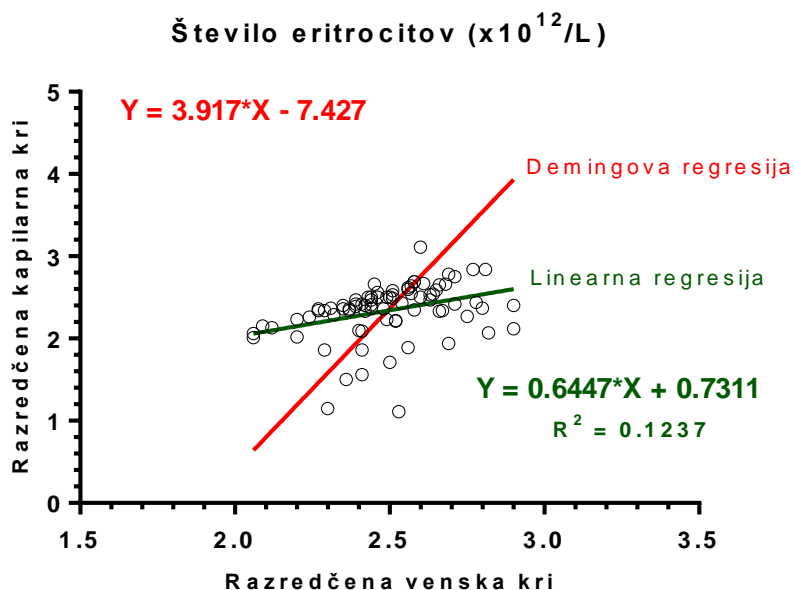
Rezultate smo primerjali s parametričnim parnim t-testom in ugotovili, da se statistično značilno razlikujejo med seboj ( $p < 0,0001$ ).



Slika 27: Grafični prikaz primerjave povprečnih vrednosti števila eritrocitov, določenih v vzorcih razredčene krvi. Rezultati se med seboj statistično značilno razlikujejo ( $p < 0,0001$ ).

Tudi korelacijska analiza je pokazala nizko stopnjo ujemanja oziroma majhen obseg povezave med rezultati, izmerjenimi v razredčeni venski in kapilarni krvi, saj je bila vrednost Pearsonovega koeficienta korelacije  $r = 0,3517$ .

Z linearno in Demingovo regresijo smo dodatno potrdili slabo ujemanje med izmerjenimi vrednostmi ( $R^2 = 0,1237$ ).



Slika 28: Poteka in enačbi premic, določenih z linearno in Demingovo regresijo, za eritrocite (razredčeni krvni vzorci); vrednost  $R^2 = 0,1237$ , kar pomeni, da si spremenljivki delita le malo variance, poleg tega pa sta poteka premic zelo različna.

Izvedli smo še Bland-Altmanov test in izrisali ustrezen graf (slika 29).

Preglednica 16a: Povprečne vrednosti in razlike meritev števila eritrocitov v razredčenih vzorcih krvi, s katerimi smo izvedli Bland-Altmanov test ( $n = 80$ ).

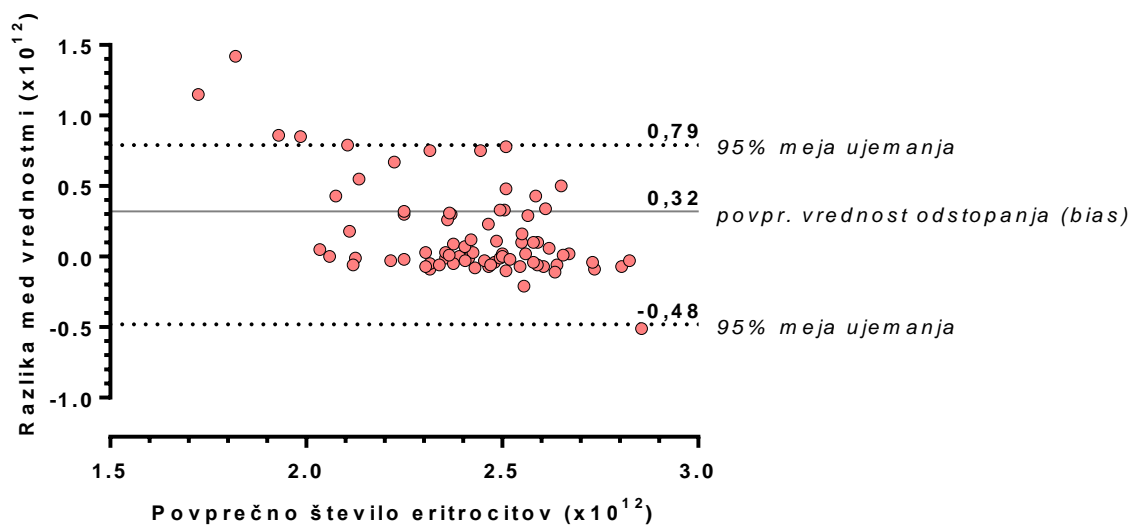
POVPREČJE	RAZLIKA								
2,59	0,1	2,315	-0,05	2,5	0	2,73	-0,04	2,495	0,33
2,06	0	2,305	0,03	2,59	-0,06	2,555	-0,21	2,635	-0,11
2,465	0,23	2,5	0,02	2,585	0,43	2,425	0,03	2,42	0,12
2,48	-0,04	2,37	0,3	1,725	1,15	2,805	-0,07	2,55	0,1
2,375	0,09	2,635	-0,11	2,445	0,75	2,655	0,01	2,51	0,78
2,465	-0,07	2,605	-0,07	2,075	0,43	2,52	-0,02	1,985	0,85
2,43	-0,08	2,215	-0,03	2,135	0,55	2,47	-0,06	2,365	0,01
2,495	-0,01	2,25	-0,02	2,25	0,3	2,36	0,26	2,65	0,5
2,545	-0,07	2,125	-0,01	2,58	-0,04	2,56	0,02	2,565	0,29
2,735	-0,09	2,355	-0,01	2,035	0,05	2,51	0,48	2,485	0,11
2,505	0,33	2,34	-0,06	2,225	0,67	1,82	1,42	2,55	0,16

2,61	0,34	2,11	0,18	2,58	0,1	2,855	-0,51	2,25	0,32
2,41	0,02	2,305	-0,07	2,105	0,79	1,93	0,86	2,12	-0,06
2,64	-0,06	2,67	0,02	2,39	0	2,315	0,75	2,365	0,31
2,62	0,06	2,355	0,03	2,375	-0,05	2,825	-0,03	2,51	-0,1
2,315	-0,09	2,415	-0,01	2,455	-0,03	2,405	0,07	2,405	-0,03

Preglednica16b: Rezultati Bland-Altmanovega testa, in sicer povprečna vrednost odstopanja in njegove SD ter 95 % interval ujemanja.

Odstopanje	0,1548
SD odstopanja	0,3245
95 % interval ujemanja	
Od	-0,4812
Do	0,7907

Povprečna vrednost odstopanja je majhna (0,1548), ozek pa je tudi 95 % interval ujemanja.



Slika 29: Bland-Altmanov graf: sipanje razlik vrednosti števila eritrocitov v razredčenih vzorcih venske in kapilarne krvi. Znotraj 95 % intervala ujemanja je izrazito nesimetrično in kaže na slabo primerljivost rezultatov.

## 4.6 REZULTATI MERITEV ŠTEVILA LEVKOCITOV V VZORCIH VENSKE IN KAPILARNE KRVI PO OPTIMIZIRANEM POSTOPKU

### 4.6.1 REZULTATI MERITEV V NERAZREDČENIH KRVNIH VZORCIH

Preglednica 17a: Rezultati meritev števila levkocitov v nerazredčenih vzorcih venske in kapilarne krvi; prikazane so povprečne vrednosti dvojnih meritev (n = 80).

5,28	4,89	11,3	10,5	6,01	5,55	5,28	4,93
7,88	7,47	8,34	8,75	6,26	6,22	6,56	6,36
13,5	13,35	5,73	5,23	5,6	5,66	9,41	8,97
8,54	9,07	7,57	6,97	7,46	7,02	6,02	5,64
8,09	8,65	4,59	4,5	7,35	8,32	6,84	6,5
6,97	7,02	7,31	7,58	8,55	8,04	8,24	8,67
6,47	6,43	5,07	4,81	6,06	6,41	9,88	9,93
6,33	6,29	4,72	4,59	7,76	7,63	4,69	4,82
8,38	8,68	7,79	7,66	7,82	7,77	7,01	7,2
9,4	9,19	8,11	7,38	8,69	8,26	4,93	4,63
6,04	5,6	5,45	4,9	7,53	7,71	6,83	6,99
7,77	7,85	5,75	6,01	6,74	6,47	6,55	5,86
7,39	6,78	8,38	8,07	8,55	8,62	6,2	6,86
5,42	5,04	8,03	8,2	9,02	8,21	5,99	6
6,89	6,71	7,52	6,79	5,34	5,37	7,5	7,17
4,94	5,09	11,8	5,7	10,65	10,8	6,61	6,65
9,25	9,59	6,37	7,11	10,95	11,2	7,29	7,37
9,55	9,6	6,03	6,18	6,6	6,91	7,48	7,21
7,25	7,43	6,36	7,6	6,58	6,46	5,67	6,02
6,27	6	6,04	6,18	7,68	7,53	8,22	7,83

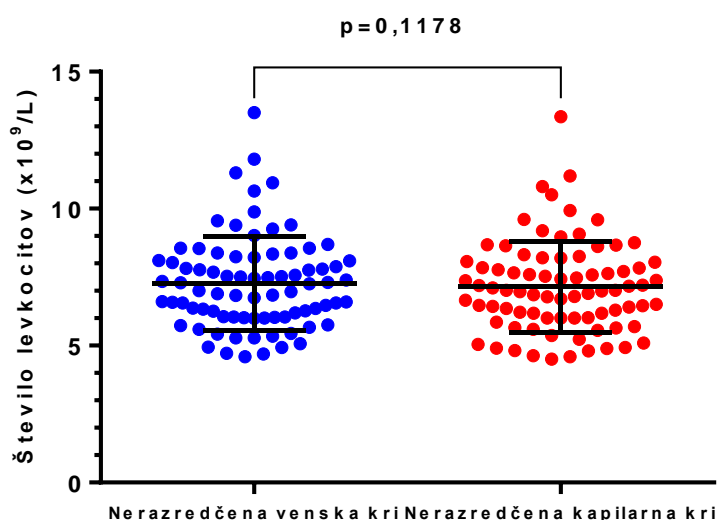
- Povprečno število levkocitov v nerazredčeni venski krvi ( $10^9/L$ ) ■
- Povprečno število levkocitov v nerazredčeni kapilarni krvi ( $10^9/L$ ) ■



Preglednica 17b: Osnovni statistični parametri levkocitov, določenih v nerazredčenih vzorcih krvi.

	Nerazredčena venska kri	Nerazredčena kapilarna kri
Aritmetična sredina in SD	7,278 ± 1,706	7,140 ± 1,664
Mediana (25. in 75. percentil)	7,13 (6,04-8,193)	7,005 (6,003-8,063)
Minimum	4,59	4,5
Maksimum	13,5	13,35

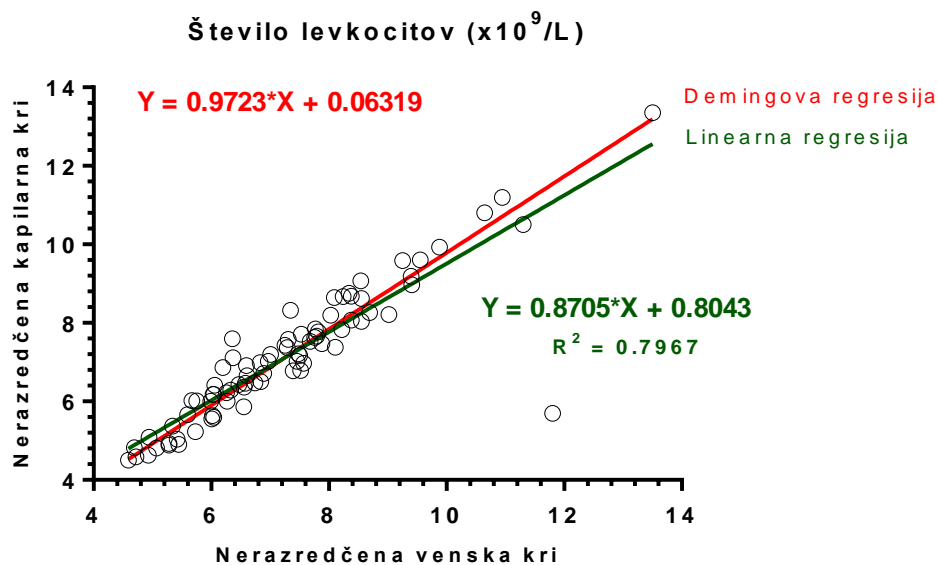
S parametričnim parnim t-testom smo ugotovili, da so vrednosti števila levkocitov, določene v nerazredčenih vzorcih venske in kapilarne krvi, med seboj primerljive ( $p = 0,1178$ ).



Slika 30: Grafični prikaz primerjave povprečnih vrednosti števila levkocitov, določenih v vzorcih nerazredčene krvi. Rezultati se med seboj ne razlikujejo statistično značilno ( $p = 0,1178$ ).

Tudi Pearsonov koeficient korelacije  $r = 0,8926$  kaže na visoko stopnjo ujemanja oziroma moči povezave med rezultati v venski in kapilarni krvi.

Z linearno in Demingovo regresijo smo prav tako dokazali, da se vrednosti levkocitov, določene v obeh vrstah krvnih vzorcev, ne razlikujeta. To potrjuje tudi vrednost koeficienta determinacije  $R^2 = 0,7967$ , izračunanega s pomočjo linearne regresije.



Slika 31: Poteka in enačbi premic, določenih z linearno in Demingovo regresijo, za levkocite (nerazredčeni krvni vzorci); vrednost  $R^2 = 0,7967$  (linearna regresija).

Izvedli smo še Bland-Altmanov test in narisali ustrezen graf (slika 32).

Preglednica 18a: Povprečne vrednosti in razlike meritev števila levkocitov v nerazredčenih vzorcih krvi, ki so osnova za izvedbo Bland-Altmanovega testa ( $n = 80$ ).

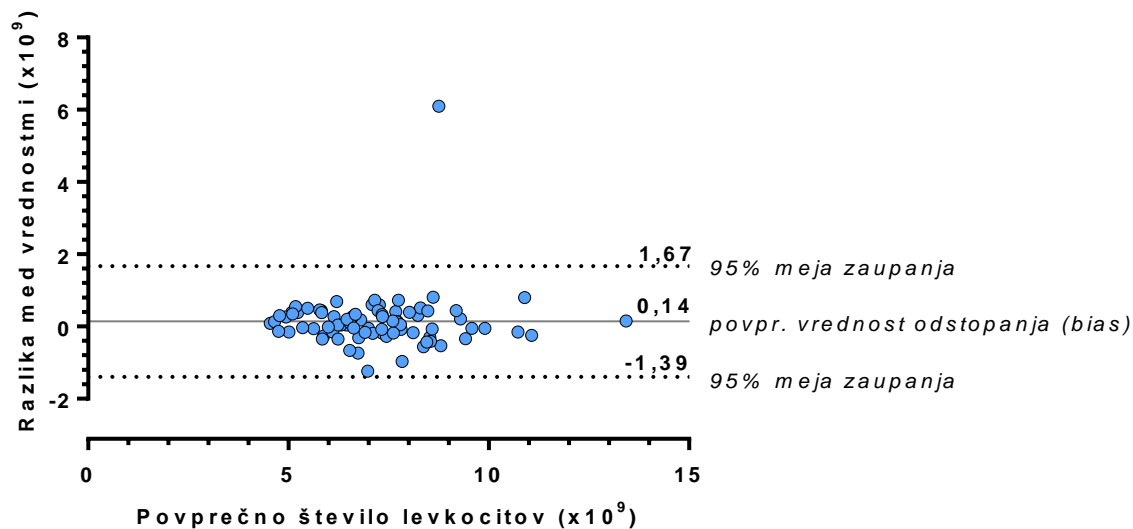
POVPREČJE	RAZLIKA								
5,085	0,39	9,42	-0,34	8,225	0,31	7,795	0,05	6,67	0,34
7,675	0,41	9,575	-0,05	8,115	-0,17	8,475	0,43	8,455	-0,43
13,425	0,15	7,34	-0,18	7,155	0,73	7,62	-0,18	9,905	-0,05
8,805	-0,53	6,135	0,27	8,75	6,1	6,605	0,27	4,755	-0,13
8,37	-0,56	10,9	0,8	0,74	-0,74	8,585	-0,07	7,105	-0,19
6,995	-0,05	8,545	-0,41	6,105	-0,15	8,615	0,81	4,78	0,3
6,45	0,04	5,48	0,5	6,98	-1,24	5,355	-0,03	6,91	-0,16
6,31	0,04	7,27	0,6	6,11	-0,14	10,725	-0,15	6,205	0,69
8,53	-0,3	4,545	0,09	5,78	0,46	11,075	-0,25	6,53	-0,66

9,295	0,21	7,445	-0,27	6,24	0,04	6,755	-0,31	5,995	-0,01
5,82	0,44	4,94	0,26	5,63	-0,06	6,52	0,12	7,335	0,33
7,81	-0,08	4,655	0,13	7,24	0,44	7,605	0,15	6,63	-0,04
7,085	0,61	7,725	0,13	7,835	-0,97	5,105	0,35	7,33	-0,08
5,23	0,38	7,745	0,73	8,295	0,51	6,46	0,2	7,345	0,27
6,8	0,18	5,175	0,55	6,235	-0,35	9,19	0,44	5,845	-0,35
5,015	-0,15	5,88	-0,26	7,695	0,13	5,83	0,38	8,025	0,39

Preglednica 18b: Rezultati Bland-Altmanovega testa: povprečna vrednost odstopanja in njegove SD ter 95 % interval ujemanja.

Odstopanje	0,1383
SD odstopanja	0,7820
95 % interval ujemanja	
Od	-1,395
Do	1,671

Povprečna vrednost odstopanja je nizka (0,1383), prav tako je ozek tudi 95 % interval ujemanja.



Slika 32: Grafični prikaz Bland-Altmanovega testa. Vidimo, da je sipanje razlik vrednosti števila levkocitov med nerazredčeno venko in kapilarno krvjo enakomerno porazdeljeno znotraj 95 % intervala ujemanja.

#### 4.6.2 REZULTATI MERITEV V RAZREDČENIH KRVNIH VZORCIH

Preglednica 19a: Rezultati meritev števila levkocitov v razredčenih vzorcih venske in kapilarne krvi; prikazane so povprečne vrednosti dvojnih meritev (n = 80).

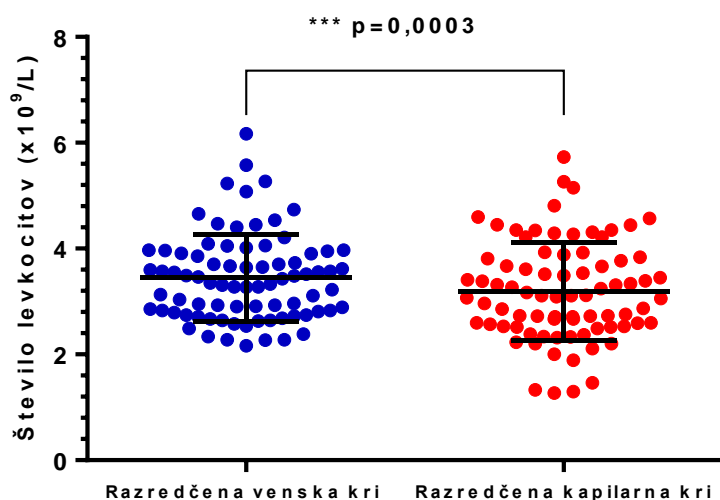
2,64	2,23	5,23	5,26	2,67	2,72	2,54	1,46
3,9	3,39	4,06	4,35	2,86	2,67	2,91	2,37
6,17	5,73	2,68	2,57	2,72	1,89	4,47	4,27
3,96	4,29	3,64	3,27	3,55	3,38	2,83	2,6
3,91	3,92	2,16	2,11	3,43	2,52	3,28	2,76
3,22	3,32	3,57	3,67	3,97	3,81	3,97	4,31
3,11	3,07	2,38	2,2	2,81	2,96	4,74	4,57
2,9	2,87	2,28	2	3,73	3,61	2,28	2,2
4,02	4,22	3,7	3,54	3,7	3,77	3,28	2,53
4,54	4,35	3,95	3,41	4,4	4,45	2,27	1,33
2,95	2,52	2,64	2,32	3,62	3,49	3,56	3,34
3,6	3,31	2,74	2,71	3,33	3,09	3,04	2,72
3,35	3,11	4,09	3,66	4,05	4,22	2,96	2,73
2,58	2,38	3,86	3,84	4,21	3,93	2,63	3,12
3,27	3,17	3,57	2,71	2,49	2,59	3,52	2,86
2,34	2,34	5,58	1,3	5,08	4,81	2,93	3,11
4,45	4,6	2,71	2,73	5,27	5,15	3,48	3,24
4,66	4,44	2,83	2,49	3,31	3,06	2,74	3,52
3,49	3,45	3,46	2,53	3,13	1,27	2,89	2,33
2,93	2,67	2,79	2,6	3,67	4,34	3,65	3,88

- Povprečno število levkocitov v razredčeni venski krvi ( $10^9/L$ ) ■
- Povprečno število levkocitov v razredčeni kapilarni krvi ( $10^9/L$ ) ■

Preglednica 19b: Osnovni statistični parametri meritev števila levkocitov v razredčenih vzorcih krvi.

	Razredčena venska kri	Razredčena kapilarna kri
Aritmetična sredina in SD	3,449 ± 0,8181	3,195 ± 0,9305
Mediana (25. in 75. percentil)	3,39 (2,815-3,94)	3,11 (2,54-3,833)
Minimum	2,16	1,27
Maksimum	6,17	5,73

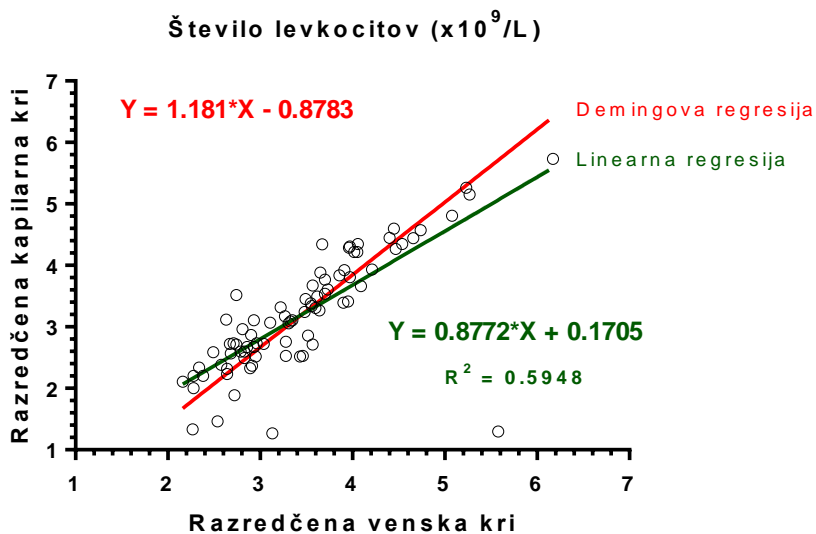
Izvedli smo parametrični parni t-test in ugotovili, da so rezultati meritev levkocitov v razredčenih vzorcih venske in kapilarne krvi statistično značilno različni ( $p = 0,0003$ ).



Slika 33: Grafični prikaz primerjave povprečnih vrednosti števila levkocitov, določenih v vzorcih razredčene venske in kapilarne krvi. Rezultati se med seboj statistično značilno razlikujejo ( $p = 0,0003$ ).

Izračunali smo Pearsonov koeficient korelacije  $r = 0,7712$ , ki nam kaže določeno stopnjo ujemanja oziroma moči povezave med vrednostmi, določenimi v razredčeni venski in kapilarni krvi.

Z linearno in Demingovo regresijo, smo določili potek regresijskih premic skozi točke povprečnih vrednosti meritev števila levkocitov v razredčenih vzorcih venske in kapilarne krvi. Vrednost  $R^2 = 0,5948$  (linearna regresija) kaže na to, da si spremenljivki delita več kot polovico variance in da sta delno primerljivi.



Slika 34: Poteka in enačbi premic, določenih z linearno in Demingovo regresijo, za levkocite (razredčeni krvni vzorci); vrednost  $R^2 = 0,5948$  (linearna regresija).

Sledil je še Bland-Altmanov test in grafični prikaz njegovih rezultatov (slika 35).

Preglednica 20a: Povprečne vrednosti in razlike meritev števila levkocitov v razredčeni venski in kapilarni krvi, s katerimi smo izvedli Bland-Altmanov test ( $n = 80$ ).

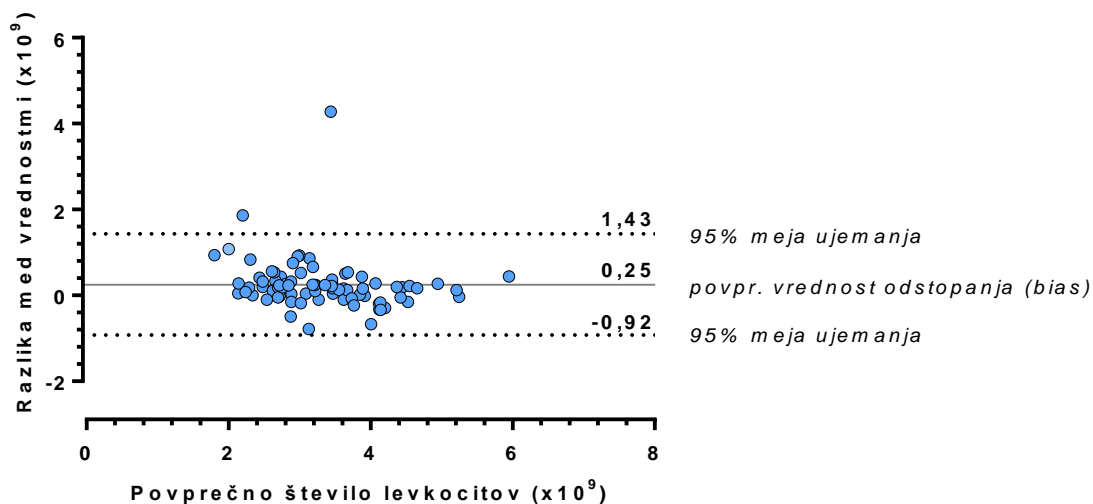
POVPREČJE	RAZLIKA								
2,435	0,41	4,525	-0,15	3,875	0,43	3,735	-0,07	3,02	0,52
3,645	0,51	4,55	0,22	3,85	0,02	4,425	-0,05	4,14	-0,34
5,95	0,44	3,47	0,04	3,14	0,86	3,555	0,13	4,655	0,17
4,125	-0,33	2,8	0,26	3,44	4,28	3,21	0,24	2,24	0,08
3,915	-0,01	5,245	-0,03	2,72	-0,02	4,135	-0,17	2,905	0,75
3,27	-0,1	4,205	-0,29	2,66	0,34	4,07	0,28	1,8	0,94
3,09	0,04	2,625	0,11	2,995	0,93	2,54	-0,1	3,45	0,22
2,885	0,03	3,455	0,37	2,695	0,19	4,945	0,27	2,88	0,32
4,12	-0,2	2,135	0,05	2,695	-0,05	5,21	0,12	2,845	0,23
4,445	0,19	3,62	-0,1	2,765	0,19	3,185	0,25	2,875	-0,49
2,735	0,43	2,29	0,18	2,305	0,83	2,2	1,86	3,19	0,66
3,455	0,29	2,14	0,28	3,465	0,17	4,005	-0,67	3,02	-0,18
3,23	0,24	3,62	0,16	2,975	0,91	2	1,08	3,36	0,24
2,48	0,2	3,68	0,54	3,89	0,16	2,64	0,54	3,13	-0,78

3,22	0,1	2,48	0,32	2,885	-0,15	4,37	0,2	2,61	0,56
2,34	0	2,725	0,03	3,67	0,12	2,715	0,23	3,765	-0,23

Preglednica 20b: Rezultati Bland-Altmanovega testa: povprečna vrednost odstopanja in njegove SD ter 95 % interval ujemanja.

Odstopanje	0,2531
SD odstopanja	0,6008
95 % interval ujemanja	
Od	-0,9244
Do	1,431

Povprečna vrednost odstopanja (0,2531) je majhna, ozek pa je tudi 95 % interval ujemanja.



Slika 35: Bland-Altmanov graf, ki prikazuje majhno sipanje oziroma precej enakomerno porazdelitev v številu levkocitov, določenih v razredčenih vzorcih venske in kapilarne krvi.

V tem sklopu eksperimentov smo ugotovili, da je večji volumen odvzema kapilarne krvi ustrežnejši za določanje števila krvnih celic v njem. Poleg tega se je izkazalo, da redčenje krvnih vzorcev venske in kapilarne krvi z diluentom v razmerju 1:1 ni primerno, saj močno poslabša rezultate meritev.

## 5 SKLEP

Na podlagi rezultatov, ki smo jih dobili s standardnim, rutinskim in naknadno optimiziranim postopkom odvzema kapilarne krvi (večji odvzemni volumen), smo ugotovili, da lahko z njim nadomestimo vensko kri za določanje števila trombocitov pred tromboferezo. S tem bi lahko krvodajalcu na manj invaziven in obremenilen način odvzeli kontrolni vzorec krvi.

Ugotovili smo tudi, da z redčenjem vzorcev venske in kapilarne krvi z diluentom v razmerju 1:1 nismo dobili boljših, temveč bistveno slabše rezultate. Za rutinsko vpeljavo kapilarnega odvzema pred izvajanjem citaferez pa moramo dosledno upoštevati naslednje zahteve:

- Uporabiti moramo ustrezen material za odvzem kapilarne krvi, torej epruvete z večjim volumnom (npr. 500  $\mu$ L).
- Pred odvzemom se moramo prepričati, da ima oseba dovolj ogrete prste, s čimer dosežemo, da kri dobro teče, pri čemer, je potrebno manj stiskati prst, na katerem je odvzemno mesto.
- Pozorni moramo biti tudi na debelino kože. V primeru trše kože uporabimo lanceto z večjim rezilom.
- Mesto vboda obvezno razkužimo z alkoholnim robčkom in prvi dve kapljici krvi obrišemo s tamponom, da se v nadaljevanju odvzeti vzorec ne kontaminira.
- Paziti moramo tudi, da se med odvzemom ne naredi koagulum. Zato moramo po odvzemu vsakih 2 do 3 kapljic krvi z epruveto potolči po trdi podlagi, da vsebino dobro premešamo.
- Epruveta mora biti dobro zatesnjena, da jo lahko dobro premešamo z rahlim obračanjem ali s postavitvijo na valjčni mešalec za kri.
- Pomembno je tudi, da sta za odvzem kapilarne krvi po predpisanem postopku odgovorna največ dva laboratorijska delavca, saj lahko le tako zagotovimo manjši obseg analitičnih napak.



Dodatna ugotovitev našega eksperimentalnega dela je, da so pri določanju števila celic v vzorcih venske in kapilarne krvi z aparatom Cell-Dyn Ruby najbolj robustni levkociti, medtem ko trombociti in eritrociti kažejo precejšno stopnjo občutljivosti, ki lahko vpliva na variabilnost rezultatov.

## 6 LITERATURA

1. Pivk B: 1954-Laboratorijska hematologija: za srednje in tehnične šole: učbenik za program Laboratorijski tehnik pri predmetu Hematologije v 3. Letniku, Elanda, 2003: 17-89.
2. Pintar J, Glonar L: Hematologija učbenik, srednje izobraževanje VIP laboratorijska dela v zdravstvu, Srednja šola za farmacijo in zdravstvo, Ljubljana, 1989: 3-4.
3. Mihevc J: Diplomsko delo: Vloga medicinske sestre na področju kakovosti odvzema bioloških vzorcev za laboratorijske preiskave, Jesenice, april, 2013: 3-4.
4. Žemva M: Laboratorijska Hematologija, Državna založba Slovenije, Ljubljana 1968: 92-94.
5. <http://www.mt.mahidol.ac.th/e-learning/BasicTechniquesInHematology/lessons/lesson%202/Platelet/normal%20platelet/normal%20platelet%20picture1.htm>
6. Stefanović S: Hematologija, medicinska knjiga, Beograd-Zagreb, 1981: 696-710.
7. Bohinjec J: Temelji klinične hematologije, Ljubljana, 1983: 149-152.
8. Bresjanac M, Rupnik M: Patofiziologija s temelji fiziologije, 3., popravljena in dopolnjena izd.-Ljubljana: Inštitut za patološko fiziologijo, 2002.
9. <http://www.ztm.si/sl/krvodajalstvo/kako/citafereza/>
10. Andoljšek D: Zdravljenje s sestavinami krvi. Zdravstveni obzornik, 1991; 25: 161-164.
11. <http://www.dvidshub.net/image/535812/us-naval-hospital-okinawa-prepares-platelet-donations#.UbiR-5yCq9Y>
12. <http://resources.psmile.org/resources/equipment/specific-equipment/cell-dyn/Equ2.2-15%20Cell-Dyn%203700%20Operator%20Manual.pdf>
13. <http://www.sysmedlabs.com/index.php/equipment/analyzers/haematological>
14. [http://www2.kclj.si/kikkb/preiskave/priporocila\\_za\\_odvzeme/priporocilo\\_kapliarna\\_kri.pdf](http://www2.kclj.si/kikkb/preiskave/priporocila_za_odvzeme/priporocilo_kapliarna_kri.pdf)
15. [http://www.ism-mf.si/Preverjanje\\_ocetovstev/](http://www.ism-mf.si/Preverjanje_ocetovstev/)
16. [http://www2.kclj.si/kikkb/preiskave/priporocila\\_za\\_odvzeme/priporocilo\\_venska\\_kri.pdf](http://www2.kclj.si/kikkb/preiskave/priporocila_za_odvzeme/priporocilo_venska_kri.pdf)
17. <http://vizita.si/clanek/zdravozivljenje/redno-pregledujete-kri-in-urin.html>