

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JERNEJA SLEVEC

**MAGISTRSKA NALOGA**

MAGISTRSKI ŠTUDIJ  
LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JERNEJA SLEVEC

**OPREDELITEV IN OVREDNOTENJE NEKATERIH KRITERIJEV  
ZA MIKROSKOPSKI PREGLED KRVNEGA RAZMAZA**

**DEFINITION AND EVALUATION OF CERTAIN CRITERIA FOR  
MICROSCOPIC EXAMINATION OF BLOOD SMEARS**

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2015

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

Prva in posebna zahvala gre nedvomno moji mentorici, izr. prof. dr. Heleni Podgornik. Iskrena hvala za vso pomoč, strokovne nasvete in usmerjanje pri izdelavi magistrske naloge. Zahvalila bi se tudi vsem zaposlenim v laboratoriju za citologijo in imunologijo za vso pomoč in prijetno vzdušje. Zahvaljujem se tudi Pediatrični kliniki za posredovane pediatrične vzorce.

Z magistrsko nalogo se zaključuje lepo obdobje mojega življenja, zato bi se ob tej priložnosti rada zahvalila vsem, ki so verjeli vame in me podpirali tekom celotnega študija, še posebej moji družini, Roku, Nini, Nastji, Maji, Sandri in Urši.

## Izjava

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

Jerneja Slevec

## KAZALO VSEBINE

1	UVOD .....	1
1.1	MIKROSKOPSKI PREGLED KRVNEGA RAZMAZA .....	1
1.1.1	Priprava in pregled krvnega razmaza .....	2
1.2	PREGLEDOVANJE IN VREDNOTENJE KRVNEGA RAZMAZA .....	3
1.2.1	Pregled krvnega razmaza z oceno trombocitov .....	3
1.2.2	Mikroskopski pregled krvnega razmaza z diferenciranjem .....	3
1.2.3	Interpretativni pregled krvnega razmaza .....	4
1.3	NOVEJŠA PRIPOROČILA ZA PREGLED KRVNIH RAZMAZOV .....	4
1.3.1	KRITERIJI MEDNARODNEGA ZDRUŽENJA LABORATORIJSKE HEMATOLOGIJE (ISLH) .....	5
1.3.2	KRITERIJI FRANCOSKEGA ZDRUŽENJA ZA CELIČNO HEMATOLOGIJO (GFHC) .....	6
1.3.2.1	Prva analiza vzorcev .....	6
1.3.2.2	Smernice, ki se nanašajo na pacientove podatke .....	7
1.3.2.3	Smernice, ki se nanašajo na hematološke rezultate .....	7
1.3.2.4	Smernice, ki se nanašajo na opozorila analizatorja .....	9
1.4	ERITROBLASTI V VENSKI KRVI .....	12
1.4.1	Razvojne stopnje eritroblastov .....	12
1.4.2	Prisotnost eritroblastov v periferni krvi pri novorojenčkih .....	12
1.4.3	Prisotnost eritroblastov v periferni krvi pri odraslih .....	14
1.4.4	Korekcija levkocitov ob prisotnosti eritroblastov .....	14
2	NAMEN DELA .....	16
3	MATERIALI IN METODE .....	17
3.1	ZBIRANJE VZORCEV .....	17
3.2	LABORATORIJSKA OPREMA IN PRIPOMOČKI .....	17
3.3	HEMATOLOŠKI ANALIZATOR SYSMEX XN-1000 .....	18
3.3.1	Reagenti in kontrole .....	18
3.3.2	Analiza vzorcev .....	19
3.3.3	Določitev eritroblastov z analizatorjem Sysmex XN-1000 .....	20
3.4	MIKROSKOPSKI PREGLED KRVNEGA RAZMAZA .....	21
3.4.1	Reagenti .....	21
3.4.2	Izdelava krvnega razmaza .....	22
3.4.3	Barvanje krvnega razmaza .....	23
3.4.4	Vrednotenje krvnega razmaza .....	23

3.5	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV .....	25
4	REZULTATI.....	26
4.1	VREDNOTENJE OPOZORIL ANALIZATORJA.....	26
4.2	SPREMEMBE KRITERIJEV ZA MIKROSKOPSKI PREGLED .....	32
4.3	RELATIVNE VREDNOSTI ERITROBLASTOV .....	33
4.3.1	Korekcija levkocitov ob prisotnosti eritroblastov .....	33
4.3.2	Korelacija relativnih vrednosti eritroblastov, določenih z analizatorjem in MPKR	34
4.3.3	Vzorci z večjim deležem eritroblastov .....	37
5	RAZPRAVA .....	39
5.1	VREDNOTENJE OPOZORIL ANALIZATORJA.....	39
5.2	KRITERIJI ZA MIKROSKOPSKI PREGLED .....	42
5.3	DOLOČANJE ERITROBLASTOV.....	45
6	ZAKLJUČEK.....	47
7	LITERATURA.....	49

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Prikaz dozorevanja eritroblastov.....	12
<b>Slika 2:</b> Prikaz razsevnega diagrama kanala WNR. Drobci predstavljajo hemolizirane eritrocite in trombocite.....	21
<b>Slika 3:</b> Priprava krvnega razmaza za mikroskopski pregled.....	22
<b>Slika 4:</b> Korelacija med analizatorjem in MPKR za nezrele granulocite (N = 999).....	31
<b>Slika 5:</b> Lažno negativni rezultati pri mejni vrednosti > 2 NRBC/100 WBC.....	32
<b>Slika 6:</b> Primerjava avtomatske in ročne korekcije številčne koncentracije levkocitov glede na prisotne eritroblaste. A) Bland-Altmanov diagram. B) Korelacija med avtomatsko in ročno korekcijo levkocitov (N = 159).....	34
<b>Slika 7:</b> Korelacija med rezultati analizatorja in MPKR za eritroblaste (vsi vzorci, N=1.088).....	35
<b>Slika 8:</b> Bland-Altmanov diagram za določitev eritroblastov z analizatorjem in MPKR. A) Vsi vzorci (N = 1.088). B) Brez rezultatov, ki so pri obeh metodah enaki vrednosti 0 NRBC/100 WBC (N = 279).....	35
<b>Slika 9:</b> Krivulji ROC za rezultate analizatorja in MPKR. A) Vsi vzorci (N = 1.088). B) Brez rezultatov, ki so pri obeh metodah enaki vrednosti 0 (N = 279).....	36
<b>Slika 10:</b> Diagram WNR prikazuje ločene populacije eritroblastov, levkocitov in bazofilcev pri bolniku z velikim razhajanjem števila eritroblastov, določenih z analizatorjem in MPKR.....	37
<b>Slika 11:</b> Grafični prikaz porazdelitve števila eritroblastov na 100 levkocitov. Primerjava med skupinami (test Mann-Whitney): A) bolniki z malignimi krvnimi boleznimi in novorojenčki; B) bolniki z anemijami in novorojenčki; C) bolniki z anemijami in malignimi krvnimi boleznimi.....	38
<b>Slika 12:</b> Delež dodatnih MPKR glede na posamezne kriterije.....	43
<b>Slika 13:</b> Primerjava deležev MPKR po trenutno veljavnih in po novih kriterijih v Specializiranem hematološkem laboratoriju, UKC Ljubljana.	44

## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica I:</b> Kriteriji združenja ISLH za opredelitev pozitivnega rezultata MPKR.....	5
<b>Preglednica II:</b> Primerjava kriterijev za izvedbo MPKR med združenjima GFHC in ISLH.....	10
<b>Preglednica III:</b> Diferencialna diagnostika povečanega števila eritroblastov pri plodu oziroma novorojenčkih.....	13
<b>Preglednica IV:</b> Reagenti za hematološki analizator Sysmex XN-1000. ....	18
<b>Preglednica V:</b> Reagenti za barvanje krvnih razmazov .....	21
<b>Preglednica VI:</b> Merila za mikroskopski pregled krvnega razmaza v Specializiranem hematološkem laboratoriju, UKC Ljubljana.. .....	24
<b>Preglednica VII:</b> Pozitivni in negativni rezultati analizatorja in MPKR pri posameznih opozorilih analizatorja. ....	26
<b>Preglednica VIII:</b> Izračuni za posamezna opozorila analizatorja. ....	28
<b>Preglednica IX:</b> Število opravljenih MPKR pri posameznih opozorilih analizatorja glede na nove oziroma spremenjene kriterije.....	33

## POVZETEK

Mikroskopski pregled krvnega razmaza kljub velikemu napredku v razvoju hematoloških analizatorjev še vedno velja za zlati standard pri prepoznavi celic. Vsak laboratorij mora določiti kriterije za pregled krvnega razmaza, ki so odvisni od vrste analizatorja in preiskovane populacije. Ovrednotili smo različna opozorila hematološkega analizatorja ter ugotovili zelo dobro specifičnost in hkrati zelo slabo občutljivost opozoril na trombocitne skupke, nenormalno porazdelitev trombocitov, pomik v levo, anizocitozo, shizocite in reaktivne limfocite. Zelo dobro specifičnost in občutljivost smo ugotovili pri opozorilih na hladne aglutinine, atipične limfocite, blaste, nekoliko slabši pa sta bili pri opozorilu na prisotnost nezrelih granulocitov. Vrednotenje relativnih vrednosti nezrelih granulocitov je bilo najboljše pri mejni vrednosti  $\geq 1\%$  z 72,8 % občutljivostjo in 80,8 % specifičnostjo. Na podlagi novejših objavljenih smernic, ki so laboratoriju v pomoč pri vzpostavitevi lastnih kriterijev za mikroskopski pregled krvnih razmazov, smo preverili, kako bi sprememba nekaterih kriterijev v skladu z omenjenimi smernicami vplivala na kakovost in obseg dela pri tej preiskavi. Ugotovili smo, da bi se obseg dela tako povečal za 28,7 %. Med kriteriji smo se podrobneje osredotočili na določanje eritroblastov, nezrelih celic eritrocitne vrste z jedrom. Pri novorojenčkih so eritroblasti prisotni fiziološko, medtem ko jih pri odraslih praviloma zasledimo le pri krvnih ali nekaterih drugih težjih boleznih. S primerjavo ročne in avtomatske korekcije levkocitov ob prisotnosti eritroblastov smo ugotovili odlično korelacijo ( $r = 0,999$ ). Pri opozorilu analizatorja na prisotnost eritroblastov so bili najboljši rezultati pri mejni vrednosti  $\geq 0,5$  eritroblastov na 100 preštetih levkocitov. Pri določanju eritroblastov smo ugotovili dobro ujemanje med analizatorjem in mikroskopskim pregledom, večje razlike pa smo zasledili pri tistih vzorcih, pri katerih so bile prisotne tudi mlajše razvojne stopnje levkocitov. Eritroblaste smo določali v treh skupinah preiskovancev, in sicer pri novorojenčkih, bolnikih z malignimi krvnimi boleznimi in bolnikih z anemijami, ter nato rezultate med seboj statistično primerjali. Značilno večji delež eritroblastov smo določili v skupini novorojenčkov.

## ABSTRACT

Microscopic examination of blood smear is still the gold standard for the identification of blood cells despite the significant progress in the development of haematology analysers. Every laboratory must specify the criteria for blood smear examination, depending on the type of analyser and the examined population. We have evaluated the various haematology analyser flags and established that the specificity was very good, while the flags were poorly sensitive to platelet clumps, abnormal platelet distribution, left shift, anisocytosis, RBC fragments and reactive lymphocytes. Very good specificity and sensitivity has been established for flags regarding cold agglutinins, atypical lymphocytes and blasts, while alerts to the presence of immature granulocytes performed somewhat more poorly. The evaluation of the relative counts of immature granulocytes was best in case of the threshold value of  $\geq 1\%$  with 72.8 % sensitivity and 80.8 % specificity. On the basis of the more recently published guidelines, helping the laboratories to establish their own criteria for the microscopic examination of blood smear, we have checked how adapting certain criteria to the aforementioned guidelines would influence the quality and work load with regard to this sort of examination. We have established that the work load would increase by 28.7 %. Of these criteria we have focused more closely on the erythroblast count (erythroblasts are immature erythrocyte cells, containing a nucleus). In newborn infants erythroblasts are present physiologically, while in adults they are, as a rule, only detected in case of blood disorders or certain other serious illnesses. When comparing the manual and automatic corrections of leukocytes in the presence of erythroblasts, we have established an excellent correlation ( $r = 0.999$ ). As far as the analyser's alert to the presence of erythroblasts was concerned, we have established the best results for the threshold value of  $\geq 0.5$  erythroblasts per 100 of leukocytes detected. We have established that the matching between the determination of erythroblasts with the analyser and microscopic examination was generally good. The exception were the samples that contained younger developmental phases of leukocytes. In the case of these samples the matching was weaker. Erythroblast counts have been carried out for three groups: newborn infants, patients with malignant blood disorders, and patients with anaemia. The groups were compared to each other statistically. Significantly higher share of erythroblasts was determined with newborn infants.

## **KLJUČNE BESEDE**

Mikroskopski pregled krvnega razmaza, eritroblasti, hematološki analizator, opozorila analizatorja.

## **KEY WORDS**

Microscopic examination of blood smear, erythroblasts, haematology analyser, analyser flags.

## SEZNAM OKRAJŠAV

KRATICA	POMEN
<b>CBC</b>	Celotna krvna slika (angl. Complete blood count)
<b>DKS</b>	Diferencialna krvna slika
<b>EDTA</b>	Etilendiamintetraocetna kislina
<b>FSC</b>	Prednje sisanje svetlobe (angl. Forward scattered light)
<b>ISLH</b>	Mednarodno združenje laboratorijske hematologije (angl. International Society for Laboratory Haematology)
<b>GFHC</b>	Francosko združenje za celično hematologijo (angl. Francophone Group of Cell Haematology)
<b>IG</b>	Nezreli granulociti (angl. Immature granulocytes)
<b>MCHC</b>	Povprečna koncentracija hemoglobina v eritrocitu (angl. Mean corpuscular hemoglobin concentration)
<b>MCV</b>	Povprečni volumen eritrocita (angl. Mean corpuscular volume)
<b>MPKR</b>	Mikroskopski pregled krvnega razmaza
<b>NRBC</b>	Eritroblasti (angl. Nucleated red blood cells)
<b>PLT</b>	Trombociti (angl. Platelets)
<b>RDW</b>	Koeficient variacije volumna eritrocitov (angl. Red blood cell distribution width)
<b>SFL</b>	Stransko sisanje fluorescenčne svetlobe (angl. Side fluorescent light)
<b>SLS</b>	Natrijev lauril sulfat (angl. Sodium lauryl sulfate)
<b>SOP</b>	Standardni operacijski postopki
<b>SSC</b>	Stransko sisanje svetlobe (angl. Side scattered light)
<b>TAT</b>	Čas analize (angl. Turn around time)
<b>TNCC</b>	Celokupno število celic z jedri (angl. Total nucleated cell count)
<b>TORCH</b>	Toksoplazma, drugi virusi, rdečke, citomegalovirus, herpes (angl. Toxoplasma, other viruses, rubella, cytomegalovirus, herpes)
<b>WBC</b>	Levkociti (angl. White blood cells)

# 1 UVOD

Hemogram je ena najpogostejših preiskav, ki se izvaja v medicinskem laboratoriju. Pomembna je za nadaljnjo usmeritev diagnostike, saj poda osnovno informacijo o stanju organizma. Kljub zelo dobri točnosti in natančnosti avtomatiziranih hematoloških analizatorjev ima ročni pregled krvi pod mikroskopom v hematologiji še vedno zelo pomembno vlogo. Vsak laboratorij mora določiti jasne kriterije za mikroskopski pregled krvnega razmaza (MPKR), saj le tako lahko zagotovi zanesljivost in kakovost podajanja rezultatov. Kriteriji se med laboratoriji lahko razlikujejo in so odvisni od vrste uporabljenega hematološkega analizatorja, volumna in števila vzorcev, časa analize (TAT), pričakovanj zdravnikov ter preiskovane populacije. Glavni cilj je vzpostaviti optimalne kriterije za mikroskopski pregled krvnih razmazov, ki bodo čim bolj zmanjšali število lažno pozitivnih rezultatov, število lažno negativnih pa zmanjšali tako, da ne bodo imeli kliničnih posledic za paciente (1, 2).

## 1.1 MIKROSKOPSKI PREGLED KRVNEGA RAZMAZA

Pregled krvnega razmaza pod mikroskopom predstavlja zlati standard za prepoznavo krvnih celic. Mikroskopski pregled naredimo, ko sumimo na prisotnost parazitov, bakterij ali gliv, na morfološke nepravilnosti eritrocitov in levkocitov, ob spremembah v grafični predstavitvi levkocitov na analizatorju, ko so populacije celic med seboj slabo ločene ali pa ko se pojavi dodatna, nepojasnjena populacija celic. Pri pregledovanju rezultatov so nam v pomoč t.i. preverjanja delta (angl. delta check), ki nam prikažejo odstopanja rezultatov v krvni sliki, ob upoštevanju predhodnih rezultatov pri istem pacientu (3). Preverjanja delta se lahko nanašajo na delež ali pa na absolutno vrednost rezultata za določen hematološki parameter in se pojavijo, ko se rezultati razlikujejo od predhodnih vrednosti v pozitivni ali v negativni smeri za več, kot je bilo predhodno določeno (4, 5).

Prednosti MPKR so predvsem preverjanje rezultatov iz hematološkega analizatorja, pridobitev takojšnje informacije o morebitni diagnozi oziroma o nadaljnji usmeritvi diagnostike (6). Gre za časovno zamudno preiskavo brez avtomatizacije, ki zahteva veliko znanja in izkušenj laboratorijskega osebja, saj gre za subjektivno oceno krvnih celic,

natančnost je slabša zaradi manjšega števila preštetih celic v primerjavi s hematološkim analizatorjem, poleg tega pa je brez vsakodnevnih kontrol za preverjanje kakovosti (7).

Pregled krvnega razmaza včasih predstavlja ključen korak pri postavitvi diagnoze, še posebej, ko je čas zelo pomemben dejavnik nadaljnega poteka in izida zdravljenja (npr. pri akutni promielocitni levkemiji, trombotični trombocitopenični purpuri ali Burkittovem limfomu) (6).

V Evropi krvne razmaze pregledujejo izkušeni laboratorijski strokovnjaki, v nekaterih državah (ZDA, VB) pa jih običajno ocenjujejo kliniki, ki imajo zbrane vse klinične podatke o svojih pacientih in tako lažje postavijo diagnozo (8). Za MPKR se odloči zdravnik na osnovi kliničnih znakov ali pa laboratorijski strokovnjak na podlagi vnaprej določenih kriterijev, ki zajemajo tako kvalitativne kot tudi kvantitativne spremembe v hemogramu. Med kvantitativne spremembe uvrščamo npr. anizocitozo, nevtrofilijo, levkocitozo, levkopenijo, limfocitozo, eozinofilijo in trombocitopenijo. Novejši avtomatizirani hematološki analizatorji podajajo opozorila ob kvalitativnih spremembah krvnih celic, kot so npr. prisotnost blastov, reaktivnih ali atipičnih limfocitov, nezrelih granulocitov, eritroblastov, skupkov trombocitov in eritrocitnih fragmentov (6).

### **1.1.1 Priprava in pregled krvnega razmaza**

Krvne preparate pripravimo iz polne krvi, odvzete v epruveto z antikoagulantom K<sub>2</sub>-EDTA ali K<sub>3</sub>-EDTA, in sicer čim prej po odvzemu, saj s staranjem vzorca prihaja do neželenih artefaktov, npr. do sprememb eritrocitov v ehnocite ali sferocite, povečanja trombocitov, pojava apoptotskih sprememb levkocitov ter vakuol v citoplazmi nevtrofilcev in monocitov. Za pripravo uporabimo čista, suha in nepoškodovana predmetna stekla. Krvni razmaz mora biti enakomerno razporejen, z ravnimi robovi in dolžino 2,5–4 cm ter končnim zaokroženim repom. Debelina razmaza je odvisna od velikosti kapljice krvi, koncentracije hemoglobina, naklona stekla in hitrosti potiska. Kadar želimo krajše in debelejše razmaze, povečamo naklon, velikost kapljice krvi ter hitrost potiska. Zaradi bioloških vzrokov je včasih težko izdelati tehnično ustrezni krvni razmaz. Pri hladnih aglutininih se eritrociti zlepijo v nepravilno oblikovane skupke, kar lahko rešimo, če vzorec segrejemo v inkubatorju na 37 °C. Pri lipemičnem vzorcu se v razmazu pojavijo okrogle praznine, pri formacijah rulo (angl. rouleaux) pa vidimo eritrocite, nanizane kot prekrivajoči se kovanci. Pri pregledovanju in štetju celic pod mikroskopom se moramo

zavedati, da so celice po razmazu razporejene neenakomerno. Večje celice, kot so monociti ter segmentirani in nezreli nevtrofilci, so potisnjene bolj na robove in v rep razmaza.

Pred postopkom barvanja morajo biti preparati dobro posušeni na zraku. Obstajajo različni postopki barvanja: po Wrightu, Wright-Giemsi, May-Grünwald-Giemsi in Leishmanu, pri katerih sta ključna procesa fiksacija in barvanje celic (9, 10).

## **1.2 PREGLEDOVANJE IN VREDNOTENJE KRVNEGA RAZMAZA**

Gene Gulati je s sodelavci razdelil pregled krvnih razmazov na tri tipe, in sicer na pregled krvnega razmaza z oceno trombocitov brez diferencialne krvne slike (DKS), mikroskopski pregled krvnega razmaza z vključeno DKS ter interpretativni pregled krvnega razmaza (11).

### **1.2.1 Pregled krvnega razmaza z oceno trombocitov**

Krvni razmaz pregledamo, ko je številčna koncentracija trombocitov pri posameznem pacientu  $< 100 \times 10^9/L$ , kadar so prisotna opozorila analizatorja za trombocitne skupke ter preverjanja delta  $z \geq 50\%$  nižjo vrednostjo glede na predhodni rezultat. Služi tudi za pregled ostalih rezultatov analizatorja z opozorili in za odločitev o izvedbi ročne DKS, ko so prisotni nezreli, atipični levkociti. Za preverjanje trombocitov je potrebno pregledati celoten preparat najprej pod 100x povečavo, s čimer zaznamo predvsem večje trombocitne skupke, prisotnost manjših pa preverimo pod 400x povečavo ali pod 100x imerzijskim objektivom. Prisotnost fragmentiranih eritrocitov, bakterij in gliv lahko povzroči lažno povišane vrednosti trombocitov, medtem ko prisotnost gigantskih trombocitov povezujemo z lažno prenizkimi vrednostmi. Kadar so prisotni agregati trombocitov, rezultat številčne koncentracije trombocitov iz analizatorja ni zanesljiv, zaradi česar je potreben ponovni odvzem krvi v epruveto z Na-citratom (11).

### **1.2.2 Mikroskopski pregled krvnega razmaza z diferenciranjem**

MPKR vključuje diferencialno krvno sliko ob pregledu 100 levkocitov in oceno morfologije vseh treh celičnih vrst. Rezultate podamo kot deleže in absolutne vrednosti posameznih levkocitnih podvrst. Preiskavo izvedemo, ko je DKS iz analizatorja nezanesljiva, kadar so prisotna odstopanja od številčnih vrednosti in opozorila analizatorja ter na željo naročnika. Izvedba MPKR z DKS omogoča kontrolo rezultatov analizatorja,

prepoznavanje nenormalnih, atipičnih oziroma nezrelih celic ter klinično pomembnih morfoloških nepravilnosti, ki jih hematološki analizator ni zmožen zaznati in prepoznati ter generirati ustrezna opozorila. Hematološki aparati ne podajo informacije o spremembah in vključkih v eritrocitih (npr. eliptociti, tarčaste celice, ehnociti, dakriociti, Howell-Jollyjeva telesca, bazofilne punktacije, paraziti malarije), o spremembah pri levkocitih (Auerjeva palčka, toksična granulacija, Döhlejeva telesca) ter ob spremembah trombocitov (trombocitni sateliti, hipogranuliranost, agranuliranost). Sodobni hematološki analizatorji so zelo zanesljivi, vendar ne omogočajo 100 % občutljivosti in 100 % specifičnosti pri zaznavanju morfoloških sprememb v katerikoli celični vrsti, zato je zelo priporočljivo, da izvedemo MPKR pri vsakem neznanem pacientu ob pojavu opozoril oziroma ob utemeljenem kliničnem dvomu ali sumu (11).

### **1.2.3 Interpretativni pregled krvnega razmaza**

Preparat pregleda izkušen hematolog oziroma patolog, ki ima zbrane vse ostale klinične in laboratorijske podatke o pacientu. Zdravnik se običajno odloči za pregled krvnega razmaza zaradi nepričakovane anemije, trombocitopenije, levkopenije, suma na mikroangiopatično hemolitično anemijo, hemoglobinemijo, talasemijo, mielodisplastični sindrom, parazitsko okužbo ali infekcijsko mononukleozo. Kriterije določi laboratorij v sodelovanju s kliniki glede na klinično pomembnost ter populacijo pacientov. Klinik sestavi pisno poročilo z interpretacijo vseh podatkov in postavi diagnozo ali pa se odloči za nadaljnje preiskave (11).

## **1.3 NOVEJŠA PRIPOROČILA ZA PREGLED KRVNIH RAZMAZOV**

Določitev kriterijev za MPKR je nujna za vsak laboratorij, saj so od njih odvisni finančni stroški, organizacija in obseg dela, hitrost ter zanesljivost podajanja rezultatov. MPKR ne izvedemo pri vsakem opozorilu analizatorja, prav tako tudi ne pri vsakem rezultatu izven referenčnih meja, zato je pri sestavi kriterijev smiselno upoštevati novejša priporočila.

Število lažno pozitivnih rezultatov je odvisno od vrste hematološkega analizatorja, ki podaja opozorila ob morfoloških nepravilnostih. Tako se analizatorji na nek način uporabljajo za presejanje, saj zaznajo pomembne nepravilnosti celic in podajo opozorilo, ki mu mora slediti mikroskopski pregled vzorca.

### **1.3.1 KRITERIJI MEDNARODNEGA ZDRUŽENJA LABORATORIJSKE HEMATOLOGIJE (ISLH)**

Dr. Berend Houwen je spomladi leta 2002 na srečanje povabil 20 strokovnjakov, da bi določili najustreznejši nabor kriterijev za MPKR. Na tem srečanju je bilo sprejetih 83 meril, ki so jih nato preverili v 15 laboratorijih na 13.298 vzorcih, analiziranih s hematološkimi analizatorji, skladno s standardnimi operacijskimi postopki (SOP). Tri pravila niso ustrezala nobenemu vzorcu in niso imela vpliva na pacientovo klinično oskrbo, zato so jih iz kriterijev izključili. Preostalih 80 meril pa so med seboj smiselno združili. Tako so po podrobnih analizah leta 2005 sprejeli 41 pravil, ki vključujejo tako pravila za prvo analizo vzorcev kot tudi preverjanja delta za hemograme, ponovljene znotraj 72 ur (4).

Vseh 41 pravil lahko porazdelimo na: 15 meril, ki se nanašajo na parametre hemograma brez DKS (CBC – complete blood count), 7 meril, ki zajemajo absolutne vrednosti petih populacij levkocitov (diferencialka), 7 kriterijev, ki se nanašajo na opozorila za eritrocite in trombocite, 10 meril za opozorila na levkocite ter na 2 merili za retikulocite. Združenje ISLH je pripravilo objektivne kriterije, ki odražajo njihovo klinično pomembno vlogo pri obravnavi in oskrbi pacientov. Predstavilo je smernice za pomoč pri vzpostavitvi lastnih kriterijev v različnih laboratorijih, namenjene pa so tudi proizvajalcem, ki se ukvarjajo z razvojem novih hematoloških analizatorjev. Med različnimi laboratoriji lahko namreč delež mikroskopskih pregledov krvnih razmazov niha od 5 do 95 % (4).

V skladu s temi kriteriji in priporočili ISLH so nastala tudi slovenska priporočila za pregled krvnega razmaza, ki od naših laboratorijev zahtevajo postavitev kriterijev, njihovo podrobnejšo opredelitev pa prepuščajo specifičnosti posameznega laboratorija (12).

**Preglednica I:** Kriteriji združenja ISLH za opredelitev pozitivnega rezultata MPKR (4).

Morfološke spremembe celic	Nenormalne, nezrele celice
Eritrocitna morfologija: 2+/zmerna ali izrazita	Blasti $\geq 1$
Trombocitna morfologija (veliki trombociti): 2+ / zmerna ali izrazita	Metamielociti $> 2$
Trombocitni skupki: > posamezni, maloštevilni	Mielociti / promielociti $\geq 1$
Döhlejeva telesca: 2+/pri nekaj ali večini celic	Reaktivni limfociti $> 5$
Toksične granulacije: 2+/pri nekaj ali večini celic	Eritroblasti $\geq 1$
Vakuolizacija: 2+/pri nekaj ali večini celic	Plazmatke $\geq 1$

### **1.3.2 KRITERIJI FRANCOSKEGA ZDRUŽENJA ZA CELIČNO HEMATOLOGIJO (GFHC)**

Posebno francosko združenje GFHC se je podobno kot predhodno združenje ISLH odločilo, da bo za potrebe akreditacijskih postopkov natančno pregledalo kriterije za MPKR ter sestavilo minimalna priporočila. V ta namen se je maja in junija leta 2013 zbralo 17 strokovnjakov s področja celične hematologije, pediatrije in splošnih bolnišnic. Osredotočili so se predvsem na kritično presojo že objavljenih kriterijev ter rezultate študije, v katero je bilo vključenih 39 laboratorijskih, ki vsakodnevno mikroskopsko pregledajo veliko število krvnih razmazov. V študiji so uporabili vse vodilne hematološke analizatorje, ki so na voljo na tržišču. Namen srečanja združenja GFHC je bilo, da sestavi smiselne kriterije, ki bodo preprečili nepotrebne MPKR, ohranili kakovost dela, lažno negativne rezultate pa omejili na < 5 % in s tem zagotovili varnost pacientov (13).

#### **1.3.2.1 Prva analiza vzorcev**

Definirali so, kaj je prva analiza vzorcev. Najprej je to takrat, ko gre za neznanega pacienta v laboratorijskem informacijskem sistemu oziroma kadar ni znanih predhodnih rezultatov hemograma. Poleg tega pa prvo analizo vzorca lahko predstavlja tudi prvo odstopanje v krvni sliki pri sicer že znanem pacientu ter takrat, ko je od predhodnega pregleda krvnega razmaza minilo več kot 90 dni za odrasle oziroma več kot 30 dni za otroke. Nenormalni rezultati hemograma so lahko prisotni prvič, lahko kažejo na novo ali pa na napredujoče bolezensko stanje pacienta. Pregled krvi pod mikroskopom tako lahko pomaga postaviti diagnozo ali pa le oceniti trenutno stanje bolnika. Združenje GFHC je določilo maksimalno obdobje med dvema zaporednima MPKR, in sicer 90 dni za odrasle in 30 dni za otroke, saj gre pri slednjih pogosteje za akutna klinična kot pa kronična stanja, ki so pogostejša pri odraslih (13). Za pediatrično populacijo veljajo podobna merila kot za odrasle, z nekaterimi dodatnimi priporočili. Pri zvečanem številu levkocitov prilagodimo kriterije za pregled razmaza glede na starostne referenčne razrede. Tako kot pri odraslih tudi pri otrocih velja, da kadar diferenciranje ni možno zaradi številčne koncentracije levkocitov, ki je manjša od  $1,0 \times 10^9/L$ , ga moramo opraviti takoj, ko se ta poveča na več kot  $1,0 \times 10^9/L$ . Pri otrocih, pri katerih smo predhodno že našli blaste ali eritroblaste, pa je diferenciranje razmazov potrebno ne glede na opozorila analizatorja.

### **1.3.2.2 Smernice, ki se nanašajo na pacientove podatke**

Otroci so vsi, ki so mlajši od 15 let, odrasli pa vsi, ki so presegli navedeno starostno mejo. Združenji GFHC in ISLH priporočata, da se pri novorojenčkih MPKR naredi vedno ob prvem pregledu krvi (starost < 8 dni) zaradi prisotnosti eritroblastov. Pri mlajših otrocih, starih manj kot 1 leto, je izvedba MPKR tudi priporočljiva vedno, saj se večina hematoloških bolezni pojavi v prvem letu življenja (13).

### **1.3.2.3 Smernice, ki se nanašajo na hematološke rezultate**

#### **Levkociti**

Sama številčna koncentracija levkocitov ni dober kriterij za odločitev za MPKR, veliko bolj so za to uporabna kvantitativna in kvalitativna opozorila analizatorja. V primeru levkopenije in levkocitoze je potrebno določiti tudi diferencialno krvno sliko, če te že avtomatsko ne določi analizator. Pri poznanih bolnikih, ki prejemajo mielosupresivno kemoterapijo, lahko laboratorij izda rezultate brez DKS, če gre za levkopenijo ( $< 1,0 \times 10^9/L$ ) in je tak tudi dogovor med laboratorijem in zdravniki. Pri bolnikih s hematološkimi obolenji, pri katerih je celokupna številčna koncentracija levkocitov  $\geq 1,0 \times 10^9/L$ , je potreben pregled krvnih razmazov pod mikroskopom zaradi možnih morfoloških sprememb celic med zdravljenjem (13).

#### **Nevtrophilci**

Pri nevtropenijski ( $< 1,5 \times 10^9/L$ ) je MPKR potreben zaradi lažno znižanih rezultatov (aglutinacija), možnih morfoloških sprememb ali patološko spremenjenih celic. Če nenormalnih celic ni, je podajanje rezultatov iz analizatorja bolj natančno kot pa iz ročne DKS. Združenje ISLH je določilo, da je potrebno narediti MPKR pri nevtrofiliji ( $> 20 \times 10^9/L$ ), medtem ko združenje GFHC meni, da to ni potrebno (13).

#### **Eozinofilci**

Ko eozinofilci presežejo mejo  $1,5 \times 10^9/L$ , je priporočljiv pregled krvnega razmaza, saj skupaj z eozinofilijo lahko zasledimo tudi limfomske celice (T-limfomi) (13).

#### **Bazofilci**

Kadar je število bazofilcev večje od  $0,3 \times 10^9/L$  oziroma te celice predstavljajo več kot 3 % vseh levkocitov, je izvedba MPKR priporočljiva, saj jih lahko povežemo z

mieloproliferativnim sindromom ali pa so sočasno prisotni nenormalni levkociti, ki jih analizator lahko zamenja z bazofilci (13).

### **Limfociti**

Z MPKR preverimo prisotnost malignih celic oziroma reaktivnih limfocitov in je potreben vedno, ko številčna koncentracija limfocitov preseže  $5 \times 10^9/L$ . Pri otrocih veljajo sledeče mejne vrednosti:  $11 \times 10^9/L$  (< 2 leti),  $9 \times 10^9/L$  (2–6 let) ter  $6 \times 10^9/L$  (6–12 let). Limfocitopenije pa ne uvrščamo med kriterije za MPKR (13).

### **Monociti**

Merilo za izvedbo MPKR je monocitoza ( $> 1,5 \times 10^9/L$ ). Monocite je včasih težko določiti z analizatorjem, npr. pri pomanjkanju mieloperoksidaze, ob prisotnosti nenormalnih celic, ki so po velikosti ali morfoloških lastnostih podobne monocitom ter pri monocitni aktivaciji ob hujših sepsah. Z mikroskopskim pregledom lahko ločimo med kronično mielomonocitno in akutno monocitno/monoblastno levkemijo. Kadar monocitoza vztraja več kot 30 dni, moramo ponovno narediti MPKR. Pri absolutni monocitopeniji lahko najdemo tudi lasaste celice (13).

### **Trombociti**

Pri trombocitozi ( $> 450 \times 10^9/L$ ) je ob prvi analizi MPKR priporočljiv zaradi lažno prevelikih vrednosti trombocitov (krioglobulini, shizociti, razpadle celice). Pri pacientih, ki že imajo znano trombocitozo, pa krvni razmaz ni potreben. V primeru trombocitopenije ( $< 150 \times 10^9/L$ ) moramo preveriti, ali so rezultati lažno znižani, saj gre lahko za prisotnost trombocitnih skupkov, gigantskih trombocitov ali fibrina. Kadar ne najdemo nobenih interferenc, je MPKR obvezen pri odraslih, in sicer ko je številčna koncentracija trombocitov manjša od  $100 \times 10^9/L$ , pri otrocih pa  $150 \times 10^9/L$ . Če je na analizatorju prisotno opozorilo za trombocitne skupke, ga moramo obravnavati neodvisno od števila trombocitov in izvesti MPKR. V primeru, da so prisotni agregati trombocitov, število trombocitov nadomestimo s komentarjem o prisotnosti skupkov. Če zdravnik želi rezultat trombocitov iz analizatorja, moramo napisati komentar, da je bil ta izdan na zahtevo zdravnika. V primeru, da ob pregledu pod mikroskopom ne najdemo aggregatov trombocitov, ob ponovnem pregledu kljub prisotnosti opozorila za trombocitne skupke izdamo rezultat, določen z analizatorjem (13).

## Eritrociti, hemoglobin in retikulociti

Če koncentracija hemoglobina presega referenčne vrednosti, MPKR ni potrebno narediti. Pri odraslih, v primeru normocitne ali makrocitne anemije, kjer je koncentracija hemoglobina  $< 100 \text{ g/L}$ , moramo določiti število retikulocitov. Takšen postopek je ključen za hitro odkrivanje hemolitične anemije. Kadar je koncentracija hemoglobina  $< 80 \text{ g/L}$ , je zaradi morfoloških sprememb ali prisotnosti abnormalnih celic pregled krvnega razmaza nujen. Pri otrocih moramo izmeriti številčno koncentracijo retikulocitov, in sicer pri koncentraciji hemoglobina  $< 90 \text{ g/L}$ , kar je tudi meja za izvedbo MPKR. Številčna koncentracija retikulocitov, ki je  $> 120 \times 10^9/\text{L}$  ob prvi analizi, je lahko tudi samostojno merilo za MPKR, saj kaže na povečano eritropoezo v kostnem mozgu. Kadar pacient ni prejel nobene transfuzije, rezultati analizatorja pa prikazujejo dvojno populacijo eritrocitov, združenje GFHC priporoča, da izvedemo MPKR. Pri povišanih vrednostih povprečnih koncentracij hemoglobina v eritrocitih (MCHC, 360 g/L oziroma 370 g/L, odvisno od analizatorja), moramo najprej izključiti vse možne interference (hladni aglutinini). Če jih ne najdemo, potem je zaradi možne sferocitoze smiselno pregledati krvni razmaz. Nizke vrednosti MCHC niso klinično pomembne, saj so rezultati odvisni od koncentracije hemoglobina, številčne koncentracije eritrocitov oziroma vrednosti povprečnega volumna eritrocitov (MCV).

Kadar na analizatorju zasledimo opozorilo na shizocite in sta prisotni tudi anemija ter trombocitopenija, je smiselno narediti še MPKR (13).

## Eritroblasti

Vsi analizatorji nimajo sposobnosti merjenja deleža ali številčne koncentracije eritroblastov, zato je podajanje rezultatov levkocitov lažno previsoko in moramo ročno prešteti eritroblaste pod mikroskopom (13).

### 1.3.2.4 Smernice, ki se nanašajo na opozorila analizatorja

#### Nezreli granulociti in pomik v levo

Izvedba MPKR ni potrebna ob pojavu opozorila na pomik v levo. Ko pa se pojavi opozorilo za nezrele granulocite (IG), je potreben mikroskopski pregled krvi, v primeru da analizator le-teh ne meri, v nasprotnem primeru pa je MPKR potreben samo ob prvi analizi (13).

## Blasti in atipični limfociti

Opozorila na blaste in atipične limfocite je potrebno vsakokrat preveriti pod mikroskopom. Prav tako je MPKR vsakič potreben, kadar se populacije levkocitov med seboj težko ločijo (13).

**Preglednica II:** Primerjava kriterijev za izvedbo MPKR med združenjima GFHC in ISLH (4, 13).

Odstopanja številčnih vrednosti				
Parameter	GFHC		ISLH	
<b>WBC (<math>\times 10^9/L</math>)</b>	Odrasli/otroci	Pacienti z malignim obolenjem, aplastično regeneracijo ( $WBC \geq 1,0$ , predhodni rezultat $WBC < 1,0$ )	Prva analiza	$< 4,0$ ali $> 30,0$
			Preverjanje delta, znotraj 3 dni	$< 4,0$ ali $> 30,0$
<b>PLT (<math>\times 10^9/L</math>)</b>	Odrasli, prva analiza	$< 100$ ali $> 450$	Prva analiza	$< 100$ ali $> 1000$
	Otroci, prva analiza	$< 150$	Preverjanje delta	Vsaka vrednost
<b>HGB (g/L)</b>	Odrasli, prva analiza	$< 80$ ali $< 100$ , ko so retikulociti $> 120 \times 10^9/L$	Prva analiza	$< 70$ ali $> 20$ nad zgornjo referenčno mejo glede na starost in spol
	Otroci, prva analiza	$< 90$		
<b>MCV (fL)</b>	Odrasli, prva analiza	$> 105$ ali $< 75$	Odrasli, prva analiza, vzorec $< 24$ h	$< 75$ ali $> 105$
	Otroci, prva analiza	$> 85$ (6 mesecev–2 leti), $> 95$ (2–15 let), $< 70$ (6 mesecev–2 leti), $< 72$ (2–6 let), $< 75$ (> 6 let)		
<b>MCHC (g/L)</b>	Odrasli/otroci	$>$ normalna zgornja meja, ko ni prisotnih interferenc	$\geq 2$ enoti nad zgornjo mejo referenčnega območja	Preveri lipemičnost, hemolizo, aglutinacijo RBC, sferocitozo
<b>RDW-CV (%)</b>	Odrasli/otroci, prva analiza	$> 22\%$	Prva analiza	$> 22\%$
<b>Retikulociti (<math>\times 10^9/L</math>)</b>	Odrasli/otroci, prva analiza	$> 120$	Prva analiza	$> 100$
<b>NRBC (št.)</b>	Odrasli/otroci	Ob prvi analizi; če analizator ne meri št., vsakokrat	Prva analiza	Vsaka vrednost
<b>Nevtrophili (x <math>10^9/L</math>)</b>	Odrasli/otroci, prva analiza	$< 1,5$	Prva analiza	$< 1,0$ ali $> 20,0$
<b>Limfociti (<math>\times 10^9/L</math>)</b>	Odrasli, prva analiza	$> 5,0$	Odrasli, prva analiza	$> 5,0$
	Otroci, prva analiza	$> 9$ (2–6 let), $> 6$ (6–12 let), $> 4$ (> 12 let)	Otroci (< 12 let), prva analiza	$> 7,0$

Parameter	GFHC		ISLH	
<b>Monociti (x 10<sup>9</sup>/L)</b>	Odrasli/otroci, prva analiza	> 1,5	Odrasli, prva analiza	> 1,5
	Odrasli/otroci	> 1,5, če je povišano več kot 30 dni	Otroci (< 12 let), prva analiza	> 3,0
	Odrasli/otroci	> meja, ki jo določi laboratorij, ko se monociti pojavijo med hospitalizacijo		
<b>Eozinofilci (x 10<sup>9</sup>/L)</b>	Odrasli/otroci, prva analiza	> 1,5	Prva analiza	> 2,0
<b>Bazofilci (x 10<sup>9</sup>/L)</b>	Odrasli/otroci, prva analiza	> 0,3 in/-ali 3 %	Prva analiza	> 0,5

**Opozorila analizatorja**

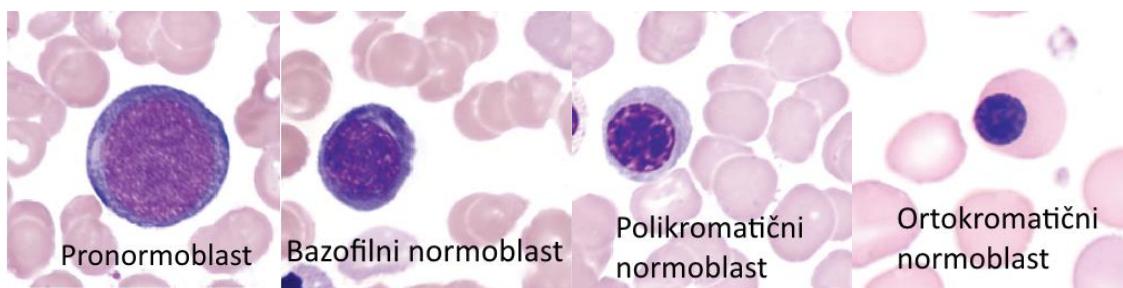
Parameter	GFHC	ISLH
<b>Shizociti</b>	Ob anemiji in/ ali trombocitopeniji	Vsakokrat
<b>Dvojna populacija RBC</b>	Ko bolnik ni prejel transfuzije	Prva analiza
<b>Odpornost na lizo RBC</b>	Pregled morfologije RBC in diferenciacije WBC	Vsakokrat, pregled WBC histograma/ citograma, pregled morfologije RBC
<b>PLT skupki</b>	Vsakokrat, neodvisno od rezultata PLT (obarvani krvni razmazi ali pod fazno kontrastnim mikroskopom s kapljico sveže krvi)	Ob vsaki vrednosti, pregled vzorca in preparata za PLT skupke
<b>IG</b>	Vsakokrat, če analizator ne meri št. IG, drugače samo ob prvi analizi	Prva analiza, nato ob pozitivnem delta opozorilu za WBC
<b>Pomik v levo</b>	MPKR ni potreben	Sledi SOP
<b>Reaktivni, atypični limfociti</b>	Vsakokrat	Prva analiza, nato ob pozitivnem delta opozorilu za WBC
<b>Blasti</b>	Vsakokrat	Prva analiza, nato ob pozitivnem opozorilu za WBC
<b>NRBC</b>	Prva analiza, nadalje ni potrebno; če analizator ne meri št. NRBC, vsakokrat	Vsakokrat; če so prisotni NRBC, prestej in popravi št. WBC

HGB – hemoglobin, IG – nezreli granulociti, MCHC – povprečna koncentracija hemoglobina v eritrocitu, MCV – povprečni volumen eritrocitov, NRBC – eritroblasti, PLT – trombociti, RBC – eritrociti, RDW – koeficient variacije volumena eritrocitov, WBC – levkociti.

## 1.4 ERITROBLASTI V VENSKI KRVI

### 1.4.1 Razvojne stopnje eritroblastov

Eritroblasti so nezrele celice eritrocitne vrste, ki še vsebujejo jedro. Prva prepoznavna celica rdeče vrste je pronormoblast, ki je velik do približno  $25 \mu\text{m}$ . Razvoj nato poteka preko bazofilnega normoblasta, polikromatičnega in ortokromatičnega normoblasta do retikulocita in eritrocita (Slika 1). Med potekom dozorevanja opazimo manjšanje celice, dozorevanje citoplazme in jedra, ki izgublja jedrca, zgoščevanje kromatina v grude ter spremembe razmerja med jedrom in citoplazmo v korist citoplazme. Ortokromatični normoblast se ne deli, saj ni več sposoben sintetizirati DNA. Ko dozori in izloči jedro, nastane retikulocit, ki preide v kri in dozori v eritrocit (3).



Slika 1: Prikaz dozorevanja eritroblastov. Prijeljeno po (14).

### 1.4.2 Prisotnost eritroblastov v periferni krvi pri novorojenčkih

Eritroblasti so fiziološko prisotni v periferni krvi pri plodu, nedonošenčkih, novorojenčkih, redkeje pa pri mlajših otrocih in nosečnicah (15, 16). Primarno se njihova tvorba začne v kostnem mozgu fetusa v odzivu na eritropoetin, ki stimulira eritropoezo in s tem tudi nastajanje ter sproščanje rdečih krvnih celic z jedrom. Eritroblasti so prisotni v placenti v prvi polovici nosečnosti. Ob rojstvu jih v placenti ni ali pa so prisotni v manjšem številu, če pa jih najdemo v velikem številu, pa je to lahko znak akutne ali kronične fetalne hipoksije, sladkorne bolezni matere, fetalne anemije ali prirojene okužbe TORCH (toksoplazma, rdečke, citomegalovirus, herpes, drugi virusi – parvovirus B19, varicella zoster, sifilis). Povečano število eritroblastov zasledimo pri novorojenčkih z Downovim sindromom, pri levkemijah in pri materah kadilkah, pri katerih so odkrili pozitivno korelacijo med številom pokajenih cigaret na dan in številom eritroblastov (16).

Čas, ki je potreben, da zaznamo povišane vrednosti eritroblastov v krvi novorojenčkov, pri katerih je nastala akutna hipoksija, je lahko manj kot 60 min, nekatere študije pa so pokazale, da je dovolj že 20–30 minut (16).

**Preglednica III:** Diferencialna diagnostika povečanega števila eritroblastov pri plodu oziroma novorojenčkih. Povzeto po (16).

<b>Fiziološko</b>
Rojevanje Nedonošenček Prenošenček
<b>Povečana eritropoeza</b>
<b>Kronična hipoksija</b> Zastoj rasti ploda Preeklampsija Matere kadilke
<b>Anemija</b> Izguba krvi Hemoliza – ABO, Rh izoimunizacija
<b>Sladkorna bolezen matere</b>
<b>Drugo</b> Levkemija Downov sindrom Okužba TORCH
<b>Akutni stres</b>
Akutna hipoksija Subakutna hipoksija Horioamnionitis
<b>Poporodna hipoksija</b>
Cianotična srčna napaka Pljučna bolezen
<b>Idiopatično</b>

S kliničnega vidika je podajanje števila eritroblastov najprimernejše v obliki absolutnega števila celic na volumsko enoto, pri nas je to število NRBC/L, vendar pa večina kliničnih laboratoriјev in znanstvenih raziskav podaja rezultate v obliki relativnega deleža eritroblastov na 100 preštetih levkocitov. Bolezni, pri katerih naraste številčna koncentracija levkocitov, lahko to vodi do zavajajoče nižje vrednosti eritroblastov, kadar rezultate podajamo na 100 levkocitov (16, 17).

Normalne vrednosti eritroblastov pri novorojenčkih ob rojstvu lahko zelo nihajo, saj je težko določiti referenčno mejo za zdrave in bolne ter za tiste, ki so se predčasno rodili (17).

Na prvi dan po porodu je njihovo število okoli  $0,5 \times 10^9/\text{L}$  oziroma 3–10 NRBC/100 WBC in predstavljajo 0,1 % vseh rdečih krvnih celic (16, 18). Vse vrednosti nad  $1 \times 10^9/\text{L}$  oziroma 10–20 NRBC/100 WBC veljajo za povišane. Nedonošenčki imajo lahko normalno do  $10 \times 10^9/\text{L}$  eritroblastov. Pri zdravih so eritroblasti prisotni nekje do četrtega dne, pri nedonošenčkih pa lahko v manjšem številu vztrajajo do enega tedna (16). Manjše gestacijske starosti kot je nedonošenček, večje število eritroblastov ima ob rojstvu. Eritroblasti imajo prognostično napovedno vrednost predvsem v prvem mesecu življenja (19). Novorojenčki z okužbo sifilisa imajo lahko tudi do 500 NRBC/100 WBC (16).

#### **1.4.3 Prisotnost eritroblastov v periferni krvi pri odraslih**

Pri odraselom človeku eritroblasti v periferni krvi normalno niso prisotni (20). Zasledimo jih lahko tako pri hematoloških kot tudi nehematoloških boleznih in so povezani s slabim potekom bolezni. Smrtnost tovrstnih bolnikov narašča z večjo številčno koncentracijo eritroblastov (21). Normalne, zrele celice lahko prehajajo iz kostnega mozga v periferno cirkulacijo, težje pa prehajajo eritroblasti in nezreli granulociti, zato njihova prisotnost v periferni krvi kaže na okvare kostnega mozga ali pa na ekstramedularno eritropoezo v vranici in jetrih (18, 22).

Hematološka stanja, pri katerih zasledimo eritroblaste, so: akutna in kronična hematološka maligna obolenja, benigna hematološka stanja – hemolitična anemija, hemoragija, infekcijska mononukleoza ter mielodisplazija (20).

Med nehematološka stanja s prisotnostjo eritroblastov uvrščamo sepsko, solidne tumorje z ali brez metastaz, vnetne črevesne bolezni, kronična pljučna obolenja, miokardni infarkt in jetrne bolezni (20).

Spremljanje števila eritroblastov po presaditvi kostnega mozga s krvotvornimi matičnimi celicami pa lahko predstavlja klinično pomembno informacijo o uspešnosti zdravljenja (23).

#### **1.4.4 Korekcija levkocitov ob prisotnosti eritroblastov**

Če je prisotno opozorilo analizatorja na eritroblaste, moramo narediti MPKR in prešteti eritroblaste na 100 diferenciranih levkocitov ter izvesti tudi korekcijo celokupnega števila celic z jedri (TNCC), saj so vanj vključeni tako levkociti kot tudi rdeče krvne celice z jedri (15). Če korekcije levkocitov ob prisotnosti eritroblastov ne izvedemo, lahko spregledamo

levkopenijo ali pa so rezultati levkocitov lažno zvišani, kar lahko vodi do napačne diagnoze in zdravljenja (24).

$$\text{Korigirano število levkocitov } (\times 10^9/\text{L}) = \frac{\text{število levkocitov (analizator)} (\times 10^9/\text{L})}{100 + \text{število eritroblastov}} \times 100$$

Sodobni hematološki analizatorji omogočajo tako določitev števila eritroblastov kot avtomatsko korekcijo številčne koncentracije levkocitov. Posameznih podvrst eritroblastov ne diferenciramo posebej, ampak vse nezrele rdeče krvne celice z jedri uvrstimo v eno skupino. Pri izračunu korekcije levkocitov pa moramo upoštevati nekorigirano številčno koncentracijo levkocitov (12).

## 2 NAMEN DELA

Mikroskopski pregled krvnega razmaza ostaja referenčna metoda za prepoznavo celic v laboratorijski hematologiji, saj sodobni avtomatizirani hematološki analizatorji še vedno ne zmorejo zanesljivo prepoznati patološko spremenjenih celic. Vsak laboratorij mora glede na ekonomske in kadrovske sposobnosti ter v dogovoru z naročniki preiskav smiselno določiti kriterije za izvajanje MPKR, pri čemer pa ne sme biti oškodovana pacientova oskrba.

Namen našega dela bo ugotoviti, kako bi sprememba nekaterih laboratorijskih kriterijev vplivala na število opravljenih MPKR ter posledično na kakovost in obseg dela v Specializiranem hematološkem laboratoriju, UKC Ljubljana. Pri tem se bomo osredotočili predvsem na opozorila analizatorja ter pri izdelavi posodobljenih kriterijev upoštevali novejša priporočila za MPKR.

S statistično obdelavo podatkov bomo ugotavliali, kakšne so občutljivost, specifičnost, pozitivna in negativna napovedna vrednost ter celokupna učinkovitost opozoril analizatorja za hladne aglutinine, trombocitne skupke, nenormalno porazdelitev trombocitov, pomik v levo, reaktivne in atipične limfocite, blaste, anizocitozo, shizocite, nezrele granulocite in eritroblaste. S tovrstno analizo podatkov želimo ugotoviti, kakšna je korelacija med analizatorjem in MPKR za relativne vrednosti števila nezrelih granulocitov in eritroblastov.

V nalogi se bomo najbolj osredotočili na eritroblaste. Določiti želimo mejno relativno vrednost, pri kateri je potrebno pregledati tudi krvni razmaz. Prav tako bomo ovrednotili zanesljivost avtomsatske korekcije levkocitov v primerjavi z ročno, kadar so v vzorcu prisotni eritroblasti. Glede na najverjetnejše pojavljanje eritroblastov, jih bomo določali v treh skupinah vzorcev: pri bolnikih, ki imajo maligne krvne bolezni, pri tistih z anemijami in pri novorojenčkih.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 ZBIRANJE VZORCEV

Vzorce krvi preiskovancev smo zbirali iz različnih ambulant in oddelkov UKC Ljubljana, pediatrične vzorce krvi pa iz Službe za specialno laboratorijsko diagnostiko – laboratorij za hematocitologijo na Pediatrični kliniki v Ljubljani. Vzorci so bili napoteni na rutinsko krvno analizo.

Vzorci polne krvi so bili odvzeti v epruvete s K<sub>3</sub>EDTA. Pri odraslih so izvedli venski, pri novorojenčkih oziroma mlajših otrocih pa kapilarni odvzem krvi, pri tem pa so bila upoštevana vsa priporočila za pravilni odvzem in transport krvi. Vsi vzorci so bili analizirani znotraj 4 ur po odvzemu in dobro premešani pred začetkom analize.

V analizo smo vključili preiskovance obeh spolov z različnimi diagozami ter s širokim starostnim razponom (0 dni–87 let).

#### 3.2 LABORATORIJSKA OPREMA IN PRIPOMOČKI

- Pipete (Eppendorf, 10–100 µl)
- Nastavki za pipete
- Predmetna stekla (Vitrognost, 26 x 76 mm, z matiranim robom)
- Krovna stekla (22 x 22 mm, Brand)
- Nastavek za pripravo krvnih razmazov Diff-Safe Blood Dispenser
- Kadičke s pokrovi za barvanje krvnih razmazov
- Nosilci za preparate
- Štoparica
- Imerzijsko olje
- Števec za štetje celic
- Svetlobni mikroskop Olympus BH-2

### 3.3 HEMATOLOŠKI ANALIZATOR SYSMEX XN-1000

#### 3.3.1 Reagenti in kontrole

Vsak dan moramo pred analizo vzorcev izvesti kontrole kakovosti za nadzorovanje delovanja hematološkega analizatorja in ustrezeno ukrepati, če pride do odstopanj od dovoljenih meja. Kontrolni vzorci zajemajo 3 različne koncentracijske nivoje in jih analiziramo zjutraj in po vsaki seriji 50 izmerjenih vzorcev. Hranimo jih v hladilniku (2–8 °C) in jih pred analizo segrejemo na sobno temperaturo. Skladno z navodili proizvajalca moramo reagente uporabljati pri temperaturi od 15 do 30 °C, neodprte pa shranjujemo do roka uporabe, ki je naveden na embalaži.

**Preglednica IV:** Reagenti za hematološki analizator Sysmex XN-1000 (25).

Reagent	Uporaba	T shranjevanja	Sestava
<b>CELLPACK</b>	Redčenje polne krvi,	2–35 °C	0,7 % natrijev klorid
<b>DCL</b>	nosilna tekočina, merjenje koncentracije Hb, števila in velikosti eritrocitov, trombocitov		0,2 % Tris pufer 0,02 % K <sub>2</sub> EDTA
<b>CELLPACK</b>	Merjenje števila,	2–35 °C	15,7 % natrijev klorid
<b>DST</b>	velikosti eritrocitov, trombocitov, koncentracije Hb, nosilna tekočina		4,3 % Tris pufer 0,4 % K <sub>2</sub> EDTA
<b>CELLPACK</b>	Analiza retikulocitov,	2–35 °C	pufer z 0,17 % tricina
<b>DFL</b>	trombocitov		
<b>SULFOLYSER</b>	Merjenje koncentracije Hb	1–30 °C	1,8 g/L natrijev lauril sulfat
<b>Lysercell WNR</b>	Reagent za lizo, merjenje levkocitov brez bazofilcev, analiza bazofilcev, eritroblastov	2–35 °C	0,20 % organske kvartarne amonijeve soli 0,10 % neionski surfaktant

Reagent	Uporaba	T shranjevanja	Sestava
<b>Lysercell WDF</b>	Reagent za lizo, merjenje nevtrofilcev, limfocitov, monocitov, eozinofilcev	2–35 °C	0,07 % organske kvartarne amonijeve soli 0,17 % neionski surfaktant
<b>Lysercell WPC</b>	Reagent za lizo, analiza nenormalnih, nezrelih celic	2–35 °C	0,03 % anionski surfaktant 0,12 % neionski surfaktant
<b>Fluorocell WNR</b>	Fluorescenčni reagent, merjenje levkocitov, eritroblastov, bazofilcev	2–35 °C	0,005 % polimetinsko barvilo 99,9 % etilglikol
<b>Fluorocell WDF</b>	Fluorescenčni reagent, diferenciacija levkocitov	2–35 °C	0,002 % polimetinsko barvilo 3,0 % metanol 96,9 % etilglikol
<b>Fluorocell RET</b>	Fluorescenčni reagent za analizo retikulocitov, trombocitov	2–35 °C	0,03 % polimetinsko barvilo 7,9 % metanol 92,0 % etilglikol
<b>Fluorocell PLT</b>	Fluorescenčni reagent za trombocite	2–35 °C	0,003 % oksazinsko barvilo 99,9 % etilglikol
<b>Fluorocell WPC</b>	Fluorescenčni reagent za levkocite, nezrele celice	2–35 °C	0,004 % polimetinsko barvilo 15,1 % etanol 84,8 % etilglikol
<b>CELLCLEAN AUTO</b>	Alkalno čistilo za odstranitev reagenta za lizo, ostankov celic, krvnih beljakovin	1–25 °C	Natrijev hipoklorit (5,0 % koncentracija klora)

### 3.3.2 Analiza vzorcev

Vzorce smo analizirali s hematološkim analizatorjem Sysmex XN-1000 (Sysmex Corporation, Kobe, Japonska), s katerim lahko merimo vzorce polne krvi in telesnih tekočin. Analizni sistem omogoča izvedbo šestdelne avtomatizirane diferencialne krvne slike, s katero izmerimo absolutni in relativni delež nevtrofilnih, eozinofilnih ter bazofilnih

granulocitov, monocitov, limfocitov in nezrelih granulocitov, med katere uvrščamo promielocite, mielocite in metamielocite (26).

Analizator Sysmex XN-1000 deluje na osnovi pretočne citometrije s polprevodnim laserjem, in sicer na principu hidrodinamičnega fokusiranja (zaznavanje neposrednega toka, DC – direct current) za določanje eritrocitov in trombocitov ter metodi SLS (natrijev lauril sulfat) za določanje hemoglobina. Ob interakciji laserske svetlobe z valovno dolžino 633 nm s posamezno krvno celico pride do sisanja svetlobe, na podlagi katere dobimo informacijo o njeni velikosti (prednje sisanje svetlobe, FSC – Forward Scattered Light), o njeni notranji strukturi (stransko sisanje svetlobe, SSC – Side Scattered Light) ter o vsebnosti DNA ozziroma RNA (stransko sisanje fluorescenčne svetlobe, SFL – Side Fluorescent Light) (25, 27, 28).

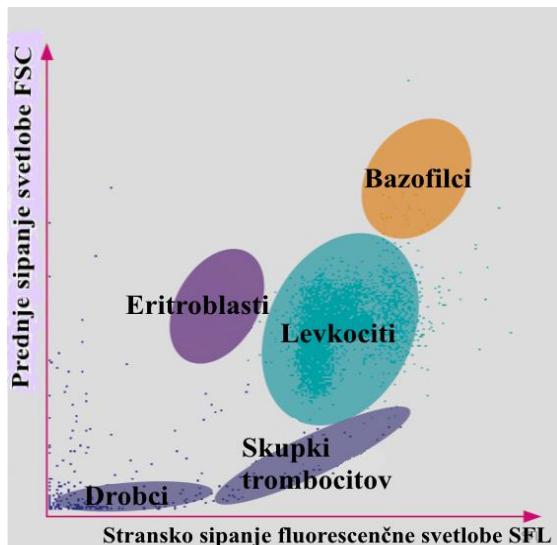
Merjenje posameznih hematoloških parametrov poteka v različnih analiznih kanalih, in sicer v WDF, WNR, WPC, RBC/PLT, HGB, RET ter PLT-F. Kanal WDF je namenjen predvsem diferenciaciji levkocitov (limfociti, nevtrofilci, monociti, eozinofilci), zazna pa tudi nezrele levkocite in atipične ter reaktivne limfocite. Reagent Lysercell WDF najprej hemolizira in razgradi eritrocite ter trombocite, celične membrane levkocitov pa naredi prehodne za fluorescenčno barvilo prisotno v reagentu Fluorocell WDF, ki vstopi v omenjene celice in v njihobarva nukleinske kisline in celične organele. Intenziteta fluorescence je različna glede na podvrste levkocitov, največjo pa zasledimo pri nezrelih in aktiviranih celicah, in sicer zaradi prisotnosti večjih količin RNA (25, 28, 29).

### **3.3.3 Določitev eritroblastov z analizatorjem Sysmex XN-1000**

Pred analizo vzorcev smo vedno izvedli kontrole kakovosti, pri čemer so bile vse znotraj dovoljenih odstopanj. Vzorce smo pred analizo dobro premešali (8–10 x) in jih vstavili v aparat s pomočjo avtomatskega podajalca nosilcev – analiza z vzorčevalnikom. Analizator je najprej odčital črtno kodo, epruveto premešal in nato aspiriral vzorec. Pediatrične vzorce smo analizirali z ročno analizo, s predhodno odstranjenim pokrovčkom epruvete. Za analizo zadostuje 88 µl polne krvi (25). Po končanih meritvah so se rezultati avtomatsko prenesli v laboratorijski informacijski sistem (LIS), kjer je sledil pregled rezultatov.

Kanal WNR se uporablja za štetje levkocitov, bazofilcev in določitev rdečih krvnih celic z jedri (absolutno in relativno število). Celice se med seboj ločijo po intenziteti fluorescence in velikosti (Slika 2). Proses merjenja je dvostopenjski, in sicer v prvi stopnji reagent

Lysercell WNR povzroči hemolizo eritrocitov in naredi celične membrane levkocitov prehodne. V drugi stopnji reagent Fluorocell WNR vstopi v levkocite in obarva nukleinske kisline ter celične organele. Celična membrana eritroblastov se popolnoma lizira, obarva se samo jedro. Levkociti močneje fluorescirajo kot eritroblasti, zato lahko s pomočjo kanala WNR ločimo levkocite od eritroblastov in oboje preštejemo. Vpliv lipidov in eritrocitov, ki so odporni na lizo, je z uporabo fluorescence zmanjšan na minimum (25, 28, 29).



**Slika 2:** Prikaz razsevnega diagrama kanala WNR. Drobci predstavljajo hemolizirane eritrocite in trombocite. Prirejeno po (29).

### 3.4 MIKROSKOPSKI PREGLED KRVNEGA RAZMAZA

#### 3.4.1 Reagenti

**Preglednica V:** Reagenti za barvanje krvnih razmazov.

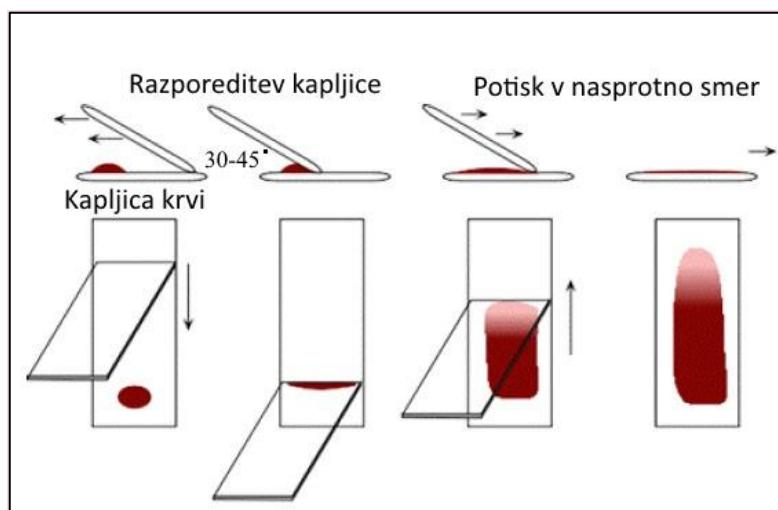
Raztopina May – Grünwald (Sigma Life Science): eozin in metilensko modrilo v metanolu
Raztopina Giemsa (Fluka Analytical): eozin, dva derivata metilenskega modrega v metanolu, azur I in azur II
Fosfatni pufer
Destilirana voda

Za pripravo reagentov smo uporabili predhodno pripravljene delovne raztopine. Fosfatni pufer je sestavljen iz raztopine A (9,1 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  raztopljenega v destilirani vodi) in raztopine B (9,5 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ali 11,9 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  raztopljenega v destilirani vodi). Osnovno raztopino pufra smo pripravili tako, da smo vzeli 630 mL raztopine A in 370 mL raztopine B, ju pomešali in uravnali pH vrednost na 6,6. Delovno raztopino pa smo pripravili tako, da smo 50 mL osnovne raztopine dodali v 1000 mL bučko ter z destilirano vodo dopolnili do oznake. Končna pH vrednost fosfatnega pufra je bila 6,8, služil pa nam je za pripravo raztopine May-Grünwald v razmerju 1 : 1 ter raztopine Giemsa v razmerju 1 : 10 (10 mL reagenta Giemsa smo v merilnem valju dopolnili z delovno raztopino fosfatnega pufra do 100 mL).

### 3.4.2 Izdelava krvnega razmaza

Pri pripravi krvnega razmaza smo na začetek predmetnega stekla s pomočjo nastavka za pripravo razmaza kanili kapljico krvi s premerom 2–3 mm (30). Pri pediatričnih vzorcih smo si za nanos kapljice pomagali s pipeto. Nato smo s krovnim steklom pod kotom 30–45° zajeli kapljico krvi in jo enakomerno potisnili v nasprotno smer, pri čemer nismo smeli spremnjati naklona in pritiska na predmetno steklo (Slika 3) (30). Hematološki preparat smo na matiranem delu predmetnega stekla označili s svinčnikom in ga 30 minut sušili na zraku.

Priprava krvnega razmaza pri novorojenčkih je lahko težja zaradi velikega števila eritrocitov (24).



Slika 3: Priprava krvnega razmaza za mikroskopski pregled. Pritejeno po (31).

### **3.4.3 Barvanje krvnega razmaza**

Posušene krvne razmaze smo zložili v nosilce in jih postavili v prvo kadičko z barvilo May-Grünwald za 5 minut. Nato smo jih brez vmesnega spiranja prenesli v drugo kadičko za 1 minuto. V njej je bila razredčena raztopina barvila May-Grünwald s fosfatnim pufrom, v razmerju 1 : 1. Sledil je prenos v tretjo kadičko z razredčeno raztopino Giemsa v fosfatnem pufru (1 : 10), v kateri smo razmaze barvali 20 minut. Nato smo nosilec z razmazi prenesli še v četrto posodico, kjer smo jih sprali z raztopino fosfatnega pufra. Obarvane preparate smo na koncu sprali še z vodo, jih odcedili in pustili, da so se posušili na zraku (12).

### **3.4.4 Vrednotenje krvnega razmaza**

Celotno področje preparata smo najprej pregledali makroskopsko, ocenili smo njegovo kakovost in ustrezeno obarvanost. Pri manjši povečavi (100x) smo preverili porazdelitev, obarvanost in število trombocitov, levkocitov, eritrocitov, prisotnost aglutinacije, agregatov trombocitov, formacije rulo (angl. rouleaux) in fibrinskih nitk. Nato smo pri večji povečavi (400x) izbrali področje za diferenciranje. S pomočjo imerzijskega olja smo pri 1000x povečavi ocenili morfološke lastnosti celic in diferencirali 100 levkocitov po metodi cik-cak, s katero smo zmanjšali vpliv neenakomerne porazdelitve levkocitov (11, 12). Pri vrednotenju krvnega razmaza smo pregledali tudi številčne vrednosti in opozorila iz analizatorja. Nikoli ne diferenciramo mehansko poškodovanih celic, golih jeder in apoptočnih celic (12).

Za MPKR se odločimo na osnovi odstopanj številčnih vrednosti, prisotnih opozoril analizatorja (Preglednica VI) ali na željo naročnika. Upoštevati moramo predhodno znane klinične (starost, rasa, nosečnost, znane bolezni, vrojene spremembe v morfoloških lastnostih krvnih celic) in laboratorijske podatke o pacientih (12).

**Preglednica VI:** Merila za MPKR v Specializiranem hematološkem laboratoriju, UKC Ljubljana.

**ODSTOPANJA, PRI KATERIH OB PRVI ANALIZI VEDNO PREGLEDAMO RAZMAZ**

<b>ODSTOPANJA ŠTEVILČNIH VREDNOSTI ANALIZATORJA</b>		<b>OPOZORILA ANALIZATORJA</b>
<b>Parameter</b>	<b>Opomba</b>	<b>Parameter</b>
WBC ( $\times 10^9/L$ )	< 3,0 ali > 20,0	Fragmenti RBC (RBC Fragments)
PLT ( $\times 10^9/L$ )	< 100 ali > 1000	Dizmorfični RBC (Dismorphic RBC)
HGB (g/L)	< 70 ali > 20 nad zgornjo referenčno mejo	Skupki PLT (PLT clumps/aggregates)
MCV (fL)	< 75 ali > 105	Nezreli granulociti (Immature granulocytes present)
MCHC (g/L)	$\geq 351$	Atipični limfociti ali blasti (Abnormal lymphocytes or blasts)
RDW (%)	> 22	Pomik v levo (Left shift)
Nevtrophilci ( $\times 10^9/L$ )	< 1,0 ali > 20,0	Reaktivni limfociti (Atypical lymphocytes)
Limfociti ( $\times 10^9/L$ )	> 5,0	Nenormalna morfologija levkocitov (WBC morph positive)
Monociti ( $\times 10^9/L$ )	> 1,5	Najdene nenormalnosti pri avtomatski diferencialni sliki (Abnormal Diff findings in CBC order)
Eozinofilci ( $\times 10^9/L$ )	> 2,0	Ugotovljena displazija (Indications of dysplasia)
Bazofilci ( $\times 10^9/L$ )	> 0,5	Nenormalni levkociti (Abnormal WBC scattergram)
NRBC ( $\times 10^9/L$ )	Vsaka vrednost/opozorilo	Interference pri merjenju trombocitov (PLT interference)

## OPOZORILA, PRI KATERIH PREGLEDAMO RAZMAZ, ČE PREDPISANI UKREP NE POMAGA

Opozorilo	Ukrep
Odklon med kanalom RBC in RET (Deviation between RBC and RET channel)	Preglej instrument (sum na hladne aglutinine oziroma formacije rulo).
Nezanesljiv WBC	Preveri aparat in vzorec ter zahtevaj nov odvzem.
RBC odporni na lizo	Preveri histogram WBC.
Nepopolna ali odsotna diferencialka (No analyser DIFF possible)	Preveri aparat in ponovi.
Hladni aglutinini (Cold agglutinins)	Inkubiraj vzorec 30 min in ponovo izmeri na ročni način.
Lipemija/hemoliza/aglutinini/hipoosmolarnost (Lipaemia/haemolysis/agglutinins/hypoosmolarity)	Lipemija: redči vzorec ali zamenjaj plazmo z diluentom ter ponovi analizo. Hemoliza: zahtevaj nov vzorec. Hipoosmolarnost: napiši komentar v izvidu.
Interferenca v kanalu RET (Interference RET scattergram)	Ročno štetje retikulocitov, možna malarija ali dedna sferocitoza.
MPKR naredimo, če je od predhodnega pregleda krvnega razmaza minilo > 1 leto.	

### 3.5 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Podatke smo zbirali v preglednice in s pomočjo programa Microsoft Excel 2010 izračunali specifičnost, občutljivost, pozitivno in negativno napovedno vrednost ter celokupno učinkovitost. Občutljivost predstavlja verjetnost, da je rezultat pozitiven pri resnično pozitivnih vzorcih, specifičnost pa verjetnost, da je rezultat negativen pri resnično negativnih vzorcih. Pozitivna napovedna vrednost je verjetnost, da gre za resnično pozitiven vzorec, kadar je rezultat testa pozitiven, negativna napovedna vrednost pa verjetnost, da gre za resnično negativen vzorec, ko je rezultat testa negativen (32). Celokupna učinkovitost je zmožnost testa, da napove pravilne, torej resnično pozitivne in resnično negativne rezultate (1).

S programom MedCalc, verzije 15.6.1, smo naredili teste Mann-Whitney, izdelali Bland-Altmanove dijagrame, izrisali korelacijske grafe in krivulje ROC.

## 4 REZULTATI

### 4.1 VREDNOTENJE OPOZORIL ANALIZATORJA

Za vrednotenje opozoril analizatorja smo pregledali 1.020 naključnih rutinskih vzorcev, zbranih v obdobju med 9. 3. in 3. 4. 2015, pri katerih smo poleg krvne slike na hematološkem analizatorju Sysmex XN-1000 naredili tudi pregled krvnega razmaza pod svetlobnim mikroskopom. Pri 12 vzorcih nismo izvedli popolnega mikroskopskega pregleda, saj zaradi nizkega števila levkocitov diferenciranje ni bilo možno. Pri 8 vzorcih smo naredili samo pregled krvnega razmaza za oceno trombocitov, pri 1 pa smo preverjali prisotnost shizocitov brez diferenciranja levkocitov. MPKR smo opravili zaradi izpolnitve predhodno določenih kriterijev (192 vzorcev) Specializiranega hematološkega laboratorijsa, UKC Ljubljana (Preglednica VI) ali predhodno naročene ročne DKS s strani naročnika (828 vzorcev).

Pri vsakodnevnih rutinskih vzorcih smo pregledali opozorila analizatorja na hladne aglutinine, skupke trombocitov, nenormalno porazdelitev trombocitov, nezrele granulocite, pomik v levo, reaktivne limfocite, atipične limfocite, blaste, anizocitozo, shizocite in eritroblaste.

**Preglednica VII:** Pozitivni in negativni rezultati analizatorja in MPKR pri posameznih opozorilih analizatorja.

	Analizator			
	DKS		pozitivni	negativni
		pozitivni	2	0
Hladni aglutinini	DKS	negativni	3	994
		Analizator		
	DKS		pozitivni	negativni
Trombocitni skupki	DKS	pozitivni	3	15
		negativni	45	944
	Analizator			
Nenormalna porazdelitev trombocitov	DKS		pozitivni	negativni
		pozitivni	38	109
	DKS	negativni	109	751
Združeni opozorili: trombocitni skupki, nenormalna porazdelitev trombocitov	DKS		pozitivni	negativni
		pozitivni	9	9
	DKS	negativni	168	821
Pomik v levo	Analizator			
	DKS		pozitivni	negativni
		pozitivni	60	160
	DKS	negativni	11	768

		Analizator	
		DKS	
Reaktivni limfociti		pozitivni	2
		negativni	39
			948
Atypični limfociti		Analizator	
		DKS	
		pozitivni	21
Blasti		negativni	177
			797
Združena opozorila: blasti, reaktivni in atypični limfociti		Analizator	
		DKS	
		pozitivni	69
Anizocitoza		negativni	142
			763
Shizociti		Analizator	
		DKS	
		pozitivni	14
Opozorilo na prisotnost IG		negativni	26
			919
Relativne vrednosti IG ≥ 0,5 %		Analizator	
		DKS	
		pozitivni	183
Relativne vrednosti IG ≥ 1 %		negativni	71
			562
Opozorilo na prisotnost eritroblastov > 2 NRBC/100 WBC		Analizator	
		DKS	
		pozitivni	226
Opozorilo na prisotnost eritroblastov ≥ 1 NRBC/100 WBC		negativni	27
			344
			402
Opozorilo na prisotnost eritroblastov > 2 NRBC/100 WBC		Analizator	
		DKS	
		pozitivni	185
Opozorilo na prisotnost eritroblastov ≥ 1 NRBC/100 WBC		negativni	69
			143
			602
Opozorilo na prisotnost eritroblastov ≥ 0,5 NRBC/100 WBC		Analizator	
		DKS	
		pozitivni	1
Opozorilo na prisotnost eritroblastov ≥ 0,5 NRBC/100 WBC		negativni	895
Opozorilo na prisotnost eritroblastov ≥ 1 NRBC/100 WBC		Analizator	
		DKS	
		pozitivni	58
Opozorilo na prisotnost eritroblastov ≥ 0,5 NRBC/100 WBC		negativni	45
			8
			888
Opozorilo na prisotnost eritroblastov ≥ 0,5 NRBC/100 WBC		Analizator	
		DKS	
		pozitivni	75
Opozorilo na prisotnost eritroblastov ≥ 0,5 NRBC/100 WBC		negativni	28
			31
			865

**Preglednica VIII:** Izračuni za posamezna opozorila analizatorja.

Opozorilo	Občutljivost (%)	Specifičnost (%)	Pozitivna napovedna vrednost (%)	Negativna napovedna vrednost (%)	Celokupna učinkovitost (%)
Hladni aglutinini	100,00	99,70	40,00	100,00	99,70
Trombocitni skupki	16,67	95,45	6,25	98,44	94,04
Nenormalna porazdelitev trombocitov	25,85	87,33	25,85	87,33	78,35
Združeni opozorili: trombocitni skupki, nenormalna porazdelitev trombocitov	50,00	83,01	5,08	98,92	82,42
Pomik v levo	27,27	98,59	84,51	82,76	82,88
Reaktivni limfociti	16,67	96,05	4,88	98,96	95,10
Atipični limfociti	84,00	81,83	10,61	99,50	81,88
Blasti	80,70	83,97	23,35	98,63	83,78
Združena opozorila: blasti, reaktivni, atipični limfociti	73,40	84,31	32,70	96,83	83,28
Anizocitoza	39,51	97,99	83,51	86,28	86,01
Shizociti	35,00	95,73	25,45	97,25	93,30
Opozorilo na prisotnost IG	72,05	75,44	50,00	88,78	74,57
Relativne vrednosti IG $\geq 0,5\%$	89,33	53,89	39,65	93,71	62,86
Relativne vrednosti IG $\geq 1\%$	72,83	80,81	56,40	89,72	78,78
Opozorilo na prisotnost eritroblastov $>2$ NRBC/100 WBC	30,10	99,89	96,88	92,55	92,69
Opozorilo na prisotnost eritroblastov $\geq 1$ NRBC/100 WBC	56,31	99,11	87,88	95,18	94,69
Opozorilo na prisotnost eritroblastov $\geq 0,5$ NRBC/100 WBC	72,82	96,54	70,75	96,86	94,09

Hladni aglutinini (Cold agglutinins) so avtoprotitelesa razreda IgM, ki se vežejo na antigene eritrocitov pri temperaturi nižji od 37 °C (3). Vzorec z opozorilom na hladne aglutinine smo segreli na 37 °C ter ponovili analizo. Hladne aglutinine smo našli le v 2 vzorcih (0,2 %). V 3 vzorcih (0,3 %) pa s pregledom krvnega razmaza nismo našli hladnih aglutininov kljub opozorilu analizatorja. Občutljivost opozorila analizatorja je bila 100 %, saj nismo našli lažno negativnih rezultatov, število resnično pozitivnih vzorcev pa je zelo majhno (2).

Tudi pri trombocitih lahko pride do aktivacije avtoprotiteles v vzorcu krvi, odvzete v epruveto z EDTA, kar se odraža v trombocitnih skupkih. Težavo lahko rešimo, če prosimo za ponovni odvzem krvi v epruveto z Na-citratom, rezultat pa nato podamo kot produkt številčne vrednosti in faktorja redčenja (pri razmerju 1 : 9 je faktor 1,1). Kadar pa je lažna trombocitopenija posledica aglutinacije trombocitov na hladnem, moramo vzorce krvi analizirati takoj po odvzemu ali pa jih segreti na 37 °C v inkubatorju. Pseudotrombocitopenijo lahko zasledimo tudi, kadar se trombociti vežejo na membrano nevtrofilnih granulocitov in nastanejo satelitski trombociti (12).

Opozorilo na aggregate trombocitov (PLT clumps/aggregates) ima zelo slabo občutljivost in pozitivno napovedno vrednost, zato smo pregledali še opozorilo o nenormalni porazdelitvi trombocitov (PLT Abn Distribution) ter napravili izračune za omenjeni združeni opozorili. S tem smo bistveno povečali občutljivost, pozitivno napovedno vrednost pa znatno zmanjšali (Preglednica VIII) .

Opozorilo pomik v levo (Left shift) se nanaša na prisotnost paličastih nevtrofilnih granulocitov. Pri pregledovanju krvnega razmaza smo upoštevali pozitiven rezultat, če smo v njem našli vsaj en paličasti nevtrofilec, zato je bilo število lažno negativnih rezultatov veliko (16,02 %).

Reaktivni limfociti (Atypical lymphocytes) so spremenjeni levkociti (virociti, imunoblasti, plazmacitoidni limfociti), ki imajo pomembno vlogo v imunskega odziva in jih prepoznamo po obilni citoplazmi ter nepravilnih oblikah jedra. V periferni krvi se pojavijo zaradi različnih vzrokov, najpogosteje zaradi virusnih okužb (Epstein-Barr virus, citomegalovirus, herpes simplex, ipd.) (12, 33). Atipični limfociti (Abnormal lymphocytes) so maligne limfoidne celice različnih velikosti in morfologij (z jedrci, zažetimi, prepognjenimi jedri in lasastimi citoplazemski izrastki). Razlikovanje med reaktivno ali

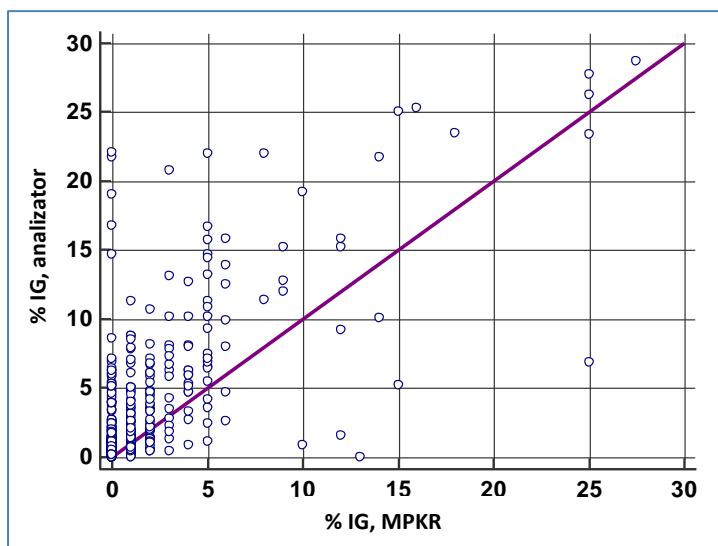
maligno spremenjenimi (atipičnimi) limfociti je ena od težjih nalog pri MPKR, zato je prekrivanje tovrstnih opozoril pri analizatorju veliko. Prav tako je pomembno, da namenimo veliko pozornosti opozorilu na blaste, ki predstavljajo enoten izraz za vse najmlajše celice v razvoju limfatične in mieloične celične vrste (12). Analizator ob prisotnosti blastov in/ali atipičnih limfocitov poda bodisi posamezno bodisi skupno opozorilo za blaste in atipične limfocite (Abnormal lymphocytes or blasts), medtem ko ob prisotnosti reaktivnih limfocitov poda samostojno opozorilo (Atypical lymphocytes). Zaradi raznovrstnih morfoloških odstopanj pri maligno spremenjenih celicah se populacije le-teh v razsevnih histogramih lahko prekrivajo.

Analizator pogosto poda opozorilo za anizocitozo (Anisocytosis). Tega je bolj smiselno upoštevati pri  $RDW > 22\%$ . Pri tej vrednosti namreč praviloma zasledimo različne oblike in velikosti eritrocitov.

Eritrocitni fragmenti ali shizociti (RBC Fragments) so eritrociti z odtrganimi deli celic in imajo lahko tudi obliko razbite jajčne lupine (keratociti) (12). Prisotni so pri intravaskularni hemolizi (3).

Hematološki analizator Sysmex XN-1000 podaja tako relativne kot tudi absolutne vrednosti za nezrele granulocite. Kadar v analiziranem vzorcu nezreli granulociti presežejo določeno nastavljeno mejno vrednost, analizator poda opozorilo na prisotnost nezrelih granulocitov (Immature granulocytes present).

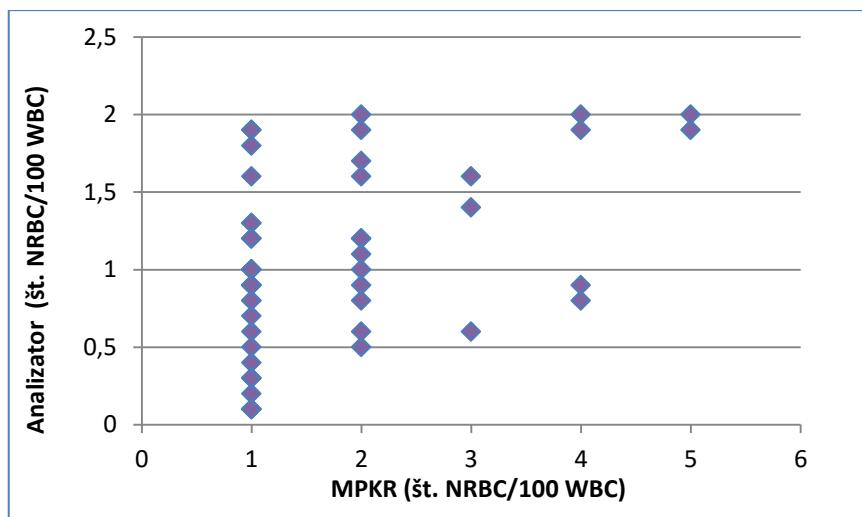
Med nezrele granulocite smo pri diferenciraju pod mikroskopom uvrstili vse promielocite, mielocite in metamielocite, kar ustreza parametru IG hematološkega analizatorja. Za vrednotenje pozitivnega rezultata pri pregledu krvnega razmaza smo si postavili mejno vrednost  $\geq 1\%$  nezrelih granulocitov. Poleg določitve parametrov za opozorilo aparata (Preglednica VIII) smo določili tudi korelacijo med relativnimi deleži IG, določenimi z aparatom in z mikroskopskim pregledom (Slika 4).



**Slika 4:** Korelacija med analizatorjem in MPKR za nezrele granulocite ( $N = 999$ ).

Z D'Agostino-Pearsonovim testom smo preverili porazdelitev meritev in ugotovili, da ta ni normalna ( $p < 0,05$ ). Glede na izračunani koeficient asimetrije (Skewness) je porazdelitev desnostranska. Pearsonov koeficient korelacije lahko izračunamo, kadar imamo linearno odvisnost obeh spremenljivk, za določanje njune povezanosti v primeru nelinearne odvisnosti, pa uporabljamo Spearmanov koeficient korelacije. Za analizo relativnih vrednosti nezrelih granulocitov smo izračunali Spearmanov koeficient korelacije, ki je znašal 0,545. Ugotovili smo torej zmerno do dobro povezano med rezultati MPKR in analizatorja.

Ker eritroblasti lahko pomembno vplivajo na lažno zvišano številčno koncentracijo levkocitov, moramo upoštevati vsako opozorilo analizatorja na njihovo prisotnost (NRBC present). Opozorilo na prisotnost eritroblastov se pojavi pri prednastavljeni vrednosti  $> 2$  NRBC/100 WBC. Pri tem je problematično število lažno negativnih rezultatov (7,2 %) (Preglednica VII), zato smo izsledke analizirali še grafično (Slika 5). Ugotovili smo, da so bile skoraj vse vrednosti eritroblastov (1 ali 2 NRBC/100WBC), ugotovljene pri MPKR, dejansko zelo podobne tistim vrednostim, ki smo jih izmerili z analizatorjem. Pri 9 vzorcih pa so bila odstopanja nekoliko večja.



Slika 5: Lažno negativni rezultati pri mejni vrednosti  $> 2$  NRBC/100 WBC.

## 4.2 SPREMEMBE KRITERIJEV ZA MIKROSKOPSKI PREGLED

Ugotavljali smo, kako bi sprememba kriterijev za MPKR vplivala na potek dela v Specializiranem hematološkem laboratoriju, UKC Ljubljana. Spremenjeni kriteriji bi zajemali vsa že uveljavljena merila za MPKR (Preglednica VI) in naslednje nove oziroma spremenjene kriterije (13):

- Retikulociti  $> 120 \times 10^9/L$  (nov kriterij).
- Mikroskopski pregled vsakokrat, ko se pojavijo opozorila na blaste, atipične, reaktivne limfocite ter pomik v levo (tudi pri znanih bolnikih).
- Ponovni MPKR v skladu s kriteriji, če so od predhodnega pregleda krvnega razmaza minili več kot 3 meseci (prej 1 leto).

Pri analizi podatkov smo upoštevali vse hemograme, ki so bili narejeni v obdobju od 9. 3. do 3. 4. 2015. Število vzorcev, ki so ustrezali novim kriterijem, je bilo 429, 138 pa je imelo znižano številčno koncentracijo levkocitov ( $< 1 \times 10^9/L$ ), kar je bila posledica zdravljenja (kemoterapija). Vse te vzorce smo odšteli, z izjemo 2, ki sta sicer imela številčno koncentracijo levkocitov  $< 1 \times 10^9/L$ , vendar pa MPKR pri pacientih ni bil izveden že več kot 3 mesece. Pri 1.020 vzorcih je bil MPKR narejen po starih merilih (naročen s strani naročnika ali pa so bila izpolnjena merila za mikroskopsko diferenciranje) (Preglednica VI), pri 293 vzorcih pa smo morali MPKR izvesti v skladu z novimi merili (Preglednica IX). Obseg dela v laboratoriju bi se z uveljavitvijo dodatnih meril tako povečal za 28,7 %.

**Preglednica IX:** Število opravljenih MPKR pri posameznih opozorilih analizatorja glede na nove oziroma spremenjene kriterije.

Število opozoril	Blasti/ atypični limfociti	Reaktivni limfociti	Pomik v levo	Retikulociti $>120 \times 10^9/L$	$> 3$ mesece od zadnjega MPKR	Levkociti $< 1 \times 10^9/L$	Skupaj
200	6	23	10	54	136	429	

### 4.3 RELATIVNE VREDNOSTI ERITROBLASTOV

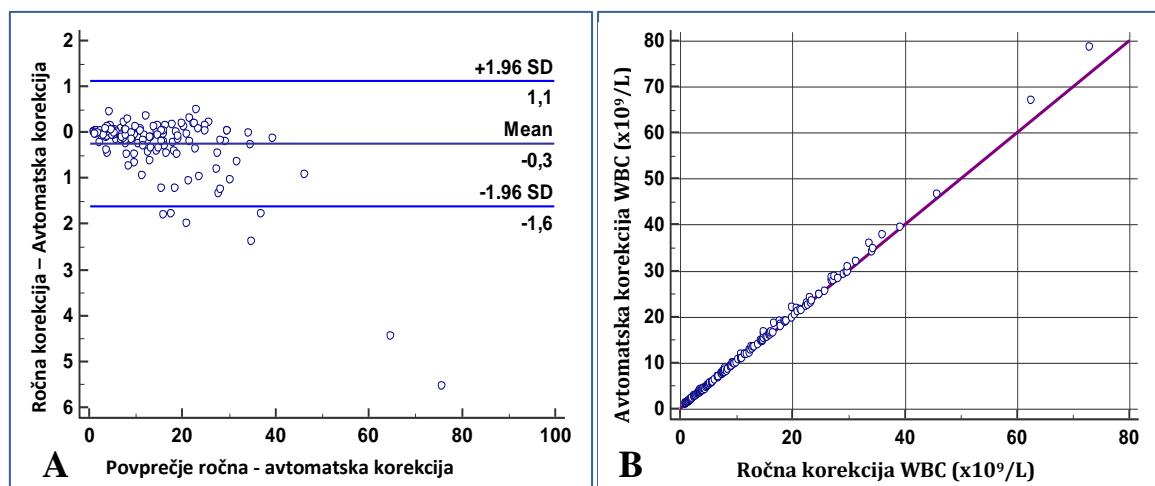
V analizo smo vključili 161 vzorcev (Priloga I), v katerih smo našli eritroblaste, od česar jih je 29 pripadalo novorojenčkom, starim do enega meseca. Vzorce bolnikov s krvnimi boleznimi smo izbirali izključno na podlagi zaznave eritroblastov, pri novorojenčkih pa neselektivno. Dva vzorca smo iz analize izključili. Eden je imel premalo krvi za analizo, pri drugem vzorcu pa meritve nismo uspeli izvesti zaradi slabo ločenih populacij celic. Vzorce s prisotnimi eritroblasti smo zbirali iz različnih ambulant in oddelkov, posebej pa smo zbirali pediatrične vzorce. Vsi vzorci niso imeli opozorila za eritroblaste (49 vzorcev), saj smo za analizo izbrali mejno vrednost  $\geq 1$  NRBC/100 WBC, za lažjo izvedbo MPKR pa številčno koncentracijo levkocitov  $> 1 \times 10^9/L$ . V 5 vzorcih smo z analizatorjem za eritroblaste določili relativno vrednost  $< 1$  NRBC/100 WBC, vendar smo jih kljub temu vključili v analizo, saj smo pri mikroskopskem pregledu v njih zasledili eritroblaste. Bolniki so imeli večinoma maligne krvne bolezni (akutna levkemija, mielodisplastični sindrom, mieloproliferativne novotvorbe, plazmocitom, ne-Hodgkinov limfom; 79 vzorcev) in anemije (avtoimunska hemolitična anemija, megaloblastna anemija, renalna anemija, aplastična anemija, mikrocitna anemija; 9 vzorcev).

#### 4.3.1 Korekcija števila levkocitov ob prisotnosti eritroblastov

Preverili smo tudi korekcijo številčne koncentracije levkocitov v prisotnosti eritroblastov, in sicer smo primerjali avtomatsko korekcijo analizatorja in ročno korekcijo, ki smo jo opravili s pomočjo izračuna, pri katerem smo upoštevali nekorigirano številčno koncentracijo levkocitov (TNC-N) in relativno vrednost eritroblastov, pridobljeno s štetjem pri MPKR. Analizirali smo 159 vzorcev z eritroblasti, pri katerih so bile zastopane vse tri preiskovane skupine (bolniki z malignimi krvnimi boleznimi, pacienti z anemijami in novorojenčki).

Z D'Agostino-Pearsonovim testom smo ugotovili, da porazdelitev rezultatov ni normalna ( $p < 0,05$ ), koeficient asimetrije (Skewness) pa je pokazal, da gre za desnostransko porazdelitev. Spearmanov koeficient korelacije je bil 0,999.

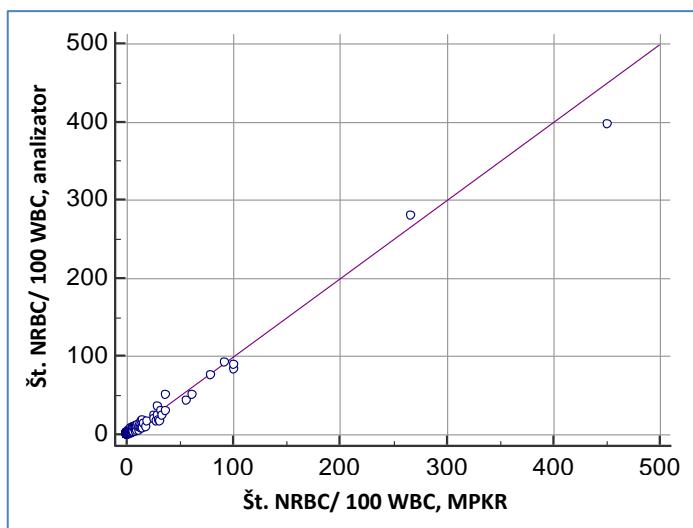
Bland-Altmanov diagram (Slika 6A) je grafičen prikaz primerjave rezultatov, dobljenih z dvema metodama merjenja. Prikazuje razlike med meritvami dveh metod, in sicer glede na povprečje rezultatov obeh metod. Z njim ugotavljamo, kako dobro je ujemanje med primerjalnima metodama (34).



**Slika 6:** Primerjava avtomatske in ročne korekcije številčne koncentracije levkocitov glede na prisotne eritroblaste. A) Bland-Altmanov diagram. B) Korelacija med avtomatsko in ročno korekcijo levkocitov ( $N = 159$ ).

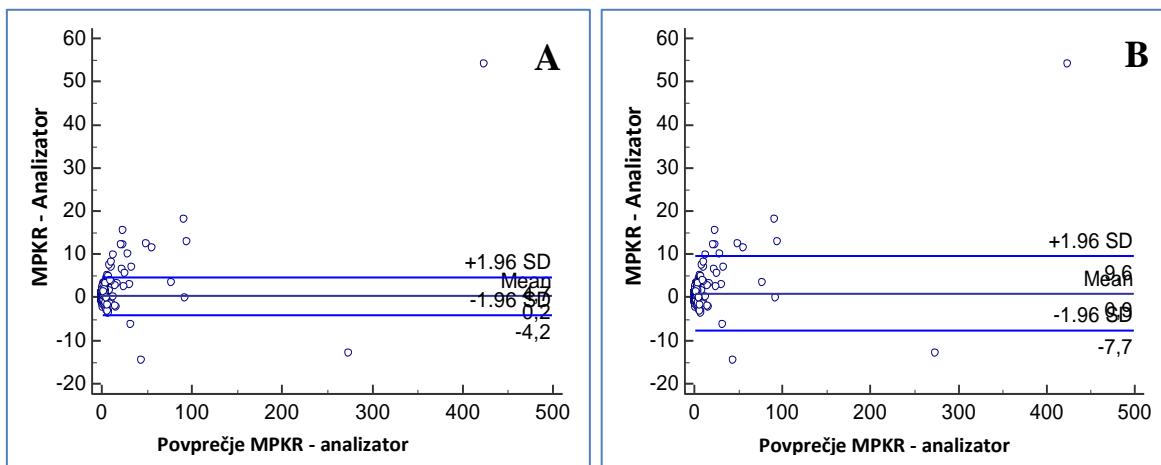
#### 4.3.2 Korelacija relativnih vrednosti eritroblastov, določenih z analizatorjem in MPKR

Korelacijsko med vrednostmi eritroblastov, določenih z analizatorjem in MPKR, smo izračunali za 1.088 vzorcev, od tega smo 159 vzorcev zbirali ločeno in so vsebovali večje deleže eritroblastov.



**Slika 7:** Korelacija med rezultati analizatorja in MPKR za eritroblaste (vsi vzorci, N=1.088).

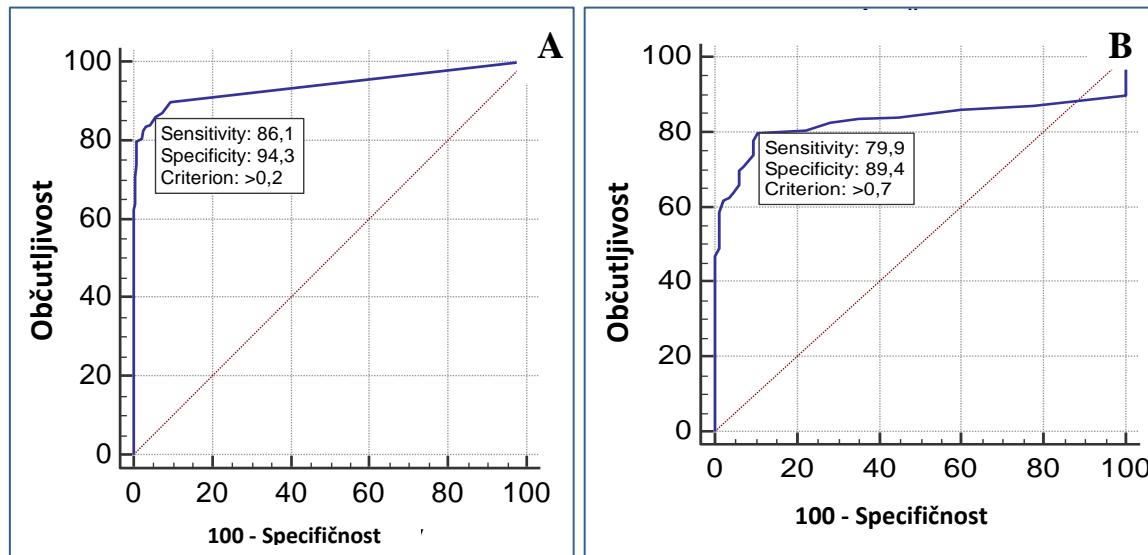
Z D'Agostino-Pearsonovim testom smo dokazali, da porazdelitev ni bila normalna ( $p < 0,05$ ), zato smo uporabili Spearmanov koeficient korelacije, ki je znašal 0,793 (Slika 7). Koeficient asimetrije (Skewness) je ponovno pokazal desnostransko porazdelitev. Tudi z Bland-Altmanovim testom smo ugotovili močno povezavo med rezultati, dobljenih z MPKR in analizatorjem (Slika 8).



**Slika 8:** Bland-Altman diagram za določitev eritroblastov z analizatorjem in MPKR. A) Vsi vzorci (N = 1.088). B) Brez rezultatov, ki so pri obeh metodah enaki vrednosti 0 NRBC/100 WBC (N = 279).

Preverili smo tudi, kako se spremeni Spearmanov koeficient, če postavimo mejno vrednost analizatorja na  $\geq 1$  NRBC/100 WBC, in kakšen je, če izključimo vse rezultate, ki so 0 NRBC/100 WBC pri obeh metodah. V prvem primeru je bil Spearmanov koeficient 0,868, v drugem pa 0,808.

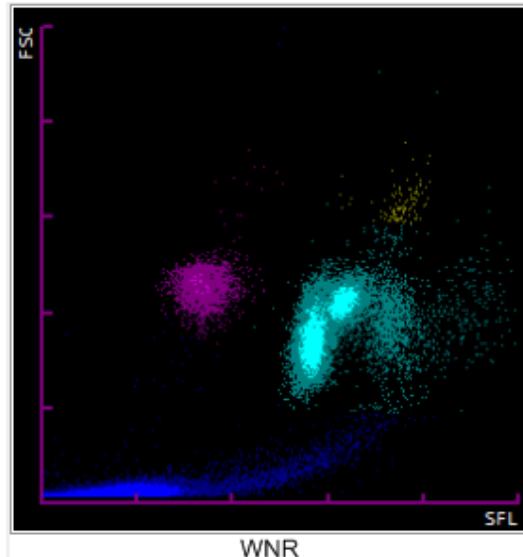
S pomočjo krivulje ROC smo ovrednotili mejno vrednost  $> 0,2$  NRBC/100 WBC za vse vzorce (Slika 9A) in  $> 0,7$  NRBC/100 WBC za rezultate brez tistih, ki so pri obeh metodah enaki vrednosti 0 (Slika 9B). Površini pod krivuljama (AUC) znašata 0,937 za vse vzorce in 0,83 za rezultate brez vrednosti 0 pri obeh metodah.



**Slika 9:** Krivulji ROC za rezultate analizatorja in MPKR. A) Vsi vzorci ( $N = 1.088$ ). B) Brez rezultatov, ki so pri obeh metodah enaki vrednosti 0 ( $N = 279$ ).

Preverili smo grafične izpise iz analizatorja pri tistih bolnikih, kjer so vrednosti eritroblastov med analizatorjem in MPKR najbolj odstopale, in sicer za več kot 10 NRBC/100 WBC (12 bolnikov). Največja tovrstna razlika je znašala 54 NRBC/100 WBC. Referenčna metoda za določanje eritroblastov je pretočna citometrija, ki pa je pri naši analizi nismo uporabili, zato je že sam vpliv uporabljenе metode doprinesel k večjemu odstopanju vrednosti eritroblastov. Skoraj pri vseh, z izjemo 2 pacientov, so bile vrednosti eritroblastov pri MPKR večje, v primerjavi z analizatorjem. Populacije celic na diagramu WNR so bile med seboj dobro ločene (Slika 10), pri pregledu opozoril analizatorja pa smo opazili prisotnost opozorila za eritroblaste pri vseh vzorcih, za nezrele granulocite pri 11, na blaste oziroma atipične limfocite pri 9 in opozorilo na monocitozo pri 8 vzorcih. Ostala opozorila (nevtrofilija, pomik v levo, nevtropenija, limfocitoza) so se pojavljala v manjšem številu. Zaključimo torej lahko, da je prišlo do večje razlike v vrednostih eritroblastov pri

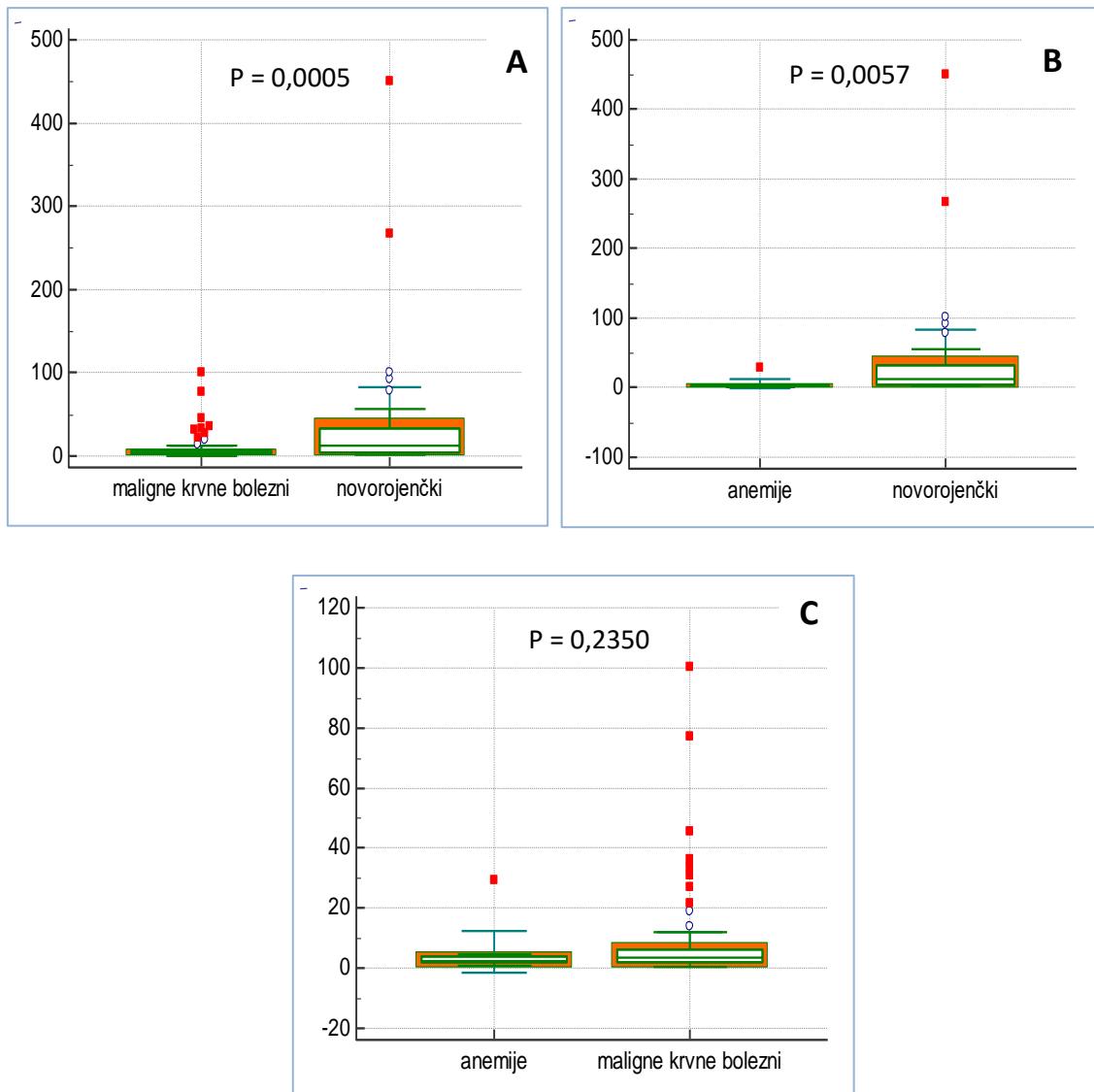
tistih pacientih, ki so imeli sočasno prisotne tudi druge nezrele celice. Analizator je najverjetneje razvrščal eritroblaste med nezrele levkocite.



**Slika 10:** Diagram WNR prikazuje ločene populacije eritroblastov, levkocitov in bazofilcev pri bolniku z velikim razhajanjem števila eritroblastov, določenih z analizatorjem in MPKR.

#### 4.3.3 Vzorci z večjim deležem eritroblastov

Z neparametričnim testom Mann-Whitney smo med seboj primerjali porazdelitev števila eritroblastov na 100 levkocitov v treh preiskovanih skupinah, in sicer pri novorojenčkih, bolnikih z malignimi krvnimi boleznimi in bolnikih z anemijami (Slika 11). Omenjeni test uporabljamo za primerjavo dveh neodvisnih spremenljivk, pri čemer na grafičen način prikažemo vse rezultate meritev, mediano testne skupine ter 5. in 95. percentil vseh vrednosti za posamezno skupino. Povprečno število NRBC/100 WBC je bilo v skupini novorojenčkov 45,7, v skupini bolnikov z malignimi krvnimi boleznimi 8,6, pri bolnikih z anemijami pa 5,6. Statistični test je pokazal, da je delež eritroblastov značilno večji v skupini novorojenčkov, v primerjavi z ostalima testnima skupinama, ki se med seboj nista statistično značilno razlikovali.



**Slika 11:** Grafični prikaz porazdelitve števila eritroblastov na 100 levkocitov. Primerjava med skupinami (test Mann-Whitney): A) bolniki z malignimi krvnimi boleznimi in novorojenčki; B) bolniki z anemijami in novorojenčki; C) bolniki z anemijami in malignimi krvnimi boleznimi.

## 5 RAZPRAVA

### 5.1 VREDNOTENJE OPOZORIL ANALIZATORJA

Vsa opozorila analizatorja smo vrednotili glede na izsledke pri MPKR, ki je še vedno referenčna metoda. Pri tem je treba opozoriti, da pri referenčni metodi razmaz vrednotita dva pregledovalca, pri čemer vsak šteje 200 levkocitov. Mi smo delali tako, kot poteka vrednotenje v rutini. Tako je MPKR vrednotil en pregledovalec, ki je štel 100 levkocitov, zato so vse vrednosti verjetno v celoti nekoliko slabše, kot bi bile pri izvedbi referenčne metode, ki pa je časovno bistveno zahtevnejša.

Pri opozorilu na hladne aglutinine sta bili občutljivost in negativna napovedna vrednost (NNV) 100 %, saj nismo našli lažno negativnih rezultatov (Preglednica VII). Zelo dobra je bila tudi specifičnost, ki je znašala 99,70 %. Pozitivna napovedna vrednost (PNV) je bila slaba (40 %), saj smo določili več lažno pozitivnih (0,3 %) kot resnično pozitivnih rezultatov (0,2 %). Glavna pomanjkljivost naših rezultatov pa je, da bi morali imeti večje število vzorcev s hladnimi aglutinini (resnično pozitivnih) oziroma vsaj več vzorcev z opozorili nanje.

Opozorilo za trombocitne skupke je kazalo izjemno slabo občutljivost (16,67 %) in pozitivno napovedno vrednost (6,25 %), za malenkost boljše rezultate (občutljivost in PNV 25,85 %) smo dobili pri opozorilu o nenormalni porazdelitvi trombocitov, ki smo ga pri pregledovanju krvnega razmaza povezovali z velikimi in gigantskimi trombociti. Ko pa smo obe opozorili za trombocite združili, se je občutljivost izboljšala na 50 %, PNV pa se je še znižala, in sicer na 5,08 %. V 8 vzorcih smo zasledili agregate trombocitov v krvnem razmazu, pri katerih je analizator javil opombo o nenormalni porazdelitvi trombocitov. Po opozorilu na trombocitne skupke pa smo med mikroskopskim pregledom našli agregate samo v 3 vzorcih. Obe opozorili skupaj smo zasledili pri 2 vzorcih, v katerih so bili prisotni trombocitni skupki. Na osnovi teh podatkov lahko zaključimo, da bi občutljivost zaznavanja trombocitnih agregatov lahko izboljšali, če bi upoštevali obe opozorili analizatorja. Pri znanih pacientih z agregati trombocitov si lahko pomagamo tako, da jih označimo v laboratorijskem informacijskem sistemu in smo tako pri naslednjem pregledu vnaprej pozorni na njihovo prisotnost v krvnih vzorcih.

Tudi pri opozorilu na pomik v levo smo izračunali nizko občutljivost (27,27 %), ki je posledica velikega števila lažno negativnih rezultatov (Preglednica VII). Občutljivost bi lahko izboljšali, če bi postavili višjo mejo za pozitiven rezultat pri diferencirjanju krvnih razmazov. V nekaterih raziskavah so kot mejno vrednost za pozitiven rezultat postavili vrednosti  $> 7\%$  in celo  $> 8\%$  (35, 36). V študiji so dokazali, da se ob upoštevanju kombinacije opozoril na pomik v levo in nevtrofilije učinkovitost poveča za 6 %, občutljivost za 30 %, specifičnost pa ostane nespremenjena (37).

Opozorilo na reaktivne limfocite je imelo zelo nizko občutljivost (16,67 %) in PNV (4,88 %), saj smo našli več lažno negativnih (1 %) in lažno pozitivnih (3,9 %) vzorcev kot pa resnično pozitivnih (0,2 %). Tudi v tem primeru bi potrebovali večje število vzorcev za preučevanje opozoril. Kar 5x večjo občutljivost (84 %) smo zasledili pri opozorilu na atipične limfocite, pri čemer pa je bila PNV nizka (10,61 %), in sicer zaradi 17,7 % lažno pozitivnih rezultatov (Preglednica VII).

Pri opozorilu na blaste smo ugotovili dobro občutljivost (80,7 %), specifičnost (83,97 %), NNV (98,63 %) in celokupno učinkovitost (83,78 %). PNV je bila slaba (23,35 %) zaradi velikega števila lažno pozitivnih rezultatov (151 vzorcev). Za pozitivne rezultate smo šteli vse tiste, pri katerih smo pri mikroskopskem pregledu našli vsaj 1 % blastov, kar je skladno z objavljenou literaturo (4, 38). Če združimo opozorila za blaste, atypične in reaktivne limfocite, ugotovimo, da se PNV izboljša na 32,70 %.

V primeru opozorila na anizocitozo smo izračunali zelo dobro specifičnost (97,99 %) in slabo občutljivost (39,51 %), saj je bilo 12,4 % rezultatov lažno negativnih. Pri vrednotenju anizocitoze gre pogosto za subjektivno oceno velikosti eritrocitov, zato je v tem primeru morda celo bolje upoštevati le parameter RDW. Za lažjo oceno eritrocitov smo si torej pomagali še s to vrednostjo. V vzorcih, v katerih je bila presežena vrednost RDW 22 %, smo povsod zasledili spremembe v oblikah eritrocitov (shizociti, eliptociti, stomatociti, kodociti, dakriociti, sferociti, akantociti) ali pa spremembe v njihovi velikosti (mikrociti, makrociti in megalociti). Glede na objavljene smernice je torej prav zaradi diagnostičnega pomena morfološko spremenjenih eritrocitov smiselno pregledati mikroskopski razmaz vedno, ko je vrednost RDW nad 22 %.

Podobno občutljivost (35 %) in specifičnost (95,73 %) smo zasledili tudi pri opozorilu na fragmente eritrocitov. Rezultat lahko v tem primeru podamo v odstotkih, če preštejemo shizocite med 1.000 eritrociti.

Opozorilo za nezrele granulocite analizator poda, ko ugotovi vsaj eno izmed sledečih mejnih vrednosti:  $> 0,10 \times 10^9/L$  ali  $> 1\%$ . Enako kot v literaturi smo za pozitiven rezultat pri diferenciraju pod mikroskopom upoštevali mejo  $\geq 1\%$  nezrelih granulocitov (38). Občutljivost in specifičnost je bila glede na izračune sprejemljiva (Preglednica VIII). Zanimivo je, da smo našli enako število (183 vzorcev) resnično pozitivnih in lažno pozitivnih rezultatov, zaradi česar je nizka PNV (50 %).

Za relativne vrednosti nezrelih granulocitov analizatorja smo izbrali 2 mejni vrednosti, in sicer  $IG \geq 0,5\%$  in  $IG \geq 1\%$ . Občutljivost rezultatov je bila boljša za 16,5 %, NNV za 3,99 %, specifičnost rezultatov pa je bila slabša za 26,92 %, PNV za 16,75 % in celokupna učinkovitost za 15,92 %, če primerjamo mejno vrednost  $IG \geq 0,5\%$  z  $IG \geq 1\%$ . Boljše vrednotenje rezultatov smo torej dobili, če smo upoštevali mejno vrednost analizatorja  $IG \geq 1\%$ . Korelacija med avtomatsko in ročno DKS je odražala nenormalno porazdelitev rezultatov (Slika 4). Spearmanov koeficient korelacije je bil 0,545, kar kaže na zmerno dobro povezavo med primerjalnima metodama.

Občutljivost opozorila na prisotnost eritroblastov je bila slaba (30,10 %), kar je bila posledica previsoke mejne vrednosti ( $> 2$  NRBC/100 levkocitov) analizatorja za prikaz tega opozorila, zato smo rezultate ovrednotili še pri drugih mejnih vrednostih (Preglednica VIII). Če bi analizator nastavili na mejo  $\geq 1$  NRBC/100 WBC, bi se občutljivost povečala za 26,21 %, NNV za 2,63 %, celokupna učinkovitost pa za 2 %. V tem primeru bi se PNV in specifičnost zmanjšali za 9 % oziroma 0,78 %. V kolikor pa bi analizator nastavili na mejno vrednost  $\geq 0,5$  NRBC/100 WBC, bi se občutljivost povečala kar za 42,72 %, NNV za 4,31 %, celokupna učinkovitost pa za 1,4 %. Specifičnost in PNV bi se v tem primeru zmanjšali za 3,35 % oziroma 26,13 %. Iz navedenih podatkov lahko zaključimo, da bi bila občutljivost opozorila analizatorja za eritroblaste najboljša, če bi mejno vrednost analizatorja prestavili na  $\geq 0,5$  NRBC na 100 levkocitov, s čimer pa bi delež opravljenih razmazov povečali za 7,4 %. Ker pa slednji delež pomeni precej več dela za laboratorij, smo preverili, do kolikšnih razlik prihaja med obema metodama pri lažno negativnih rezultatih. Ugotovili smo, da so bila ta odstopanja minimalna, zato menimo, da premik mejne vrednosti opozorila analizatorja za eritroblaste na nižjo vrednost ne bi bil smiseln.

Glede na podatke v literaturi je kriterij za pregled krvnega razmaza opredeljen na  $> 2$  NRBC/100 levkocitov za tiste preiskovance, ki so stari več kot 7 dni ter  $> 50$  NRBC/100 WBC za novorojenčke, stare od 0 do 7 dni (11). Spearmanov koeficient korelacije med rezultati analizatorja in MPKR je bil 0,793, kar pomeni zelo dobro povezavo.

Bland-Altmanov diagram prikazuje večino rezultatov znotraj območja  $\pm 1.96$  SD, kar prav tako potrjuje dobro ujemanje med izsledki analizatorja in MPKR. Če pri statistični analizi izključimo rezultate, katerih vrednosti so pri obeh metodah 0 NRBC/100 WBC, ugotovimo še boljše ujemanje, saj je v tem primeru območje  $\pm 1.96$  SD širše (Slika 8B). Iz diagramov je razvidno, da so bile večje razlike med avtomatsko in mikroskopsko metodo prisotne pri večjih vrednostih. Največja razlika med obema metodama je znašala 54 NRBC/100 WBC. Bland-Altmanov diagram je prikazal višje vrednosti pri mikroskopski določitvi eritroblastov.

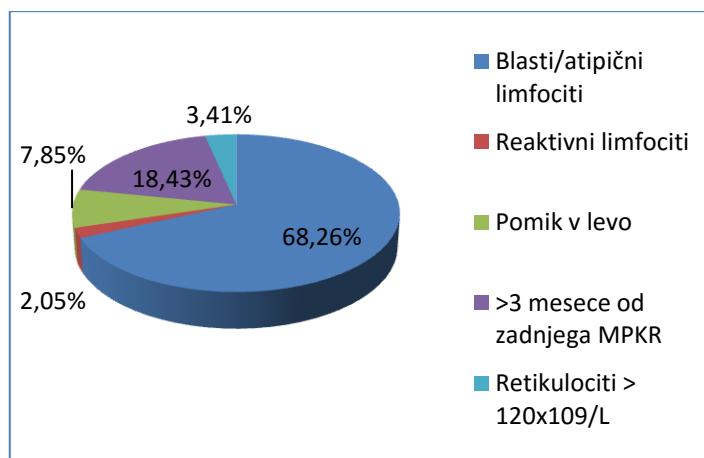
Spearmanov koeficient je bil najboljši, če smo upoštevali mejno vrednost  $\geq 1$  NRBC/100 WBC (0,868), nekoliko slabši pa, če smo izključili vse rezultate, ki so imeli pri obeh metodah vrednost 0 NRBC/100WBC (0,808).

Krivulja ROC je najboljša takrat, kadar sega v zgornji levi kot diagrama. Takrat sta občutljivost in specifičnost 100 %. Bližje ko je krivulja ROC zgornjemu levemu kotu, večja je tudi celokupna točnost testa (39). Mejna vrednost  $> 0,2$  NRBC/100 WBC se je izkazala kot najboljše razmerje med občutljivostjo in specifičnostjo, in sicer smo v tem primeru dobili 86,1 % občutljivost in 94,3 % specifičnost pri vrednosti površine pod krivuljo ROC 0,937, ob upoštevanju vseh rezultatov (Slika 9A). Pri mejni vrednosti  $> 0,7$  NRBC/100 WBC pa smo ugotovili slabšo občutljivost (79,9 %), slabšo specifičnost (89,4 %) in manjšo vrednost površine pod krivuljo (0,83), če smo iz analize izključili vse rezultate z vrednostmi 0 NRBC/100 WBC pri obeh metodah (Slika 9B).

## 5.2 KRITERIJI ZA MIKROSKOPSKI PREGLED

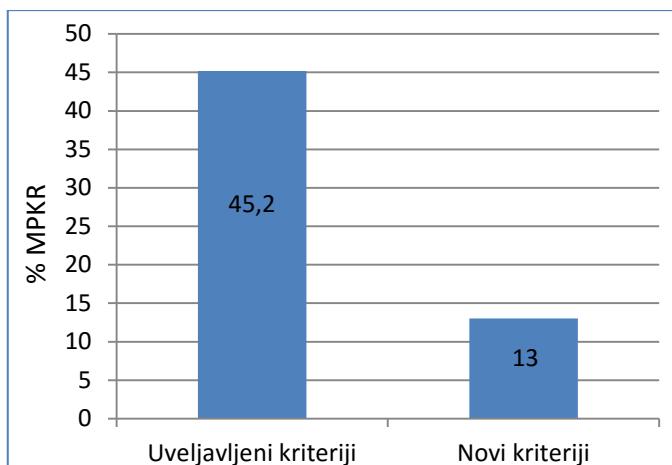
Uvodoma smo omenili, da mora vsak laboratorij določiti kriterije za MPKR, zato smo v Specializiranem hematološkem laboratoriju, UKC Ljubljana, preverili, kako bi spremembu obstoječih kriterijev glede na objavljene smernice vplivala na obseg dela. Največji vpliv na povečan obseg dela bi imel kriterij, ki zahteva mikroskopski pregled vsakič, ko se na analizatorju pojavi opozorilo na blaste ali atipične limfocite (68,26 %), reaktivne limfocite

(2,05 %) ali na pomik v levo (7,85 %). Naslednji kriterij, ki zahteva MPKR, je vezan na situacijo, ko je od predhodnega pregleda krvnega razmaza minilo več kot tri mesece (18,43 %). Vpeljava novega kriterija glede na številčno koncentracijo retikulocitov  $> 120 \times 10^9/L$  pa bi predstavljal najmanjši odstotek dodatnih MPKR (3,41 %).



**Slika 12:** Delež dodatnih MPKR glede na posamezne kriterije.

Če bi upoštevali vsa nova merila, bi se odstotek izvedenih MPKR povečal za 28,7 %. Glede na vse hemograme, ki se dnevno analizirajo v laboratoriju, je MPKR potreben v 45,2 %, če upoštevamo trenutno uveljavljene kriterije. V kolikor pa bi upoštevali nova merila, bi bil MPKR potreben pri dodatnih 13 % hemogramov. Skupno bi bil torej delež MPKR glede na vse analizirane hemograme 58,2 %. Velik delež hemogramov (31,7 %), ki smo jih obravnavali po novih kriterijih, je pripadal poznamim bolnikom, katerih vrednosti levkocitov so bile  $< 1 \times 10^9/L$ , kar je bila posledica kemoterapije, ali pa je bila njihova diferencialna krvna slika narejena znotraj treh mesecev.



**Slika 13:** Primerjava deležev MPKR po trenutno veljavnih in po novih kriterijih v Specializiranem hematološkem laboratoriju, UKC Ljubljana.

Delež mikroskopskih pregledov se od laboratorija do laboratorija razlikuje, in sicer od 5 pa vse do 95 % (4). Odstotek izvedenih MPKR je večinoma odvisen od opozoril analizatorja (40). V našem primeru je bil delež mikroskopskih pregledov razmeroma velik, saj smo preiskovali populacijo bolnikov z različnimi hematološkimi obolenji, zato smo zabeležili več takih opozoril analizatorja, ki zahtevajo MPKR.

V kolikor bi upoštevali nove kriterije, bi to za laboratorij pomenilo povečanje števila MPKR, kar bi podaljšalo čas analiz, povečalo stroške in obseg dela, ki bi ga morali opraviti v določenem času. S stališča bolnikov pa bi to pomenilo sicer počasnejšo ambulantno obravnavo, vendar pa hitrejše odkrivanje bolezni oziroma novih hematoloških sprememb, pravilnejši bi bili rezultati za relativne in posledično absolutne vrednosti diferencialne krvne slike, s tem pa bi se seveda izboljšala tudi kakovost.

Če bi premaknili mejno vrednost opozorila za prisotnost eritroblastov na  $\geq 0,5$  NRBC/100 WBC, bi se občutljivost zaznavanja izboljšala, saj bi se število lažno negativnih rezultatov zmanjšalo, vendar pa bi se povečalo število MPKR, ki je že pri sedanjih kriterijih dokaj visoko. Z grafično analizo rezultatov smo ugotovili, da je pri lažno negativnih rezultatih prihajalo do minimalnih odstopanj, zato premik mejne vrednosti ni bil potreben, tako da lahko mejna vrednost ostane na  $> 2$  NRBC/100 WBC. S spremembjo mejne vrednosti nezrelih granulocitov na IG  $\geq 1$  % pa bi lahko izboljšali specifičnost in s tem zmanjšali lažno pozitivne rezultate.

Visoka občutljivost je pomembna predvsem za presejanje v medicinskih laboratorijih na primarnem nivoju, visoka specifičnost pa je priporočljiva na sekundarnem in terciarnem nivoju, in sicer zaradi krajšega časa analize (40). Za večino opozoril, ki jih podaja analizator, smo ugotovili visoko specifičnost. Dobro občutljivost opozoril smo ugotovili v primeru opozoril na hladne aglutinine, atipične limfocite in blaste, slabo pa za opozorila na anizocitozo, shizocite, reaktivne limfocite, pomik v levo in opozorila na trombocitne aggregate ter nenormalno porazdelitev trombocitov.

### 5.3 DOLOČANJE ERITROBLASTOV

Hematološki analizator, ki omogoča štetje eritroblastov, je zaželen predvsem v laboratorijih, kjer pregledujejo veliko vzorcev novorojenčkov na fiziološko prisotnost teh celic.

Tudi mi smo v skupini novorojenčkov določili statistično značilno večji delež eritroblastov kot pa v skupinah bolnikov s krvnimi boleznimi, pri katerih se ti tudi pogosto pojavljajo v periferni krvi (test Mann-Whitney). Ugotovili smo tudi, da je bila porazdelitev vrednosti eritroblastov na 100 levkocitov statistično različna med skupinama novorojenčkov in bolnikov z malignimi krvnimi boleznimi ( $p < 0,05$ ) ter med skupinama novorojenčkov in bolnikov z anemijami ( $p < 0,05$ ). Med skupinama bolnikov z anemijami in tistih z malignimi krvnimi boleznimi pa smo ugotovili boljše ujemanje kot pri primerjavi tovrstnih preiskovancev z novorojenčki. Z MPKR smo najvišjo vrednost določili pri novorojenčku, in sicer 451 NRBC/100 WBC.

Kadar z analizatorjem določimo manj kot 0,5 eritroblastov/100 WBC, nam ni potrebno narediti krvnega razmaza, saj tako majhen delež teh celic nima vpliva na rezultat levkocitov (24). Hematološki analizator, ki omogoča štetje eritroblastov, je primeren tudi za presejanje, saj prešteje veliko več celic, kot jih lahko sami pod mikroskopom (23). Ujemanje med določitvijo eritroblastov z MPKR in analizatorjem je dobro, in sicer je boljše pri manjših vrednostih, pri večjih pa slabše, zlasti takrat, ko so v krvi prisotne tudi druge, mlajše razvojne stopnje levkocitov.

Kadar preštejemo 10 ali več eritroblastov na 100 diferenciranih levkocitov, moramo napraviti ročno korekcijo številčne koncentracije levkocitov, v kolikor je analizator ne

izvede avtomatsko (12). Izračunani Spearmanov koeficient korelacije (0,999) predstavlja odlično ujemanje med ročno in avtomatizirano korekcijo (Slika 6B), kar pomeni, da lahko določitvi analizatorja zaupamo brez dodatnega ročnega preverjanja korekcije številčne koncentracije levkocitov.

V Bland-Almanovem diagramu je bila večina rezultatov znotraj območja  $\pm 1.96$  SD (Slika 6A), izven teh meja pa so bile vrednosti  $> 15,9 \times 10^9/\text{L}$  glede na povprečje rezultatov obeh metod. Gre za nižje vrednosti pri ročni korekciji levkocitov v primerjavi z avtomatizirano. Največja razlika med ročno in avtomatsko korekcijo levkocitov je bila  $5,53 \times 10^9/\text{L}$ .

## 6 ZAKLJUČEK

1. Ugotovili smo zelo dobro specifičnost in zelo slabo občutljivost opozoril analizatorja na: trombocitne skupke, nenormalno porazdelitev trombocitov, pomik v levo, reaktivne limfocite, anizocitozo in shizocite. Občutljivost se je pri vrednotenju opozoril za trombocite izboljšala, če smo upoštevali obe opozorili skupaj, torej opozorilo na trombocitne skupke in nenormalno porazdelitev trombocitov, vendar je bila še vedno zelo nizka (50 %). Tako specifičnost kot tudi občutljivost sta bili zelo dobri pri opozorilih na hladne aglutinine, atipične limfocite in blaste, še sprejemljivi pa pri opozorilu na prisotnost nezrelih granulocitov. Kljub temu bi zaradi majhnega števila vzorcev z opozorili na hladne aglutinine in reaktivne limfocite morali opraviti dodatne analize. Za nezrele granulocite smo ugotovili zmersno do dobro povezano med rezultati analizatorja in MPKR ( $r = 0,545$ ) (Slika 4). Vrednotenje občutljivosti in specifičnosti za relativne vrednosti nezrelih granulocitov je bilo najboljše pri mejni vrednosti  $\geq 1\%$ .
2. V kolikor bi v obstoječe kriterije za izvedbo MPKR vključili nove, bi se obseg dela v laboratoriju povečal za 28,7 %, pri čemer bi največji delež prispevalo skupno opozorilo analizatorja na blaste in atipične limfocite (68,26 %).
3. Pri vrednotenju opozoril na prisotnost eritroblastov smo ugotovili, da je najboljša mejna vrednost  $\geq 0,5$  eritroblastov na 100 preštetih levkocitov. Nižja vrednost bi bila namreč nesmiselna, saj manjši deleži prisotnih eritroblastov nimajo vpliva na določeno številčno koncentracijo levkocitov. Pri navedeni mejni vrednosti bi se delež MPKR povečal za 7,4 % v primerjavi s trenutno uporabljenou mejno vrednostjo  $> 2$  NRBC/100 WBC. Med pregledovanjem lažno negativnih rezultatov smo ugotovili le minimalna odstopanja med rezultati analizatorja in MPKR, zato menimo, da premik mejne vrednosti ne bi bil smiseln. Korelacija med določitvijo števila eritroblastov/100 levkocitov z analizatorjem in mikroskopsko metodo je bila zelo dobra ( $r = 0,793$ ) (Slika 7).

4. Največje število eritroblastov smo določili v skupini novorojenčkov. Korelacijo med ročno in avtomatizirano korekcijo levkocitov pa smo, razen v tej skupini, določali še v vzorcih bolnikov z anemijami in malignimi krvnimi boleznimi, kjer se te nezrele celice tudi pojavljajo v večjem številu. Ugotovili smo, da je bila korelacija med ročno in avtomatizirano korekcijo števila levkocitov odlična ( $r = 0,999$ ) (Slika 6B), zato lahko avtomatski zaupamo brez dodatnega preverjanja.

## 7 LITERATURA

- 1) Pratumvinit B, Wongkrajang P, Reesukumal K, Klinbua C, Niamjoy P: Validation and Optimization of Criteria for Manual Smear Review Following Automated Blood Cell Analysis in a Large University Hospital. *Arch Pathol Lab Med.* 2013; 137: 408–414.
- 2) Cui W, Wu W, Wang X, Wang G, Hao Y, Chen Y: Development of the personalized criteria for microscopic review following four different series of hematology analyzer in Chinese large scale hospital. *Chin Med J.* 2010; 123: 3231–7.
- 3) Košnik M, Mrevlje F, Štajer D, Černelč P, Koželj M: Interna medicina, 4. izdaja, Littera Picta d.o.o. Slovensko medicinsko društvo, Ljubljana, 2011: 1244–1245, 1252–1254, 1284–1285.
- 4) Barnes PW, McFadden SL, Machin SJ, Simson E: The international consensus group for hematology review: Suggested criteria for action following automated CBC and WBC differential analysis. *Laboratory Hematology.* 2005; 11: 83–90.
- 5) Gulati GL, Alomari M, Kocher W, Schwarting R: Criteria for blood smear review. *Lab Med.* 2002; 33: 374–7.
- 6) Bain BJ: The peripheral blood smear, Cecil Medicine, 24th edition, Philadelphia, Saunders Elsevier. 2011; 160: 1024–31.
- 7) Kwon MJ, Nam MH, Kim SH, Lim CS, Lee CK, Cho Y, Lee KN, Yoon SY: Evaluation of the nucleated red blood cell count in neonates using the Beckman Coulter UniCel DxH 800 analyzer. *Int J Lab Hematol.* 2011; 33: 620–628.
- 8) Bain BJ: Diagnosis from the blood smear. *N Eng J Med.* 2005; 353: 498–507.
- 9) Houwen B: Blood film preparation and staining procedures. *Lab Hematol.* 2000; 6: 1–7.
- 10) Vives Corrons JL, Albarède S, Flandrin G, Heller S, Horvath K, Houwen B, Nordin G, Sarkani E, Skitek M, Van Blerk M, Libeer JC: Guidelines for blood smear preparation and staining procedure for setting up an external quality assessment scheme for blood smear interpretation. Part I: control material. *Clin Chem Lab Med.* 2004; 42(8): 922–926.
- 11) Gulati G, Song J, Florea AD, Gong J: Purpose and criteria for blood smear scan, blood smear examination, and blood smear review. *Ann Lab Med.* 2013; 33: 1–7.

- 12) Berce K, Božnar AE, Podgornik H, Trampuš BA, Žontar D: Priporočeni postopki za mikroskopski pregled krvnega razmaza, Slovensko združenje za klinično kemijo, Ljubljana, 2012: 3–20.
- 13) Geneviévé F, Galois AC, Mercier-Bataille D, Wagner-Ballon O, Trimoreau F, Fenneteau O, Schillinger F, Leymarie V, Girard S, Settegrana C, Daliphard S, Soenen-Cornu V, Cividin M, Lesesve JF, Châtelain B, Troussard X, Bardet V: Smear microscopy revision: propositions by the GFHC. Feuillets de Biologie. 2014; 314: 1–9.
- 14) Rodak BF, Carr JH: Clinical Hematology Atlas, 4. Izdaja, Saunders Elsevier, 2013; 3: 19–32.
- 15) Bain BJ: Blood cells – A practical guide, 4. Izdaja, Blackwell publishing, Oxford, 2006; 26–28, 88–89, 130–132, 177.
- 16) Hermansen MC: Nucleated red blood cells in the fetus and newborn. Arch Dis Child Fetal Neonatal. 2001; 84: F211–F215.
- 17) Perrone S, Vezzosi P, Longini M, Marzocchi B, Tanganelli D, Testa M, Santilli T, Buonocore G: Nucleated red blood cell count in term and preterm newborns: reference values at birth. Arch Dis Child Fetal Neonatal. 2005; 90: F174–F175.
- 18) Constantino BT, Cogionis B: Nucleated RBCs – Significance in the peripheral blood film. Lab Med. 2000; 31: 223–229.
- 19) Schaer C, Schmugge M, Frey B: Prognostic value of nucleated red blood cells in critically ill children. Swiss Med Wkly. 2014; 144: w13944.
- 20) Fernandes BJ: Identification and enumeration of nucleated red blood cells in peripheral blood. Sysmex Journal International. 2002; 12: 56–62.
- 21) Kuert S, Holland-Letz T, Friese J, Stachon A: Association of nucleated red blood cells in blood and arterial oxygen partial tension. Clin Chem Lab Med. 2011; 49: 257–263.
- 22) Schafer M, Rowan RM: The clinical relevance of nucleated red blood cell counts. Sysmex Journal International. 2000; 10: 59–63.
- 23) Sysmex: The clinical relevance of measuring NRBC in the XN-CBC. Dostopno na: [http://www.sysmex-europe.com/fileadmin/media/f100/Xtra/Xtra\\_article\\_The\\_clinical\\_relevance\\_of\\_measuring\\_NRBC\\_in\\_the\\_XN-CBC.pdf](http://www.sysmex-europe.com/fileadmin/media/f100/Xtra/Xtra_article_The_clinical_relevance_of_measuring_NRBC_in_the_XN-CBC.pdf) (online 28. 6. 2015).

- 24) De Keijzer MH, Van Der Meer W: Automated counting of nucleated red blood cells in blood samples of newborns. *Clin Lab Haem.* 2002; 24: 343–345.
- 25) Sysmex corporation, Automated hematology analyzer, Xn series: Navodila za uporabo, 2010-2013. Dostopno v Specializiranem hematološkem laboratoriju.
- 26) Sysmex: Greater possibilities by design. Dostopno na:  
[https://www.sysmex.com/us/en/Brochures/XN-Series\\_Main\\_Brochure\\_MKT-10-1174.pdf](https://www.sysmex.com/us/en/Brochures/XN-Series_Main_Brochure_MKT-10-1174.pdf) (online 29. 6. 2015).
- 27) Sysmex: Flourescence flow cytometry. Dostopno na:  
<http://www.sysmex-europe.com/academy/knowledge-centre/measurement-technologies/fluorescence-flow-cytometry.html> (online 29. 6 .2015).
- 28) Matsushita H, Tanaka Yuzo, Sakairi K, Tanaka Yumiko. Sysmex Corporation – XN Series: Automated Hematology Analyzer: Clinical case report, 2013. Dostopno v Specializiranem hematološkem laboratoriju.
- 29) Sysmex: Measurement principles. Dostopno na:  
<http://www.sysmex-europe.com/academy/knowledge-centre/calendar-2014/measurement-technology-and-scattergram.html> (online 1. 7. 2015).
- 30) Dunning K, Safo AO: The ultimate Wright-Giemsa stain: 60 years in the making. Department of Laboratory Medicine and Pathology. Minnesota. 2011; 86(2): 69–75.
- 31) Human blood cells. Dostopno na:  
<http://www.ronaldschulte.nl/human-blood-cells.html> (online 10. 7. 2015).
- 32) Akobeng AK: Understanding diagnostic tests 1: sensitivity, specificity and predictive values. *Acta Paediatrica.* 2006; 96: 338–341.
- 33) Simon MW: The atypical lymphocyte. *International Pediatrics.* 2003; 18: 20–22.
- 34) Editorial I: Using the Bland-Altman method to measure agreement with repeated measures. *Br J Anaesth.* 2007; 99(3): 309–311.
- 35) Sireci A, Schlaberg R, Kratz A: A method for optimizing and validating institution – specific flagging criteria for automated cell counters. *Arch Pathol Lab Med.* 2010; 134: 1528–1533.
- 36) Comar SR, Malvezzi M, Pasquini R: Are the review criteria for automated complete blood counts of the International Society of Laboratory Hematology suitable for all hematology laboratories? *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2014; 36(3): 219–225.

- 37) Grotto H: Why and how validate criteria by manual smear review to improve laboratory productivity? *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2015; 37(1): 67–68.
- 38) Kim H, Hur M, Choi SG, Moon HW, Yun YM, Hwang HS, Kwon HS, Sohn IS: Performance evaluation of Sysmex XN hematology analyzer in umbilical cord blood: a comparison study with Sysmex XE-2100. *Clin Chem Lab Med.* 2014; 1–9.
- 39) MedCalc: Statistics for biomedical research, Software manual, Receiver Operating Characteristic (ROC) curve analysis. 2015:186–193.
- 40) Kim SJ, Kim Y, Shin S, Song J, Choi JR: Comparison study of the rates of manual peripheral blood smear review from 3 automated hematology analyzers, Unicel DxH 800, Advia 2120i, and XE 2100, using International consensus group guidelines. *Arch Pathol Lab Med.* 2012; 136: 1408–1413.

**PRILOGA I**

**Preglednica XIX:** Rezultati določitve eritroblastov s hematološkim analizatorjem in pri MPKR.

Zaporedna št.	Spol	TNC-N ( $\times 10^9/L$ )	NRBC ( $\times 10^9/L$ )	WBC ( $\times 10^9/L$ )	NRBC (št./100 WBC, analizator)	NRBC (št./100 WBC, MPKR)	Ročna korekcija WBC ( $\times 10^9/L$ )
<b>Maligne krvne bolezni</b>							
1	M	4,42	0,10	4,32	2,3	3,5	4,27
2	Ž	19,96	3,78	16,18	23,4	33,5	14,95
3	Ž	2,09	0,08	2,01	4,0	4,0	2,01
4	Ž	1,79	0,04	1,75	2,3	1,0	1,77
5	Ž	12,97	0,19	12,78	1,5	5,0	12,35
6	M	7,81	0,10	7,71	1,3	1,0	7,73
7	M	1,74	0,02	1,72	1,2	2,5	1,70
8	Ž	4,98	0,05	4,93	1,0	1,0	4,93
9	Ž	10,55	0,78	9,77	8,0	8,0	9,77
10	Ž	13,79	0,31	13,48	2,3	5,0	13,13
11	Ž	20,10	0,28	19,82	1,4	0,5	20,00
12	Ž	2,24	0,07	2,17	3,2	3,5	2,16
13	Ž	37,68	1,65	36,03	4,6	12,0	33,64
14	M	1,03	0,02	1,01	2,0	2,0	1,01
15	Ž	1,74	0,04	1,70	2,4	2,5	1,70
16	M	2,76	0,08	2,68	3,0	6,5	2,59
17	M	16,27	0,21	16,06	1,3	1,5	16,03
18	M	18,49	0,31	18,18	1,7	3,0	17,95
19	M	8,84	0,61	8,23	7,4	14,0	7,75
20	Ž	13,5	0,16	13,34	1,2	2,0	13,24
21	M	1,95	0,03	1,92	1,6	1,0	1,93
22	Ž	1,56	0,11	1,45	7,6	6,0	1,47
23	M	16,61	0,22	16,39	1,3	0,5	16,53
24	Ž	1,75	0,15	1,60	9,4	9,5	1,60
25	Ž	4,28	0,27	4,01	6,7	3,5	4,14
26	Ž	1,81	0,04	1,77	2,3	2,5	1,77
27	M	4,45	0,16	4,29	3,7	3,0	4,32
28	Ž	17,18	0,45	16,73	2,7	5,5	16,28
29	Ž	1,15	0,06	1,09	5,5	5,5	1,09
30	M	5,17	0,05	5,12	1,0	1,0	5,12
31	M	1,22	0,04	1,18	3,4	4,0	1,17
32	M	22,61	1,27	21,34	6,0	4,5	21,64
33	M	19,51	0,39	19,12	2,0	2,5	19,03
34	M	4,03	0,05	3,98	1,3	1,0	3,99
35	Ž	1,72	0,02	1,70	1,2	1,0	1,70
36	M	8,04	0,67	7,37	9,1	6,0	7,58
37	Ž	8,21	0,22	7,99	2,8	6,0	7,75
38	M	3,96	0,08	3,88	2,1	2,0	3,88

Zaporedna št.	Spol	TNC-N ( $\times 10^9/L$ )	NRBC ( $\times 10^9/L$ )	WBC ( $\times 10^9/L$ )	NRBC (št./100 WBC, analizator)	NRBC (št./100 WBC, MPKR)	Ročna korekcija WBC ( $\times 10^9/L$ )
39	Ž	4,37	0,60	3,77	15,9	19,0	3,67
40	M	6,54	2,39	4,15	57,6	77,0	3,69
41	Ž	6,03	0,14	5,89	2,4	5,0	5,74
42	Ž	8,89	0,23	8,66	2,7	3,5	8,59
43	M	6,31	0,09	6,22	1,4	2,0	6,19
44	Ž	13,3	0,21	13,09	1,6	2,5	12,98
45	M	1,11	0,03	1,08	2,8	2,0	1,09
46	Ž	26,03	0,48	25,55	1,9	1,0	25,77
47	M	15,18	0,37	14,81	2,5	5,5	14,39
48	M	8,71	0,68	8,03	8,5	11,0	7,85
49	M	3,32	0,04	3,28	1,2	1,5	3,27
50	M	6,19	1,61	4,58	35,2	31,0	4,73
51	Ž	7,79	0,24	7,55	3,2	5,0	7,42
52	M	5,23	1,62	3,61	44,9	45,5	3,59
53	Ž	4,06	0,06	4,00	1,5	3,5	3,92
54	Ž	30,29	0,96	29,33	3,3	4,0	29,13
55	Ž	5,15	0,10	5,05	2,0	3,5	4,98
56	M	2,03	0,44	1,59	27,7	27,0	1,60
57	Ž	1,42	0,02	1,40	1,4	3,5	1,37
58	M	7,62	0,66	6,96	9,5	10,5	6,90
59	Ž	1,49	0,14	1,35	10,4	9,0	1,37
60	M	2,06	0,40	1,66	24,1	21,5	1,70
61	M	5,80	0,20	5,60	3,6	2,5	5,66
62	M	4,11	0,09	4,02	2,2	2,0	4,03
63	Ž	7,15	0,13	7,02	1,9	3,5	6,91
64	Ž	6,05	0,23	5,82	4,0	4,0	5,82
65	Ž	28,81	0,53	28,28	1,9	2,5	28,11
66	M	3,40	0,09	3,31	2,7	2,5	3,32
67	Ž	7,91	0,09	7,82	1,2	2,0	7,75
68	Ž	1,57	0,11	1,46	7,5	9,0	1,44
69	Ž	40,67	1,24	39,43	3,1	3,5	39,29
70	Ž	2,90	0,07	2,83	2,5	3,5	2,80
71	Ž	2,03	0,05	1,98	2,5	3,5	1,96
72	M	25,37	0,65	24,72	2,6	2,0	24,87
73	Ž	10,98	1,04	9,94	10,5	9,0	10,07
74	Ž	22,03	1,00	21,03	4,8	5,0	20,98
75	Ž	5,04	0,23	4,81	4,8	3,5	4,87
76	M	4,43	2,00	2,43	82,3	100,5	2,21
77	Ž	1,22	0,00	1,22	0,0	2,5	1,19
78	M	6,22	2,10	4,12	51,0	36,5	4,56
79	Ž	14,01	0,61	13,40	4,6	9,5	12,79
<b>Anemije</b>							
80	Ž	19,39	2,61	16,78	15,6	29,5	14,97
81	Ž	7,76	0,11	7,65	1,4	2,5	7,57

Zaporedna št.	Spol	TNC-N ( $\times 10^9/L$ )	NRBC ( $\times 10^9/L$ )	WBC ( $\times 10^9/L$ )	NRBC (št./100 WBC, analizator)	NRBC (št./100 WBC, MPKR)	Ročna korekcija WBC ( $\times 10^9/L$ )
82	Ž	16,51	0,60	15,91	3,8	3,5	15,95
83	M	1,42	0,03	1,39	2,2	1,0	1,41
84	M	3,45	0,06	3,39	1,8	1,5	3,40
85	M	3,73	0,16	3,57	4,5	3,0	3,62
86	M	4,13	0,30	3,83	7,8	4,5	3,95
87	Ž	2,60	0,07	2,53	2,8	2,0	2,55
88	M	5,46	0,11	5,35	2,1	2,5	5,33
<b>Novorojenčki</b>							
89	Ž	71,93	4,60	67,33	6,8	15	62,55
90	Ž	9,70	0,15	9,55	1,6	2	9,51
91	Ž	48,83	21,01	27,82	75,5	79	27,36
92	M	45,29	7,42	37,87	19,6	26	36,09
93	M	30,43	2,58	27,85	9,3	13	27,05
94	Ž	24,63	1,77	22,86	7,7	6	23,35
95	M	21,78	0,12	21,66	0,6	2	21,46
96	Ž	35,87	16,80	19,07	88,1	101	17,85
97	Ž	35,57	6,76	28,81	23,5	29	27,57
98	Ž	28,39	6,53	21,86	29,9	37	20,80
99	M	15,21	0,37	14,84	2,5	3	14,77
100	M	10,14	0,41	9,73	4,2	5	9,66
101	M	11,79	0,04	11,75	0,3	2	11,56
102	M	3,93	0,54	3,39	15,9	14	3,46
103	M	19,31	0,27	19,04	1,4	4	18,57
104	M	35,31	0,59	34,72	1,7	3	34,45
105	M	12,13	0,34	11,79	2,9	6	11,50
106	M	9,35	0,31	9,04	3,4	4	9,03
107	M	9,38	0,20	9,18	2,2	4	9,02
108	Ž	19,83	15,84	3,99	397,0	451	3,60
109	Ž	30,80	22,69	8,11	279,8	267	8,39
110	M	9,50	0,72	8,78	8,2	18	8,05
111	M	15,83	0,25	15,58	1,6	3	15,37
112	M	57,66	10,97	46,69	23,5	26	45,76
113	Ž	26,10	1,26	24,84	5,1	5	24,86
114	Ž	56,97	27,33	29,64	92,2	92	29,67
115	M	16,97	5,15	11,82	43,6	56	10,88
116	M	33,39	2,54	30,85	8,2	12	29,81
<b>Ostali (neznana diagnoza)</b>							
117	Ž	12,11	1,46	10,65	13,7	16,5	10,39
118	Ž	21,36	2,90	18,46	15,7	28,0	16,69
119	M	6,99	0,25	6,74	3,7	2,5	6,82
120	M	30,08	0,32	29,76	1,1	1,0	29,78
121	Ž	25,12	1,01	24,11	4,2	8,5	23,15
122	Ž	22,75	0,42	22,33	1,9	1,0	22,52
123	Ž	20,86	0,54	20,32	2,7	2,0	20,45

Zaporedna št.	Spol	TNC-N ( $\times 10^9/L$ )	NRBC ( $\times 10^9/L$ )	WBC ( $\times 10^9/L$ )	NRBC (št./100 WBC, analizator)	NRBC (št./100 WBC, MPKR)	Ročna korekcija WBC ( $\times 10^9/L$ )
124	Ž	16,58	0,44	16,14	2,7	4,0	15,94
125	M	2,76	0,05	2,71	1,8	4,0	2,65
126	Ž	8,53	0,22	8,31	2,6	5,0	8,12
127	Ž	13,13	0,32	12,81	2,5	4,0	12,63
128	Ž	11,08	0,24	10,84	2,2	2,0	10,86
129	M	23,66	0,30	23,36	1,3	1,0	23,43
130	Ž	16,64	0,27	16,37	1,6	3,5	16,08
131	Ž	18,99	0,29	18,70	1,6	1,5	18,71
132	M	12,02	0,12	11,90	1,0	1,5	11,84
133	Ž	9,43	0,11	9,32	1,2	1,5	9,29
134	M	14,72	0,15	14,57	1,0	1,0	14,57
135	M	32,34	0,30	32,04	0,9	3,0	31,40
136	M	23,5	0,43	23,07	1,9	3,5	22,71
137	M	19,48	0,41	19,07	2,1	3,0	18,91
138	M	23,98	1,44	22,54	6,4	5,5	22,73
139	M	15,72	1,10	14,62	7,5	6,5	14,76
140	M	11,09	0,14	10,95	1,3	0,5	11,03
141	M	19,71	1,88	17,83	10,5	9,5	18,00
142	M	25,93	3,93	22,00	17,9	29,5	20,02
143	M	5,61	0,15	5,46	2,7	4,0	5,39
144	M	10,79	0,71	10,08	7,0	14,5	9,42
145	M	7,06	0,14	6,92	2,0	4,5	6,76
146	M	13,29	1,16	12,13	9,6	6,5	12,48
147	Ž	15,96	0,33	15,63	2,1	2,0	15,65
148	M	5,23	0,12	5,11	2,3	3,5	5,05
149	M	19,78	4,57	15,21	30,0	33,0	14,87
150	Ž	12,79	1,89	10,90	17,3	17,0	10,93
151	M	14,63	0,82	13,81	5,9	5,0	13,93
152	M	18,42	0,03	18,39	0,2	2,5	17,97
153	M	117,84	39,34	78,50	50,1	61,5	72,97
154	Ž	29,38	0,97	28,41	3,4	8,5	27,08
155	M	3,13	0,05	3,08	1,6	4,0	3,01
156	M	8,30	0,38	7,92	4,8	4,0	7,98
157	M	5,63	0,59	5,04	11,7	10,5	5,10
158	M	9,77	0,38	9,39	4,0	5,5	9,26
159	Ž	38,61	4,42	34,19	12,9	13,0	34,17

TNC-N – celokupno število celic z jedri