

**UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

NEJC ŠPENDAL

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2015

Univerza v Ljubljani



Fakulteta za farmacijo

NEJC ŠPENDAL

**EVALVACIJA METODE ZA DOLOČANJE KONCENTRACIJE
CELIC V TELESNIH TEKOČINAH NA HEMATOLOŠKEM
ANALIZATORJU**

**EVALUATION OF THE METHOD FOR DETERMINING THE
CONCENTRATION OF CELLS IN BODY FLUIDS ON
HEMATOLOGY ANALYSER**

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2015

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

ZAHVALA

Zahvalil bi se mentorju prof. dr. Milanu Skitku in somentorici mag. Elizabeti Božnar Alič za usmerjanje in koristne nasvete pri izdelavi naloge.

Hvala tudi vsem sodelavkam v Laboratoriju za analitiko telesnih tekočin, za nasvete v praksi. V največji meri pa se zahvaljujem zaročenki Petri, za vso podporo, potrpežljivost in spodbudo v času študija.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo z naslovom Evalvacija metode za določanje koncentracije celic v telesnih tekočinah na hematološkem analizatorju izdelal samostojno pod mentorstvom prof. dr. Milana Skitka in somentorstvom mag. Elizabete Božnar Alič.

Podpis:

Predsednik komisije: prof. dr. Darko Černe

Mentor:izr. prof. dr. Milan Skitek

Somentor: mag. Elizabeta Božnar Alič

Član: doc. dr. Damjan Janeš

Ljubljana, 2015

KAZALO

1. UVOD	1
1.1 TELESNE TEKOČINE IN NJIHOVA SESTAVA	1
1.1.1 Anatomija in fiziologija	2
1.2 VRSTE IZLIVA	4
1.3 ODVZEM IN TRANSPORT VZORCA	4
1.4 PREISKAVE ZA ANALIZO PUNKTATA	5
1.4.1 Organoleptični pregled	5
1.4.2 Celice v punktatih	6
1.4.3 Biokemične preiskave	10
1.4.4 Citološke preiskave	10
1.4.5 Avtomatizirana metoda ugotavljanja koncentracije celic	12
2. IZHODIŠČE IN NAMEN DELA	13
3. MATERIALI IN METODE	14
3.1 Vzorci	14
3.2 Reagenti, instrumenti in oprema	15
3.3 Mikroskopska metoda	16
3.4 Avtomatizirana metoda: Sysmex XN-1000	18
3.5 Štetje celic s pretočno citometrijo	18
3.6 Statistične metode	22
4. REZULTATI	24
4.1 Natančnost analizatorja	24
4.2 Točnost analizatorja	25
4.3 Opisna statistika	26
4.4 Primerjava absolutnih vrednosti levkocitov	29
4.5 Primerjava deležev polimorfonuklearnih in mononuklearnih celic	32
6. SKLEPI	48
7. LITERATURA	49
8. VIRI SLIK	51

KAZALO SLIK

Slika 1: Punkcija.....	4
Slika 2: Neubauerjeva komora.....	11
Slika 3: Mreža Neubauerjeve komore.....	11
Slika 4: Analizator Sysmex XN-1000.....	18
Slika 5: Prednje in stransko sipanje svetlobe.....	19
Slika 6: Pretočna citometrija.....	19

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Orientacijske referenčne vrednosti.....	3
Preglednica II: Reagenti in kontrole avtomatizirane metode.....	16
Preglednica III: Osnovni parametri Sysmex XN-1000.....	20
Preglednica IV: Parametri za študijske namene Sysmex XN-1000.....	21
Preglednica V: Natančnost analizatorja.....	24
Preglednica VI: Kontrolne vrednosti meritev na analizatorju Sysmex XN-1000.....	25
Preglednica VII: Opisna statistika med obema metodama.....	26
Preglednica VIII: Opisna statistika relativne koncentracije mononuklearnih celic.....	26
Preglednica IX: Opisna statistika relativne koncentracije polimorfonuklearnih celic.....	27
Preglednica X: Primerjava mikroskopske in avtomatizirane metode.....	28

KAZALO DIAGRAMOV

Diagram 1: Bland-Altmanov diagram primerjave absolutnih koncentracij levkocitov.....	29
Diagram 2: Diagram prepognjene empirične kumulativne porazdelitve absolutnih koncentracij levkocitov.....	30
Diagram 3: Bland-Altmanov diagram absolutnih koncentracij levkocitov do $1,0 \times 10^9/l$	31
Diagram 4: Bland-Altmanov diagram absolutnih koncentracij levkocitov od 1,0 do $20,0 \times 10^9/l$	31
Diagram 5: Bland-Altmanov diagram deleža PMN-celic.....	32
Diagram 6: Diagram prepognjene empirične kumulativne porazdelitve deleža PMN-celic... ..	33
Diagram 7: Bland-Altmanov diagram deleža MN-celic.....	34
Diagram 8: Diagram prepognjene empirične kumulativne porazdelitve deleža MN-celic.....	35
Diagram 9: Bland-Altmanov diagram absolutnih koncentracij PMN-celic.....	36
Diagram 10: Bland-Altmanov diagram absolutnih koncentracij MN-celic.....	37

SEZNAM OKRAJŠAV

BF	telesne tekočine (angl. body fluids)
CI	interval zaupanja
CLSI	Clinical Laboratory Standard Institute
EO	eozinofilci
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
HF-BF	področje z močnejšo fluorescenco
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine
KV	koeficient variacije
LKC	levkociti
LDH	encim laktat-dehidrogenaza
LY	limfociti
MN	mononuklearni levkociti
MN %	delež mononuklearnih levkocitov
MO	monociti
NM	nanometer
PMN	polimorfonuklearni levkociti
PMN %	delež polimorfonuklearnih levkocitov
RBC	eritrociti
RE	relativna napaka
SD	standardni odklon
TC-BF	celotno število celic z jedrom
UKC	Univerzitetni klinični center
WBC	levkociti
WDF	angl. WBC differential channel

POVZETEK

Namen magistrske naloge je ugotoviti ujemanje dveh metod štetja celic v vzorcih telesnih tekočin. Ocenili smo ujemanje mikroskopske in avtomatizirane metode. V nalogo smo vključili 85 vzorcev punktativ telesnih tekočin različnega izvora. Vse vzorce smo analizirali najprej z mikroskopsko metodo, nato še z avtomatizirano metodo, ki je potekala na hematološkem analizatorju Sysmex XN-1000, z ločenim modulom za analizo telesnih tekočin. Za glavno statistično analizo, s katero smo ocenili ujemanje, smo izbrali Bland-Altmanov test.

Ugotovili smo, da so meritve analizatorja Sysmex relativno natančne in primerljive z drugimi študijami natančnosti na tem analizatorju. To smo ugotavljali s kontrolnimi vzorci, v nizkem in visokem nivoju. Koeficient variacije v nizkem nivoju je bil v povprečju 5,7 %, pri visokem nivoju pa 4,2 %. Točnost analizatorja smo ugotavljali s pomočjo izračuna relativne napake med izmerjeno vrednostjo kontrolnih vzorcev in vrednostjo ugotovljeno s strani proizvajalca. Največje odstopanje smo ugotovili pri absolutnih številčnih koncentracijah levkocitov (nizka kontrola: -11,8 %, visoka kontrola: -15,2 %), pri absolutni številčni koncentraciji polimorfonuklearnih levkocitov (nizka kontrola: -14,2 %, visoka kontrola: -17,4 %), pri absolutni številčni vrednosti mononuklearnih levkocitov (nizka kontrola: -8,3 %, visoka kontrola: -11,9 %). Druge vrednosti ne odstopajo za več kot 3,7 %. Pri ugotavljanju ujemanja metod, ki zavzame vse pare meritev ($n = 74$), je opazna enakomerna porazdelitev napak in zelo majhna pristranskost. Treba pa je biti pozoren na vsa opozorila analizatorja in na področje visoke fluorescence, kamor uvrščamo vse atipične in tumorske celice. V skupini do $1,0 \times 10^9/l$ levkocitov ($n = 46$) analizator v povprečju izmeri za $0,03 \times 10^9/l$ levkocitov manj, kot jih preštejemo v komori. Enajst vzorcev (13 %) smo izključili iz primerjave zaradi prenizke koncentracije celic, razpadlih celic, opozorila analizatorja, kar pomeni, da je rezultat vprašljiv. Primerjava obeh metod štetja celic je pokazala, da je v večini analiz avtomatizirana metoda primerljiva z mikroskopsko, razlike med metodama so, vendar so se izkazale za klinično nepomembne. Zaključimo lahko, da je za končno določanje patoloških celic mikroskopska metoda še vedno zlati standard.

ABSTRACT

The purpose of this dissertation is to evaluate the agreement of the two methods for counting cells in body fluids, that is a manual and an automated method. As much as 85 specimens of body fluids of unknown resource were included in our assignment. All specimens were first analysed manually by a microscope and then by means of the automated method which was performed by Sysmex XN-1000 hematology analyser with a separated body fluid mode. Bland-Altman test was chosen as a main statistical analysis to evaluate the agreement of the methods.

The conclusion of our study is that analyzer Sysmex is relatively precise and is comparable with other studies of precision made with this analyzer. Control specimens at low and high level were evaluated for precision. Coefficient of variation at low level was on average 5.7% and only 4.2% at high level control. The accuracy of the analyzer made by comparing the value we measured and the value determined by manufacturer was being determined by calculating relative error. The highest deviations were found in absolute leucocyte concentration (low level: -11.8%, high level: -15.2%), absolute polimorfonuclear leukocyte concentration (low level: -14.2%, high level: -17.4%), absolute mononuclear leukocyte concentration (low level: -8.3%, high level: -11.9%). Other values did not deviate for more than 3.7%. The agreement of methods which includes all pairs of measurements ($n = 74$), an equal error distribution was noticeable and a very low bias too. It is necessary that all analyser warnings and cell distribution at high fluorescence region are checked where all the atypical and tumor cells are distributed. In concentration group $0-1 \times 10^9/L$ leukocytes ($n = 46$) analyzer counted on average $0.03 \times 10^9/L$ less cells than manually. Eleven samples (13%) were excluded from the comparison assignment due to cell concentration that was too low, defragmentation of cells, and analyzer warnings, which means that the result is questionable. The comparison of the two methods for counting cells has showed that in most cases methods are comparable, however there are differences, but they are clinically unimportant. We may conclude that for determination of pathologic cells microscopic method still represents a golden standard.

1. UVOD

1.1 TELESNE TEKOČINE IN NJIHOVA SESTAVA

Celice so eden od najbolj preprostih živih delov telesa, ki imajo prav vse funkcije, ki opredeljujejo življenje. Čeprav je v telesu veliko različnih tipov celic, so njihovi življenjski procesi v osnovi enaki: izmenjava snovi z okoljem, vzdrževanje energije preko organskih hranil, sinteza kompleksnejših molekul in njihovo razmnoževanje. Večina celic večceličnega organizma je ločena od zunanjega okolja in je v zaprtem sistemu, njihove življenjske funkcije pa potekajo v vodnem okolju – telesnih tekočinah (1, 2).

Volumen in vsebina tekočin morata biti natančno regulirana, da celice lahko opravljajo svoje funkcije. Večinoma so telesne tekočine sestavljene iz vode, ki vsebuje določene topljence, značilne za posamezno telesno tekočino. Telesne tekočine delimo v dve glavni skupini: ZUNAJCELIČNE telesne tekočine in ZNOTRAJCELIČNE tekočine. V tej nalogi se bomo posvetili zunajceličnim tekočinam. Zunajcelična tekočina vključuje tekočine različnih predelov telesa (1, 2):

- intersticijska tekočina,
- plazma,
- limfa,
- cerebrospinalna tekočina,
- tekočina v gastrointestinalnem traktu,
- sinovijska tekočina,
- burza,
- plevralna tekočina,
- perikardialna tekočina,
- peritonealna tekočina,
- urin.

1.1.1 Anatomija in fiziologija

Telesne tekočine so znotraj zaprtih telesnih votlin (plevralna, peritonealna, perikardialna, sinovijska) (1, 2, 4). Plevralna tekočina obdaja pljuča, perikardialna tekočina obdaja srce, peritonealna tekočina obdaja trebušne organe in sinovijska tekočina obdaja sklepe. Serozne tekočine so del različnih telesnih tekočin, ki so v telesnih votlinah. Pomembne naloge seroznih tekočin so pri prebavi, dihanju in izločanju odpadnih produktov (4).

Vse telesne votline so prekrите z dvema seroznima membranama, ki sta prekriti z enoslojnim epitelijem iz mezotelijskih celic. Organi v telesni votlini so prekriti z visceralno membrano, steno votline pa prekriva parietalna membrana. Med membranama je zelo majhna količina serozne tekočine, ki služi kot lubrikacijsko sredstvo med premikanjem organov (na primer raztezanje in krčenje pljuč pri dihanju). Je proizvod parietalne membrane, visceralna membrana pa jo reabsorbira (2, 4). Serozna tekočina prehaja preko endotelija kapilar s filtracijo plazme, njena količina pa je odvisna od prepustnosti kapilar, hidrostatskega in onkotskega tlaka, kakor tudi od ponovne reabsorpcije preko limfnih kapilar v membrani. Količina tekočine v normalnem stanju ostaja približno enaka, saj oba procesa nastanka in ponovne reabsorpcije potekata v ravnotežju (1, 2, 3, 4). Hidrostatski tlak v žilah poganja tekočino iz žil v vezno tkivo, preko sloja mezotelijskih celic v prostor med membranama. Osmotski tlak poganja tekočino v obratni smeri, torej nazaj v žile. V normalnih pogojih torej to niso prave telesne votline (4).

1.1.2 Normalna sestava punktatov

V priporočilih CLSI (CLSI H56-P) (4) so navedene okvirne referenčne vrednosti samo za plevralne punktate, ki so povzete iz različnih študij. Za ostale punktate referenčne vrednosti še niso določene. Normalna količina plevralne tekočine je $8,4 \pm 4,3$ ml v posamezni plevralni votlini. Perikardialna tekočina je ultrafiltrat plazme perikarda, lahko pa je prisoten tudi ultrafiltrat, ki izvira iz miokarda. Normalna količina bistre tekočine je od 15 do 50 ml (4).

Preglednica I: Orientacijske referenčne vrednosti

	Enota	Plevralni punktat
Volumen	ml	4,1 do 12,7
Celice z jedri	$10^9/l$	1,4 do 3,7
Makrofagi	%	64 do 80
Limfociti	%	18 do 36
Nevtrofilni granulociti	%	0 do 1
Mezotelijske celice	%	0 do 2

Med patološkim procesom pride do izliva tekočine med membrane in takrat ta prostor postane veliko večji, bolj razširjen, kot je sicer. Do povečane količine tekočine (izliva) pride torej zaradi porušenega ravnotežja med mehanizmi, ki sodelujejo pri **nastanku** in **reabsorbiciji** (1, 2). Vzroki za nastanek izliva so:

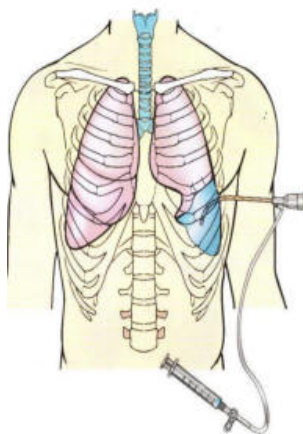
- povečana prepustnost kapilar (maligna obolenja, vnetja membran, bakterijska okužba),
- zapora limfnih žil (vnetje in okužbe, poškodba limfnih vodov, maligni tumorji),
- povečan kapilarni hidrostatski tlak (srčno popuščanje, zadrževanje vode in soli v telesu),
- znižan onkotski tlak (nezadostna prehrana, enteropatija z izgubo proteinov, nefrotski sindrom, jetrna ciroza) (2).

1.2 VRSTE IZLIVA

Izliv nastane zaradi sistemske motnje, ki poruši ravnotežje v regulaciji filtracije in reabsorpcije (4). Opredelimo ga kot **transudat** ali **eksudat**. Transudat je nakopičena tekočina v telesni votlini z majhno koncentracijo proteinov. Eksudat pa je nakopičena tekočina v telesni votlini z visoko koncentracijo proteinov, torej je tu neposredno vključena tudi parietalna membrana, ki je na primer zaradi okužbe bolj prepustna, ali pa gre za slabšo funkcijo reabsorpcije zaradi malignosti (4). Opredelitev punktata je pomembna zaradi določitve vzroka bolezni in nadaljnje laboratorijske diagnostike. Če je punktata transudat, bolj obsežna diagnostika ni potrebna, če je eksudat pa so potrebni nadaljnji diagnostični postopki, ki bi določili, zakaj je do izliva prišlo (2, 4).

1.3 ODVZEM IN TRANSPORT VZORCA

Vzorci telesnih tekočin (punktatov) pridobimo s punkcijo, ki velja za težek in invaziven poseg v telo. Odvzem opravi zdravnik, in sicer gre za odvzem plevralne tekočine s postopkom imenovanim toracenteza, odvzem perikardialne tekočine s perikardiocentezo in peritonealne tekočine ali ascitesa s paracentezo (1). Zelo pomembno je, da odvzem opravimo v sterilnih razmerah, s sterilnimi pripomočki. Priporoča se, da vzorce med odvzemom, pred alikvotiranjem in pred celičnim štetjem oziroma diferenciacijo, rahlo premešamo. Punktate velikih količin lahko porazdelimo v manjše alikvote pred transportom v laboratorij ali v samem laboratoriju (2, 3, 4).



Slika 1: Punkcija
(številka vira: 1)

Pomemben je vrstni red odvzema vzorca, in sicer:

- prvi mililitri vzorca se odvzamejo za mikrobiološke analize v sterilno epruveto brez dodatkov ali v transportno gojišče;
- nato se odvzame vzorec za citološki pregled v epruveto z vijoličnim zamaškom in antikoagulantom etilendiamintetraocetno kislino (EDTA);
- vzorec za biokemične analize v epruveto brez dodatkov oz. z rdečim zamaškom;
- vzorec za ugotovitev pH v brizgo za plinsko analizo s heparinom ali z epruveto s heparinom oz. z zelenim zamaškom;
- vzorec za bakteriološki sediment v epruveto z vijoličnim ali rdečim zamaškom (2, 3, 4).

Vzorci za citološki pregled punktatov do analize lahko shranjujemo na sobni temperaturi. Punktati moramo analizirati najkasneje v dveh urah po punkciji, saj celice po tem času začnejo razpadati in diferenciacija ni več mogoča. Če je ta čas daljši, je vpliv na kakovost analize in posledično tudi na interpretacijo rezultata toliko večji (3). Zato je bistvenega pomena, da citološki sediment naredimo v najkrajšem možnem času in ga tudi obarvamo. Vzorce za biokemične preiskave punktatov centrifugiramo in ločimo od celičnega dela. Tako pripravljene vzorce shranjujemo v hladilniku (2, 3, 4, 7).

1.4 PREISKAVE ZA ANALIZO PUNKTATA

Navadno opravljeni testi za analizo punktata vključujejo organoleptični pregled in diferenciacijo med eksudatom in transudatom. Navadno eksudate pregledamo še mikrobiološko in citološko (3).

1.4.1 Organoleptični pregled

Videz vzorca je podatek, ki je zelo v pomoč pri opredelitvi izliva. Opisujemo obarvanost vzorca in njegovo motnost. Barva vzorca je odvisna od vzroka nastanka. Transudati so navadno bistri, svetlorumene barve. Pri različnih patoloških procesih pa so punktati lahko obarvani rdeče, zeleno, rjavo, belo in črno (1). Pri krvavih vzorcih se priporoča ugotavljanje hematokrita, ki ga primerjamo s hematokritom v krvi. Kadar vrednost hematokrita presega 50 % vrednost hematokrita v krvi, obstaja sum na hemotoraks (prisotnost krvi v pleuralni votlini, navadno zaradi poškodbe, malignosti ali poškodbe membran pri aspiraciji vzorca). Kadar pa je vrednost hematokrita zelo nizka v primerjavi z vrednostjo v krvi (okrog 1 %), je

kri lahko prisotna zaradi malignega obolenja, poškodbe ali pljučne embolije (1, 2). Vzorci imajo moten in gnojen videz zaradi povečane koncentracije levkocitov in proteinov. Izliv je lahko tudi zeleno obarvan, navadno zaradi prisotnosti žolča ob pankreatitisu ali ob perforaciji žolčnika ali črevesja (1, 2, 4).

1.4.2 Celice v punktatih

Celice z jedri:

- hematopoezne celice: nevtrofilci (segmentirani, paličasti), nezreli granulociti (metamielociti, mielociti, promielociti), limfociti, monociti/makrofagi, eozinofilci, bazofilci, mastociti, plazma celice, eritroblasti;
- mezotelijske celice;
- blaste, limfomske celice, nehematopoezne tumorske celice;
- atipične celice (opišemo celice) (4).

Morfološko so celice podobne tistim v krvi ali kostnem mozgu, vendar so degenerativne spremembe celic bolj pogoste. Pri pregledu citoloških sedimentov je pomembno, da prepoznamo maligne celice, če so prisotne. Zavedati pa se je potrebno omejitev morfološkega pregleda pod mikroskopom, saj je razlikovanje med reaktivnimi in atipičnimi mezotelijskim celicami ter malignimi celicami pogosto zelo težko (4).

Polimorfonuklearne celice

Nevtrofilni granulociti

V primeru, da prevladujejo, lahko posumimo na bakterijsko pljučnico, pljučni infarkt ali pankreatitis. Vidimo lahko vse razvojne stopnje nevtrofilcev. Za segmentirane nevtrofilne granulocite je značilno, da so segmenti med sabo bolj jasno ločeni in pogosto so jedrni segmenti bolj na zunanem robu celice, ob membrani. Nevtrofilci so v izlivih, kjer so prevladujoča celična vrsta, pogosto degenerirani. Jedro lahko postane piknotično in je vidno kot majhna, gosta in okrogla masa. Pri okužbah pa se degeneracija lahko kaže z zabrisano strukturo jedra, izrazito vakuolizacijo citoplazme in izgubo granulacij. V nevtrofilcih lahko opazimo tudi fagocitirane bakterije (3, 4, 5).

Eozinofilni granulociti

Morfološko se ne razlikujejo od eozinofilcev v krvnem razmazu. V večjem številu (več kot 10 %) pa so lahko prisotni pri alergijskih reakcijah in parazitskih okužbah, pnevmotoraksu, hemotoraksu (4).

Bazofilni granulociti, mastociti

Bazofilci so po morfologiji enaki tistim v krvi (4).

Mononuklearne celice

Limfociti

Tipični zreli limfociti so nekoliko večji kot v krvi, navadno imajo obilnejšo citoplazmo, jedro imajo lahko zažeto, lahko je vidno tudi manjše jedrce (4). Reaktivni limfociti so v punktatih pogosto prisotni in se po morfologiji zelo razlikujejo. Navadno imajo okroglo in rahlo zažeto jedro, obilno citoplazmo, ki se razlikuje v barvi, od svetle do izrazito bazofilne. Plazmocitoidne oblike imajo značilno strukturo kromatina, izrazito bazofilno citoplazmo in več manjših jedrc. Pogosto imajo ob jedru svetlino, lahko so tudi dvojedrne. Reaktivni limfociti imajo v nasprotju s celicami malignih limfomov, izrazito in gladko jedro membrano in pravilno obliko jedra. Povišano število limfocitov lahko zasledimo v izlivih pri virusnih okužbah, tuberkulozi in avtoimunskih boleznih, kot sta revmatoidni artritis in sistemski lupus eritematozus (3, 4, 5).

Monociti/monohistiociti

Najdemo jih posamično ali v skupinah in so nekoliko večji od normalne mezotelijske celice. Morfološko so zelo različni – od tipičnih oblik, podobnih v krvi, do reaktivnih monocitov. Celica je svetlo obarvana, jedro je okroglo ali ledvičasto in leži ekscentrično ali periferno. Kromatinska struktura je drobno zrnata, jedrca niso prisotna. Citoplazma je obilna, jasno ali neizrazito omejena in vakuolizirana. Take oblike monocitov imenujemo tudi monohistiociti (4, 5, 6).

Makrofagi

Kadar imajo monociti/monohistiociti jasne znake fagocitoze, jih imenujemo makrofagi. Lahko vsebujejo fagocitirane eritrocite (eritrofagi), nevtrofilce (nevtrofagi), lipide (lipidofagi), mikroorganizme, kristale in modročrne hemosiderinske granule (siderofagi), ki nastanejo iz ostanka železa fagocitiranih eritrocitov (4, 5, 6).

Mezotelijske celice

Prekrivajo notranji del parietalne membrane v telesnih votlinah in se po morfologiji zelo razlikujejo. Ob bolezenskem procesu se lahko odluščijo in sprostijo v izliv. Imajo centralno ali ekscentrično locirano okroglo, včasih ovalno jedro, ki v premeru zavzema 1/3 do 1/2 velikosti celice. Imajo gost, enakomeren kromatin, vidno je lahko manjše neizrazito jedrce. Celice imajo zmerno količino svetlo do zmerno bazofilne citoplazme, ki ne vsebuje granulacij in je jasno omejena. V kroničnih izlivih so prisotne reaktivne mezotelijske celice, ki so po morfologiji izredno raznolike. Celice so lahko dvojedrne, posamične tudi večjedrne (vsebujejo tudi 20 ali več jeder), so povečane, imajo rahlejšo strukturo jedra in vidna majhna jedrca. Jedrca so lahko številna, vendar so, v nasprotju z malignimi celicami, enake velikosti. Količina citoplazme je različna, intenzivno bazofilna in drobno vakuolizirana. Vakuolizacija je lahko prisotna po celotni citoplazmi ali pa le ob jedru. Zaradi teh sprememb lahko spominjajo na maligne celice. Mezotelijske celice prav tako lahko opravljajo fagocitozo in se pretvorijo v makrofage. Možne so tudi vmesne oblike, takrat pa je razlikovanje med mezotelijskimi celicami in makrofagi zelo težavno (4, 5, 6).

Maligne celice

Med maligne celice uvrščamo hematopoezne (blasti, limfomske celice) in nehematopoezne maligne celice, ki so lahko različnega izvora.

Blasti:

Po obliki so podobni blastom v krvi ali kostnem mozgu. Kadar jih odkrijemo v izlivu je bistvenega pomena ugotoviti, ali predstavljajo zaplet pri levkemiji ali je njihova prisotnost posledica kontaminacije s krvjo (4, 5, 6).

Limfomske celice:

Po videzu so podobne imunoblastnim reaktivnim limfocitom. Imajo nezrel jedrni kromatin, številna jedrca in zmerno količine bazofilne citoplazme. Zanje so značilne tudi: nepravilna oblika jedra, jedrna membrana ni izrazita, velika jedrca, majhne vakuole, ki prekrivajo tudi jedro, brez jasne svetline okoli jedra in homogen videz celic v izlivu. Pri limfomih z majhnimi celicami jih je težko ločiti od normalnih limfocitov. V tem primeru so potrebne še druge preiskave (na primer imunohistološke preiskave in pretočna citometrija) (4).

Nehematopoezne maligne celice:

Maligne celice lahko izvirajo iz primarnih tumorjev ali metastaz (adenokarcinom, sarkom in primarni možganski tumorji) (4, 5).

Glavne morfološke značilnosti malignih celic:

- visoko razmerje med jedrom in citoplazmo;
- celice so velike in večjdrne (različna velikost in oblika jeder);
- neenakomerno razporejen jedrni kromatin;
- hiperkromatična jedrca;
- povečano število in velikost jedrc;
- vakuolizirana citoplazma;
- tvorba tesnih skupkov, celice med sabo niso jasno ločene (celice se prekrivajo, izguba kontaktne inhibicije);
- fagocitoza (4, 5, 6).

1.4.3 Biokemične preiskave

Priporočljivo je, da meritve primerjamo z meritvami krvi, saj punktata predstavlja ultrafiltrat plazme. Z njimi lahko opredelimo vzrok nastanka. Izbor označevalcev je odvisen od izvora punktata. Kot primer nam pri plevralnem punktatu veliko pomenijo meritve vrednosti glukoze in LDH, pri peritonealnem punktatu pa so lahko bistvene meritve amilaze in lipaze. Biokemična analiza zajema ugotavljanje koncentracije glukoze, celotnih proteinov in albuminov, elektrolitov, alfa-amilaze in lipaze, laktat-dehidrogenaze, bilirubina, holesterola in trigliceridov (1, 2, 8).

1.4.4 Citološke preiskave

Ugotavljanje koncentracije celic z jedrom

V telesnih tekočinah ugotavljamo koncentracijo celic z jedri, da ugotovimo, ali gre za vnetni ali nevnetni proces. Transudat in eksudat razlikujemo tudi z ugotavljanjem koncentracije celic z jedrom. To lahko ugotovimo z mikroskopsko metodo ali z avtomatizirano metodo na hematološkem analizatorju. Razmejitvena vrednost je $1,0 \times 10^9/l$ (2, 3).

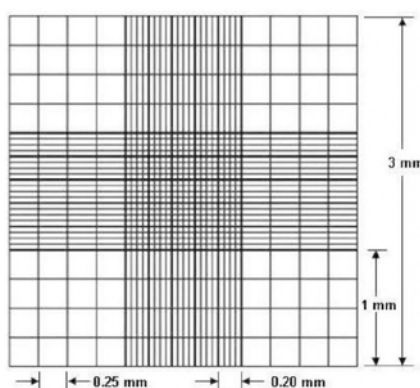
Neubauerjeva komora za štetje celic

Mikroskopsko ugotavljanje koncentracije celic izvajamo s pomočjo komore za štetje celic po Neubauerju (slika 2). Mreža komore (slika 3) je 0,1 mm globoka, njena površina meri 9 mm^2 . Mreža je razdeljena na 9 velikih kvadratov. Osrednji veliki kvadrat je razdeljen v 25 majhnih kvadratov, ti pa so še nadalje razdeljeni v 16 še manjših kvadratov (4).

Punktata je treba pred tem razredčiti v razmerju 1 : 20 z raztopino po Türku, ki zaradi hipotoničnosti hemolizira eritrocite, hkrati pa obarva jedra levkocitov. Če so vzorci krvavi ali motni, jih je treba redčiti z izotoničnimi tekočinami (na primer s fiziološko raztopino) v čim manjšem možnem razmerju glede na številčno koncentracijo levkocitov. Če je v celotni komori prisotnih manj kot 200 celic, preštejemo celotno površino komore, če pa je celic več, pa lahko zmanjšamo površino štetja, vendar je to treba upoštevati pri izračunu. V komori je težko ločiti celice med sabo, zato preštejemo vse celice z jedri in rezultat podamo v enotah SI ($\text{št.} \times 10^9/l$) (4, 7).



Slika 2: Neubauerjeva komora
(številka vira: 2)



Slika 3: Mreža Neubauerjeve komore
(številka vira: 3)

$$V_{\text{vzorca}} = \text{površina} \times \text{globina} = 9 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm} = 0,9 \text{ mm}^3 = 0,9 \mu\text{l}.$$

Diferenciacija celic

Citološki pregled izvajamo z namenom diferenciacije celic z jedri in ugotavljanja prisotnosti malignih celic. Priporočljiva je priprava preparatov citoloških sedimentov s pomočjo citocentrifuge. S to tehniko namreč celice primerno koncentriramo; možnosti, da se celice pri tem poškodujejo so minimalne, saj je celični nanos v enem sloju. Tudi pri vzorcih, ki imajo izredno nizko koncentracijo celic ali če v komori za štetje celic ne najdemo, lahko v citološkem sedimentu najdemo do 35 celic (4).

V primeru, da citocentrifuge nimamo, lahko pripravimo klasične razmaze iz sedimenta vzorca, ki smo ga centrifugirali 10 minut pri $40 \times g$. Vsekakor pa je diferenciacija celic v citoloških sedimentih bolj zanesljiva, ker lahko pri pripravi razmazov pride do poškodb in neenakomerne razporeditve celic. Diferenciramo vse celice z jedri in rezultat izrazimo v odstotkih ali pa diferenciramo le levkocite in druge celice opišemo z opisnimi izrazi za

količino (na primer: posamezni, maloštevilni, številni). Zaradi možne prisotnosti malignih celic je prav tako pomembno, da pregledamo cel preparat, saj so lahko prisotne le posamezne maligne celice (3, 7).

1.4.5 Avtomatizirana metoda ugotavljanja koncentracije celic

Nekateri sodobnejši hematološki analizatorji (ki so dobili dovoljenje za analizo in imajo točno določen namen uporabe) omogočajo določanje koncentracije celic z jedri in eritrocitov tudi v telesnih tekočinah. Metodo štetja celic so različne in lahko potekajo z metodo impedance, fluorescence, pretočne citometrije, razpršenostjo svetlobe ali s kombinacijo naštetega. Bistvenega pomena pri avtomatiziranih metodah so zanesljivi rezultati, predvsem pri nizkih koncentracijah celic (4). Vsak laboratorij, ki določa koncentracijo celic na avtomatiziran način, mora sam določiti analizno območje, spodnjo mejo detekcije (osnovana na analizno sprejemljivih standardih in zagotavljata klinično pomembne informacije) in v primeru opozoril uporabiti druge metode (števna komora, citološki sediment) (4).

Primeri analizatorjev, ki omogočajo analizo telesnih tekočin (povzetih iz študij), in parametri, ki jih določajo:

- Sysmex XN-1000: število eritrocitov, levkociti (absolutno), PMN (delež in absolutno), MN (delež in absolutno), celotno število celic z jedri (absolutno), celice v področju močnejše fluorescence;
- Sysmex XE-5000: število eritrocitov, celotno število celic z jedri (absolutno), PMN (delež in absolutno), MN (delež in absolutno), celice v področju močnejše fluorescence;
- Advia 120: število eritrocitov, število levkocitov (absolutno), PMN (delež in absolutno), MN (delež in absolutno);
- Sysmex XT-4000i: število eritrocitov, število levkocitov (absolutno), PMN (delež in absolutno), MN (delež in absolutno).

2. IZHODIŠČE IN NAMEN DELA

Že desetletja je štetje celic s pomočjo mikroskopa zlati standard za ugotavljanje števila levkocitov in eritrocitov v telesnih tekočinah. Vendar pa ta metoda v laboratoriju velja za eno izmed najbolj nenatančnih in netočnih, saj je močno odvisna od opazovalca, ki jo izvaja. Da bi odpravili ta problem netočnosti in nenatančnosti, je težnja v modernih laboratorijih zamenjati mikroskopsko štetje celic z avtomatskim, in sicer z analizatorji, ki štejejo celice z pomočjo pretočne citometrije. Na tržišču je veliko proizvajalcev, katerih hematološki analizatorji omogočajo štetje in diferenciacijo celic v telesnih tekočinah, vendar pa imajo vsi določene omejitve. V letu 2006 je proizvajalec Sysmex predstavil hematološke analizatorje serije XE-5000, namenjene štetju celic v telesnih tekočinah, kmalu zatem pa še izboljšano verzijo XN, ki so jo predstavili leta 2011 na mednarodnem kongresu IFCC v Berlinu.

V magistrski nalogi bomo bolj podrobno pregledali uporabnost analizatorja serije XN-1000 (Sysmex, Japonska) za štetje celic v punktatih z metodo pretočne citometrije in ga primerjali z metodo štetja celic s pomočjo mikroskopa.

Primerjali bomo natančnost in točnost avtomatizirane in mikroskopske metode ter pregledali njuno mero (linearne) povezanosti. Poleg tega nas bo zanimala tudi njuna variabilnost oziroma sistematična ali naključna napaka meritev in zakaj je do njih prišlo. Pričakujemo, da bodo rezultati obeh metod primerljivi, predvsem pri nizkih koncentracijah celic. Zanimivo pa bo tudi videti, kakšen vpliv imajo interference vzorcev pri določitvi celic, predvsem pri avtomatizirani metodi, in ali vpliv na zanesljivost rezultata ni prevelik. Vsekakor bo zelo pozitivno, če se avtomatizirana metoda izkaže za zanesljivo in hitro metodo za določanje celic v telesnih tekočinah, kar bi za laboratorij predstavljalo veliko razbremenitev, v smislu hitrejših rezultatov, kar je bistveno v urgentni medicini.

3. MATERIALI IN METODE

Naključne vzorce punktativ za rutinske preiskave so sprejeli v Laboratorij za analitiko telesnih tekočin, Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo, UKC Ljubljana. Najprej smo izvedli rutinsko mikroskopsko analizo, šele nato analizo punktata na analizatorju Sysmex XN-1000 (odprta aspiracija).

V primerjavo smo vključili 85 vzorcev punktativ naključno izbranih pacientov z neznano diagnozo. Punktati so bili različnega izvora – plevralni, peritonealni in sinovijski. Informirani pristanek pacientov ni bil potreben, ker smo primerjavo opravili po opravljenih rutinskih preiskavah iz ostanka vzorca. Vsi vzorci, namenjeni za celično štetje, so bili odvzeti v epruvete z etilendiamintetraocetno kislino (EDTA). Analizo punktativ za celično štetje smo izvedli v skladu s priporočili dokumenta CLSI H56-P (4). Analizo smo izvedli v roku ene ure po sprejemu v laboratorij.

3.1 Vzorci

V primerjavo smo vključili 85 vzorcev (vzorci so bili mešani, in sicer 26 plevralnih punktativ, 20 vzorcev ascitesa in 1 sinovijska tekočina, 27 je bilo vzorcev, za katere vrsta punktata ni bila navedena s strani oddelka, kjer so ga odvzeli). V statistično analizo smo vključili 74 vzorcev. Enajst vzorcev smo izključili iz analize zaradi različnih vzrokov: ni bilo naročene analize citološkega sedimenta ($n = 5$), premajhno število levkocitov v punktatu, zato diferenciacija ni bila mogoča ($n = 1$), razpadli levkociti ($n = 3$), v punktatu so bile prisotne številne atipične celice ($n = 2$), zaradi katerih se je na analizatorju vklopilo opozorilo nenormalni razsevni diagram in primerjava ni bila mogoča .

3.2 Reagenti, instrumenti in oprema

MIKROSKOPSKA METODA

Pri mikroskopskem ugotavljanju koncentracije levkocitov potrebujemo sledeče (7):

- raztopina po Türku

Pripravimo vodno raztopino barvila »gentianaviolet« (Hollborn & Sohne, Leipzig): to pripravimo tako da 0,2 g barvila raztopimo v majhni količini destilirane vode, nato pa dopolnimo do 100 ml.

Nato je treba 3 ml koncentrirane očetne kisline dodati 0,8 ml raztopine barvila in dopolniti z destilirano vodo do 100 ml. Tako pripravljen reagent je pred uporabo treba še prefiltrirati.

- epruveta z gumijastim zamaškom, pipeta 500 μ l, pipeta 25 μ l, komora za štetje celic po Neubauerju, Pasteurjeve pipete, valjčni mešalec, mikroskop, števec za diferenciranje celic.

Za pripravo citološkega sedimenta punktata potrebujemo naslednje (7):

- citocentrifuga (Shandon, Španija), objektno steklo (s krogcem) Cytospin Cytoslide (Shandon, Španija), filtrirni papir z luknjico, kivete za vzorec, zaponke za objektna stekla, 2 kadički za barvanje z nosilci za preparate, merilna ura, imerzijsko ali cedrovo olje, mikroskop.
- priprava barvil May-Grünwald, Giemsa:
 - barvilo May-Grünwald (Fluka, 1 l) je pripravljeno za uporabo,
 - barvilo Giemsa (100 ml): 12 ml barvila Giemsa (Sigma – Aldirich), dopolnimo do 200 ml s fosfatnim pufrom (pH 6,8),
 - priprava fosfatnega pufra (pH 6,8): 94,50 g natrijevega hidrogen fosfata (Na_2HPO_4) in 90,78 g kalijevega dihidrogen fosfata (KH_2PO_4) raztopimo vsakega posamezno v 1000 ml destilirane vode, da dobimo dve delovni raztopini. Nato 100 ml raztopine natrijevega fosfata dodamo 100 ml raztopine kalijevega fosfata ter še dodamo 4000 ml destilirane vode. Na koncu je treba še uravnati pH s pufrom.

AVTOMATIZIRANA METODA

Reagenti, instrumenti in oprema, potrebni za avtomatizirano metodo (6, 7):

- Analizator Sysmex XN-1000

Preglednica II: Reagenti in kontrole avtomatizirane metode

Reagent	Uporaba
Cellpack DCL	diluent
Lysercell WDF	hemoliza eritrocitov
Fluorocell WDF	barvilo
Cellclean Auto	čistilo
XN Check BF	kontrolni vzorec

3.3 Mikroskopska metoda

Koncentracijo celic z jedrom v punktatu ugotovimo s pomočjo Neubauerjeve komore. V epruveto s 500 μ l Türkove raztopine dodamo 25 μ l vzorca (redčitev 1 : 20) in mešamo na valjčnem mešalcu nekaj minut. Ker je ta raztopina hipotonična, povzroči, da vsi eritrociti hemolizirajo, hkrati pa obarva vse levkocite oziroma njihova jedra modrovijolično. Če je punktat zelo moten ali krvav, ga redčimo s fiziološko raztopino v razmerju 1 : 10, 1 : 100, 1 : 200 ali več. Nato napolnimo Neubauerjevo komoro tako, da se z pipeto dotaknemo zgornjega ali spodnjega roba krovnega stekla na komori, rahlo stisnemo vzorec iz pipete, pomaga pa nam tudi kapilarni vlek. V komori ne sme biti zračnih mehurčkov (7).

Priporočila za štetje levkocitov so (4):

- ✓ če je v komori manj kot 200 celic, celice preštujemo na površini vseh devetih kvadratov;
- ✓ če je v komori več kot 200 celic, celice preštujemo v štirih zunanjih kvadratih;
- ✓ če je v komori več kot 200 celic v enem kvadratu, celice preštujemo v 5 manjših kvadratih v osrednjem velikem kvadratu komore.

Celice v komori najprej pregledamo pod 100-kratno povečavo, da preverimo, ali so enakomerno razporejene, nato jih štejemo pod 400-kratno povečavo.

Rezultat podamo v enotah SI ($10^9/l$) in sicer tako, da število ugotovljenih levkocitov v Neubauerjevi komori delimo z dvajset (7).

Za točno diferenciacijo celic je treba opraviti citološki pregled in pripraviti citološki sediment s pomočjo citocentrifuge. V citološkem sedimentu celice primerno skoncentriramo, celični nanos je v enem sloju. Preparate nato barvamo z metodo po Pappenheimu z barvili May-Grünwald-Giemsa (4).

Priprava citološkega sedimenta (7):

Za pripravo citološkega sedimenta vedno uporabimo svež vzorec. V zaponko za objektno steklo vstavimo objektno steklo in kiveto za vzorec s filtrirnim papirjem za enkratno uporabo, ki mora biti obrnjen z dvignjeno površino proti kiveti z vzorcem. V kiveto pipetiramo 0,5 ml dobro premešanega vzorca. Če je v vzorcu več kot $1,0 \times 10^9/l$ levkocitov, ga predhodno redčimo z fiziološko raztopino. Centrifugiramo 5 minut pri $40 \times g$. Celice se nakopičijo na označenem mestu na objektnem steklu, filtrirni papir pa vsrka tekočino. Tako pripravljen sediment pustimo, da se posuši na zraku, tj. vsaj 30 minut, nato ga obarvamo po Pappenheimu, in sicer:

- 5 minut v barvilu May-Grünwald,
- 15 minut v barvilu Giemsa.

Ko se preparat posuši, diferenciramo levkocite (200 celic) pod imerzijsko povečavo (1000-krat). Diferenciramo samo levkocite, druge celice opišemo z opisnimi izrazi za količino (posamezni, maloštevilni, številni). Zaradi morebitne prisotnosti malignih celic je treba pregledati cel preparat. V primeru, da je citološki sediment narejen po več kot 8 urah po punkciji, so v preparatu namreč že lahko prisotne razpadle ali delno razpadle celice, kar je treba upoštevati pri končnem izračunu, poleg tega pa tudi navesti v komentar vzorca, da rezultat ni povsem točen zaradi razpadlih celic.

3.4 Avtomatizirana metoda: Sysmex XN-1000

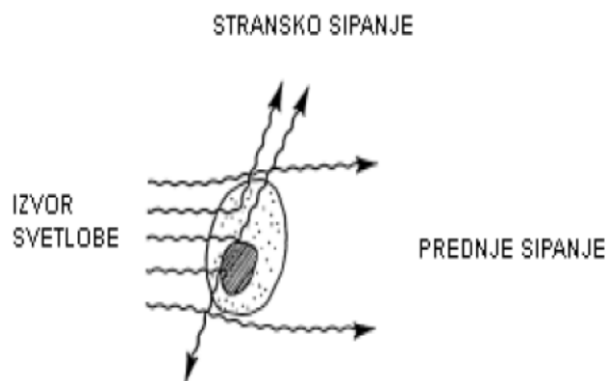
Vsako jutro je bilo treba pred rutinskimi preiskavami na analizatorju (Sysmex, Japonska) opraviti vzdrževalna dela in analizirati kontrolni material. Najprej opravimo navadne rutinske preiskave, ki so bile zahtevane pri posameznem vzorcu, ko je ta prišel v laboratorij (eritrociti, levkociti in diferencialna krvna slika). Posebna priprava vzorca ni bila potrebna.



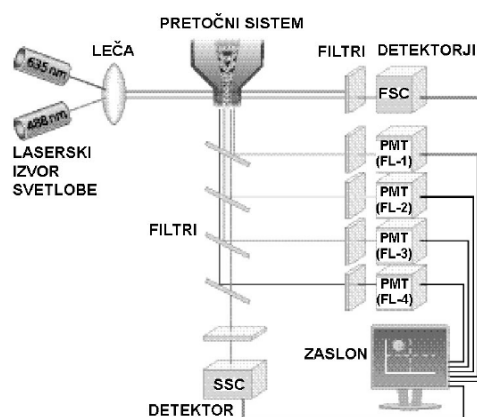
Slika 4: Analizator Sysmex XN-1000
(številka vira: 4)

3.5 Štetje celic s pretočno citometrijo

Analizator XN-1000 uporablja princip pretočne citometrije za štetje in razvrščanje celic s pomočjo laserskega žarka, ki celice presvetli pri valovni dolžini svetlobe 633 nm in tako analizira njihovo prednjo odbito lasersko svetlobo (angl. forward scattered light – FSC), lasersko svetlobo odbito s strani (angl. side scattered light – SSC) in stransko fluorescentno svetlobo (angl. side fluorescent light – SFL). Intenzivnost dveh tipov svetlobe, in sicer prednje odbite svetlobe (FSC) in stranske odbite svetlobe (SSC), odseva strukturo celične površine, obliko celice, obliko jedra, lomni količnik in presevnost celic. Na splošno je žarek FSC močnejši pri večjih celicah, žarek SSC pa je močnejši, ko je struktura celic kompleksnejša. Intenzivnost stranske fluorescentne svetlobe v glavnem odseva vrsto in količino nukleinskih kislin in celičnih organelov. Vse tri tipe signalov uporabljamo za ugotavljanje koncentracije celic in diferenciranje levkocitov, eritroblastov, retikulocitov in trombocitov in za odkrivanje nenormalnih, nezrelih celic s pomočjo edinstvene digitalne tehnologije in algoritmov (5, 6).



Slika 5: Prednje in stransko sipanje svetlobe
(številka vira: 4)



Slika 6: Pretočna citometrija
Legenda: FSC-detektor za prednje sipanje svetlobe, SSC-detektor za stransko sipanje svetlobe,
FL-detektor za fluorescenco, PMT-fotopomnoževalka
(številka vira: 6)

3.5.1 Štetje levkocitov

KOMORA WDF

V levkocitni komori (WDF) ugotavljamo koncentracijo levkocitov in razporedimo celice med mononuklearne (MN) in polimorfonuklerane (PMN) celice. S pomočjo reagenta Lysercell WDF poteče najprej hemoliza eritrocitov, nato pa reagent prodre skozi membrano levkocitov in tako spremeni njihovo obliko in notranjo strukturo. Nato s fluorescentnim barvilom v reagentu Fluorocell WDF obarvamo nukleinske kisline in celične organele. Analiza razlik v intenzivnosti razpršene svetlobe in fluorescentne svetlobe posamezne celice s pomočjo pripadajočih algoritmov omogoča štetje levkocitov, diferenciacijo levkocitov in detekcijo nenormalnih celic.

Število izmerjenih celic v tej komori je v modulu za telesne tekočine približno 10-krat večje kot v načinu za štetje celic v krvi (5, 6).

Parametri v telesnih tekočinah

Osnovni parametri, ki jih omogoča analizator pri analizi telesnih tekočin. Nekatere analizator izmeri, druge poda na osnovi izračuna (5, 6).

Preglednica III: Osnovni parametri Sysmex XN-1000

Analizna komora:	Princip merjenja:	Parameter:	Pomen:
WDF (redčitev vzorca: 1 : 20)	Pretočna citometrija	WBC - absolutno	Število levkocitov
		Absolutno št. MN-celic	Koncentracija mononuklearnih celic
		Delež MN-celic	Odstotek mononuklearnih celic
		Absolutno št. PMN-celic	Število polimorfonuklearnih celic
		Delež PMN-celic	Odstotek polimorfonuklearnih celic
		TC - absolutno	Celotno število celic z jedrom

Parametri za študijske namene:

Poleg vseh že naštetih ugotavljanj vrst celic analizator omogoča tudi ugotavljanje in izračun nekaterih drugih parametrov, vendar se nekateri izmed njih smejo uporabljati samo v raziskovalne namene (5, 6).

Preglednica IV: Parametri za študijske namene Sysmex XN-1000

Analizna komora:	Raziskovalni parameter:	Pomen:
WDF	HF - absolutno	Koncentracija celic z močnejšo fluorescenco
	HF - delež	Odstotek celic z močnejšo fluorescenco
	NE - absolutno	Koncentracija nevtrofilcev
	NE - delež	Odstotek nevtrofilnih granulocitov
	LY - absolutno	Koncentracija limfocitov
	LY - delež	Odstotek limfocitov
	MO - absolutno	Koncentracija monocitov
	MO - delež	Odstotek monocitov
	EO - absolutno	Koncentracija eozinofilcev
	EO - delež	Odstotek eozinofilcev

Drugi izračuni (5, 6):

- $WBC = MN \text{ (absolutno)} + PMN \text{ (absolutno)}$
- $TC \text{ (absolutno)} = WBC + HF \text{ (absolutno)}$
- $MN = LY + MO$
- $PMN = NE + EO$

Parameter HF

Komora WDF poleg drugih parametrov poroča tudi o celicah z visoko fluorescenco, kot so npr. makrofagi ali mezotelijske celice. Te celice najdemo v diagramu nad predelom mononuklearnih celic in niso vključene v celotno število celic z jedrom (TC). Če število prisotnih celic v visoko fluorescentnem področju (HF) preseže mejo linearnosti, se prikaže opozorilo, da gre za nenormalni razsevni diagram in to mejo linearnosti si lahko uporabnik nastavi sam. Vendar pa to pomeni tudi to, da se bo v primeru prisotnosti bakterij ali debris (moteči delci, hilomikroni) to opozorilo prav tako izpisalo (5, 6).

3.6 Statistične metode

Statistično analizo podatkov smo naredili s programom MedCalc (22). Podatke smo ocenili in primerjali z več statističnimi analizami za oceno točnosti in natančnosti obeh analiz. Za vse statistične analize smo uporabili absolutne vrednosti, razen v primeru, ko je omenjeno drugače. Bland-Altmanov diagram smo uporabili za prikaz razlik med metodama. Diagram empirične kumulativne porazdelitve smo uporabili zaradi lažje interpretacije Bland-Altmanovega diagrama. Statistično značilnost smo osnovali na 95-odstotnem intervalu zaupanja (CI).

Natančnost pove, kako blizu so si meritve, merjene pod enakimi pogoji. Natančnost metode prikažemo s ponovljivostjo rezultatov. Za prikaz natančnosti uporabljamo standardni odklon (SD) in koeficient variacije (KV) (17).

Točnost pove, koliko je izmerjena vrednost blizu dejanski, resnični vrednosti. Netočnost metode ugotovimo s pomočjo odklona izmerjene vrednosti od prave vrednosti (17).

Bland-Altmanov diagram je ena izmed statističnih analiz, ki jo uporabljamo za primerjavo dveh metod za oceno njune medsebojne razlike (17). Ustrezno ujemanje metod je takrat, ko je dovolj velik delež razlik na diagramu blizu vrednosti 0. Na abscisno os nanašamo povprečne vrednosti obeh primerjanih meritev, na ordinatno os pa razlike meritev obeh primerjanih metod. Z izračunom povprečnega odklona meritev ugotovimo ujemanje ali pomanjkanje ujemanja metod, kar nam služi za oceno sistematične napake. Povprečni odklon je izračun med standardnim odklonom razlik med meritvama in srednjo vrednostjo meritev. Pomembni sta tudi meji ujemanja, ki ju imenujemo 95-odstotni meji ujemanja, ker

zajemata 95 % vseh razlik med meritvama. Meje ujemanja zajemajo celo populacijo in jih izračunamo iz povprečnega in standardnega odklona (povprečni odklon $\pm 1,96 \times SD$). Če so meje ujemanja široke, lahko s kliničnega vidika ocenimo, da so rezultati dvoumni, v primeru, da so meje ujemanja ozke oziroma dovolj blizu vrednosti 0 pa metodi prikazujeta primerljive rezultate (18).

Bland-Altmanov diagram s povprečjem razlik prikaže točnost, z razpršenostjo razlik pa natančnost. Treba ga je oceniti s kliničnega vidika. Iz diagrama moramo razbrati, ali je odstopanje klinično pomembno in kako široke so meje ujemanja. Pozorni moramo biti tudi na trend meritev in spreminjanje variabilnosti (18).

4. REZULTATI

4.1 Natančnost analizatorja

Natančnost meritev na analizatorju Sysmex XN-1000 med serijami smo preverili z analizo kontrol v dveh nivojih (nizka in visoka) v modulu za štetje celic v telesnih tekočinah v 22 izbranih dnevih, zjutraj pred analizami vzorcev.

Preglednica V: Natančnost analizatorja

PARAMETER	Nizka kontrola			Visoka kontrola		
	\bar{X}	SD	KV [%]	\bar{X}	SD	KV [%]
WBC [10 ⁹ /l]	0,07	0,004	6,0	0,26	0,013	5,1
RBC [10 ⁶ /l]	0,03	0,001	3,5	0,08	0,002	1,9
MN [10 ⁹ /l]	0,03	0,002	7,1	0,11	0,005	4,7
PMN [10 ⁹ /l]	0,04	0,003	9,7	0,15	0,010	6,8
PMN [%]	58,15	1,926	3,3	57,49	1,483	2,6
MN [%]	41,85	1,926	4,6	42,51	1,483	3,5
TC-BF [10 ⁶ /l]	0,07	0,004	6,0	261,30	0,013	5,1
POVPREČJE			5,7 %			4,2 %

Legenda: \bar{X} – povprečna vrednost meritev; SD – standardni odklon; KV – koeficient variacije; WBC – levkociti, koncentracija; PMN – polimorfonuklearni levkociti, koncentracija; PMN % – polimorfonuklearni levkociti, delež; MN – mononuklearni levkociti, koncentracija; MN % – mononuklearni levkociti, delež; TC – skupno število celic z jedrom, koncentracija; BF – telesne tekočine.

4.2 Točnost analizatorja

Točnost merjenja analizatorja Sysmex XN-1000 smo prav tako ocenili na podlagi kontrolnih vzorcev (nizka in visoka kontrola). Opravili smo 22 meritev. Primerjali smo meritve kontrol s ciljnim vrednostmi proizvajalca, ki so nam predstavljale prave vrednosti.

Rezultati meritev:

Preglednica VI: Kontrolne vrednosti meritev na analizatorju Sysmex XN-1000

Parameter	Nizka kontrola	Visoka kontrola
	\bar{X}_{RE}	\bar{X}_{RE}
WBC [10 ⁹ /l]	-11,18 %	-15,16 %
RBC [10 ⁶ /l]	2,18 %	-0,74 %
MN [10 ⁹ /l]	-8,32 %	-11,94 %
PMN [10 ⁹ /l]	-14,15 %	-17,44 %
PMN [%]	-1,43 %	-2,76 %
MN [%]	2,07 %	3,69 %
TC-BF [10 ⁹ /l]	2,34 %	-1,41 %

Legenda: \bar{X}_{RE} – povprečna vrednost relativne napake; WBC – levkociti, koncentracija; MN # – mononuklearni levkociti, koncentracija; PMN # – polimorfonuklearni levkociti, koncentracija; MN % – mononuklearni levkociti, delež; PMN % – polimorfonuklearni levkociti, delež; TC – skupno število levkocitov z jedrom, koncentracija.

4.3 Opisna statistika

Med vsemi vzorci v primerjavi med metodama smo določili osnovne statistične parametre, kot so: velikost vzorca, najnižja vrednost, najvišja vrednost, aritmetična sredina in varianca.

Primerjava absolutnih koncentracij celic z jedri

Preglednica VII: Opisna statistika med obema metodama

	AVTOMATIZIRANA METODA	MIKROSKOPSKA METODA
Velikost vzorca	74	74
Najnižja vrednost	$0,03 \times 10^9/l$	$0,10 \times 10^9/l$
Najvišja vrednost	$17,43 \times 10^9/l$	$20,00 \times 10^9/l$
Aritmetična sredina	$1,59 \times 10^9/l$	$1,61 \times 10^9/l$
Varianca	8,90	8,95

Primerjava relativne koncentracije mononuklearnih celic [%]

Preglednica VIII: Opisna statistika relativne koncentracije mononuklearnih celic

	AVTOMATIZIRANA METODA	MIKROSKOPSKA METODA
Velikost vzorca	74	74
Najnižja vrednost	$5,30 \times 10^9/l$	$3,00 \times 10^9/l$
Najvišja vrednost	$98,90 \times 10^9/l$	$100,00 \times 10^9/l$
Aritmetična sredina	$71,85 \times 10^9/l$	$73,07 \times 10^9/l$
Varianca	701,02	805,27

Primerjava relativne koncentracije polimorfonuklearnih celic [%]

Preglednica IX: Opisna statistika relativne koncentracije polimorfonuklearnih celic

	AVTOMATIZIRANA METODA	MIKROSKOPSKA METODA
Velikost vzorca	74	74
Najnižja vrednost	$1,10 \times 10^9/l$	$0,00 \times 10^9/l$
Najvišja vrednost	$94,70 \times 10^9/l$	$97,00 \times 10^9/l$
Aritmetična sredina	$16,92 \times 10^9/l$	$26,95 \times 10^9/l$
Varianca	/ *	804,68

* Ne gre za normalno porazdelitev, zato parameter ni primeren.

Primerjava metod

Metodi smo primerjali z Bland-Altmanovim diagramom razlik, v nekaterih primerih pa smo za boljšo predstavo statistične analize uporabili še diagram prepognjene empirične kumulativne porazdelitve. Referenčno metodo je predstavljala mikroskopska metoda, avtomatizirana metoda pa je bila testna.

Preglednica X: Primerjava mikroskopske in avtomatizirane metode

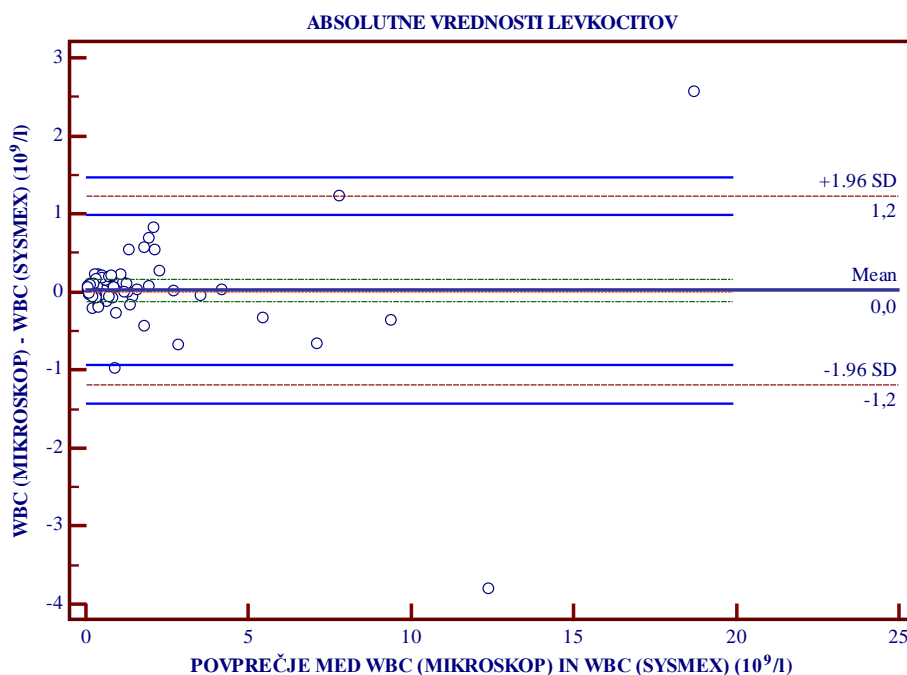
Parameter	Enote	n	odklon	IZ (odklon)	Sp. meja ujemanja	Zg. meja ujemanja
Levkociti	$10^9/l$	74	0,019	-0,123-0,161	-1,187	1,226
Levkociti do 1,0	$10^9/l$	46	0,032	0,000-0,065	-0,184	0,249
Levkociti nad 1,0	$10^9/l$	25	0,038	-0,391-0,467	-2,001	2,077
MN	$10^9/l$	74	0,114	0,025-0,202	-0,635	0,863
PMN	$10^9/l$	74	0,019	-0,054-0,093	-0,607	0,646
MN	%	74	1,218	-0,545-2,982	-13,704	16,142
PMN	%	74	-1,205	-2,966-0,555	-16,102	13,691

Legenda: n – število parov meritev; odklon – povprečje razlik; IZ (odklon) – interval zaupanja za odklon; ujemanje sp./zg. meja – spodnja in zgornja meja ujemanja; do 1, nad 1 – izključeni vsi pari meritev, kjer vrednost presega 1 ali je pod $1 \times 10^9/l$ levkocitov; MN ($10^9/l$) – mononuklearni levkociti, absolutno; PMN ($10^9/l$) – polimorfonuklearni levkociti, absolutno; MN % – mononuklearni levkociti, delež; PMN % – polimorfonuklearni levkociti, delež.

4.4 Primerjava absolutnih vrednosti levkocitov

Najprej smo preverili pristranskost oziroma sistematično napako obeh metod z Bland-Altmanovim diagramom oziroma diagramom razlik. Analizirali smo vse izmerjene vrednosti levkocitov.

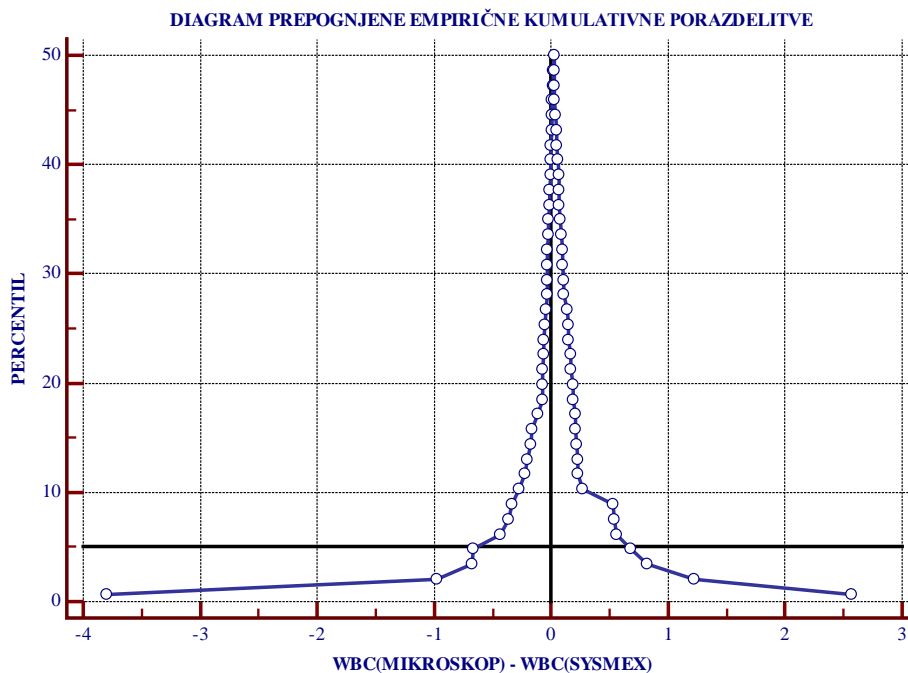
Diagram 1: Bland-Altmanov diagram primerjave absolutnih koncentracij levkocitov



Legenda: polna modra črta – povprečje razlik; črtkani rjavi črti – 95% meji ujemanja; polni svetlo modri črti – notranja in zunanja meja 95% intervala zaupanja za meji ujemanja; WBC (MIKROSKOP) – določanje številčne koncentracije levkocitov z mikroskopsko metodo; WBC (SYSMEX) – določanje številčne koncentracije levkocitov z avtomatizirano metodo.

Tukaj smo za lažjo predstavo množice podatkov na Bland-Altmanovem diagramu iste podatke analizirali še s pomočjo diagrama prepognjene empirične kumulativne porazdelitve. Med prednostmi tega prikaza so neobčutljivost za osamelce, lažje ugotavljanje osrednjih 95-odstotnih podatkov, lažja ocena odstotkov velikih razlik in lažja primerjava različnih porazdelitev.

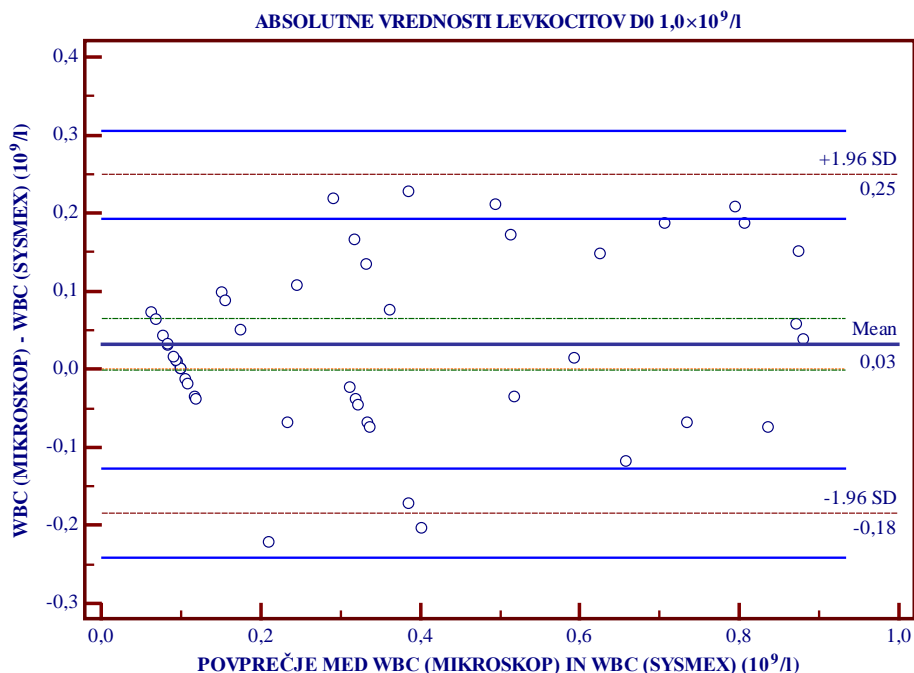
Diagram 2: Diagram prepoznjene empirične kumulativne porazdelitve absolutnih koncentracij levkocitov



Legenda: polna navpična črta – razlika 0; vodoravna polna črta – 5 oz. 95 odstotkov; WBC (MIKROSKOP) – določanje številčne koncentracije levkocitov z mikroskopsko metodo; WBC (SYSMEX) – določanje številčne koncentracije levkocitov z avtomatizirano metodo.

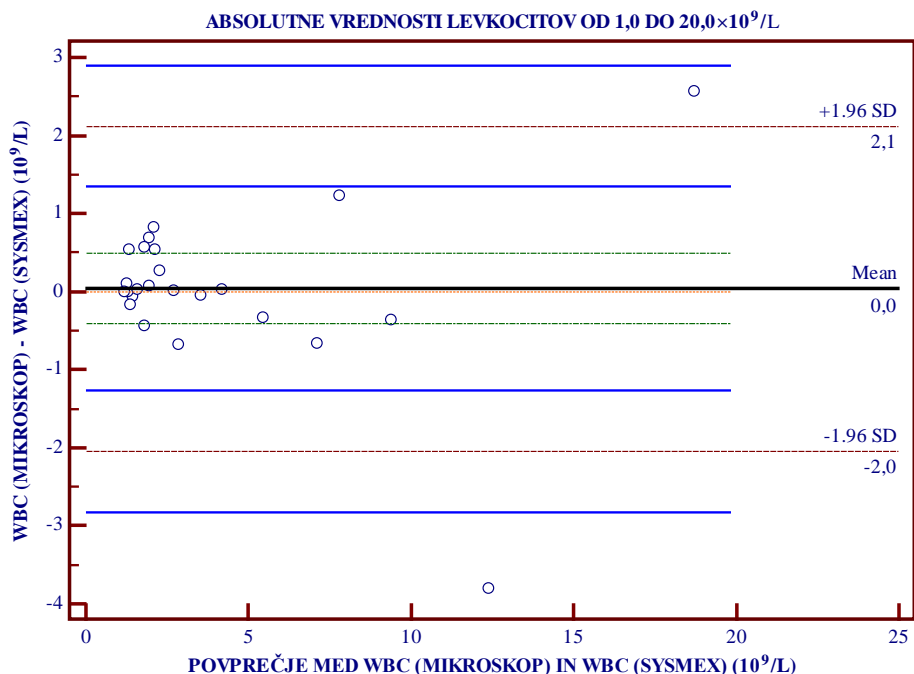
Nato smo za primerjavo absolutnih vrednosti levkocitov še enkrat primerjali vrednosti obeh metod, toda tokrat smo v analizo zajeli samo vrednosti levkocitov od $0,0 \times 10^9/l$ do vključno $1,0 \times 10^9/l$ in vrednosti od $1,0 \times 10^9/l$ do vključno $20,0 \times 10^9/l$ (največja izmerjena vrednost). To smo naredili iz dveh razlogov, in sicer vrednost levkocitov $1,0 \times 10^9/l$ predstavlja razmejitveno vrednost za razlikovanje med transudatom in eksudatom, drugi razlog za to analizo pa je boljša preglednost razlik pri vrednostih analiz, ki so bile najbolj pogoste.

Diagram 3: Bland-Altmanov diagram absolutnih koncentracij levkocitov do $1,0 \times 10^9/l$



Legenda: polna modra črta – povprečje razlik; črtkani rjavi črti – 95% meji ujemanja; polni svetlo modri črti – notranja in zunanja meja 95% intervala zaupanja za meji ujemanja; WBC (MIKROSKOP) – določanje številčne koncentracije levkocitov z mikroskopsko metodo; WBC (SYSMEX) – določanje številčne koncentracije levkocitov z avtomatizirano metodo.

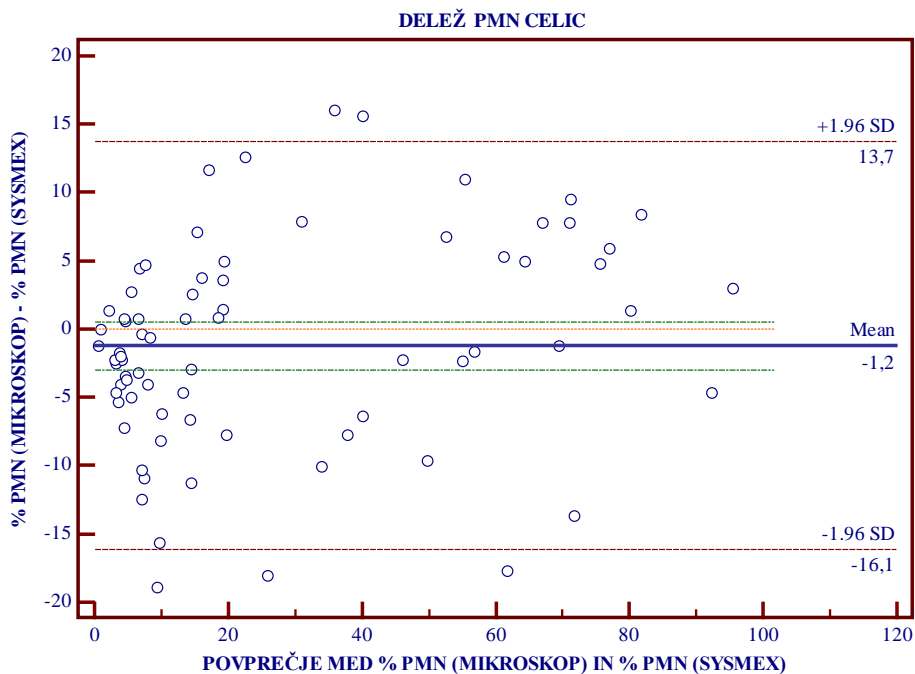
Diagram 4: Bland-Altmanov diagram absolutnih koncentracij levkocitov od $1,0$ do $20,0 \times 10^9/L$



Legenda: polna črna črta – povprečje razlik; črtkani rjavi črti – 95% meji ujemanja; polni svetlo modri črti – notranja in zunanja meja 95% intervala zaupanja za meji ujemanja; WBC (MIKROSKOP) – določanje številčne koncentracije levkocitov z mikroskopsko metodo; WBC (SYSMEX) – določanje številčne koncentracije levkocitov z avtomatizirano metodo.

4.5 Primerjava deležev polimorfonuklearnih in mononuklearnih celic

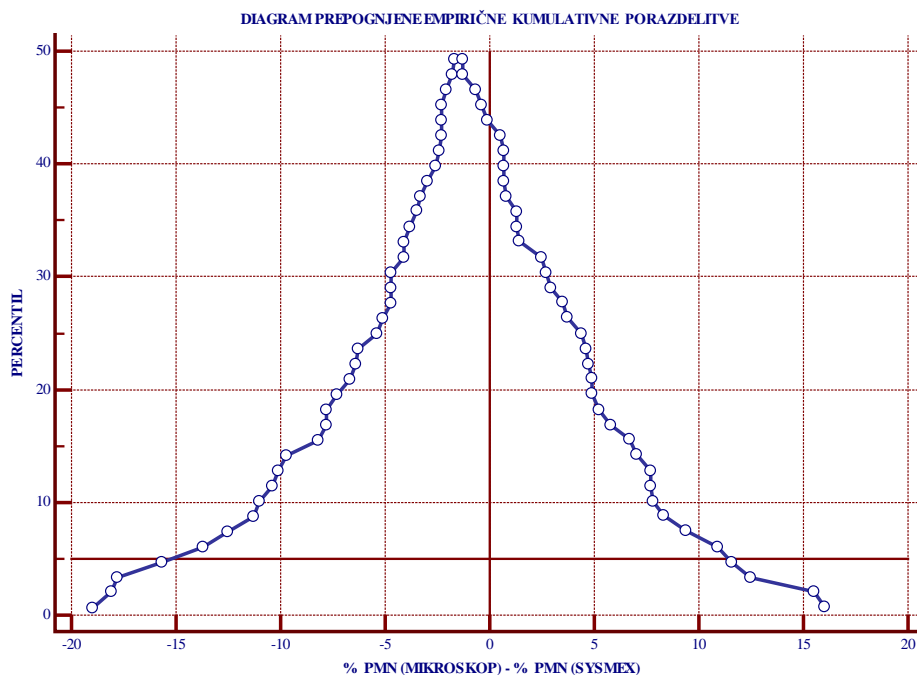
Diagram 5: Bland-Altmanov diagram deleža PMN-celic



Legenda: polna temno modra črta – povprečje razlik; črtkani rjavi črti – 95% meji ujemanja; PMN % (MIKROSKOP) – določanje deležev polimorfunuklearnih levkocitov z mikroskopsko metodo; PMN % (SYSMEX) – določanje deležev polimorfunuklearnih levkocitov z avtomatizirano metodo.

Razvidno je, da je povprečje razlik $-1,2$ %, kar pomeni, da je delež PMN-celic na analizatorju Sysmex XN-1000 za $1,2$ % večji kot pri mikroskopski metodi štetja. Trenda ni opaznega, prav tako ni spreminjanja variabilnosti. Za boljši pregled naredimo še diagram prepognjene empirične kumulativne porazdelitve.

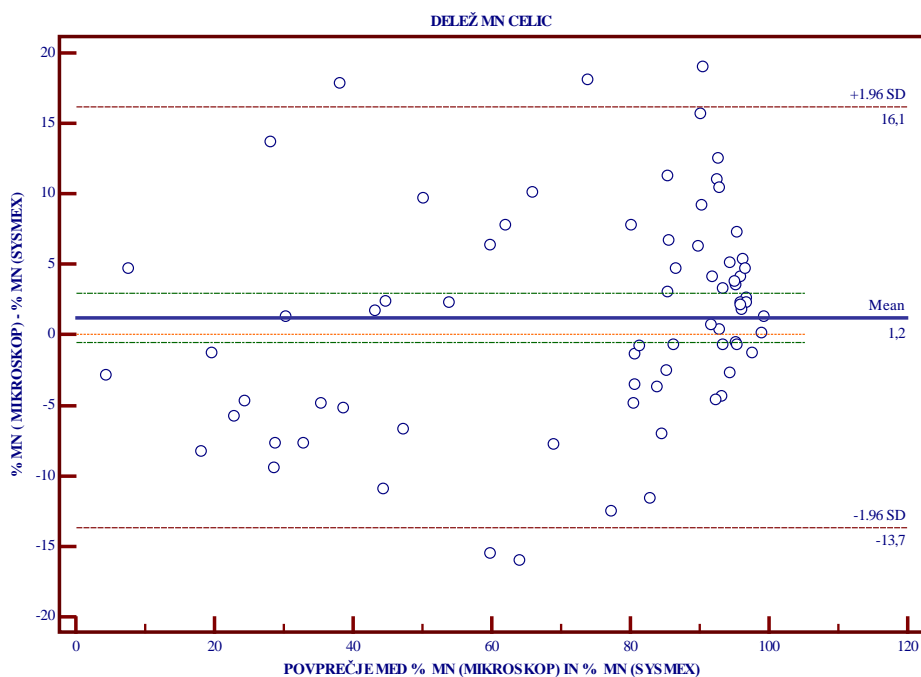
Diagram 6: Diagram prepognjene empirične kumulativne porazdelitve deleža PMN-celic



Legenda: polna navpična črta – razlika 0; vodoravna polna črta – 5 oz. 95 odstotkov; PMN % (MIKROSKOP) – določanje deležev polimorfonuklearnih levkocitov z mikroskopsko metodo; PMN % (SYSMEX) – določanje deležev polimorfonuklearnih levkocitov z avtomatizirano metodo.

Z diagrama prepognjene empirične kumulativne porazdelitve je tako enako kot pri Bland-Altmanovem diagramu razvidno, da vrh ni na polni navpični črti, ki označuje razliko 0, temveč je pomaknjen v levo, kar nakazuje na sistematično napako, in sicer je delež PMN-celic na analizatorju Sysmex XN-1000 za 1,2 % večji kot pri mikroskopski metodi štetja.

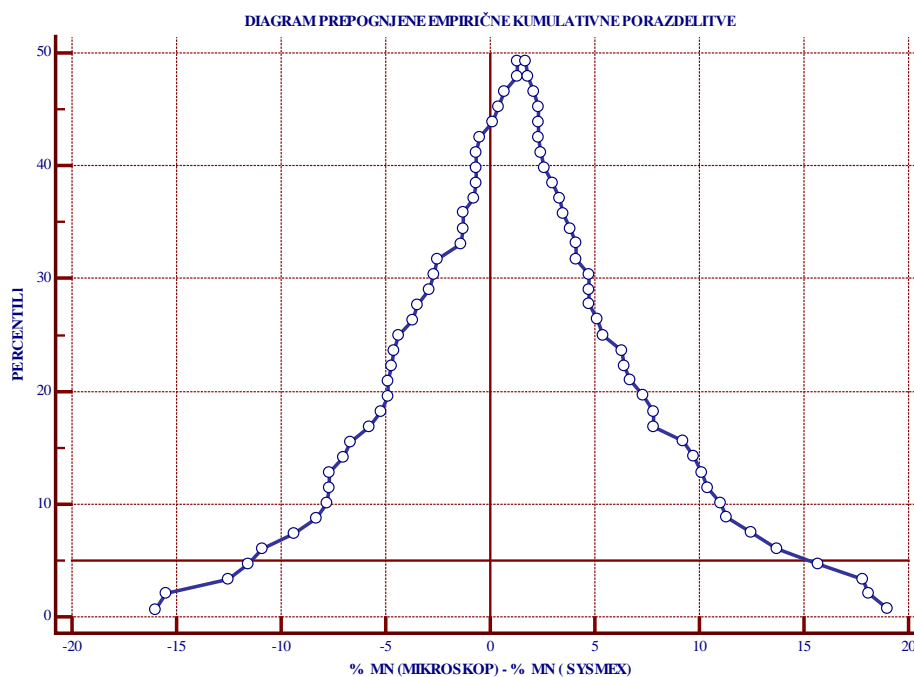
Diagram 7: Bland-Altmanov diagram deleža MN-celic



Legenda: polna temno modra črta – povprečje razlik; črtkani rjavi črti – 95% meji ujemanja; MN % (MIKROSKOP) – določanje deležev mononuklearnih levkocitov z mikroskopsko metodo; MN % (SYSMEX) – določanje deležev mononuklearnih levkocitov z avtomatizirano metodo.

Razvidno je, da je povprečje razlik 1,2 %, kar pomeni obratno kot pri deležu PMN-celic, da je delež MN-celic na analizatorju Sysmex XN-1000 za 1,2 % manjši kot pri mikroskopski metodi štetja. Trenda ni opaznega, prav tako ni spreminjanja variabilnosti. Nato naredimo še diagram prepognjene empirične kumulativne porazdelitve.

Diagram 8: Diagram prepojnjene empirične kumulativne porazdelitve deleža MN-celic

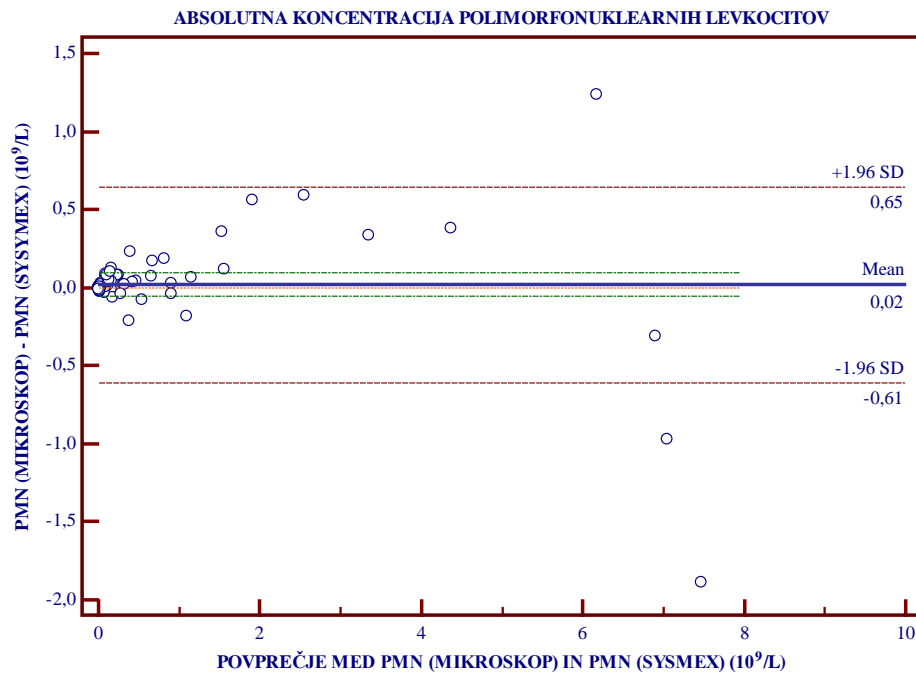


Legenda: polna navpična črta – razlika 0; vodoravna polna črta – 5 oz. 95 odstotkov; MN % (MIKROSKOP) – določanje deležev mononuklearnih levkocitov z mikroskopsko metodo; MN % (SYSMEX) – določanje deležev mononuklearnih levkocitov z avtomatizirano metodo.

Tudi na tem diagramu je lepo viden zamaknjen vrh v desno, torej je delež MN-celic na analizatorju Sysmex XN-1000 za 1,2 % manjši kot pri mikroskopskem štetju.

4.6 Polimorfonuklearni levkociti absolutna koncentracija

Diagram 9: Bland-Altmanov diagram absolutnih koncentracij PMN-celic

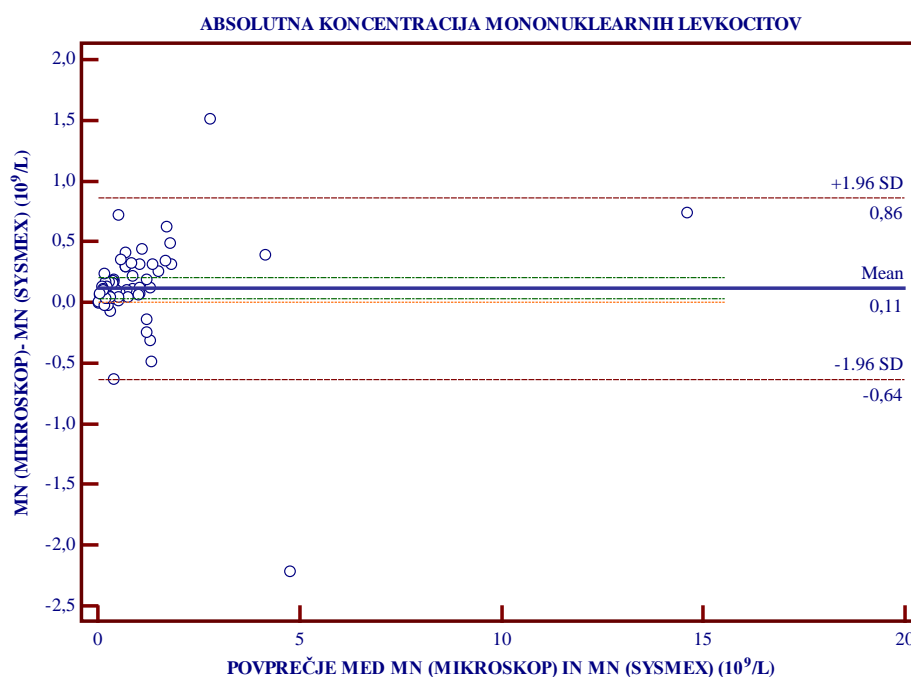


Legenda: Polna temno modra črta – povprečje razlik, črtkani rjavi črti – 95% meji ujemanja; PMN (MIKROSKOP) – določanje številčne koncentracije polimorfonuklearnih levkocitov z mikroskopsko metodo; PMN (SYSMEX) – določanje številčne koncentracije polimorfonuklearnih levkocitov z avtomatizirano metodo.

Na Bland-Altmanovem diagramu razlik za absolutne koncentracije PMN-celic je vidno zelo majhno povprečje razlik med obema metodama, le $0,02 \times 10^9/l$ so vrednosti na analizatorju manjše.

4.7 Mononuklearni levkociti absolutna koncentracija

Diagram 10: Bland-Altmanov diagram absolutnih koncentracij MN-celic



Legenda: polna temno modra črta – povprečje razlik; črtkani rjavi črti – 95% meji ujemanja; PMN (MIKROSKOP) – določanje številčne koncentracije polimorfonuklearnih levkocitov z mikroskopsko metodo; PMN (SYSMEX) – določanje številčne koncentracije polimorfonuklearnih levkocitov z avtomatizirano metodo.

Pri diagramu za primerjavo med metodama štetja celic za MN-celice je razlika tudi zelo majhna, le za $0,11 \times 10^9/l$ je v povprečju razlike.

5. RAZPRAVA

V primerjavo smo vključili 85 vzorcev različnega izvora, od tega smo 74 punktatov vključili v statistično analizo, drugih 11 pa smo iz statistične analize izključili. Pri merjenju nekega inštrumenta je bistven odnos med izmerjeno in resnično vrednostjo ter sistematično napako in slučajno napako merjenja. Vsaka izmerjena vrednost torej predstavlja odklon od resnične vrednosti, za ta odklon pa sta krivi sistematična in naključna napaka. Sistematična je najpogosteje povezana z inštrumentom oziroma nepravilnim izvajanjem merjenja. Naključna napaka pa predstavlja skupek številnih slučajnih vplivov. Za ovrednotenje obeh napak se lahko opremo le na razlike parov meritev, opravljenih z eno in drugo metodo, referenčno in primerjalno metodo (18).

Vzorci punktatov so enkratni nenadomestljivi vzorci, ki jih pridobimo s punkcijo. Punkcija je težak, invaziven poseg, zato je potrebno dobro poznati vse stopnje analize punktata (odvzem, transport, predanalizna faza, postopki analize, shranjevanje, vpliv biološke in analitične variabilnosti na interpretacijo rezultatov). Poleg tega se moramo pri analizi zavedati, da je za dobro pacienta bistvenega pomena hitra analiza vzorca, ker bo le v tem primeru analiza dovolj točna. Analiziramo namreč celice, ki so zlasti nestabilne. Torej je pri analizi punktatov in vseh telesnih tekočinah potreba po hitrih rezultatih, čim krajši čas od odvzema vzorca do končnega izvida (3, 4).

V punktatih telesnih votlin ugotavljamo koncentracijo celic z jedri z namenom, da bi ugotovili, ali gre za vnetni ali nevnetni proces, eksudat ali transudat. Pri pregledu citološkega sedimenta pa diferenciramo celice z jedri in ugotavljamo prisotnost morebitnih malignih celic. Slabše lastnosti mikroskopske metode so: predpriprava vzorca (barvanje celic z jedri), redčenje vzorca (motni oz. krvavi vzorci), zamudnost analize, potreben je velik volumen vzorca (redčenja in 500 μ l za pregled citološkega sedimenta), slaba točnost in natančnost, velika variabilnost med laboratorijskimi delavci zaradi subjektivne ocene pri diferenciaciji celic. Poleg tega bi lahko med slabost uvrstili tudi finančni vložek ustanove, ki je potreben za analizo celic punktata, in ta je gledano na dolgi rok nedvomno večji za laboratorijsko osebje kot pa za analizator. Med prednosti mikroskopskega štetja celic bi lahko uvrstili hitro ugotovitev prisotnosti malignih celic in nizko mejo detekcije (15).

Avtomatizirana metoda z analizatorjem Sysmex ima prednosti, kot je na primer hitrejši čas analize, kar je bistvenega pomena pri nujnih vzorcih in tudi v nočnih izmenah. Naslednja izmed prednosti so ponovljivi in točni rezultati, potreba po majhni količini vzorca (88 µl), ni potrebe po predpripravi vzorca, kar močno zmanjša trajanje predanalizne faze. Prednost je tudi ta, da tukaj ni potrebe po posebni izkušeni laboratorijskega delavca, kar je danes velik problem v laboratoriju (6, 8).

Kot slabost avtomatizirane metode bi lahko izpostavili dejstvo, da analizator ni zmožen razlikovati med malignimi celicami in drugimi celicami (mezotelijske celice in makrofagi). Torej bo analizator v primeru prisotnosti teh celic le-te razporedil ali v področje HF ali pa v področje mononuklearnih celic in ob tem izdal opozorilo nenormalni razsevni diagram, kar pomeni, da mora biti opravljen še mikroskopski pregled vzorca in to še dodatno podaljša čas od sprejema vzorca do izdaje izvida (6, 8).

Proizvajalci avtomatiziranih sistemov bi v prihodnosti lahko vključili več specifičnih opozoril analizatorja, ki bi tako pomagali laboratorijskemu osebju pri diferenciaciji malignih od nemalignih celic. Cilji za prihodnost modernega laboratorija so prav gotovo čim večje možno zmanjševanje stroškov dela, povečanje učinkovitosti laboratorija, poenostavljeno delo in vpeljava avtomatiziranih analiz v čim večji meri, kjer je to smiselno, stroškovno utemeljeno in možno. Vendar pa je pred uporabo novega analizatorja v rutinske namene, metodo merjenja tega analizatorja treba primerjati, validirati, vpeljati (11).

Natančnost

Za ugotavljanje natančnosti avtomatizirane metode smo uporabili rezultate kontrolnih vzorcev proizvajalca, ker imajo točno določene ciljne vrednosti. Kontrolna nivoja sta dva, nizka in visoka kontrola. Iz rezultatov dnevnih kontrol smo izračunali srednjo vrednost, standardni odklon ali standardno deviacijo in koeficient variacije.

V obeh nivojih kontrol (nizka in visoka) imajo največji koeficient variacije absolutne vrednosti PMN, 9,7 % v nizki kontroli in 6,8 % v visoki kontroli. Koeficient variacije 9,7 % (v nizki kontroli) je prav tako največji med vsemi, kar pomeni, da ima vrednost polimorfonuklearnih levkocitov na analizatorju najmanjšo natančnost. Koeficient variacije vseh meritev analizatorja je bila pod 9,8 %. Rezultat je sicer rahlo višji, kot je rezultat v študiji, objavljeni leta 2012 na Nizozemskem, ki jo je izvedel Fleming s sodelavci (10) in kjer so prav tako ocenjevali štetje celic v telesnih tekočinah na analizatorju Sysmex XN-1000. Namreč njihova ugotovljena natančnost kontrolnih vzorcev (nizka in visoka kontrola)

je bila pod 7,5 % (nizka kontrola: levkociti -5,2 %, PMN -7,2 %, MN -7,4 %; visoka kontrola: levkociti -3,2 %, PMN -3,6 % in MN -4,0 %) (10).

Prav tako je iz rezultatov obeh primerjav razvidno, da so vrednosti koeficienta variacije v nivoju visoke kontrole nižji kot v nivoju nizke kontrole (povprečje nizke kontrole: 5,7 %, povprečje visoke kontrole: 4,2 %). Tako lahko podamo in potrdimo naslednji ugotovitvi, da smo dobili podobne rezultate natančnosti analizatorja Sysmex in da variabilnost pada z naraščanjem koncentracije celic (10).

Rezultati natančnosti pri analizatorju Sysmex XN-1000 so primerljivi tudi z rezultati študije iz leta 1999 v Nemčiji, ki jo je izvedel Ziebig s sodelavci (21). V študiji so ocenjevali natančnost analizatorjev CellDyn 3500 in urinskega pretočnega citometra UF-1000. Tudi njihov zaključek je bil, da variabilnost pada s koncentracijo celic. Razvidno je, da so rezultati natančnosti za levkocite pri ($\bar{x} = 0,07 \times 10^9/l$, KV = 6,0 %) in pri ($\bar{x} = 0,26 \times 10^9/l$, KV = 5,1 %) primerljivi z rezultati kontrol na urinskem citometru (pri $\bar{x} = 0,03$, KV = 4,9 %) in pri ($\bar{x} = 0,39 \times 10^9/l$, KV = 3,5%) in celo boljši od rezultatov na hematološkem analizatorju CellDyn 3500 ($\bar{x} = 0,03 \times 10^9/l$, KV= 28 % in $\bar{x} = 0,36 \times 10^9/l$, KV = 3,3 %), vendar pa je treba pri tem poudariti, da so njihovi koeficienti variacije izračunani na podlagi drugih koncentracijskih območij in da so to že stare študije (leto 1999), kar pomeni, da gre za starejšo tehnologijo (slabše tehnično in programsko razviti analizatorji) in to je v primerjavi treba upoštevati (21).

Zanimiva je tudi primerjava natančnosti med serijami naše študije na analizatorju Sysmex XN-1000 in študije na Norveškem iz leta 2004 (12), kjer so ocenjevali štetje celic na analizatorju Advia 120. V nivoju nizke kontrole so koeficienti variacije naše študije znatno nižji kot pri Advii 120 (Sysmex / Advia: 6,0 / 20,0 % za levkocite), pri visoki kontroli pa je ta razlika manjša (Sysmex / Advia: 5,1 / 9,3 %). Zaključek njihove študije glede natančnosti med serijami na Advii 120 je bil, da so vrednosti koeficienta variacije sprejemljive za klinično pomembna območja. Še eno študijo štetja celic v telesnih tekočinah na Advii 120 so opravili, in sicer na Japonskem leta 2013, ki so jo naredili Tanada s sodelavci (11).

Če bi primerjali koeficiente variabilnosti za levkocite, analizatorja Sysmex-a in Advie, so vrednosti: nizka kontrola Sysmex / Advia: 6,0 % / 16,8 %, visoka kontrola Sysmex / Advia: 5,1 % / 6,9 %. Torej tudi pri tej študiji so prišli do zaključka da vrednosti KV padajo z večjo koncentracijo celic.

Točnost

Točnost analizatorja Sysmex XN-1000 smo ugotovili s pomočjo izračuna relativne napake, med vrednostjo nizke oziroma visoke kontrole in ciljno vrednostjo kontrole, ugotovljeno s strani proizvajalca. Iz relativnih napak smo izračunali še srednjo vrednost napak pri posameznih analitih. V obeh kontrolah bi lahko poudarili največje odstopanje od ciljnih vrednosti proizvajalca pri absolutni številčni koncentraciji levkocitov (nizka kontrola: -11,8 %, visoka kontrola: -15,2 %), absolutni številčni koncentraciji polimorfonuklearnih levkocitov (nizka kontrola: -14,2 %, visoka kontrola: -17,4 %) in mononuklearnih levkocitih (nizka kontrola: -8,3 %, visoka kontrola: -11,9 %). Vse druge vrednosti relativnih napak ne odstopajo za več kot 3,7 %. Kot možne vzroke malo večjih odstopanj absolutnih koncentracij levkocitov, polimorfonuklearnih in mononuklearnih levkocitov od ciljnih vrednosti proizvajalca lahko navedemo:

- izvajanje istih kontrol skozi daljše obdobje (22 dni) in posledično slabše stabilnosti celic v odprti kontrolni raztopini;
- premalo homogenizirani kontrolni vzorci (pred meritvijo slabo premešani);
- nepravilna temperatura kontrolnih raztopin ob analizi.

Točnost bi torej lahko izboljšali z doslednim in s pravilnim rokovanjem s kontrolnimi vzorci ter z izvajanjem kontrolnih testov iz svežih kontrol.

Primerjava metod: SYSMEX XN-1000 / MIKROSKOPSKA METODA

Levkociti in diferencialna slika

Pri primerjavi rezultatov, ki zavzame vse pare meritev levkocitov ($n = 74$), je opazna enakomerna porazdelitev napak in zelo majhna pristranskost: analizator Sysmex XN-1000 sistematično prešteje za $0,02 \times 10^9/l$ manj levkocitov, kot se jih prešteje ročno v komori. 95-odstotni meji ujemanja sta od približno $-1,2$ do $1,2 \times 10^9/l$, zunanji meji njunega intervala zaupanja pa od $-1,4$ do $1,4 \times 10^9/l$. Iz diagrama je razvidno, da ni prisotnega trenda odstopanja (oziroma imamo premajhno število meritev, da bi ga opazili), prav tako ni spreminjanja variabilnosti (oziroma heteroskedastičnosti, kar pomeni porazdelitev točk na diagramu v obliki troblje). Iz diagrama sta opazna dva vzorca, ki odstopata, gre za sinovijsko tekočino in punktati neznanega izvora. Skupno pri obeh je:

- veliko število levkocitov (mikroskopska / avtomatizirana; levkociti $10,5 / 14,3 \times 10^9/l$, MN $36,0 / 41,2$ %, PMN $64,0 / 58,8$ %; levkociti $20,0 / 17,4 \times 10^9/l$, MN $81,0 / 81,8$ %, PMN $19,0 / 18,2$ %);
- pri obeh rezultatih je analizator Sysmex izdal opozorilo (@), kar pomeni, da so izmerjene vrednosti nad mejo linearnosti analizatorja in da je potrebno opraviti še mikroskopsko štetje celic.

Zaključimo lahko, da gre za ustrezno ujemanje metod (dovolj velik delež meritev okoli vrednosti 0). Pri vrednostih levkocitov, ki jih izda analizator, pa je treba biti pozoren na vsa opozorila analizatorja in vrednost levkocitov v HF-področju, v katerega navadno uvrščamo mezoteljske celice, makrofage in druge atipične ali tumorske celice. Ob prisotnosti celic v HF-področju in opozorilu analizatorja bi bilo torej potrebno celice pogledati še mikroskopsko v citološkem sedimentu. Je pa možnost za uporabnika, da na podlagi izkušenj, rezultatov, določi mejno oz. »cut off« vrednost na analizatorju sam.

Pri pregledu diagrama empirične kumulativne porazdelitve za absolutne koncentracije levkocitov je razvidno, da med metodama avtomatiziranega štetja celic in mikroskopskega štetja ni sistematičnega razhajanja, saj je vrh krivulje nad 0, sicer je vrh nad mediano razliko. Repa krivulje nakazujeta na razhajanje med metodama: kolikor krajša sta, toliko manjše je razhajanje. Vodoravna polna črna črta označuje 5 oz. 95 odstotkov. Krivulja je primerno simetrična, kar je zaželeno.

V skupini do $1,0 \times 10^9/l$ levkocitov ($n = 46$) vidimo, da je povprečje razlik $0,03 \times 10^9/l$, kar kaže na tudi zelo majhno sistematično napako, saj analizator Sysmex XN-1000 v povprečju izmeri za $0,03 \times 10^9/l$ manjše vrednosti, kot je bilo prešteto število levkocitov v komori. Prav tako ni opaznega trenda. 95-odstotni meji ujemanja sta od $-0,18$ do $0,25 \times 10^9/l$, zunanji meji 95-odstotnega intervala zaupanja pa od $-0,24$ do $0,31 \times 10^9/l$.

Da gre za odlično ujemanje med mikroskopsko in avtomatizirano metodo, so ugotovili tudi v študiji, ki jo je izvedel Fleming s sodelavci (10), le da so oni prišli do te ugotovitve s pomočjo regresijske analize. Izvedli so primerjavo za celotno koncentracijsko območje levkocitov in v območju pod $10,0 \times 10^6/l$ in nad $10,0 \times 10^6/l$ v punktatih ascitesa, pleuralnega punktata, CAPD (kontinuirana ambulantna peritonealna dializa) in peritonealnega punktata. V celotnem koncentracijskem območju so bili rezultati naslednji: $y = 1,06x - 0,26$, $n = 109$, $R^2 = 0,96$, za območji pod in nad $10,0 \times 10^6/l$ pa so navedli, da so bili rezultati zelo primerljivi z tistimi v celotnem koncentracijskem območju levkocitov (10).

Tudi mi smo naredili primerjavo ujemanja v koncentracijskem območju $\geq 1,0 \times 10^9/l$ ($n = 25$) levkocitov in rezultati so bili odlični, saj analizator Sysmex XN-1000 v povprečju pokaže za $0,04 \times 10^9/l$ manjše koncentracije kot pri štetju celic v komori. Trenda pri tem številu parov ni opaznega, 95-odstotni meji ujemanja sta od $-2,00 \times 10^9/l$ do $2,01 \times 10^9/l$, njuni zunanji meji pa od $-2,74 \times 10^9/l$ do $2,82 \times 10^9/l$. Vrednosti, ki izstopata od vseh drugih vrednosti sta isti, ki sta že omenjeni pri primerjavi vseh levkocitov in je pri njuni meritvi analizator izdal opozorilo, zato bi bilo treba celice prešteti mikroskopsko.

Iz primerjave koncentracij levkocitov med dvema metodama v različnih koncentracijskih območjih (vsi pari meritev, levkociti do $1,0 \times 10^9/l$ in levkociti nad $1,0 \times 10^9/l$) je razvidno, da analizator v povprečju prešteje manj levkocitov, kot jih je pri mikroskopski metodi, vendar so odstopanja zelo majhna in klinično nepomembna. Pri vseh primerjavah je povprečni odklon meritev skoraj enak nič, torej lahko primerjavo štetja levkocitov ocenimo kot zelo dobro, meritve obeh metod v povprečju so skoraj identične. Največja variabilnost meritve je bila dosežena pri levkocitih nad $1,0 \times 10^9/l$, ta je bila $\pm 2,0 \times 10^9/l$ levkocitov, manjše variabilnosti pa so pričakovano pri manjši koncentracijah levkocitov. Idealen cilj primerjave bi bila variabilnost 0. Zanimiva je primerjava naše študije s študijo Zimmermanna s sodelavci iz leta 2011 (14). V njihovi študiji so sicer primerjali število celic v cerebrospinalni telesni tekočini z mikroskopsko metodo in analizatorjem Sysmex XE-5000 (eno generacijo starejša različica od XN-1000).

Njihove ugotovitve se niso precej razlikovale od naših (koncentracija levkocitov $0-5 \times 10^6/l$), in sicer je v povprečju analizator XE-5000 preštel za 2,4 % celice več kot je bilo prešteto mikroskopsko. V območju $0-200 \times 10^6/l$ pa je analizator preštel v povprečju za 3,3 % celice več. Še bolj zanimiva pa je časovna in stroškovna primerjava obeh analiz, ki so ju tudi izvedli. Na žalost mi teh dveh primerjav nismo izvedli, torej rezultatov ne moremo primerjati. Njihov zaključek je bil, da je povprečen čas, potreben za ročno štetje celic v Fuchs-Rosenthalovi komori približno 635 sekund, štetje z analizatorjem pa zahteva le približno 85 sekund, če pa so časovno primerjavo omejili na koncentracijo levkocitov (pod $20 \times 10^6/l$), je bil čas, potreben za mikroskopsko štetje celic, v povprečju 103 sekunde, analizator pa je potreboval le 62,1 sekunde (samo za šteje celic, priprava in mešanje vzorca sta bila izključeni). Pri stroškovni primerjavi analiz, po njihovi oceni je povprečna vsota stroškov za mikroskopsko štetje celic 6,74 € (pri tej oceni so vključeni samo stroški, potrebni za plačilo zaposlenega, ker so po njihovi oceni stroški za vso potrebno opremo in material zanemarljivo nizki). Približna vsota stroškov za štetje celic na analizatorju pa naj bi bila v povprečju le 1,22 € (materialni stroški so bili vključeni). Zaključek njihove študije je bil, da avtomatizirana metoda za štetje celic lahko zamenja mikroskopsko metodo štetja v večini primerov, kar lahko pospeši in olajša klinično pomembne odločitve, vendar pa je mikroskopska metoda nenadomestljiva pri nekaterih patoloških stanjih, kje so celice spremenjene (14).

Pri deležih **polimorfonuklearnih** levkocitov je povprečje razlik $-1,2$ %, torej analizator v povprečju ugotovi za $1,2$ % več polimorfonuklearnih levkocitov. Meji ujemanja sta od $-16,1$ % do $13,7$ %. Za absolutne vrednosti polimorfonuklearnih levkocitov je povprečje razlik le $0,02 \times 10^9/l$, meji ujemanja pa sta od $-0,60$ do $0,65 \times 10^9/l$. Naši rezultati so sprejemljivi, saj so vrednosti povprečnih razlik med meritvama in njune variabilnosti relativno nizke. Je pa naš rezultat delno v nasprotju z rezultati izračuna točnosti meritev na analizatorju. Tam so bile vrednosti relativnih napak za deleže in absolutne vrednosti polimorfonuklearnih levkocitov največje od vseh, in sicer od $-1,4$ % do $-2,7$ % za deleže pri nizki in visoki kontroli, pri absolutnih vrednostih pa je vrednost relativne napake od $-14,2$ % do $-17,4$ % pri nizki in visoki kontroli. To je bil tudi najvišji odstotek odstopanja od ciljne vrednosti. Naša študija tako podpira ugotovitev študije Fleminga s sodelavci (10), kjer so zaključili, da se koncentracije polimorfonuklearnih levkocitov med mikroskopsko in avtomatizirano metodo odlično ujemajo ($y = 1,06x + 0,81$; $n = 93$, $R^2 = 0,98$).

Pri relativnih vrednostih **mononuklearnih** levkocitov je iz Bland-Altmanovega diagrama razvidno, da je povprečje razlik 1,2 %, kar pomeni, da nasprotno kot pri PMN-celicah analizator Sysmex XN-1000 prešteje v povprečju za 1,2 % manjše vrednosti MN-celic (sistematična napaka). Trenda pri merjenju ni opaznega, spreminjanja variabilnosti tudi ni. Meji ujemanja sta postavljeni od -13,7 do 16,1 %. Za absolutne vrednosti MN-celic pa je povprečje razlik $0,11 \times 10^9/l$, z mejo ujemanja od -0,63 do $0,86 \times 10^9/l$. Tudi tukaj tako podpremo odlične rezultate ujemanja za MN-celice pri študiji Fleminga s sodelavci ($y = 1,06x - 0,41$; $n = 93$, $R^2 = 0,96$) (10).

Eritrociti

Primerjave štetja obeh metod pri delu nismo naredili in je zato ne moremo komentirati. Vrednostim, ki jih je izdal analizator ($10^6/l$), smo dodali le opisno oceno eritrocitov ročnega štetja (mikroskopsko se jih v punktatih ne šteje), te pa so:

- posamezni eritrociti,
- maloštevilni eritrociti,
- številni eritrociti.

So pa v študiji Fleminga s sodelavci primerjali število eritrocitov med mikroskopsko in avtomatizirano metodo pri koncentraciji eritrocitov nad $1,0 \times 10^6/l$ in dobili odlične rezultate, korelacija avtomatizirane metode z mikroskopsko je bila 0,98 (10).

Tudi v drugih študijah so le redko primerjali štetje eritrocitov v punktatih, večinoma vsi navajajo težavnost primerjave zaradi omejitve analizatorjev (spodnja meja zaznave – Sysmex XN-1000 jo ima nad $1000 \times 10^6/l$) in relativno nizke diagnostične vrednosti. Kot je že omenjeno v uvodu naloge, je pri krvavih vzorcih punktata priporočljivo ugotavljanje hematokrita. In kadar ta presega 50 % vrednost hematokrita v krvi, obstaja sum na prisotnost krvi v kateri izmed votlin (plevralni, peritonealni, perikardialni), vendar je to najpogosteje v plevralni votlini – hemotoraks. Če pa je vrednost hematokrita nižja od 1 % vrednosti v krvi, gre lahko za različna patološka stanja, maligno obolenje, pljučno embolijo ali poškodbo.

Drugi vzorci, ki jih nismo vključili v primerjavo

Od skupno 85 vzorcev, ki smo jih analizirali na analizatorju Sysmex XN-1000, smo jih iz primerjave izločili 11 (13 %). Razlogi so bili naslednji:

- premalo levkocitov v citološkem sedimentu, zato diferenciacija celic v citološkem sedimentu ni bila mogoča;
- razpadli levkociti, zato diferenciacija preko mikroskopa ni bila izvedena;
- iz oddelka ni bilo naročene preiskave pregleda citološkega sedimenta, zato so bili prešteti samo celotni levkociti v komori;
- analizator je izdal opozorilo poleg rezultata, zato je bil rezultat vprašljiv (nenormalni razsevni diagram, nezrele celice);
- opozorila: * (rezultat ni zanesljiv, možni delci, ki motijo analizo), @ (rezultat je nad mejo linearnosti analizatorja), --- (rezultat ni izdan, zaradi napak pri merjenju ali analizi), +++ (izven predpisanega območja).

Na izpisu iz analizatorja sta poleg vseh drugih celičnih vrednosti tudi dva parametra TC in HF. Parameter TC je vključen v izvid analizatorja, HF pa je v pomoč osnovnim parametrom pri interpretaciji izvida.

Parameter TC je izmerjen (levkociti + druge celice z jedrom), parameter HF pa je izračunan (celice, ki močnejše fluorescirajo kot levkociti, TC – WBC). To so navadno makrofagi in mezotelijske celice, lahko pa tudi različne tumorske celice. Pri povečanem številu celic, ki močnejše fluorescirajo, analizator na to opozori z »nenormalen diagram levkocitov«.

Pri 74 vzorcih, ki so bili vključeni v primerjavo, jih je bilo 59 (80 %) takih, ki so imeli parameter HF pod $0,1 \times 10^9/l$. Pri teh vzorcih je bilo v komentarju citološkega sedimenta (mikroskop) navedeno, da so bili opaženi eritrociti (posamezni, maloštevilni, številni) ali posamezne mezotelijske celice. 15 vzorcev (11 %) je imelo parameter HF večji od $0,1 \times 10^9/l$. Tukaj pa je bilo v komentarju citološkega sedimenta navedeno, da so bile opaženi eritrociti (posamezni, maloštevilni, številni), mezotelijske celice (posamezne, maloštevilne, številne), posamezne skupine atipičnih celic, sumljivih kot maligne, reaktivne mezotelijske celice. Tudi pri 11 vzorcih, ki so bili izključeni iz primerjave, so bili 3 vzorci, pri katerih je analizator izmeril povišano število levkocitov (nad $4,8 \times 10^9/l$). Vsi so imeli poleg rezultata opozorilo, dva sta imela tudi parameter HF nad $0,1 \times 10^9/l$ in opažene limfomske celice v citološkem sedimentu. En vzorec pa je še posebno izstopal, analizator je

namreč preštel $8,2 \times 10^9/l$ levkocitov, poleg izdal opozorilo * (možni moteči delci, ki motijo analizo), HF-parameter je bil pod $0,1 \times 10^9/l$. Pod mikroskopom pa je bilo prešteti le za $0,1 \times 10^9/l$ levkocitov, v komentarju vzorca pa je bilo navedeno, da je punktat gnojnega videza, nesmrdeč in da v citološkem sedimentu ni bilo prisotnih levkocitov. Tukaj je lepo opazen primer, kako dobro analizator opozori na moteče delce in je treba preveriti njegove rezultate. Za spremljanje uporabnosti in pravilnosti opozoril analizatorja bi bilo treba opraviti še več patoloških vzorcev. Na podlagi le-teh bi lahko dejansko ocenili, kdaj pripraviti citološki sediment. Programska oprema analizatorja pa omogoča tudi, da si uporabnik sam določi mejne (angl. cut-off) vrednosti med koncentracijo levkocitov in koncentracijo celic v parametru TC, torej, kdaj naj bi rezultate analizatorja preverjali še z diferenciacijo v citološkem sedimentu.

6. SKLEPI

1. Primerjava dveh metod štetja celic v punktatih, z analizatorjem Sysmex XN-1000 in s pomočjo mikroskopa, je pokazala, da je v večini analiz avtomatska metoda štetja zelo primerljiva z mikroskopsko metodo.
2. Avtomatizirana metoda daje natančne rezultate, vendar nekoliko slabše pri absolutnih vrednostih polimorfonuklearnih levkocitov, toda povsem primerljive s predhodno študijo gospe Fleming s sodelavci (10), kjer so prav tako kot mi ugotovili, da variabilnost pada z naraščajočo koncentracijo celic.
3. Avtomatizirana metoda daje nekoliko slabše rezultate točnosti pri absolutnih vrednostih levkocitov, tako polimorfonuklearnih kot tudi mononuklearnih. Treba pa je tudi vedeti, da bi bila točnost analizatorja lahko boljša z doslednim rokovanjem in shranjevanjem kontrolnih vzorcev.
4. Avtomatizirana metoda v povprečju prešteje manjše število levkocitov v punktatu kot mikroskopska metoda v vseh koncentracijskih območjih, v katerih smo jo primerjali (levkociti absolutno, levkociti do $1,0 \times 10^9/l$ in levkociti nad $1,0 \times 10^9/l$), je z njo primerljiva, razlike so majhne in klinično nepomembne.
5. Rezultati diferencialne slike levkocitov kažejo na odlično ujemanje metod.

Primerjava metod potrjuje rezultate predhodnih študij na analizatorju Sysmex XN-1000 Fleminga s sodelavci (10) in Zimmermanna s sodelavci (14) na analizatorju Sysmex XE-5000.

7. LITERATURA

1. McBride JL: Textbook of urinalysis and body fluids: A Clinical Approach. Lippincott Williams Publishers, Philadelphia 1998; 15–20, 230–247.
2. King Strasinger S, Schaub Di Lorenzo M: Urinalysis and body fluids, 5th Edition. F.A.Davis Company, Philadelphia 2008: 211–234.
3. Božnar Alič E, France-Štiglic A: Osnovne biokemične in citološke preiskave punktatov telesnih votlin, Zbornik predavanj, Slovensko združenje za Klinično kemijo 2013.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute: Body Fluid Analyses for Cellular Composition. Proposed Guideline. vol.25, No.20, H56-p, 2006.
5. Tomoko K, Shigeyoshi Y, Satoshi Y: Clinical case report, XE-5000 / XT-4000i, Sysmex XN-Series, Osaka City University Hospital.
6. Matshusita H, Nakazawa N, Gondo K, Tanaka Y: Clinical case report, vol. 3. Sysmex XN-Series, Tokai University Hospital.
7. SOP LAST: Določanje številčne koncentracije levkocitov v PTV, CAPD in BAL, (velja od 22. 4. 2010), dostopano na interni mreži UKC Ljubljana, <http://ukcl.biart.si/.lin>.
8. Kjeldsberg CR, Knight JA: Laboratory examination of amniotic, cerebrospinal, seminal, serous and synovial fluids, 3rd Edition, American Society of Clinical Pathologists, Chicago 1993; 65–156.
9. McGing P, O'Kelly R: The Biochemistry of Body Fluids, 1st ed. Association of Clinical Biochemists in Ireland 2009; 11–20.
10. Fleming C, Brouwer R, Lindemans J, de Jonge R: Validation of the body fluid module of the new Sysmex XN-1000 for counting blood cells in cerebrospinal fluid and other body fluids. Clin Chem Lab Med 2012; 1791–1798.
11. Tanada H, Ikemoto T, Masutani R, Tanaka H, Takubo T: Evaluation of the automated hematology analyzer Advia 120 for cerebrospinal fluid analysis and usage of unique hemolysis reagent. International Journal of Laboratory Hematology 2013; 36: 83–91.
12. Aune MW, Becker JL, Brugnara C, Canfield W, Dorfman DM, Fiehn W: Automated flow cytometric analysis of blood cell in cerebrospinal fluid. Am J Clin Pathol 2004; 121: 690–700.
13. Kleine TO, Nebe CT, Löwer C, Geilenkeuser WJ, Dorn-Beineke A: Cell Analysis in Cerebrospinal Fluid (CSF) Using Sysmex Hematology Analyzers XT-4000i and XE-5000. Citometry Part A 2012; 81A: 255–264.

14. Zimmermann M, Ruprecht K, Kainzinger F, Heppner FL, Weimann A: Automated vs. Manual cerebrospinal fluid cell counts: a work and cost analysis comparing the Sysmex XE-5000 and the Fuchs-Rosenthal manual counting chamber. *Int Jnl Lab Hem* 2011; 33: 629–637.
15. Introduction to Flow Cytometry: A Learning guide, BD Biosciences, San Jose, 2000.
16. Brown M, Wittwer C: Flow cytometry: Principles and clinical applications in hematology. *Clinical Chemistry*, Vol. 45, No.8, 2000: 1221–1229.
17. Lajovic J: Ujemanje metod merjenja-praktični pristop. *Revija ISIS*, 2010; 1318- 0193.
18. Bland JM, Altman DG: Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *The Lancet*, 1986; 307–310.
19. Petersen PH, Stöckl D, Blaabjerg O, Pedersen B, Birkemose E, Thienpont L, Flensted Lassen J, Kjeldsen J: Graphical interpretation of analytical data from comparison of a field method with a Reference Method by use of difference plots. *Clinical Chemistry* 43:11, 1997; 2039–2046.
20. De Jonge R, Brouwer R, de Graaf MT, Luitwieler RL, Fleming C, de Frankrijker-Merkestijn M: Evaluation of the new body fluid mode on Sysmex XE-5000 for counting leukocytes and erythrocytes in cerebrospinal fluid and other body fluids. *ClinChem Lab Med* 2010; 48:665–75.
21. Ziebig R, Lun A, Sinha P: Leukocyte Counts in Cerebrospinal Fluid with the automated Hematology analyzer CellDyn 3500 and the Urine Flow Cytometer UF-100. *Clinical Chemistry* 2000; 242–247.
22. Statistična ocena podatkov, program MedCalc® Software, Različica 11. 4. 2. 0, <http://www.medcalc.be>.

8. VIRI SLIK

1. <http://www.charlestonpulmonology.com>; dostopano: 24. 3. 2015
2. <http://www.mtg-de.com/products/ivf-icsi/disposables-and-small-devices>; dostopano: 24. 3. 2015
3. <http://forum-svt.ac-toulouse.fr/>; dostopano: 24. 3. 2015
4. <https://www.sysmex.com>; dostopano: 24. 3. 2015
5. http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteka/KB/Gradivo/PC_gradivo_BMA.pdf; dostopano: 24. 3. 2015
6. http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteka/KB/Gradivo/PC_gradivo_BMA.pdf; dostopano: 24. 3. 2015