

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LIDIJA PUŠNIK

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJ
LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LIDIJA PUŠNIK

**DOLOČANJE DELEŽA FRAGMENTIRANIH
ERITROCITOV Z MIKROSKOPSKIM PREGLEDOM
KRVNEGA RAZMAZA IN HEMATOLOŠKIM
ANALIZATORJEM**

**QUANTIFICATION OF FRAGMENTED RED BLOOD
CELLS BY THE AUTOMATED HEMATOLOGY
ANALYZER AND MICROSCOPIC DETERMINATION**

MAGISTRSKI ŠTUDIJ
LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2016

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

ZAHVALA

Mentorici izr.prof. dr. Heleni Podgornik, univ. dipl. kem. inž., spec. med. biokem. se iskreno zahvaljujem za vse vzpodbudne besede, strokovno usmerjanje pri izdelavi magistrske naloge in da mi je omogočila opravljanje naloge v našem laboratoriju.

Iskrena hvala mojim sodelavcem, Katarini, Tadeju, Špeli, Hermini za vso podporo, za vzpodbudne besede in pomoč v času opravljanja magistrske naloge. Hvala Karmen, Ivani, Alenki in Nataliji ter ostalemu kolektivu za pomoč pri zbiranju testnih vzorcev in izvedbi vseh potrebnih analiz.

Zahvaljujem se mag. Nadi Snoj, spec.med.biok., ter 24-urnemu laboratoriju – KIKKB, dr. Alenki Trampuš Bakija, univ. dipl. biol., spec. med. biokem., ter Službi za specialno laboratorijsko diagnostiko (SSLD), Pediatrične klinike za prijaznost in vse opravljene analize.

Veliki HVALA Mitju, ki me je skozi študij vzpodbujal, me poslušal in mi vlival moči me razumel in bil potrpežljiv, mojima puncama za radoživost, veselje in smeh, staršem in sestri za vso podporo in vodenje skozi življenje in še posebej moji mami, ki me je naučila živeti in bi bila ponosna name. HVALA.

IZJAVA

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

Ljubljana, marec 2016

Lidija Pušnik

Predsednica komisije za zagovor: prof. dr. Janja Marc, mag. farm., spec. med. biokem.

Mentor:izr. prof. dr. Helene Podgornik univ. dipl. kem. inž., spec. med. biokem.

Član komisije za zagovor: doc. dr. Simon Žakelj, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

1. UVOD.....	1
1.1. ERITROCITI	1
1.1.1. Morfološke spremembe eritrocitov	3
1.2 SHIZOCITI.....	3
1.2.1 Določanje shizocitov	4
1.2.2 Določanje shizocitov po novih priporočilih ICSH.....	5
1.3. SHIZOCITI PRI MIKROANGIOPATIČNI HEMOLITIČNI ANEMIJI.....	9
1.3.1 Trombotična trombocitopenična purpura (TTP) in hemolitično uremični sindrom (HUS)	9
1.3.2 Shizociti pri TTP	11
1.4 POVEZAVA MED PARAMETROM FRC TER SHIZOCITI	12
2. NAMEN DELA.....	14
3. MATERIALI IN METODE	15
3.1 OBRAVNAVANI VZORCI	15
3.2 DOLOČANJE FRAGMENTIRANIH ERITROCITOV NA HEMATOLOŠKEM ANALIZATORJU	16
3.2.1 Določanje parametra FRC in parametra HIPO-He na hematološkem analizatorju	16
3.2.2 Reagenti in kontrole	18
3.2.3 Mikroskopski pregled krvnega razmaza	18
3.2.3.1 Material in oprema.....	18
3.2.3.2. Reagenti	19
3.2.3.3 Izdelava in barvanje krvnega razmaza.....	19
3.3 STATISTIČNE METODE	21
4. REZULTATI Z RAZPRAVO	22
4.1 MIKROSKOPSKO DOLOČANJE SHIZOCITOV	22
4.1.1 Določanje shizocitov v skladu s priporočili ICSH	22
4.1.2 Mikrosferociti	23
4.1.3 Poikilocitoza	25
4.1.4 Tehnično neprimerni preparati	29

4.2 PRIMERJAVA DOLOČITVE SHIZOCITOV Z RUTINSKO METODO IN V SKLADU S PRIPOROČILI.....	30
4.2.1 Natančnost določanja shizocitov z obema metodama	33
4.3 ZAZNAVANJE FRAGMENTIRANIH ERITROCITOV S HEMATOLOŠKIM ANALIZATORJEM	35
4.4 PRIMERJAVA VREDNOSTI PARAMETRA FRC Z MIKROSKOPSKO DOLOČITVIJO SHIZOCITOV	36
4.5 POVEZAVA MED FRC, SHIZOCITI IN PARAMETRI ERITROCITNE KRVNE SLIKE	40
4.6 DOLOČANJE SHIZOCITOV Z METODO PO PRIPOROČILIH ICSH PRI TREH SKUPINAH BOLNIKOV	44
4.6.1 Določanje fragmentiranih eritrocitov pri skupini bolnikov s TTP	46
4.6.2 Določitev mejne vrednosti za delež shizocitov pri bolnikih s TTP.....	47
5. ZAKLJUČEK	50
6. LITERATURA	51

KAZALO SLIK

Slika 1: Stopnje dozorevanja eritroblastov do eritrocita.....	2
Slika 2: A) Rouleaux formacije eritrocitov. B) Shizociti v razmazu krvi (1000x povečava).	6
Slika 3: A) Področje z ustrezno gostoto eritrocitov za vrednotenje shizocitov (400x povečava). B) Tehnično slab preparat neprimeren za vrednotenje shizocitov (100x povečava).	6
Slika 4: Shizociti ter mikrosferociti v razmazu krvi (1000x povečava).	8
Slika 5: Diagnostični algoritem določanja shizocitov v razmazu krvi pri sumu na TMA po priporočilih ICSH (Prirejeno po 3).....	11
Slika 6: Razsevni diagram retikulocitnega kanala pri analizatorju Sysmex XN-1000 (15).17	
Slika 7: Razmaz venske krvi s shizociti (1000x povečava). A) Shizociti in mikrosferociti. B) Shizociti, mikrosferociti ter poikilocitoza.	22
Slika 8: A) Razsevni diagram retikulocitnega kanala. B) Razmaz venske krvi z mikrosferociti (1000x povečava) (Primer 49, Priloga I).	23
Slika 9: A) Razsevni diagram retikulocitnega kanala. B) Shizociti v razmaz venske krvi (1000x povečava) (Primer 174, Priloga).	24
Slika 10: Razsevni diagram retikulocitnega kanala.....	25
Slika 11: Razmaz venske krvi (1000x povečava). A) Številčni shizociti. B) Mikrosferociti (Primer 149, Priloga I).	25
Slika 12: Razsevni diagram retikulocitnega kanala.....	26
Slika 13: Shizociti v razmazu venske krvi s poikilocitozo (1000x povečava).	26
Slika 14: Razsevni diagram retikulocitnega kanala.....	27
Slika 15: Poikilocitoza v razmazu krvi (1000x povečava) (Primer 129, Priloga I).....	27
Slika 16: Razsevni diagram retikulocitnega kanala.....	28
Slika 17: Poikilocitoza v razmazu venske krvi (1000x povečava) (Primer 51, Priloga I). .	28
Slika 18: Neprimerni preparati za določanje shizocitov (1000x povečava). A) Napaka v predanalitski fazi. B) Tehnično slabo izdelan preparat.	29
Slika 19: Določitev shizocitov z rutinsko metodo in v skladu s priporočili ICSH. A) Korelacija med metodama. B) Porazdelitev vrednosti mediane obeh metod (N=179).	31
Slika 20: Določanje shizocitov z rutinsko metodo in v skladu s priporočili ICSH. A) Bland-Altmanov diagram. B) Diagram prepognjene empirične kumulativne porazdelitve deleža shizocitov (N=179).	32

Slika 21: Vzorci z največjim odstopanjem v določitvi deleža shizocitov (modra - rutinska metoda, zelena – nova metoda).	32
Slika 22: Primerjava določitve shizocitov A) FRC in rutinsko določeni shizociti. B) FRC in shizociti določeni z novo metodo (N=179).	38
Slika 23: Primerjava parametra FRC z deležem shizocitov, določenim z rutinsko ter novo metodo. Diagram prepognjene empirične kumulativne porazdelitve (N=179).	38
Slika 24: Primerjava določitve parametra FRC in shizocitov določenimi z novo metodo vzorcev, kjer je delež shizocitov med 0,5-1,5%	39
Slika 25: Podcenitev parametra FRC pri bolnikih z deležem shizocitov določenim z novo metodo > 3%	41
Slika 26: Porazdelitev vrednosti mediane za parameter RDW pri preiskovancih z A) deležem shizocitov manj ter več kot 0,2% ter B) deležem shizocitov manj ter več kot 1% (N=272).	43
Slika 27: Porazdelitev vrednosti mediane za parameter MCV pri preiskovancih z deležem shizocitov manjšim ter večjim kot 1% (N=272).	44
Slika 28: Število vzorcev glede na skupine preiskovancev (N=272).	44
Slika 29: Število vzorcev glede na diagnozo pri skupini bolnikov s pretežno hematološkim obolenjem (N=179).	45
Slika 30: Spremljanje številčne koncentracije trombocitov (modra) in delež shizocitov z rutinsko metodo (rdeča) ter z novo metodo (zelena) pri bolnikih s TTP zdravljenih s plazmaferezami. A) Bolnica 1A- 6A. B) Bolnik 1B- 6B (Priloga I, Preglednica XIII).	47
Slika 31: ROC krivulja za zaznavanje TTP. A) Mejna vrednost za TTP pri mikroskopski določitvi shizocitov. B) Mejna vrednost za parameter FRC (N=179).	48

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Mejne vrednosti shizocitov pri zdravih in pri različnih bolezenskih stanjih (Povzeto po 3).	5
Preglednica II: Natančnost rezultatov v odvisnosti od celokupno prešteti shizocitov po Rümkeju (Prirejeno po 3).	8
Preglednica III: Primerjava določitve shizocitov glede na metodo pri skupinah krvnih bolnikov (N=179).	30
Preglednica IV: Rezultat ponovljivosti določanja shizocitov z rutinsko in novo metodo. .	33
Preglednica V: Ovrednotenje opozoril na FRC analizatorja Sysmex XN-1000 (N=233)...	35
Preglednica VI: Primerjava rezultatov določitve deleža parametra FRC z literaturnimi navedbami (17).	36
Preglednica VII: Primerjava določitve shizocitov z rutinsko metodo, metodo po priporočilih ICSH ter avtomatizirano FRC (N=179).	37
Preglednica VIII: Delež FRC pri vzorcih, kjer analizator ni določil RDW (N=5).	42
Preglednica IX: Delež shizocitov pri treh skupinah preiskovancev.	45
Preglednica X: Delež shizocitov pri preiskovancih v s TTP določen z obema metodama (N=24).	46
Preglednica XI: Določitev mejnih vrednosti za FRC in shizocite.	49
Preglednica XII: Rezultati določitve shizocitov s hematološkim analizatorjem ter mikroskopsko določitvijo z standardno in novo metodo pri preiskovancih v skupini hematoloških bolnikov.	55
Preglednica XIII: Rezultati določitve shizocitov s hematološkim analizatorjem ter mikroskopsko določitvijo z standardno in novo metodo pri preiskovancih z diagnozo TTP.	60
Preglednica XIV: Rezultati določitve shizocitov s hematološkim analizatorjem ter mikroskopsko določitvijo z novo metodo pri preiskovancih v skupini otrok.	61
Preglednica XV: Rezultati določitve shizocitov s hematološkim analizatorjem ter mikroskopsko določitvijo z novo metodo pri preiskovancih v skupini novorojenčkov.	62

POVZETEK

Shizocite najdemo v periferni krvi pri različnih bolezenskih stanjih. Določitev deleža shizocitov sodi med urgentne preiskave pri odkrivanju in potrditvi trombotične trombocitopenične purpure (TTP). Zlati standard za določitev shizocitov je mikroskopski pregled krvnega razmaza. Na tržišču obstajata dva hematološka analizatorja, ki omogočata kvantitativno določitev parametra FRC (delež fragmentiranih eritrocitov). Metoda določitve deleža shizocitov v razmazu krvi ni bila standardizirana, zato so leta 2008 ustanovili mednarodno delovno skupino v okviru mednarodnega komiteja za standardizacijo v hematologiji (ICSH), ki je pripravila priporočila za kvantitativno določitev shizocitov in jih leta 2012 tudi objavila.

Shizocite smo določali pri 272 vzorcih v skupini preiskovancev s krvno boleznijo, skupini novorojenčkov ter skupini otrok. Namen naše magistrske naloge je bil uskladiti mikroskopsko določitev shizocitov s priporočili ICSH, ki bi nadomestila rutinsko metodo, in ugotoviti diagnostično občutljivost ter diagnostično specifičnost analizatorja za določitev parametra FRC. Zanimala nas je natančnost rutinske in nove metode. Naredili smo ponovljivost določitve shizocitov z rutinsko metodo, kjer so odstotek shizocitov določale 3 različne osebe, ter ponovljivost določanja shizocitov z novo metodo, kjer je odstotek shizocitov določala ena oseba. Ponovljivost je bila slaba tako pri eni kot pri več različnih osebah ne glede na metodo, ker je ocena shizocitov vendarle subjektivna. Ponovljivost določitve shizocitov z novo metodo je bila boljša od ponovljivosti določitve shizocitov z rutinsko metodo. Primerjava vrednosti parametra FRC s shizociti določenimi z rutinsko metodo je pokazala, da je bil delež FRC na analizatorju za 1,5% večji kot pri mikroskopski določitvi shizocitov, ter 0,6% večji od rezultatov dobljenih z metodo po priporočilih ICSH. Z novo metodo so vrednosti FRC bližje deležu shizocitov. Analiza opozoril analizatorja na fragmentirane eritrocite je pokazala, da je diagnostična občutljivost analizatorja 95%, specifičnost 57%, lažno negativnih rezultatov je bilo manj kot 2%, negativna napovedna vrednost pa 95%, kar pomeni, da lahko parameter FRC uporabljamo kot presejalni test. Za analizator smo določili mejno vrednost za $FRC > 0,49\%$, ob prisotnosti opozoril analizatorja na nenormalno porazdelitev eritrocitov ter trombocitov, določitev FRC ni zanesljiva. Zato je smiselno upoštevati parameter HIPO-He, da se specifičnost FRC poveča.

Pri treh opazovanih skupinah preiskovancev smo določili najvišjo vrednost mediane pri skupini novorojenčkov, kjer je znašala 0,85%, mediana pri skupini otrok je bila 0,65% in pri skupini preiskovancev s krvnimi boleznimi 0,7%.

Najvišjo vrednost smo določili pri pacientu s TTP, kjer je znašala 26,0%. Najvišja vrednost shizocitov v skupini otrok je bila 4,0%, v skupini novorojenčkov pa 3,8%. Določili smo tudi mejno vrednost mikroskopske določitve shizocitov pri bolnikih s TTP, ki je znašala >1,1%. Ugotovili smo, da je nova metoda natančnejša in bolj točna, in lahko služi za spremljanje dinamike bolezni pri bolnikih s TTP med samim zdravljenjem.

Ključne besede: Shizociti, fragmentirani eritrociti, krvni razmaz, trombotična trombocitopenična purpura, ICSH.

ABSTRACT

Schistocytes are found in peripheral blood in various diseases. The determination of schistocyte percentage is part of emergency tests used for the detection and confirmation of thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). A microscopic examination of patient's blood smear serves as the gold standard for schistocyte determination. Two hematological analyzers are available on the market which enable quantitative determination of percentage of fragmented red blood cells given as research parameter FRC . The method which has been used for schistocytes, determination in blood smears had not been standardized. Therefore, an international work group was established in 2008 within the scope of the International Council for Standardization in Hematology (ICSH), which prepared the recommendations for quantitative schistocyte determination and published them in 2012.

In the present study, schistocytes were determined in 272 samples collected from a group of subjects with hematological diseases, a group of newborn babies, and a group of children. The purpose of this master's thesis was to harmonize microscopic schistocyte determination with ICSH recommendations in order to replace the routine method, and to establish the sensitivity and specificity of the analyzer for schistocytes based on FRC. The objective was to determine the precision of both the routine method and the new method. Repeatability of the routine and the new method was also established. Regardless of the method, repeatability was found to be low, because schistocyte determination is subjective. However, the repeatability of schistocyte determination using the new method was still better than using the routine method.

A comparison of the FRC parameter's value with schistocyte % using the routine method showed that the FRC percentage was 1.5% higher than the results obtained by microscopic schistocyte determination and 0.6% higher than those obtained by the method based on ICSH recommendations. The FRC values were closer to the actual schistocyte percentage obtained by the new method. An analysis of analyzer warnings indicating the presence of fragmented red blood cells showed that the diagnostic sensitivity of the analyzer was 95% and its specificity was 57%; there were also fewer than 2% false negative results and the negative predictive value was 95%, which means that the FRC parameter can be used as a screening test. The analyzer's limit value was determined at $FRC > 0.49\%$. In the presence of flags which alert to abnormal red blood cell and platelet distributions, FRC

determination is unreliable. Therefore, it makes sense to use the HIPO-He parameter to increase FRC specificity. For the three observed groups of subjects, the maximum median value was determined for the group of newborn babies 0.85%; the median for the group of children was 0.65% and for the group of subjects with blood diseases it was 0.7%. The maximum value was 26.0% determined in a TPP patient . The maximum value of schistocytes for the group of children was 4.0%, and for the group of newborn babies 3.8%. The limit value of microscopic schistocyte determination in TPP patients was also established to be >1.1%. It was found that the new method had a higher degrees of precision and accuracy and may be used for monitoring the dynamics of the disease in TTP patients during treatment.

Key words: Schistocytes, red blood cells fragment, blood smear, thrombotic thrombocytopenic purpura, ICSH.

SEZNAM OKRAJŠAV

ICSH	Mednarodni svet za standardizacijo v hematologiji (angl. The International Council for Standardization in Hematology (ICSH))
FRC	parameter za določitev fragmentiranih eritrocitov na analizatorju
DNA	deoksiribunukleinska kislina
RNA	ribonukleinska kislina
DIK	disemenirana intravaskularna koagulacija
TMA	mikroangiopatična hemolitična anemija
TTP	Trombotična trombocitopenična purpura
HUS	hemolitični uremični sindrom
ADAMTS-13	(ang. A disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13)
vWf	von Willebrandov faktor
K₂EDTA ali K₃EDTA	di- ali trikalijeve sol etilendiamintetraocetne kisline
DKS	diferencialna krvna slika
MCV	povprečni volumen eritrocitov (angl. Mean corpuscular volume)
RDW	koeficient variacije volumna eritrocitov (angl. Red blood cell distribution width)
HIPO-He	delež hipokromnih eritrocitov z vsebnostjo hemoglobina <17pg
Hb	hemoglobin

1. UVOD

Fragmentirane eritrocite (FRC) oz. shizocite najdemo v periferni krvi pri določenih bolezenskih stanjih, v manjši meri lahko tudi fiziološko. Zlati standard določanja shizocitov je mikroskopski pregled krvnega razmaza. Na tržišču pa so se v zadnjem obdobju pojavili tudi hematološki analizatorji, ki omogočajo hitro ter enostavno kvantitativno določitev shizocitov v periferni krvi. Načini določanja se razlikujejo glede na proizvajalca analizatorja.

Ker kvantitativno določanje shizocitov v krvnem razmazu ni bilo standardizirano je Mednarodni svet za standardizacijo v hematologiji (The International Council for Standardization in Haematology (ICSH)) leta 2012 izdal strokovna priporočila za določanje shizocitov v krvnem razmazu (1).

1.1. ERITROCITI

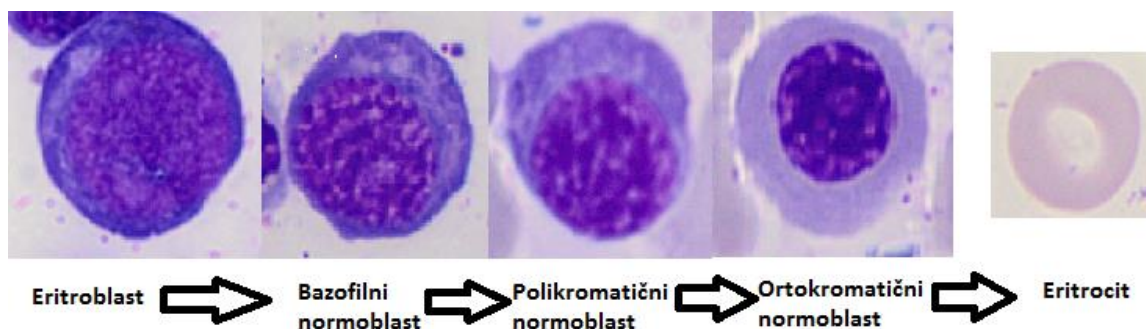
Eritrociti so zrele celice rdeče vrste velikosti med 7 in 8 μm in so bikonkavne oblike imenovane diskocit. Njihova glavna sestavina je hemoglobin, ki predstavlja 98% vseh beljakovin v citoplazmi eritrocita. Poglavitna naloga eritrocitov je prenos kisika iz pljuč v tkiva, sodelujejo pa tudi pri transportu ogljikovega dioksida iz tkiv (2).

Kot vse druge krvne celice tudi eritrociti nenehno nastajajo in propadajo. Njihova življenjska doba je med 100 in 120 dni, njihovo število pa mora biti nenehno v fizioloških mejah. Pri zdravih ljudeh je okvirno referenčno območje številčne koncentracije eritrocitov 4,32 do 5,66 $\times 10^{12}/\text{L}$ pri moških ter 3,88 do 4,99 $\times 10^{12}/\text{L}$ pri ženskah (**Priloga I**). Kadar je prisotno določeno bolezensko stanje, je lahko število eritrocitov povečano nad zgornjo mejno vrednostjo, takrat govorimo o eritrocitozi. Pri zmanjšani številčni koncentraciji govorimo o anemiji.

Eritrociti nastajajo v procesu eritropoeze iz krvotvorne matične celice usmerjene v rdečo vrsto, kjer potekata dva procesa hkrati: delitev (proliferacija) in dozorevanje (diferenciacija). Razvoj poteka po naslednjih stopnjah: pronormoblast, bazofilni normoblast, polikromatični normoblast, ortokromatični normoblast, retikulocit, eritrocit (**Slika 1**). Delitev eritroblastov poteka do stopnje ortokromatičnega normoblasta, ki pa ni več sposoben sinteze DNA in zato tudi ne delitve. Ko popolnoma dozori, izloči jedro in

nastane nezreli eritrocit, ki ga imenujemo retikulocit (2). Retikulocit je multilobularna celica s povprečnim volumnom 140 fL. Delež retikulocitov lahko določamo v krvnem razmazu obarvanem s supravitalnim barvanjem. Pri supravitalnim barvanju so ostanki ribosomov vidni kot mrežica. Retikulociti še nekaj časa ostanejo v kostnem mozgu, nato prehajajo v kri, kjer po enem do dveh dneh dozore v zrele eritrocite, bikonkavne oblike s povprečnim volumnom 90 fL. Membrana eritrocitov je močno upogljiva, kar omogoča eritrocitom neoviran prehod skozi kapilare in je odporna proti strižnim silam (3). V normalnih okoliščinah število eritrocitov v krvi uravnava hormon eritropoetin.

To je glikoprotein z molekulsko maso 36 kDa. Nastaja predvsem v ledvicah kot odgovor na tkivno hipoksijo. Eritropoetin povzroči v kostnem mozgu delitev usmerjenih matičnih celic rdeče vrste in njihovo dozorevanje v eritroblaste, hkrati pa tudi skrajša čas njihovega dozorevanja (2).



Slika 1: Stopnje dozorevanja eritroblastov do eritrocita.

Ko eritrociti ostare jih makrofagi retikuloendotelijskega sistema v vranici fagocitirajo. Pri tem se sproščeni hemoglobin razgradi v hem in globin. Aminokisliline, ki se pri proteolizi hemoglobina sprostijo, se porabijo za sintezo drugih beljakovin. Protoporfirinski obroč se najprej odpre in nato reducira v bilirubin. Pri cepitvi protoporfirinskega obroča se sprosti železo, ki se uskladišči v feritinu. Bilirubin iz makrofagov prehaja v kri, kjer se veže na serumski albumin (nekonjugirani ali indirektni bilirubin). V jetrih prehaja iz plazme v jetrne celice, kjer se konjugira predvsem z glukuronsko kislino in postane vodotopen (konjugirani ali direktni bilirubin). Slednjega jetrne celice izločijo v žolč. V debelem črevesju ga bakterije reducirajo v urobilinogen. Večji del urobilinogena se izloči z blatom, del pa se ga resorbira in ponovno izloči v žolč. Nekaj se ga izloči tudi s sečem (2).

1.1.1. Morfološke spremembe eritrocitov

Morfološko spremenjene eritrocite najdemo pri različnih bolezenskih stanjih. Morfološko se eritrociti lahko razlikujejo v obliki, velikosti in obarvanosti. Kadar so v krvi prisotne različne velikosti eritrocitov, govorimo o anizocitozi. Po velikosti ločimo eritrocite na:

- Normociti - normalni eritrociti velikosti med 7-8 μm
- Mikrociti - premer eritrocitov $\leq 6 \mu\text{m}$
- Makrociti - premer eritrocitov je $\geq 9 \mu\text{m}$
- Megalociti - zelo veliki eritrociti s premerom 10-12 μm

V krvi so lahko hkrati prisotne različne oblike eritrocitov in govorimo o poikilocitozi. Po obliki eritrocite ločimo na: ehinociti, akantociti, fragmentirani eritrociti ali shizociti, eliptociti, sferociti, tarčasti eritrociti ali kodociti, solzasti eritrociti ali dakriociti, stomatociti in srpasti eritrociti ali drepanociti.

Pri spremembah v obarvanosti eritrocitov ločimo hipokromne eritrocite, ki so zmanjšano obarvani. Osrednja svetlina je večja od tretjine premera eritrocita. Anulociti ali leptociti so eritrociti, ki imajo zelo zmanjšano količino hemoglobina in zato obarvan le ozek rob citoplazme. Polikromatični eritrociti so v krvnem razmazu večji in temneje obarvani od zrelih eritrocitov in brez osrednje svetline. To so najmlajši retikulociti, ki vežejo tudi bazična barvila, ne le kislega eozina (4).

1.2 SHIZOCITI

Beseda shizocit izhaja iz grške besede »schisto« kar pomeni zlomljen. Shizociti so odtrgani deli eritrocitov, ki nastanejo zaradi mehanske poškodbe eritrocitov, največkrat zaradi fibrinskih vlaken, nastalih pri intravaskularni hemolizi. So manjši od nepoškodovanih eritrocitov, majhni delci so lahko različnih oblik, včasih z ostrimi koti (trikotniki), v obliki polmeseca, ali čelade (t. i. keratociti). Običajno so temno obarvani, lahko pa tudi svetleje zaradi izgube hemoglobina, pri poškodbi (1,6). Shizociti nastanejo pri določenih obolenjih, ki so posledica prirojenih in pridobljenih napak v eritrocitih (talasemija, hereditarna poikilocitoza), motnjah eritropoeze (megaloblastna anemija), zaradi intravaskularne

mehanske poškodbe (TMA, umetna srčna zaklopka), primarni mielofibrozi, raku z napredovanimi metastazami, ter pri opeklinah. Pri opeklinskih stanjih v razmazu krvi prevladujejo mikrosferociti in manjši fragmenti eritrocitov (1,5,6). Ob nastanku eritrocitnih fragmentov se tvorijo t.i. mikrovezikli, ki se sproščajo s celične površine in delujejo aterogeno in trombotično. Cirkulirajoči mikrovezikli povečujejo tveganje za nastanek srčno žilnih obolenj, ki nastanejo kot posledica hipertenzije in hiperholesteremije (3).

1.2.1 Določanje shizocitov

Zlati standard za določanje shizocitov je mikroskopski pregled krvnega razmaza. Na tržišču so na voljo novejši hematološki analizatorji, ki poleg določitve vseh parametrov krvne slike omogočajo kvantitativno določitev fragmentiranih eritrocitov v krvi izraženi v relativni (%) ter absolutni vrednosti ($10^{12}/L$). Parameter FRC je zaenkrat namenjen v raziskovalne namene.

Vrednotenje shizocitov v razmazu krvi ni bilo standardizirano. Kriteriji za oceno so slabo definirani in zahtevajo veliko izkušenj ter znanja s strani ocenjevalca. Kljub temu gre vselej tudi za subjektivno oceno. Pri vrednotenju lahko pride do napake v prepoznavanju in uvrščanju shizocitov, ter do napak zaradi neenakomerne razporeditve eritrocitov, kar vpliva na točnost in natančnost rezultatov. V letu 2008 je bila ustanovljena delovna skupina Mednarodnega sveta za standardizacijo v hematologiji (The International Council for Standardization in Haematology (ICSH)), ki je natančno opredelila morfološka merila za prepoznavanje, razvrstitev ter štetje shizocitov, priporočila pa so izšla leta 2012 (1).

Pri zdravih ljudeh je odstotek shizocitov praviloma manjši kot 0,2%. Ker pa se vrednosti lahko znatno razlikujejo, širše usklajenih referenčnih vrednosti za shizocite ni. Avtorji Burns, Lou in Pathak so v letu 2004 podali mejne vrednosti shizocitov v periferni krvi, ki so prikazane v spodnji preglednici. V letu 2007 so Lesesve, Salignac ter Lecompte postavili zgornjo mejo 0,19% pri 119 zdravih preiskovancih (1,5).

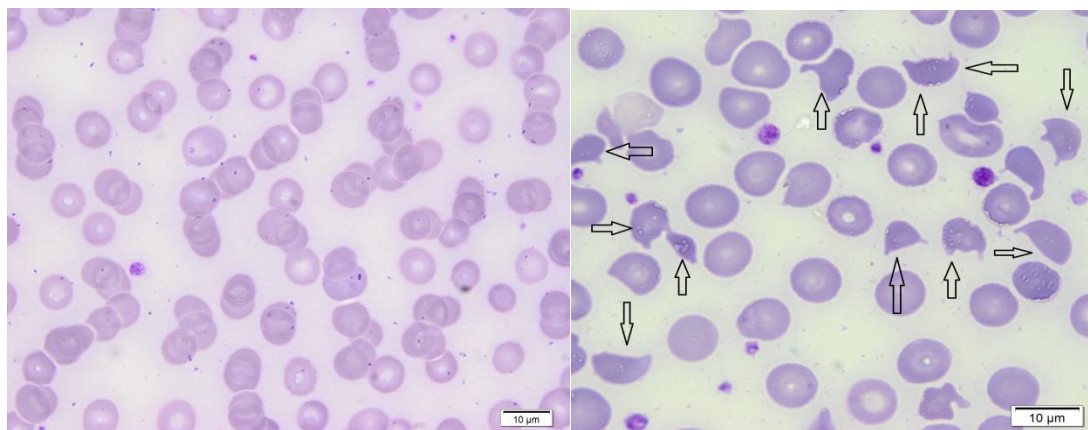
Delež shizocitov pa je povečan pri nekaterih fizioloških in različnih bolezenskih stanjih. Mediana pri nedonošenčkih je 1,70% (0,90-2,45), pri DIC-u 0,70%, pri raku 0,48%, pri TTP/ HUS 2,45% in pri kronični ledvični odpovedi 0,9%. Ob prisotnosti shizocitov v razmazu krvi s pridruženo poikilocitozo gre verjetneje za drugo hematološko obolenje (7).

Preglednica I: Mejne vrednosti shizocitov pri zdravih in pri različnih bolezenskih stanjih (Povzeto po 3).

Okvirne referenčne vrednosti (%)	
Zdravi	≤0,2
Ledvična odpoved	≤0,6
Preklampsija	≤0,45
Umetna srčna zaklopka	≤0,48
TTP	1,1-9,4
Novorojenčki	1,4-1,9
Nedonošenčki	4,9-5,5

1.2.2 Določanje shizocitov po novih priporočilih ICSH

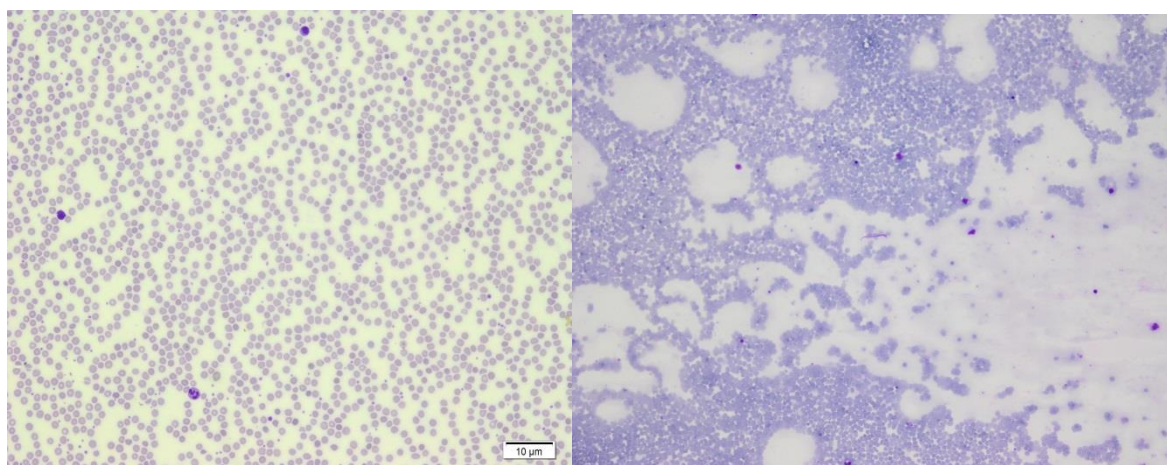
Shizocite štejemo v razmazu krvi izdelanem in pobarvanem po standardiziranem postopku v skladu s priporočili ICSH iz leta 1984, potrjenimi v letu 2005 (1). Shizocitov ne moremo določati v preparatih, ki so tehnično neustrezni (**Slika 3B**). Pri določanju shizocitov po novih priporočilih ICSH najprej pri 100x povečavi poiščemo vidno polje, ter ocenimo kakovost preparata. S 60x povečavo izberemo ustrezno področje za štetje shizocitov. Eritrociti morajo biti enakomerno razporejeni in se ne prekrivajo (**Slika 3A**). Pomembno je oceniti, kakšno populacijo eritrocitov imamo, ali niso prisotne Rouleaux formacije eritrocitov, kajti v tem primeru vrednotenje shizocitov ni mogoče (**Slika 2A**).



A

B

Slika 2: **A)** Rouleaux formacije eritrocitov. **B)** Shizociti v razmazu krvi (1000x povečava).



A

B

Slika 3: **A)** Področje z ustrežno gostoto eritrocitov za vrednotenje shizocitov (400x povečava). **B)** Tehnično slab preparat neprimeren za vrednotenje shizocitov (100x povečava).

Delovna skupina ICSH je natančno opredelila merila za morfološko uvrstitev shizocitov, ter dala natančna navodila glede izbire področja v razmazu, kar še dodatno zmanjša možnost za statistično napako (1). Pri oceni fragmentiranih eritrocitov natančna morfološka merila za določitev shizocitov do izdaje smernic ICSH niso bila opredeljena. V literaturi najdemo različne izraze za shizocite, npr. nepravilno ukrivljeni eritrociti, atipični hiperkromni eritrociti, eritrocitne sence. Shizociti so manjši od normocita ter z nenormalno obliko (**Slika 2B**). Včasih imajo zelo ostre robove v obliki trikotnika, praviloma so obarvani intenzivneje. Intenzivno obarvane eritrocite okrogle oblike, ki so manjši od normocita, imenujemo mikrosferociti (1,5).

Ključne zahteve za mikroskopsko določitev shizocitov v skladu s priporočili ICSH so naslednje (1):

- Za določitev shizocitov je potrebno pod 1000x povečavo prešteti 1000 eritrocitov in podati rezultate v odstotkih.
- Kadar je prisotna trombocitopenija in v razmazu krvi prevladujejo shizociti, lahko pomislimo na prisotnost TMA.
- Potrebno je upoštevati natančna morfološka merila za opredelitev shizocitov. Med shizocite vključimo odtrgane dele eritrocitov, majhne delce različnih oblik, včasih z ostrimi koti (trikotniki). Pozorni moramo biti na shizocite v obliki polmeseca, ki jih moramo razlikovati od drepanocitov (te najdemo pri srpasto celični anemiji). Upoštevamo tudi poškodovane eritrocite, ki so večji od majhnih fragmentov s konkavnim segmentom, imenovane keratociti (celice z rogovi). Med shizocite štejemo tudi t.i. mikrosferocite, ki so manjši od 5 μm ter intenzivno obarvani (**Slika 4**).
- Pomemben diagnostični kriterij za potrditev TTP, je delež shizocitov višji od 1 % vključno s pridruženo klinično sliko.
- Določitev parametra FRC na analizatorju ima visoko negativno napovedno vrednost in nam je lahko v pomoč pri odločitvi za mikroskopsko določitev shizocitov. V primeru prisotne makrocitoze in opozorila analizatorja na fragmentocite je potreben pregled krvnega razmaza.

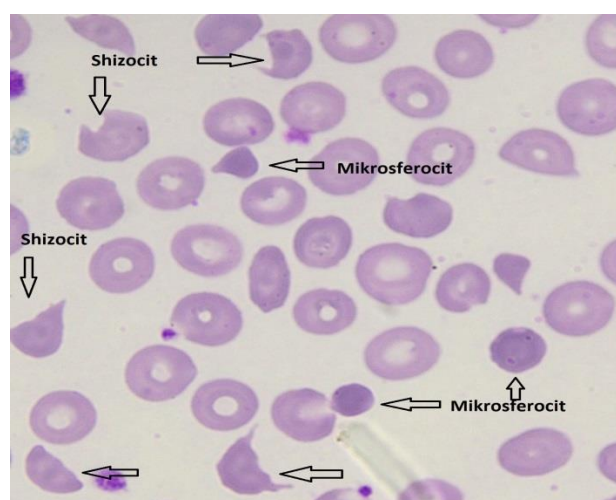
Pomembno je, da je debelina razmaza ustrezna in da so eritrociti enakomerno razporejeni ter se ne prekrivajo. V repu razmaza namreč najdemo shizocite ter mikrosferocite kot artefakt (5). Skupina je mnenja, da je metoda zadosti natančna in časovno ne preveč zamudna, če v štetje shizocitov vključimo vsaj 1000 eritrocitov (**Preglednica II**) (1). Delež v razmazu prisotnih shizocitov okvirno kvantitativno določimo v odstotkih. (8).

Preglednica II: Natančnost rezultatov v odvisnosti od celokupno prešteti shizocitov po Rümkeju (Prirejeno po 1).

Shizociti (%)	Prešteti eritrociti (število)		
	100	1000	10 000
0	0.0–3.6	0.0–0.4	0.0–0.1
1	0.0–5.4	0.5–1.8	0.8–1.3
2	0.2–7.0	1.2–3.1	1.7–2.3
3	0.6–8.5	2.2–4.3	2.6–3.4
4	1.1–9.9	2.9–5.4	3.6–4.5
5	1.6–11.3	3.7–6.5	4.5–5.5
6	2.2–12.6	4.6–7.7	5.5–6.5
7	2.9–13.9	5.5–8.8	6.5–7.6
8	3.5–15.2	6.4–9.9	7.4–8.6
9	4.2–16.4	7.3–10.9	8.4–9.6
10	4.9–17.6	8.2–12.0	9.4–10.7
15	8.6–23.5	12.8–17.4	14.3–15.8

*rezultati so podani kot 95 % interval zaupanja

Diagnostično je smiselno določanje shizocitov le takrat, kadar shizociti prevladujejo v razmazu krvi in ni prisotne poikilocitoze, ki kaže na drugo obolenje in je diagnoza TMA malo verjetna (1).



Slika 4: Shizociti ter mikrosferociti v razmazu krvi (1000x povečava).

1.3. SHIZOCITI PRI MIKROANGIOPATIČNI HEMOLITIČNI ANEMIJI

V TMA uvrščamo (2):

- Bolezni z okvaro arteriol in prekapilar (maligna arterijska hipertenzija, karcinomi z zasevki, zavrnitev ledvice, itd).
- Trombotično trombocitopenično purpuro (TTP) in hemolitični uremični sindrom (HUS).
- Sindrom diseminirane intravaskularne koagulacije (DIK).

1.3.1 Trombotična trombocitopenična purpura (TTP) in hemolitično uremični sindrom (HUS)

TTP in HUS predstavljata skupino kliničnih sindromov, kjer je prisotna poškodba endotelija v mikrocirkulaciji, posledično nastajajo mikrotrombi, kar imenujemo trombotična mikroangiopatija. Najpogosteje se pojavlja spontano, govorimo o primarni oz. idiopatski TTP. Vlogo pri nastanku trombocitnih strdkov ima von - Willebrandov faktor (vWf). To je multimerni glikoprotein, ki ga izločajo endotelijske celice in trombociti. Aktivnost vWf se veča z velikostjo multimera. Veliki polimeri imajo veliko mest za vezavo s trombociti in drugimi celicami in so funkcijsko tudi učinkovitejši od malih. Tako vWf stalno nastaja in se izloča iz endotelijskih celic, le manjši del je uskladiščen. Večina vWf, ki nastaja v trombocitih, je uskladiščena v zrcih alfa in se izloča po stimulaciji. vWf je potreben za adhezijo trombocitov na endotelij in za agregacijo trombocitov. Specifične metaloproteaze v plazmi vWf takoj razcepijo na manjše multimerne, ki ne zlepljajo neaktiviranih trombocitov v obtoku. Zelo veliki multimeri vWf pa trombocite zlepljajo. Pri (TTP) - HUS je aktivnost specifičnih metaloproteaz (ADAMTS-13) zmanjšana, zato veliki multimeri vWf v mikrocirkulaciji povzročijo nastanek strdkov trombocitov. Ti predstavljajo oviro za prehod eritrocitov, kar povzroči nastanek shizocitov. Pri podedovani obliki TTP je prisotna mutacija gena za ADAMTS-13, ki povzroči odsotnost ali zmanjšano aktivnost metaloproteaz (6,13).

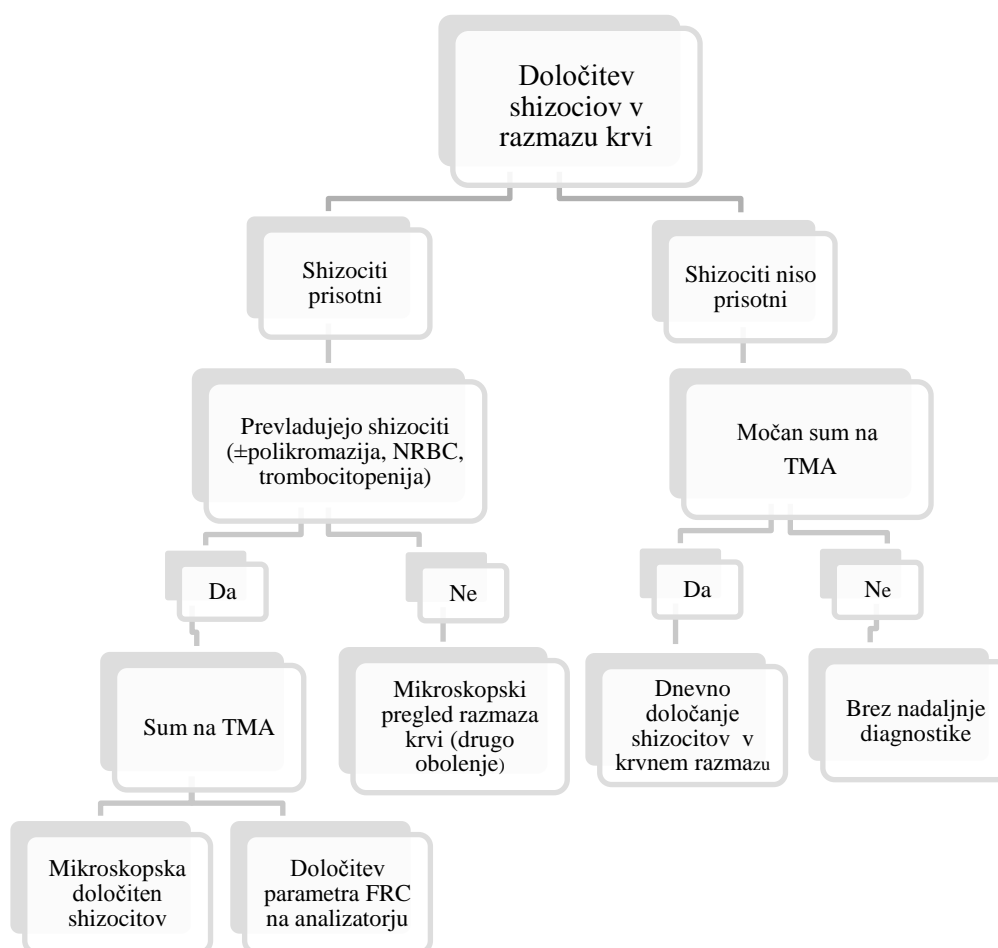
Simptomi TMA so: trombocitopenija, vročina, nevrološki simptomi, spremljajo jo lahko tudi drugi klinični znaki, kot so glavobol, zmedenost ter krči (10,12). Ko je prisotna ledvična okvara, govorimo o hemolitičnem uremičnem sindromu (HUS). HUS se pogosteje pojavlja pri otrocih v starosti od 6. meseca do 4. leta starosti in običajno nastopi po okužbi z *E.coli* (9). Sekundarno TTP lahko povzročijo številna bolezenska stanja (maligna obolenja, okužbe, HUS, sindrom (HELLP)) (11).

Za potrditev TTP in HUS ni diagnostičnega testa, s katerim bi ju lahko nedvoumno dokazali. Pri pacientih je prisotna trombocitopenija (število trombocitov $<100 \times 10^9/L$) ter TMA s prisotnostjo shizocitov v razmazu krvi (14). Pri pregledu krvi najdemo anemijo, zaradi hemolize je povečana aktivnost laktat dehidrogenaze (LDH), znižana je koncentracija haptoglobina, rahlo je povišana vrednost retikulocitov, Coombsov test je negativen, testi hemostaze so običajno normalni. V razmazu krvi najdemo poleg shizocitov, še polikromatične eritrocite na račun povečanega deleža retikulocitov. V pomoč pri potrditvi diagnoze je določitev aktivnosti encima metaloproteaze ADAMTS-13 in bolnikovih avtoprotiteles proti ADAMTS-13 (11). Aktivnost ADAMTS-13 je pri idiopatski obliki TTP zmanjšana pod 5% normalne, titer protiteles proti ADAMTS-13 pa je povečan. Pri sekundarnih oblikah TTP pa so vrednosti aktivnosti ADAMTS-13 normalne ali rahlo znižane, raven protiteles pa ni povečana (11).

TTP je urgentno stanje, ki zahteva takojšnje zdravljenje. V primeru poznega zdravljenja pa le ta vodi do hudih ter trajnih možganskih poškodb oziroma celo do smrti (15). Zdravljenje poteka s plazmaferezo, ki se je izkazala kot edino učinkovito zdravljenje. S plazmaferezami bolniku nadomestimo antigen ADAMTS-13 in odstranimo protitelesa proti ADAMTS-13. Dnevno se izmenja 1-1,5-kratnik predvidenega volumna plazme bolnika. V primeru nezadostnega odgovora se lahko plazmafereza izvaja dvakrat dnevno-toliko časa, da se normalizira število trombocitov in laboratorijskih kazalcev hemolize. Uspeh dosežemo pri približno 90% bolnikov. Ker imajo plazmafereze kratkotrajen učinek, bolniki sočasno prejemajo kortikosteroide v visokih odmerkih. TTP se lahko kljub začetnemu uspešnemu zdravljenju ponovi pri 23-44% bolnikov, zato se za dolgoročno preprečevanje ponovitve bolezni priporoča splenektomija, v zadnjem času tudi zdravljenje z monoklonskimi protitelesi proti CD20 (13,16).

1.3.2 Shizociti pri TTP

Kot že rečeno, je najdba shizocitov v krvnem razmazu ključna za postavitev diagnoze pri TTP. Ker je v primerjavi z določitvijo ADAMTS-13 hitrejša, z določitvijo ostalih biokemijskih kazalcev pa bolj specifična, je njihova določitev bistvena za čim hitrejšo ukrepanje, ki je pri tem stanju nujno. Diagnostični algoritem določanja shizocitov v razmazu krvi pri sumu na TTP prikazuje **slika 5**. Priporočila ICSH navajajo, da je pri mejni vrednosti shizocitov več kot 1% zadostni diagnostični kriterij za potrditev TTP vključno z klinično sliko. Interval deleža shizocitov v periferni krvi pri TTP je od 1,1 do 9,4%. V primeru, kadar pri TTP najdemo shizocite v razmazu krvi, je potrebno mikroskopsko določitev izvajati več dni zapored in spremljati njihovo dinamiko (1).



Slika 5: Diagnostični algoritem določanja shizocitov v razmazu krvi pri sumu na TMA po priporočilih ICSH (Prirejeno po 1).

1.4 POVEZAVA MED PARAMETROM FRC TER SHIZOCITI

Parameter FRC, ki ga določajo hematološki analizatorji, nam je lahko v pomoč kot presejalni parameter za ugotavljanje prisotnosti shizocitov v periferni krvi. Proizvajalci so poimenovali parameter fragmentirani eritrociti oz. FRC, in je zaenkrat namenjen v raziskovalne namene. Pri vpeljavi parametra FRC v rutinsko diagnostiko so določili, da je vrednost parametra $FRC > 0,5\%$ tista, pri kateri je smiselno pregledati krvni razmaz (17). Na tržišču obstajata dva analizatorja, ki omogočata določitev parametra FRC, vendar se princip določanja razlikuje. Pri skupini zdravih preiskovancev so bile povprečne vrednosti parametra FRC na enem analizatorju med 0,25-0,3%, na drugem analizatorju pa med 0,23-0,34% (18). V študijo so bili vključeni zdravi preiskovanci, pri katerih delež parametra FRC ni presegel 1%. Določili so mejno vrednost za oba analizatorja pri zdravih preiskovancih (manj kot 0,3% in manj kot 0,5%) (17,19).

Naredili so korelacijo med parametrom FRC in mikroskopsko določitvijo shizocitov. Pri vrednostih parametra FRC med 0,59-13,42% in shizocitov med 0,5-10%. Korelacijski koeficient med metodama je bil dober ($r=0,790$, $P<0,001$), primerjava metod z Bland–Altmanovim diagramom pa je pokazala, da so vrednosti pri analizatorju za 0,82% višje kot pri mikroskopski določitvi (17).

Parameter FRC ni specifičen diagnostičen parameter za potrditev določenega bolezenskega stanja, lahko pa nam je v pomoč pri odločitvi za mikroskopsko določitev shizocitov v razmazu krvi. Študije so pokazale, da se specifičnost parametra FRC poveča v kombinaciji s parametrom HIPO-He. Parameter HIPO-He je delež hipokromnih eritrocitov z vsebnostjo $Hb < 17$ pg. Normalne referenčne vrednosti za HIPO-He so med 0,1-1,1%. Določali so korelacijski koeficient med parametroma FRC in HIPO-He ($r=0,566$, $P<0,01$). Delovna skupina ICSH je določila tri stopnje hipokromije. Blaga hipokromija, z vrednostmi parametrom HIPO-He (0,1-1,1%), srednje blaga hipokromija (1,1-5,2%) in močna hipokromija (5,3-35,4%). V študijah so dokazali močno povezavo med parametrom HIPO-He ter parametrom FRC. Pri vrednostih HIPO-He med 1,1-5,2% se je delež parametra FRC zvišal ($P<0,001$). Tako dobimo višji delež lažno pozitivnih rezultatov za parameter FRC, kadar je vrednost parametra HIPO-He med 1,1-5,2% (18). Vzrok temu je v principu določanja parametra FRC. Določitev parametra FRC poteka v retikulocitnem kanalu analizatorja, kjer pride do vezave fluorescenčnega barvila na RNA. Sipanje prednje

svetlobe določa velikost celice, medtem ko fluorescenca vezanega barvila določa zrelost celice, ne določa pa oblike eritrocita. FRC so manjši od normalnega eritrocita in vsebujejo manj RNA, zato je fluorescenca nizka. Določitev parametra HIPO-He prav tako poteka s pomočjo retikulocitnega diagrama na podlagi razmerja med številom signalov nizke intenzitete prednjega sipanja svetlobe in številom zrelih eritrocitov z vsebnostjo hemoglobina <17 pg (19). Eritrociti z nizko vsebnostjo Hb se tako prekrivajo s shizociti.

2. NAMEN DELA

Shizocite določamo s štetjem pri mikroskopskem pregledu krvnega razmaza. Čeprav je določanje shizocitov dolgo uveljavljena diagnostična metoda pri opredelitvi TMA, pa do nedavnega ni bilo natančnih morfoloških meril za prepoznavanje, razvrščanje in štetje shizocitov. Zato je bilo štetje shizocitov nenatančno in netočno, vselej pa tudi podvrženo subjektivni presoji. V ta namen želimo uvesti določanje deleža shizocitov v krvnem razmazu v skladu s priporočili ICSH (1). Pri določitvi deleža shizocitov v krvnem razmazu bomo upoštevali vsa priporočila glede morfoloških oblik eritrocitov, ki jih lahko uvrščamo med shizocite. Po končani določitvi shizocitov v skladu s priporočili bomo rezultate primerjali s tistimi, ki bodo določeni pri rutinski analizi, ki se že dolgo uporablja rutinsko. Pričakujemo, da se rezultati med rutinsko in novo metodo ne bodo značilno razlikovali in da bodo meritve določene z novo metodo natančnejše.

V raziskovalno delo bomo vključili vzorce bolnikov, pri katerih pričakujemo zvečan delež shizocitov. To so vzorci odraslih in otrok s pretežno hematološkimi in drugimi boleznimi vključno s TTP, pri katerih bomo mikroskopsko določali shizocite zaradi opozoril analizatorja oziroma, če bo preiskava zaradi kliničnih razlogov naročena vnaprej. Druga skupina bodo vzorci novorojenčkov, pri katerih se zvečan delež shizocitov pojavlja fiziološko.

Hematološki analizatorji lahko opozarjajo na prisotnost shizocitov (opozoril), nekateri pa omogočajo tudi kvantitativno določitev parametra FRC. Zaenkrat določitev parametra FRC z analizatorjem služi zgolj v raziskovalne namene. V našem delu bomo primerjali delež shizocitov določenih z mikroskopskim pregledom krvnega razmaza z vrednostjo parametra FRC hematološkega analizatorja. S pomočjo statistične obdelave podatkov bomo določili diagnostično občutljivost ter specifičnost opozoril hematološkega analizatorja na prisotnost parametra FRC, ter določili, kakšni sta negativna in pozitivna napovedna vrednost opozoril. Želimo tudi določiti povezavo med vrednostmi analizatorja ter mikroskopsko določitvijo shizocitov. Pričakujemo, da bo občutljivost za parameter FRC večja od 90% in bo njegova negativna napovedna vrednost tako visoka, da bo lahko FRC služil kot presejalni parameter pri odločanju za mikroskopski pregled razmaza.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 OBRAVNAVANI VZORCI

V obdobju od januarja 2014 do februarja 2015 smo skupno analizirali 272 vzorcev venske krvi. Vsi vzorci so bili polna venska kri odvzeta z antikoagulantom di- ali trikalijeva sol etilendiamintetraacetne kisline (K_2EDTA ali K_3EDTA). Pri vseh vzorcih smo z analizatorjem določili celotno krvno sliko z DKS in naredili krvni razmaz za oceno shizocitov. Izdelava, sušenje ter barvanje krvnega razmaza je pri vseh vzorcih potekala ročno. Vsi vzorci, ki so bili uporabljeni za našo raziskavo, so bili namenjeni za rutinsko analizo.

V raziskavo smo vključili 179 vzorcev krvi, ki so bili analizirani v Specializiranem hematološkem laboratoriju Kliničnega oddelka za hematologijo Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani. Osnovno krvno sliko, diferencialno krvno sliko (DKS), ter delež parametra FRC smo določili na hematološkem analizatorju Sysmex XN-1000. Vseh 179 preiskovancev je bilo napotnih na preiskave zaradi suma na krvno bolezen ali zaradi zdravljenja že potrjene krvne bolezni. Lahko so imeli tudi druga ali pridružena obolenja.

33 vzorcev krvi je bilo odvzetih in analiziranih v Laboratoriju za hematocitologijo Službe za specialno laboratorijsko diagnostiko, Pediatrične klinike Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana. Osnovno krvno sliko, DKS smo določili na hematološkem analizatorju Sysmex XT-2000i. Vseh 33 preiskovancev so bili otroci zdravljeni ali obravnavani na Pediatrični kliniki.

60 vzorcev krvi novorojenčkov je bilo analiziranih v 24-urnem laboratoriju Kliničnega inštituta za kemijo in klinično biokemijo UKCL. Osnovno krvno sliko in DKS smo določili na hematološkem analizatorju ADVIA120.

3.2 DOLOČANJE FRAGMENTIRANIH ERITROCITOV NA HEMATOLOŠKEM ANALIZATORJU

3.2.1 Določanje parametra FRC in parametra HIPO-He na hematološkem analizatorju

Hematološki analizator omogoča analizo krvnih celic in deluje na principu pretočne citometrije in električne impedance (hidrodinamično fokusiranje). Analizator za analizo potrebuje le 88 μ L krvi (20). Osrednji del pri hidrodinamskem fokusiranju je pretočna celica. V pretočni celici je vzorec fokusiran v center prenosne tekočine, kjer laserski žarek osvetli celico v vzorcu (21).

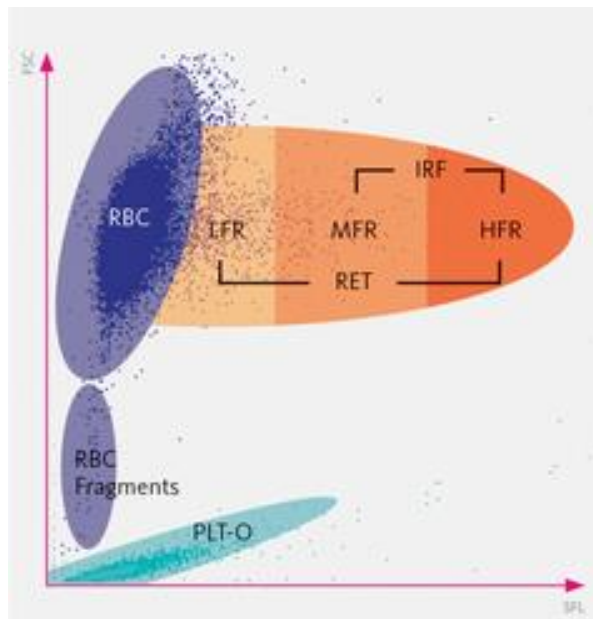
Princip meritve pri pretočni citometriji temelji na laserski svetlobi določene valovne dolžine, ki presvetli celice in ob tem pride do sipanja svetlobe. Analizator zazna stransko sipanje svetlobe (ang. Side scattered light, SSC), prednje sipanje svetlobe (ang. Forward scattered light, FSC), ter stransko fluorescenco (side fluorescence, SFL). Prednje sipanje da informacijo o velikosti celice. Močnejši kot je signal sipane svetlobe, večja je celica. Stransko sipanje svetlobe poda informacije o stopnji granuliranosti, obliki in velikosti jedra. Intenziteta SFL svetlobe je odvisna od vrste in količine aminokislin ter nukleinskih kislin v celici in celičnih organelih (22,23,24).

Princip določanja parametra FRC se razlikuje od proizvajalca do proizvajalca.

Pri analizatorju ADVIA poteka direktna določitev parametra FRC v eritrocitni trombocitni komori. Analizator loči FRC glede na volumen eritrocitov, ki so manjši od 30 fL in s pomočjo refrakturnega indeksa, ki je večji od 1,4 določi koncentracijo hemoglobina in jih tako loči od trombocitov (25).

Pri analizatorjih Sysmex XN in XT poteka določitev parametra FRC v retikulocitnem kanalu. Fluorescenčno barvilo Fluorecell RET obarva ribonukleinske kisline (RNA) v retikulocitih. Na podlagi različne intenzitete fluorescence analizator ločuje različne zrelostne stopnje retikulocitov. Razsevni diagram prikazuje razlike v intenziteti fluorescence glede na zrelost retikulocitov (**Slika 6**). Vsebnost nukleinskih kislin se z dozorevanjem retikulocitov manjša, zato je fluorescenca najnižja pri zrelih eritrocitih. Delež parameter FRC analizator določi glede na velikost in vsebnost hemoglobina v

eritrocitih. V štetje so lahko vključeni mikrociti kot tudi majhni membranski fragmenti (25,26,27,28). V točkovnem diagramu analizator med parametrom FRC razvrsti eritrocite z majhnim volumnom in nizko vsebnostjo RNA (29).



Slika 6: Razsevni diagram retikulocitnega kanala pri analizatorju Sysmex XN-1000 (17).

RBC -eritrociti, IFR -nizka fluorescenca retikulocitov, MFR -srednja fluorescenca retikulocitov, HFR -visoka fluorescenca retikulocitov, IRF -nezrela frakcija retikulocitov, RET -retikulociti, PLT -trombociti merjeni v retikulocitnem kanalu. Povzeto po (25)

Analizator Sysmex parameter HIPO-He prav tako določa v retikulocitnem kanalu. Fluorescenčno barvilo obarva RNA v retikulocitih in na podlagi različne intenzitete fluorescenčne svetlobe analizator ločuje različne zrelostne stopnje retikulocitov. Diagram prikazuje razlike v intenziteti fluorescenčne svetlobe glede na razvojne stopnje retikulocitov, ki je odvisna od intenzitete prednjega sipanja in stranskega sipanja svetlobe (**Slika 6**). Analizator s pomočjo retikulocitnega diagrama določi razmerje med številom signalov nizke intenzitete prednjega sipanja laserja in številom zrelih eritrocitov z vsebnostjo hemoglobina <17 pg (11,19,28,30). Eritrociti z nizko vsebnostjo Hb se tako prekrivajo s shizociti.

3.2.2 Reagenti in kontrole

Vzorci so bili analizirani na hematoloških analizatorjih Sysmex-XN-1000, ADVIA 120 in Sysmex-XT-2000. Analizator sam prepozna vzorec v epruveti označeni s črtno kodo, zato ni potrebno ročno vnašati pacientovih podatkov, s čimer se izognemo nekaterim predanalitskim napakam. Analizator neprekinjeno meša vzorec, kar omogoča dobro homogenost vzorca. Za analizo vzorcev smo dnevno uporabljali kontrolne vzorce na treh koncentracijskih ravneh. Kontrole so bile hranjene v hladilniku med 2-8°C. V skladu z navodili proizvajalca smo pred analizo kontrolne vzorce segreli na sobno temperaturo. Rok uporabe posameznega kompleta kontrol je 2 meseca, epruvete iz kompleta je potrebno menjavati tedensko. Uporabljali smo reagente proizvajalca in delovali po načelu dobre laboratorijske prakse. Pri vseh krvnih analizah smo upoštevali standardne operacijske postopke posameznega laboratorija, ki so natančno določali izvedbo.

3.2.3 Mikroskopski pregled krvnega razmaza

Pri vseh preiskovancih, kjer je analizator opozoril na prisotnost parametra FRC («fragments») smo mikroskopsko pregledali razmaz. Razmaze smo pobarvali po Pappenhimu z barvili May-Grünwald in Giemsa (8).

3.2.3.1 Material in oprema

Za izdelavo diferencialne krvne slike smo potrebovali:

- Predmetna stekla: 26 x 76 x 1,2 mm (Vitrognost Biognost, d.o.o Zagreb)
- Krovna stekla: 22 x 22 mm (Brand, Nemčija)
- Kapalni nastavek: Diff - Save Blood Dispanser (Alpha Scientific, Združene države Amerike)
- Rokavice iz lateksa za enkratno uporabo, nesterilne brez pudra
- Posodice za barvanje s pokrovom in nosilcem krvnih razmazov
- Štoparica
- Imerzijsko olje
- Svetlobni mikroskop

3.2.3.2. Reagenti

- Barvilo May-Grünwald, (Sigma Life Science, Amerika)
- Barvilo Giemsa, (Fluka Analytical, Amerika)
- Delovna raztopina Giemse v fosfatnem pufru (1:10). V merilnem valju odmerimo 10 mL Giemse in s fosfatnim pufrom dopolnimo do 100 mL.
- Sorensenov fosfatni pufer z vrednostjo pH =6,8 pripravimo iz KH_2PO_4 in $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ali Na_2PO_4 .
- Raztopina A: Natehtamo 9,1 g KH_2PO_4 in dopolnimo do 1000 mL destilirane vode.
- Raztopina B: Natehtamo 9,5 g Na_2PO_4 ali 11,9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ter raztopimo v destilirani vodi.
- Priprava delovne raztopine: Vzamemo 630 mL raztopine A in 370 mL raztopine B, uravnamo pH vrednost na 6,6. V 1000 mL bučki razredčimo 50 mL matične raztopine in dopolnimo z redestilirano vodo do oznake. Končna pH vrednost mora biti 6,8. Bučko označimo z datumom priprave in imenom raztopine.
- Raztopina za čiščenje mikroskopa
- Imerzijsko olje

3.2.3.3 Izdelava in barvanje krvnega razmaza

Za kvalitativno določanje in vrednotenje krvnih celic v preparatu moramo izdelati kvaliteten krvni razmaz. Razmaz pobarvamo po Pappenhimu z barvilom May-Grunwald in razredčenim barvilo po Giemsi. Bazično barvilo May-Grunwald vsebuje azur, metilensko modrilo ter metanol, ki deluje kot fiksacijsko sredstvo, s pomočjo katerega se ohranijo vse morfološke lastnosti celic. Kislo barvilo Giemsa pa vsebuje eozin in dva derivata metilensko modrega, azur A in azur B (31,32).

Preparate venske krvi pripravimo tako, da na sredino predmetnega stekla pod matiranim robom, kanemo kapljo venske krvi. Pri tem si pomagamo s kapalnim nastavkom Diff - Save Blood Dispenser za pripravo razmazov, s katerim prebodemo zamašek in ga

pritisnemo ob objektno steklo, da skozenj priteče kaplja krvi. Ta naj bo tolikšna, da je skupna dolžina razmaza 3-4 cm. Nato se s krovnim steklom, nagnjenim pod kotom 45° dotaknemo krvne kaplje, da se ta razpotegne po vsej širini stekelca. Pri tem ne smemo spreminjati nagiba, hitrosti in jakosti pritiska krovnega stekla na površino. Pravilno pripravljen krvni razmaz pokriva približno dve tretjini širine (v sredini) in tri četrtine dolžine predmetnega stekla. Ne sme biti stopničast, imeti mora ravne stranske robove in na koncu mora biti zaobljen. Na matirani del predmetnega stekla napišemo ime, priimek pacienta, ter potrebne podatke o preiskovancu. V tem območju razmaza morajo biti eritrociti porazdeljeni tesno drug ob drugem, ne smejo pa se prekrivati. Pred barvanjem razmaze sušimo vsaj 30 min v vodoravnem položaju (8,32).

Posušene razmaze venske krvi zložimo v stojalo za barvanje in postavimo v posodico z raztopino May-Grunwald za 5 min. Razmaze brez vmesnega spiranja prenesemo v drugo posodico, kjer sta raztopina May-Grunwald in fosfatni pufer v razmerju 1:1 za 1 min. Z raztopino Giemsa v fosfatnem pufru (1:10) barvamo razmaze 20 min in jih speremo v fosfatnem pufru ter posušimo na zraku (33).

Pobarvane preparate dobro posušimo in pri mali (100x) povečavi najprej poiščemo vidno polje in ocenimo kakovost preparata, če je ustrezen za določitev shizocitov.

3.3 STATISTIČNE METODE

Podatke smo obdelali s pomočjo računalniških programov Microsoft Excel 2010 ter Medcalc ®Version 14.8.1. Podatke smo analizirali z opisno statistiko. Računali smo povprečno vrednost (\bar{x}), vzorčni standardni odklon (SD), mediano, minimalno vrednost (min), maksimalno vrednost (max), 95% interval zaupanja.

Medsebojno korelacijo parametrov smo preverjali s Spearmanovim koeficientom in Bland-Altmanovim diagramom. Vrednost korelacije je izračunana kot povprečje vseh korelacij in nam pove moč povezave dveh spremenljivk. Z Bland-Altmanovim diagramom pa ugotovimo, kakšno je ujemanje dveh različno merjenih spremenljivk (34).

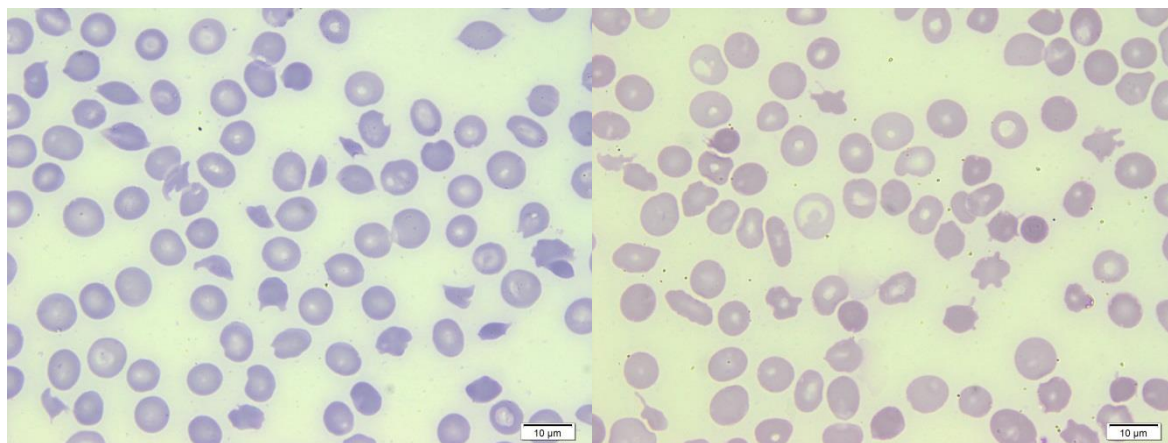
Klinično uporabnost deleža shizocitov v periferni krvi smo preverili z ROC analizo. Meje vrednosti smo določali glede na najvišjo občutljivost ob najvišji specifičnosti za posamezen parameter v vsaki raziskovalni skupini.

4. REZULTATI Z RAZPRAVO

4.1 MIKROSKOPSKO DOLOČANJE SHIZOCITOV

4.1.1 Določanje shizocitov v skladu s priporočili ICSH

Pri 179-ih vzorcih bolnikov s krvnimi boleznimi smo mikroskopsko določali shizocite z rutinsko metodo in novo metodo. Izbrali smo tiste vzorce, kjer nas je analizator opozoril na parameter FRC in tiste, kjer je bila preiskava naročena s strani specialista hematologa. Pri 10-ih vzorcih je bila prisotna izrazita poikilocitoza in v dveh primerih je bila določitev shizocitov težavna. Pri 16-ih vzorcih so bili v razmazu prisotni mikrosferociti (**Slika 7**). Pri našem delu je prihajalo do velikih razhajanj predvsem pri tistih vzorcih, kjer je bil delež shizocitov $>4\%$ in ob prisotnih mikrosferocitih. Razlog za velike razlike je bil na račun mikrosferocitov, ki smo jih upoštevali le pri določitvi z novo metodo.

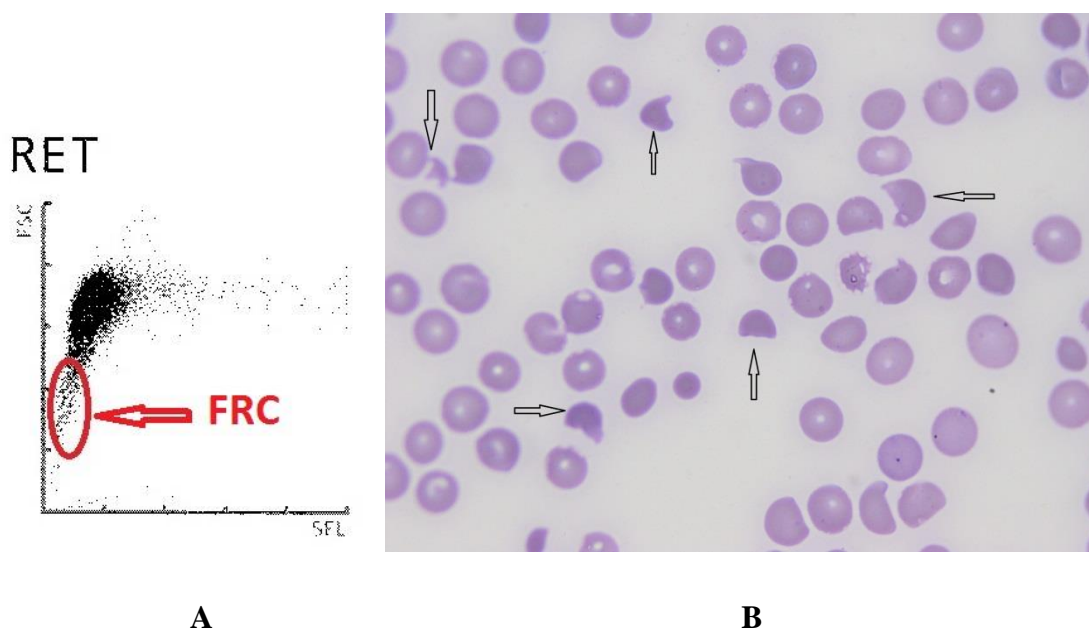
**A****B**

Slika 7: Razmaz venske krvi s shizociti (1000x povečava). **A)** Shizociti in mikrosferociti. **B)** Shizociti, mikrosferociti ter poikilocitoza.

4.1.2 Mikrosferociti

Ocena shizocitov ob prisotnosti mikrosferocitov je bila težavna. Najprej smo morali postaviti merilo za opredelitev mikrosferocitov glede na velikost ostalih eritrocitov. Med mikrosferocite smo tako uvrstili eritrocite, ki so manjši od 5 μm ter intenzivno obarvani (**Slika 7B**). Za štetje mikrosferocitov med shizocite smo se odločili samo takrat, ko so v razmazu krvi prevladovali shizociti. S tem smo izključili morebitno prisotnost podedovane sferocitoze ali imunske hemolize. V nadaljevanju predstavljam tri primere, pri katerih so bili prisotni tudi številni mikrosferociti.

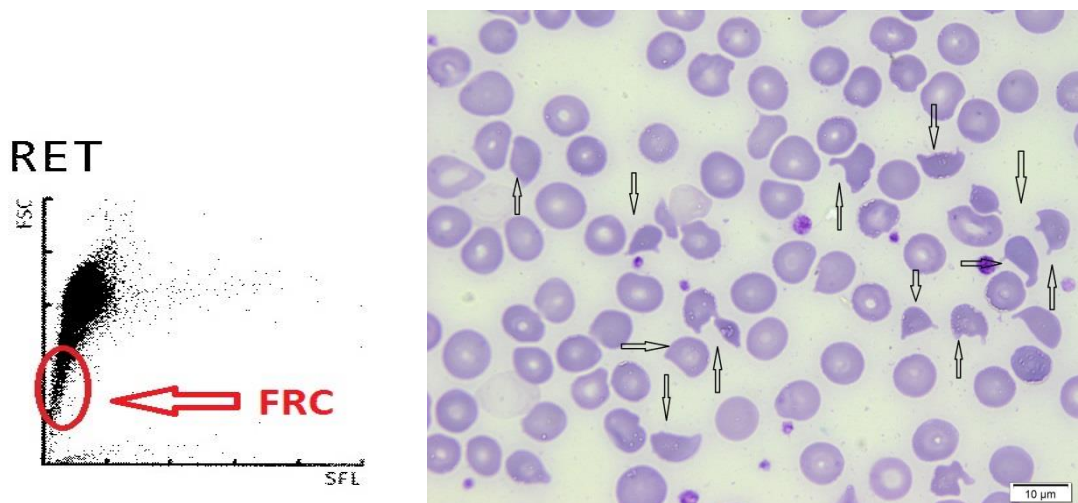
Pri bolnici z izrazito trombocitopenijo ($9 \times 10^9/\text{L}$), anemijo (66 g/L) in zvišanimi številčnimi vrednostmi retikulocitov (4,72%) nas je analizator opozoril na prisotnost fragmentiranih eritrocitov, ki jih je določil 1,08%. (**Slika 8A**). Zaradi nizkih vrednosti trombocitov in opozoril na FRC je bilo potrebno krvni razmaz pregledati mikroskopsko.



Slika 8: A) Razsevni diagram retikulocitnega kanala. B) Razmaz venske krvi z mikrosferociti (1000x povečava) (Primer 49, Priloga I).

V razmazu periferne krvi 53 letne bolnice, napotene k hematologu s sumom na TTP, smo potrdili prisotnost shizocitov in jih ovrednotili v odstotkih. Delež shizocitov določen z rutinsko metodo je bil 4,5%, z novo metodo pa 12,9% (**Slika 8B**). Razlika v rezultatu med obema metodama je bila velika, ker smo upoštevali tudi mikrosferocite kot priporočajo smernice ICSH. V razmazu krvi ni bilo poikilocitoze, delež shizocitov pa zelo visok, zato je diagnoza trombotične mikroangiopatije zelo verjetna.

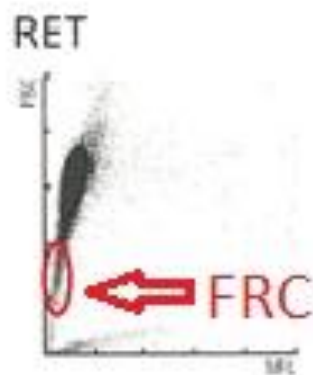
Pri 35 letnem pacientu je bila prisotna anemija, trombocitopenija, številčna vrednost retikulocitov je bila normalna. Analizator nas je opozoril na prisotnost fragmentocitov v krvi, vrednost je bila 3,31%, povečan je bil tudi RDW (17,2%) (**Slika 9A**).



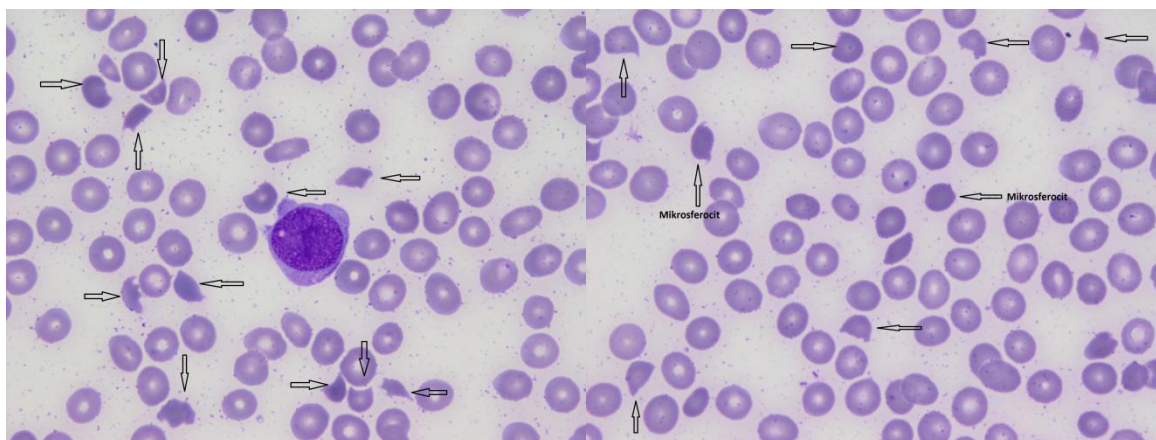
Slika 9: A) Razsevni diagram retikulocitnega kanala. B) Shizociti v razmaz venske krvi (1000x povečava) (Primer 174, Priloga).

Zaradi nizkih vrednosti trombocitov in opozoril na FRC smo pregledali krvni razmaz. V razmazu krvi so prevladovali shizociti ter mikrosferociti. Pri vrednotenju smo določili 10,7% shizocitov z rutinsko metodo ter 26,0% z novo metodo. Tako kot v prejšnjem primeru, je bila razlika med obema metodama zelo velika na račun mikrosferocitov (**Slika 9B**). Pri pacientu je bila potrjena TMA.

Pri bolnici srednjih let zdravljeni za akutno levkemijo, je bila prisotna levkocitoza, anemija, trombocitopenija, delež retikulocitov je bil normalen. Analizator nas je opozoril na prisotnost fragmentocitov, blastov, anizocitozo ter agregate trombocitov (**Slika 10**).



Slika 10: Razsevni diagram retikulocitnega kanala.



Slika 11: Razmaz venske krvi (1000x povečava). **A)** Številčni shizociti. **B)** Mikrosferociti (Primer 149, Priloga I).

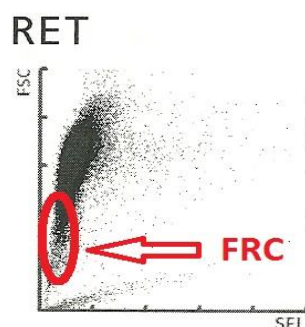
Ugotovili smo, da v razmazu krvi ni bilo agregatov trombocitov, prisotni pa so bili blasti. V eritrocitni vrsti so prevladovali shizociti ter mikrosferociti (**Slika 11**). S rutinsko metodo smo določili 4,2%, z novo metodo pa 11,4% shizocitov. Delež shizocitov določen z novo metodo je bil znova večji na račun mikrosferocitov, ki smo jih uvrščali glede na velikost ostalih eritrocitov, ki so manjši od 5 μm ter intenzivno obarvani (**Slika 11B**).

4.1.3 Poikilocitoza

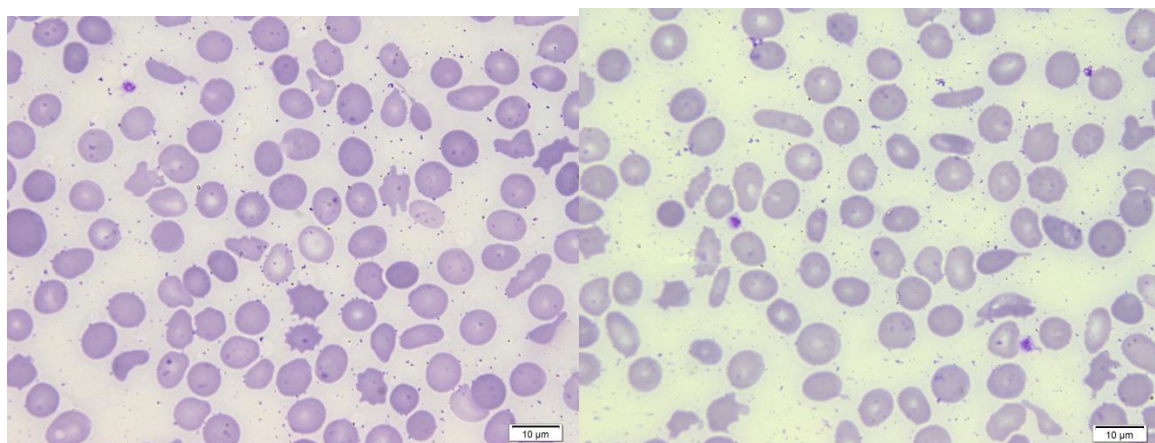
Priporočila ICSH navajajo, da določitev shizocitov v razmazu krvi ni smiselna v primeru, kadar je prisotna izrazita poikilocitoza. O poikilocitozi govorimo takrat, kadar je v razmazu krvi hkrati prisotnih več različnih oblik eritrocitov (4,32).

V nadaljevanju predstavljam primere vzorcev, kjer je shizocite spremljala tudi poikilocitoza. Pri vseh teh primerih je prišlo do večjih odstopanj med vrednostmi določenimi z rutinsko in novo metodo.

Pri starejšem pacientu z limfoplazmocitnim limfomom nas je analizator opozoril na prisotnost fragmentocitov. Vrednost FRC na aparatu je bila 4,39%, RDW je bil zvišan (18,9%), tudi analizator nas je opozoril na anizocitozo. Naredili smo krvni razmaz in določili shizocite. Z rutinsko metodo smo določili 1,1%, z novo pa 2,2% shizocitov. V razmazu venske krvi so bili poleg mikrosferocitov ter shizocitov prisotni še eliptociti, akantociti ter kodociti. Priporočila ICSH navajajo, da določanje shizocitov v takih primerih ni smiselno (**Slika 12, 13**).

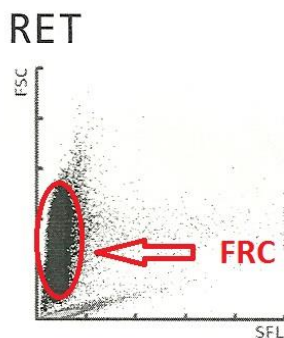


Slika 12: Razsevni diagram retikulocitnega kanala.

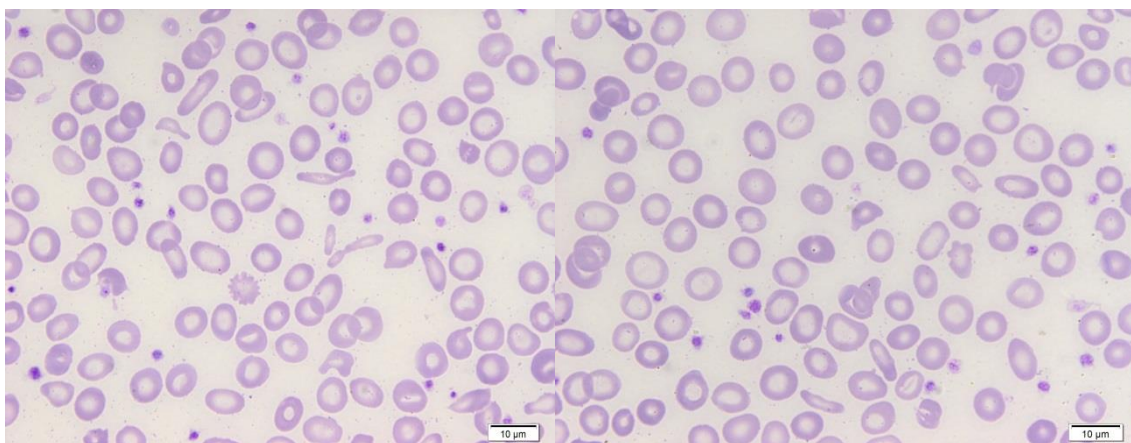


Slika 13: Shizociti v razmazu venske krvi s poikilocitozo (1000x povečava) (Primer 18, Priloga I).

Mlajši gospod je bil napoten k hematologu zaradi sideropenične anemije. Analizator nas je opozoril na prisotnost FRC, vrednost je bila 0,19%, RDW povišan (22,2%), MCV je bil le 54,7 fL. Ob tem je bilo prisotno opozorila na anizocitozo. Čeprav je bil delež FRC samo 0,19%, je bilo v razsevnem diagramu kanala RET v področju fragmentocitov zelo veliko celic (**Slika 14**). Z rutinsko metodo shizocitov nismo določili, z novo metodo pa smo določili delež shizocitov 5,8%. V razmazu krvi smo ugotavljali izrazito poikilocitozo, hipokromijo eritrocitov ter eliptocitoza (**Slika 15**). Povečana populacija v področju FRC retikulocitnega kanala pa ustreza hipokromnim eritrocitom in ne shizocitom. Glede na poikilocitozo določitev shizocitov v takem primeru ni smiselna.

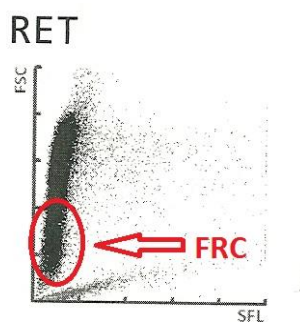


Slika 14: Razsevni diagram retikulocitnega kanala.

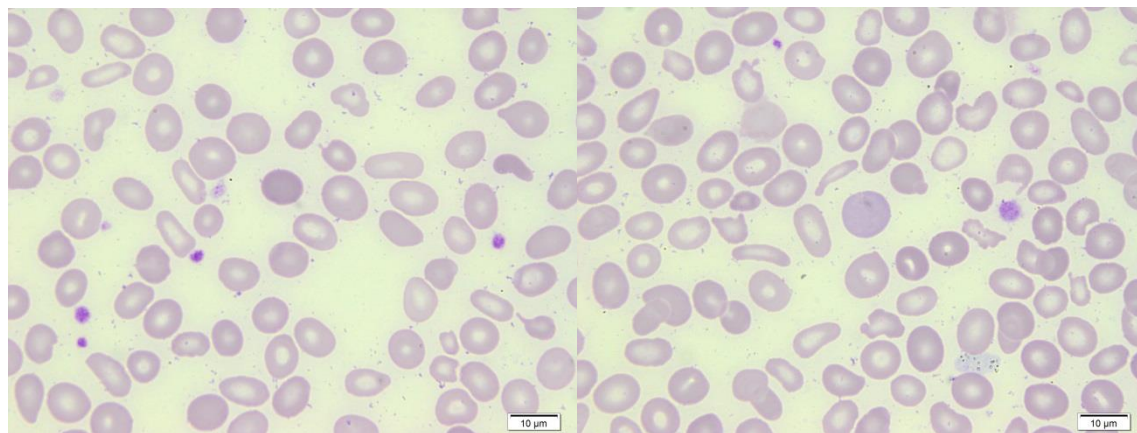


Slika 15: Poikilocitoza v razmazu krvi (1000x povečava) (Primer 129, Priloga I).

Pri bolniku srednjih let, ki se je zdravil zaradi hematološkega obolenja, nas je analizator opozoril na prisotnost FRC, vrednost je bila 8,84%, RDW je bil povišan (25%) (**Slika 16**). V krvnem razmazu smo s rutinsko metodo določili 3,8% shizocitov, z novo metodo pa 4,4%. V razmazu krvi smo potrdili poikilocitozo. Prisotni so bili shizociti, anulociti, eliptociti ter dakriociti. Določitev shizocitov je bila vnaprej naročena, zato smo jih določili, vendar je smiselno v takem primeru opozoriti, da ob poikilocitozi ni smiselna (**Slika 17**).



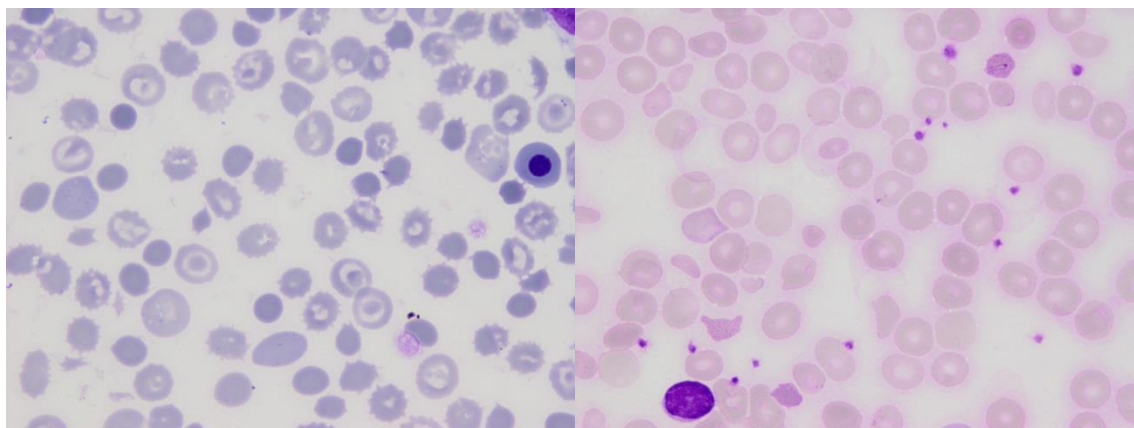
Slika 16: Razsevni diagram retikulocitnega kanala.



Slika 17: Poikilocitoza v razmazu venske krvi (1000x povečava) (Primer 51, Priloga I).

4.1.4 Tehnično neprimerni preparati

Pri delu smo se srečali tudi s težavami pri vrednotenju shizocitov zaradi neprimernosti preparatov za vrednotenje. Na spodnji **sliki 18** sta dva razmaza venske krvi odvzete pri pediatričnih pacientih. Vzrok za slabo kakovost razmazov je verjetno napaka v predanalitski fazi pri postopku odvzema krvi. Vzorec je bil verjetno odvzet iz venskega kanala, velika je verjetnost, da je kri razredčena. Težava je lahko tudi v daljšem transportnem času od odvzema do analize oziroma majhnem volumnu odvzete krvi, zaradi česar lahko pride do presežka K_3EDTA . Odločili smo se, da vrednotenje shizocitov ni smiselno, saj so lahko prisotni kot artefakt in naš rezultat bi bil posledično lažno pozitiven (**Slika 18A**). V drugem primeru je bil vzrok tehnične neustreznosti v sami izdelavi ter postopku barvanja razmaza. V preparatu ni bilo področja, ki bi bilo primerno za vrednotenje (neenakomeren poteg krvnega razmaza). Tudi v tem primeru shizocitov nismo določali (**Slika 18B**.)



Slika 18: Neprimerni preparati za določanje shizocitov (1000x povečava). **A)** Napaka v predanalitski fazi. **B)** Tehnično slabo izdelan preparat.

4.2 PRIMERJAVA DOLOČITVE SHIZOCITOV Z RUTINSKO METODO IN V SKLADU S PRIPOROČILI

Pri 179-ih vzorcih krvnih bolnikov, ki so imeli naročeno krvno sliko, smo shizocite določili v razmazu krvi vzporedno z rutinsko metodo ter metodo po mednarodnih priporočilih ICSH. Kriterij za določitev shizocitov je bilo bodisi opozorilo na FRC hematološkega analizatorja Sysmex XN-1000, ali vnaprejšnje naročilo določitve shizocitov.

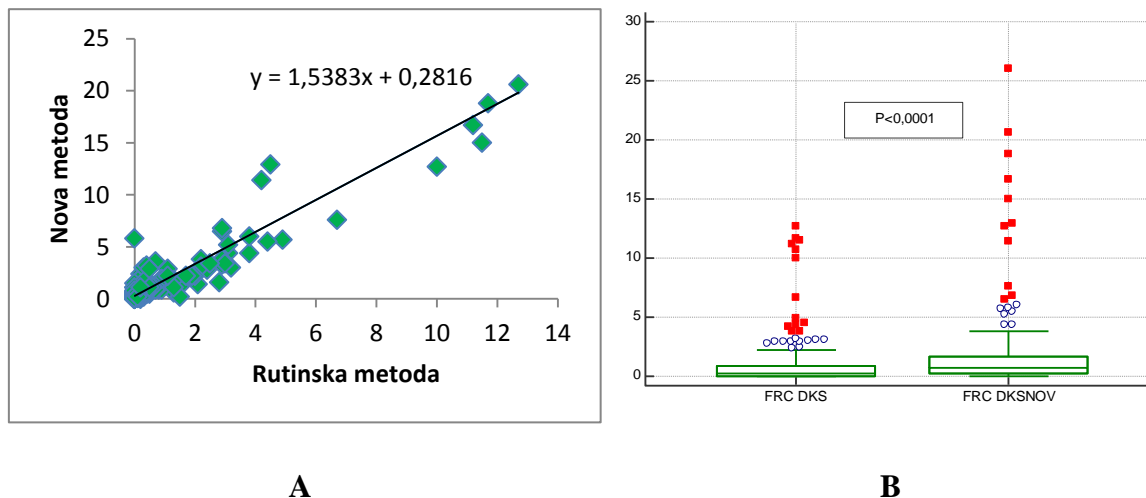
Preglednica III: Primerjava določitve shizocitov glede na metodo pri skupinah krvnih bolnikov (N=179).

Shizociti (%)	Število bolnikov	
	Rutinska določitev	Določeno po priporočilih ICSH
0-1	138	106
1-2	13	35
2-5	21	22
5-10	2	8
10-15	5	6
>20	0	2

Zanimalo nas je, kakšna je povezava med standardno metodo ter novo metodo mikroskopske določitve shizocitov. S pomočjo statističnega programa Medcalc smo s testom Kolmogorov-Smirnov preverjali, kako so porazdeljene vrednosti. Ugotovili smo, da so rezultati porazdeljeni nenormalno, zato smo za izračun korelacije med rutinsko metodo, ter novo metodo uporabili Spearmanov koeficient korelacije.

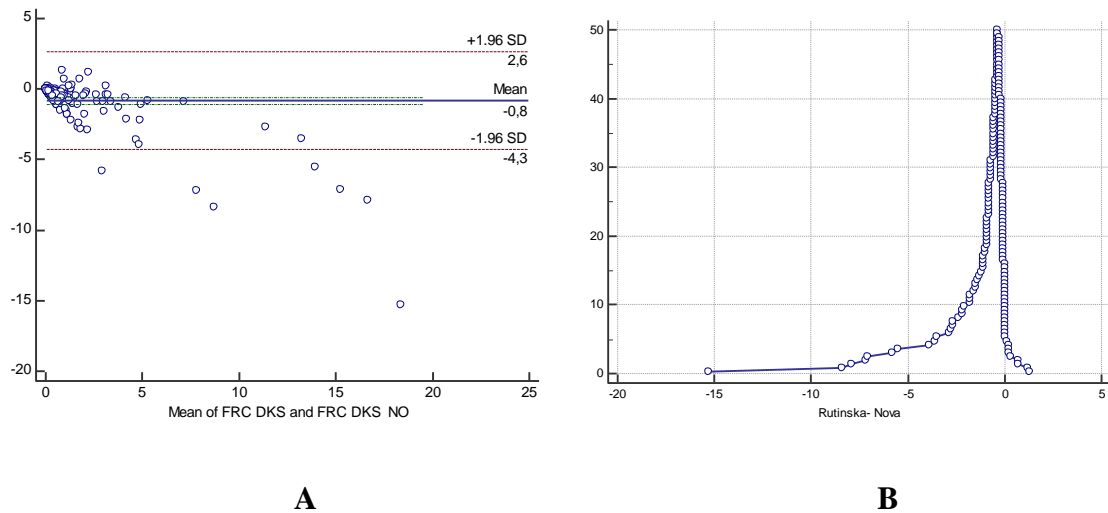
Koeficient korelacije znaša 0,797, kar pomeni odlično povezavo med obema metodama. 95% interval zaupanja je 0,737-0,845 (**Slika 19A**). Naredili smo neparametrični test Mann-Whitney za dve neodvisni spremenljivki. Na grafu so izrisane točke posamezne meritve in

mediana za shizocite določene z rutinsko in novo metodo. Razlika mediane porazdelitve obeh metod je statistično večja za novo metodo ($P < 0,0001$) (**Slika 19B**).

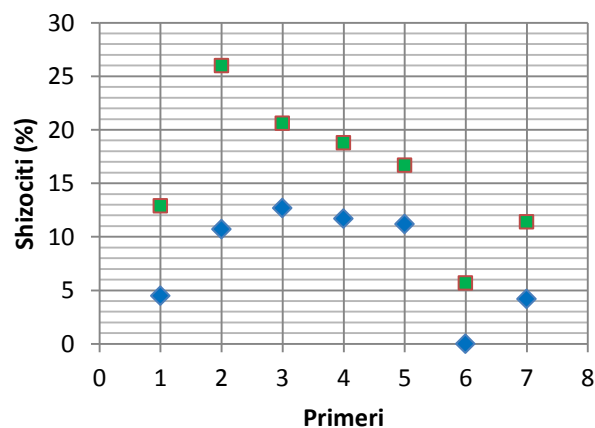


Slika 19: Določitev shizocitov z rutinsko metodo in v skladu s priporočili ICSH. **A)** Korelacija med metodama. **B)** Porazdelitev vrednosti mediane obeh metod (N=179).

Bland-Altmanov diagram na **sliki 20A** prikazuje, da so vrednosti parametra FRC določenega z novo metodo za 0,8% višje od vrednosti določenih z rutinsko metodo. 7 vzorcev, ki se nahajajo izven določenega območja $\pm 2SD$ v Bland-Altmanovem diagramu, je posebej prikazanih na **sliki 21**. Izstopajo tisti vzorci, kjer je razlika v šteju med obema metodama večja od 5%. Očitno je, da so vrednosti, določene z novo metodo, vedno večje od tistih, določenih z rutinsko. V 6-ih primerih od 7-ih so vrednosti večje zaradi prisotnih mikrosferocitov, ki smo jih upoštevali pri določitvi z novo metodo. V primeru 2 pa smo ugotovili, da je v razmazu krvi prisotna izrazita poikilocitoza. Kot je navedeno v mednarodnih priporočilih, je v takih primerih mikroskopsko določanje shizocitov nesmiselno. Ta primer pokaže, kako pomembno je, da najprej ovrednotimo populacijo eritrocitov in se nato odločimo, ali je mikroskopsko določanje shizocitov smiselno ali ne. V 3. primeru je bila razlika v mikroskopski določitvi zaradi prisotnosti mikrosferocitov. V diagramu prepognjene empirične kumulativne porazdelitve potrjuje razliko med metodama, ki smo jo dobili z Bland-Altmanovim diagramom, da je razlika 0,8% (**Slika 20B**).



Slika 20: Določanje shizocitov z rutinsko metodo in v skladu s priporočili ICSH. **A)** Bland-Altmanov diagram. **B)** Diagram prepognjene empirične kumulativne porazdelitve deleža shizocitov (N=179).



Slika 21: Vzorci z največjim odstopanjem v določitvi deleža shizocitov (modra - rutinska metoda, zelena – nova metoda).

4.2.1 Natančnost določanja shizocitov z obema metodama

Pri mikroskopski določitvi shizocitov nas je zanimalo, kakšna je natančnost naših meritev, saj gre za metodo, ki je podvržena veliki napaki tudi zaradi subjektivnosti določitve. Natančnost nam pove, kako blizu so si izmerjene vrednosti ene in iste količine, merjene pod enakimi pogoji (35). S ponovljivostjo rezultatov ugotavljamo natančnost metode. Najboljšo oceno natančnosti metode daje ponovljivost »iz dneva v dan« (36). Naredili smo ponovljivost določitve shizocitov z rutinsko metodo, kjer so odstotek shizocitov določale 3 različne osebe, ter ponovljivost določanja shizocitov z novo metodo, kjer je odstotek shizocitov določala ena oseba. Rezultati ponovljivosti določeni z novo metodo so prikazani v spodnji preglednici (**Preglednica IV**). Večje odstopanje je opazno pri vzorcu 2, v katerem so bili prisotni mikrosferociti, saj je mikrosferocite med različnimi morfološkimi oblikami shizocitov najtežje opredeliti. V priporočilih je sicer navedeno, da so to eritrociti manjši od 5 μm , ter temneje obarvani, njihovo prepoznavanje pa je odvisno od subjektivne presoje. Ponovljivost je slaba tako pri eni kot pri več različnih osebah ne glede na metodo.

Preglednica IV: Rezultat ponovljivosti določanja shizocitov z rutinsko in novo metodo.

	Metoda	Prvo štetje (%)	Drugo štetje (%)	Tretje štetje (%)	Četrto štetje (%)	X
Vzorec 1	ICSH	1,1	0,7	1,4	0,8	1 \pm 0,31
	rutinsko	0,6	0,7	0,9		0,73 \pm 0,15
Vzorec 2	ICSH	4,7	8,4	8,1	7,9	7,27 \pm 1,72
	rutinsko	2,9	4,9	3,8		3,87 \pm 1,00
Vzorec 3	ICSH	1,6	1,5	1,7	1,4	1,5 \pm 0,13
	rutinsko	1,5	1,2	1,5		1,4 \pm 0,17
Vzorec 4	ICSH	2,2	2,5	3,8	4,3	3,2 \pm 1,01
	rutinsko	2,2	2,8	0,2		1,73 \pm 1,36
Vzorec 5	ICSH	11,4	11,6	11,5	11,8	11,6 \pm 0,17
	rutinsko	4,2	5,4	4,2		4,6 \pm 0,69
Vzorec 6	ICSH	7,6	6,4	7,3	7,0	7,1 \pm 0,51
	rutinsko	6,2	4,7	5,9		5,6 \pm 0,79

Ponovljivost je bila v splošnem boljša pri določitvi shizocitov z novo metodo, saj je bil standardni odklon pri vseh 6-ih vzorcih nižji kot pri vzorcih določenih z rutinsko metodo. Delno pa tudi večje število oseb, ker gre za preiskavo, ki je podvržena subjektivni presoji. To potrjuje navedbe v literaturi, da je metoda po priporočilih ICSH natančnejša in bolj ponovljiva. Do večjih odstopanj in slabše ponovljivosti vseeno lahko pride zaradi izbire neustreznega področja krvnega razmaza za štetje shizocitov in nepravilne morfološke opredelitve shizocitov (1).

4.3 ZAZNAVANJE FRAGMENTIRANIH ERITROCITOV S HEMATOLOŠKIM ANALIZATORJEM

Vključili smo vzorce z in brez opozoril na FRC (n=233). Za izračun diagnostične občutljivosti, diagnostične specifičnosti ter pozitivne in negativne napovedne vrednosti opozoril hematološkega analizatorja na fragmentirane eritrocite smo rezultate mikroskopskega pregleda opredelili kot resnično pozitivne, če smo določili shizocite v razmazu krvi in resnično negativne (n=56), kadar shizocitov v razmazu krvi nismo opazili. Pražna vrednost za pozitivno najdbo shizocitov pri mikroskopskem pregledu razmaza krvi je bila 0,2% (37).

Preglednica V: Ovrednotenje opozoril na FRC analizatorja Sysmex XN-1000 (N=233).

Opozorilo »Fragments«	Rutinska metoda
Resnično negativni	80 (34,3%)
Lažno negativni	4 (1,7%)
Resnično pozitivni	89 (38,2%)
Lažno pozitivni	60 (25,7%)
Občutljivost	95,7%
Specifičnost	57,1%
Pozitivna napovedna vrednost	59,7%
Negativna napovedna vrednost	95,2%

Trdimo lahko, da občutljivost aparata Sysmex XN-1000 za fragmentirane eritrocite zelo dobra, specifičnost pa slabša. Naši rezultati so primerljivi z literaturo. Literatura navaja diagnostično občutljivost tega analizatorja 91,8-100%, ter specifičnost 20-52,2%. Ker delež lažno pozitivnih ne presega 40%, ter delež lažno negativnih ne 35%, sta občutljivost ter specifičnost analizatorja zadostni (38). Negativna napovedna vrednost je zelo visoka, kar pomeni, da bi lahko avtomatsko zaznavanje parametra FRC uporabili presejalno pri odločanju, kdaj prisotnost shizocitov preverjati mikroskopsko (28, 29).

4.4 PRIMERJAVA VREDNOSTI PARAMETRA FRC Z MIKROSKOPSKO DOLOČITVIJO SHIZOCITOV

Pri 179-ih vzorcih smo določili parameter FRC z analizatorjem. Ob tem smo pregledali tudi ostala opozorila analizatorja povezana z eritrocitno in trombocitno vrsto. Spodnja **preglednica VI** prikazuje primerjavo naših rezultatov z rezultati iz literature (19). V raziskavi, ki so jo naredili na zdravih preiskovancih, so vzorce razdelili v dve skupini: vzorci, kjer je analizator določil FRC in ni bilo nobenih opozoril, ter druga skupina vzorcev, kjer je analizator dal opozorila (nenormalna porazdelitev trombocitov, nenormalna porazdelitev eritrocitov, odstopanja v retikulocitni porazdelitvi). Mi smo določili višji delež FRC, kar je pričakovano, saj je bila navedena študija narejena na normalnih vzorcih. Razvidno je tudi, da smo pri določitvi deleža FRC s sočasnimi opozorili analizatorja dobili višje vrednosti kot pri določitvi parametra FRC brez opozoril. Sklepamo lahko, da ob nenormalni porazdelitvi eritrocitov ter trombocitov prihaja do lažno zvišanega deleža FRC. Zato je zelo pomembno, da ob zvečanem parametru FRC skrbno pregledamo ostala opozorila povezana s trombociti in eritrociti ter pripadajoče diagrame.

Preglednica VI: Primerjava rezultatov določitve deleža parametra FRC z literaturnimi navedbami (19).

	Literaturni podatki – zdravi (n=1366)			Hematološki bolniki (n=179)		
	FRC (%)	FRC (%) brez opozoril	FRC (%) z opozorili	FRC (%)	FRC (%) brez opozoril	FRC (%) z opozorili
Min	0	0	0	0	0,0	0,0
Max	4,01	2,4	4,1	13,62	8,53	11,09
Mediana	0	0	0,115	1,48	0,86	2,23
95% interval zaupanja	0,12-0,16	0,11-0,13	0,64-0,76	0,69-2,17	0,31-1,74	1,05-3,78

Z opisno statistiko smo pri 179-ih vzorcih, kjer smo določili FRC z analizatorjem in shizocite z mikroskopskim pregledom z obema metodama, ovrednotili vse tri določitve (**Preglednica VII**).

Preglednica VII: Primerjava določitve shizocitov z rutinsko metodo, metodo po priporočilih ICSH ter avtomatizirano FRC (N=179).

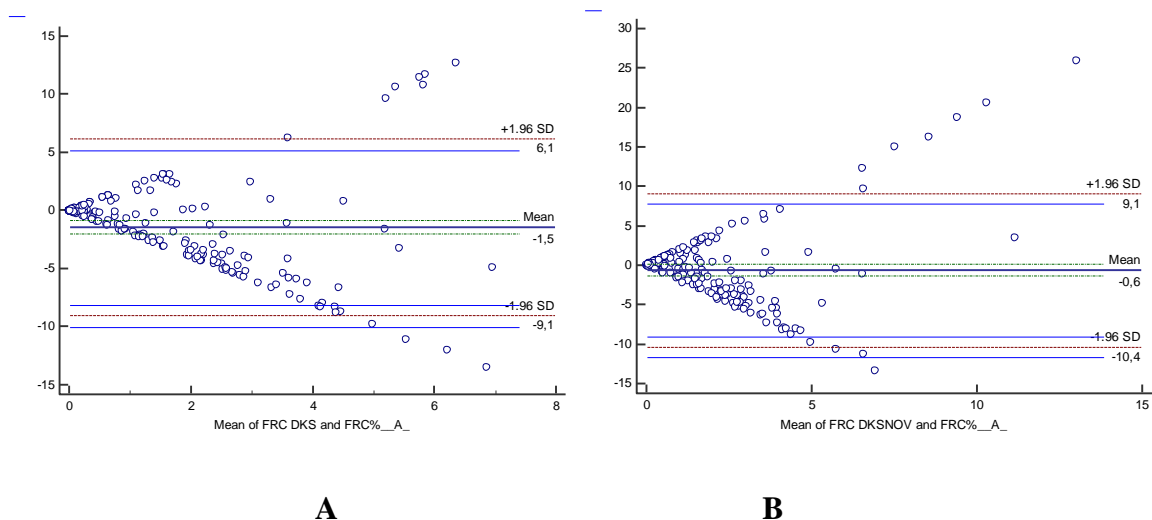
	RUTINSKA METODA	METODA PO PRIPOROČILIH	FRC
Najnižja vrednost (%)	0	0	0
Najvišja vrednost (%)	12,7	26,0	13,62
Mediana (%)	0,20	0,85	1,48
95% interval zaupanja	0,10-0,40	0,60-1,00	0,69-2,17

S pomočjo statističnega programa Medcalc smo s testom Kolmogorov-Smirnov preverjali, kako so naše meritve porazdeljene. Ugotovili smo, da so rezultati nenormalno porazdeljeni.

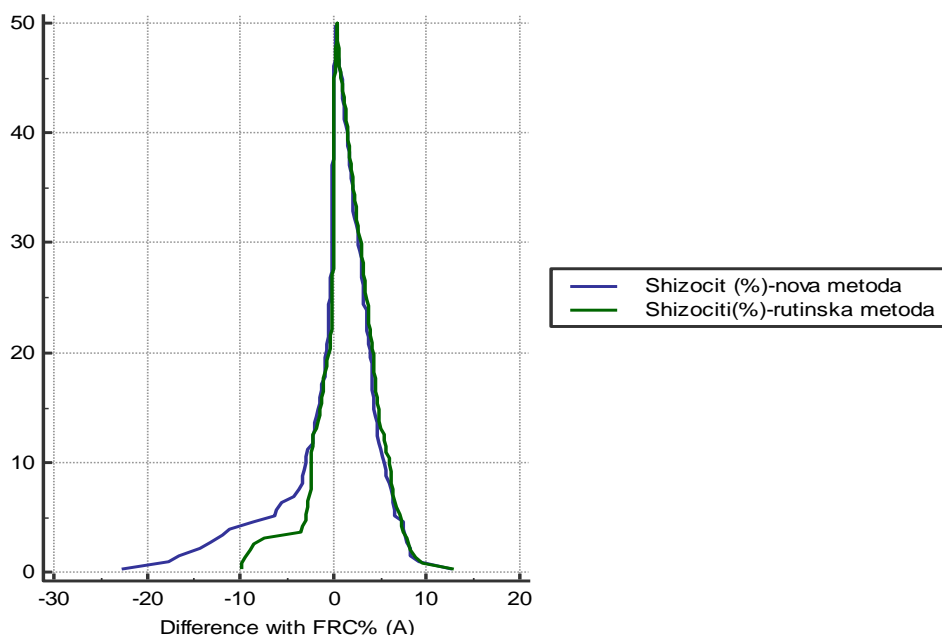
Določili smo mediano za parameter FRC, ki je znašala 1,48% in interval zaupanja, ki je znašal (0,69-2,17%). Želeli smo ugotoviti, kakšno je ujemanje med vrednostjo parametra FRC ter določitvijo shizocitov v razmazu krvi.

V eni študiji so določili za parameter FRC mediano na normalnih vzorcih 0%, 95% interval zaupanja je bil (0,12-0,16%) (39). Mi na normalnih vzorcih nismo določali parametra FRC ločeno. Razpon vrednosti, ki smo jih določili za FRC (0,0-13,62) pa je zelo primerljiv z literaturo (0,59-13,42%) (39).

Najprej smo primerjali rezultate za FRC, izmerjene na analizatorju Sysmex XN-1000, z vrednostmi shizocitov določenimi v razmazu krvi z rutinsko metodo. Naredili smo Bland-Altmanov diagram, iz katerega je razvidno, da je povprečje razlik -1,5%, kar pomeni, da je delež FRC določen na analizatorju Sysmex XN-1000 za 1,5 % večji kot delež shizocitov določen z rutinsko metod. Na diagramu so točke porazdeljene v obliki troblje, kar pomeni večanje razlik z večanjem vrednosti opazovanega parametra (**Slika 22A**). Nato smo primerjali delež FRC določen na analizatorju z deležem shizocitov določenim z metodo po priporočilih ICSH. Bland-Altmanov diagram prikazuje, da je povprečje razlik med deležem FRC in deležem shizocitov -0,6%. Vrednost parametra FRC je za 0,6% večja od deleža, določenega z mikroskopskim štetjem v skladu z novimi priporočili (**Slika 22B**).



Slika 22: Primerjava določitve shizocitov A) FRC in rutinsko določeni shizociti. B) FRC in shizociti določeni z novo metodo (N=179).

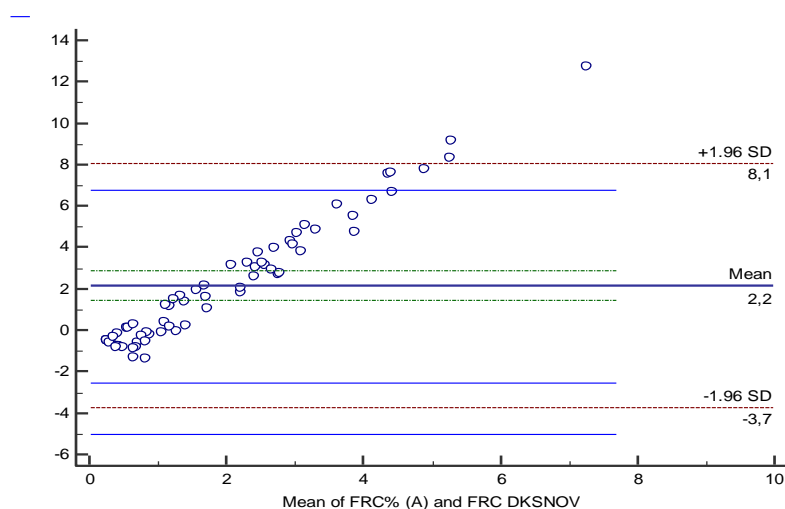


Slika 23: Primerjava parametra FRC z deležem shizocitov, določenim z rutinsko ter novo metodo. Diagram prepognjene empirične kumulativne porazdelitve (N=179).

Naredili smo še diagram prepognjene empirične kumulativne porazdelitve, iz katere je razvidno, da vrh ni na polni navpični črti, ki označuje razliko 0, pač pa je pomaknjen v desno. Rep krivulje je nekoliko daljši pri novi metodi, razhajanja med metodama so večja pri višjih vrednostih (**Slika 23**). Na ta način dobimo enako vrednost kot iz Bland-Altmanovega diagrama, da je namreč delež FRC na analizatorju Symex XN-1000 za 1,5% večji kot pri mikroskopski določitvi parametra FRC z rutinsko metodo (**Slika 22A**). Pri

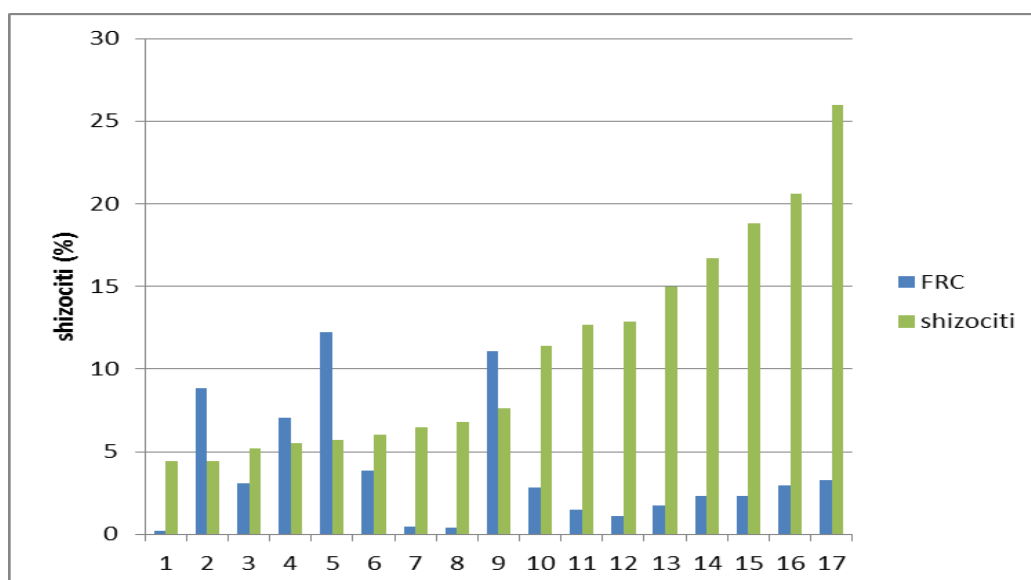
določitvi shizocitov z novo metodo je vrednost parametra FRC na analizatorju za 0,6% večja kot pri mikroskopski določitvi (**Slika 22B**).

Ker je iz zgornjih diagramov očitno, da se razlika med parametrom FRC in mikroskopsko določitvijo shizocitov povečuje z naraščajočim deležem shizocitov, smo ločeno pogledali razliko za vzorce z deležem shizocitov med 0,5 in 1,5%. Gre za vzorce, ki se nahajajo okrog klinično mejne vrednosti 1%.



Slika 24: Primerjava določitve parametra FRC in shizocitov določenimi z novo metodo vzorcev, kjer je delež shizocitov med 0,5-1,5%.

Zanimalo nas je, kakšna je razlika med rezultati parametra FRC določenimi na hematološkem analizatorju in shizociti določenimi z metodo po priporočilih ICSH, pri 69 vzorcih, kjer je bil delež shizocitov med 0,5-1,5%. Bland-Altmanov diagram prikazuje, da je delež FRC na analizatorju za 2,2% večji od delež določenega z mikroskopskim štetjem v skladu z novimi priporočili. Iz **slike 24** je razvidno, da se povprečna napaka linearno povečuje z velikostjo merjene vrednosti (CV=5%), z naraščajočim deležem shizocitov torej. Vidimo pa tudi to, da je nasprotno s precenitvijo FRC, ki smo jo ugotovili za vse vzorce (**slika 22, 23**), FRC pri vzorcih s povečanim deležem shizocitov podcenjen. Spodnja slika prikazuje podatke za FRC in delež shizocitov za 17 bolnikov z več kot 3% shizocitov. Iz grafa na **sliki 25** vidimo, da je podcenitev FRC pri velikem deležu shizocitov izrazita. Imeli smo celo tri bolnike, kjer je bil FRC<0,5%.



Slika 25: Podcenitev parametra FRC pri bolnikih z deležem shizocitov določenim z novo metodo > 3%.

4.5 POVEZAVA MED FRC, SHIZOCITI IN PARAMETRI ERITROCITNE KRVNE SLIKE

V primerjavo smo vključili 272 vzorcev. Od tega je bilo 179 vzorcev hematoloških bolnikov, 60 vzorcev novorojenčkov ter 33 vzorcev otrok. Pri vseh smo določili krvno sliko in mikroskopsko z novo metodo določili delež shizocitov (**Priloga I**).

V primerjavo smo vključili parametra RDW in MCV, pri 179-ih vzorcih bolnikov s krvno boleznijo pa še HIPO-He (hipokromni eritrociti).

Ker smo pokazali, da parameter FRC ni zadosti specifičen kazalnik TTP, nam lahko parametra RDW ter HIPO-He dodatno povečata njegovo specifičnost. Zanimalo nas je, kakšna je statistična povezava parametra FRC s parametroma RDW in HIPO-He. Parameter HIPO-He nam pove, kakšen je delež hipokromnih eritrocitov s hemoglobinom < 17 pg. Parameter HIPO-He je dober kazalnik ocene eritropoeze in določa pomanjkanje železa v 120 dnevnom obdobju. Delež HIPO-He večji od 1,1% smo določili pri 110-ih vzorcih. Izračunali smo Spearmanov koeficient korelacije med parametroma FRC in HIPO-He, ki je znašal 0,788, kar pomeni odlično povezavo med parametroma.

Določitev parametra HIPO-He neposredno vpliva na določitev parametra FRC. Pri vrednosti HIPO-He > 1,1%, lahko dobimo lažno višji delež FRC. Vrednosti parametra HIPO-He med 1,2-5,2% neposredno vpliva na povišanje parametra FRC ($P < 0,001$) (18,19). Mi smo dobili 25,7% lažno pozitivnih rezultatov za parameter FRC. V študiji, ki je bila narejena pri bolnikih z različnimi obolenji, so dobili 23,0% lažno pozitivnih rezultatov, kar se dobro ujema z našimi rezultati. Razlog je lahko zvišan delež HIPO-He (17, 18). Da bi znižali odstotek lažno pozitivnih rezultatov pri zvečanem FRC, je smiselno upoštevati parameter HIPO-He. Ugotavljali so korelacijo med parametroma, če je delež HIPO-He med 1,2-5,2%, korelacijski koeficient je znašal 0,621 ($P < 0,001$). Tudi mi smo določili korelacijski koeficient pri vzorcih, kjer je bil delež HIPO-He med 1,2-5,0%, in dobili domala enako vrednost 0,636 ($P < 0,001$) (19).

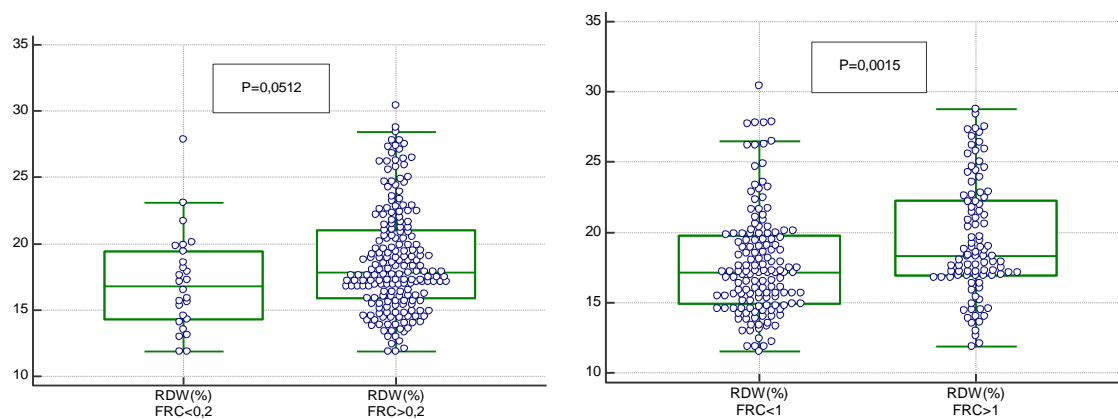
Parameter RDW, pove, kako homogena je populacija eritrocitov v določenem vzorcu. Kadar imamo vrednosti RDW znotraj referenčnega intervala, lahko sklepamo, da je populacija eritrocitov homogena. Ko so vrednosti RDW visoke, je populacija eritrocitov heterogena. V naši raziskovalni nalogi je bila mediana statistično višja v primerjavi z literaturnimi navedbami (28). Mediana pri 266-ih vzorcih je znašala 17,5, mediana iz literature, kjer so v raziskavo vključili 220 zdravih preiskovancev, pa je znašala 13,3. Vzrok za višje vrednost mediane v naši preiskovani skupini je v tem, da imamo preiskovance s pretežno hematološkim obolenjem in lahko pričakujemo večjo heterogenost eritrocitne populacije. Izračunali smo Spearmanov koeficient korelacije med parametrom RDW in parametrom FRC, ki je znašal 0,588, kar pomeni zmerno dobro povezavo med parametroma. Literatura navaja, da takrat, kadar je shizocitov več kot 6%, analizator ne more določiti parametra RDW (24). Mi tej trditvi ne moremo pritrditi.

Med 179-imi vzorci je bil delež FRC pri 22-ih vzorcih večji od 6%, analizator pa ni določil RDW le v enem primeru, kjer je bila vrednost FRC 7,1% (Vzorec 5, **Preglednica VIII**). Analizator pri štirih primerih ni določil RDW, ampak je opozoril na nenormalno porazdelitev eritrocitov, vrednosti FRC pa so bile nižje od 3% (**Preglednica VIII**).

Preglednica VIII: Delež FRC pri vzorcih, kjer analizator ni določil RDW (N=5).

	FRC na analizatorju (%)
1	1,74
2	2,51
3	0,80
4	2,77
5	7,10

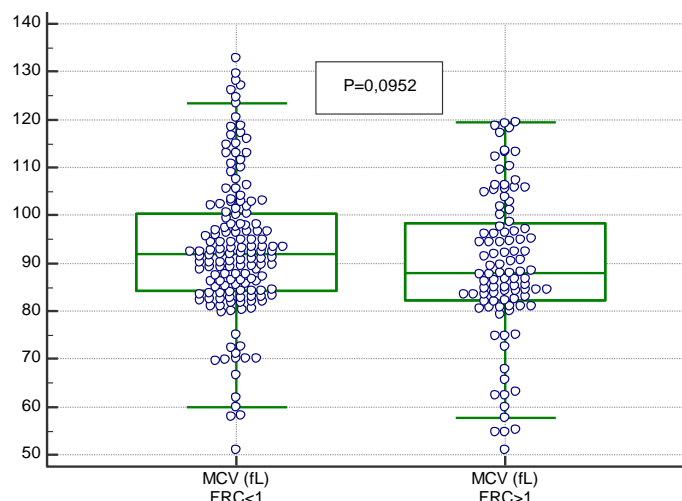
Slika 26A prikazuje razliko mediane ter porazdelitev vrednosti posameznih meritev za parameter RDW, kjer je bil delež shizocitov manj kot 0,2% in pri vzorcih, kjer je bil delež shizocitov več kot 0,2%. Ta naj bi bila okvirna zgornja referenčna vrednost za zdrave. Uporabili smo neparametrični test Mann-Whitney za dve neodvisni spremenljivki. Izbrali smo 95% interval zaupanja in izrisali graf. Na vsakem grafu so izrisane točke posamezne meritve ter mediana posameznega parametra. Vrednosti manjše od 5 in večje od 95 percentile so ekstremne vrednosti. Porazdelitev obeh parametrov statistično ni različna pri preiskovancih, kjer je delež shizocitov manj oziroma več kot 0,2% pri mikroskopski določitvi (P=0,0512). Nato smo primerjali razliko mediane ter porazdelitev posameznih meritev za parameter RDW, kjer je bil delež shizocitov večji od klinično pomembne vrednosti 1%. Tokrat smo dokazali, da je porazdelitev obeh parametrov statistično značilno različna (P=0,0015) (**Slika 26B**). Parameter RDW je pri bolnikih z več kot 1% shizocitov značilno povečan.



Slika 26: Porazdelitev vrednosti mediane za parameter RDW pri preiskovancih z **A)** deležem shizocitov manj ter več kot 0,2% ter **B)** deležem shizocitov manj ter več kot 1% (N=272).

Princip merjenja parametra FRC na analizatorju temelji na velikosti ne pa na obliki eritrocitov, zato je vpliv mikrocitoze na določitev FRC večji. Shizociti (<7 μm) so po velikosti manjši od normalnih eritrocitov. Zato nas je zanimal tudi parameter MCV. Pri 36-ih vzorcih je bil $\text{MCV} > 95 \text{ fL}$, pri dveh od teh je bil $\text{RDW} > 22\%$. Pri ostalih 34-ih vzorcih je bil RDW normalen. V literaturi priporočajo, da se pri makrocitozi, kjer je $\text{MCV} > 105 \text{ fL}$ in vrednost RDW normalna, priporoča pregled krvnega razmaza zaradi možnosti, da so vzorci lažno negativni (40). Pri 7-ih vzorcih smo ugotovili $\text{MCV} > 105 \text{ fL}$, nobeden od njih ni bil lažno negativen. Korelacijski koeficient med FRC in shizociti je bil pri teh vzorcih 0,79. Kar kaže dobro povezavo med parametroma, kljub temu, da je bila prisotna makrocitoza (17).

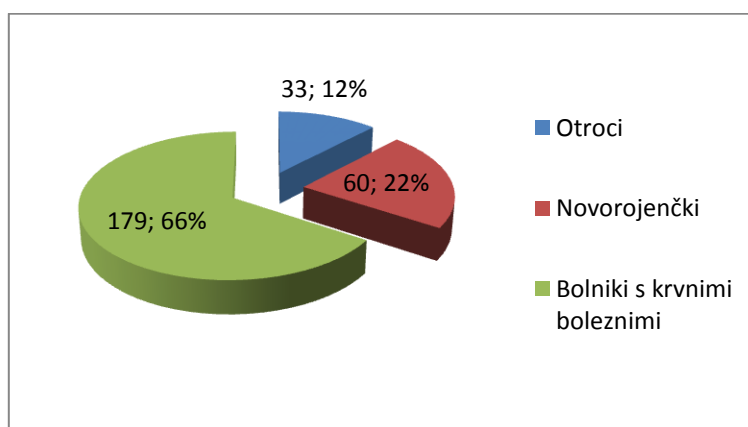
Za parameter MCV nismo našli statističnih razlik ($P=0,0952$) med preiskovanci, kjer je delež shizocitov manj kot 1% ter več kot 1% (**Slika 27**). Za parameter FRC smo dobili zelo visoko negativno napovedno vrednost, ki je znašala 95,2%, lažno negativnih vzorcev pa samo 1,7%. Vzrok lažno negativnih rezultatov je lahko prisotnost mikrocitoze, kar pa pri naših vzorcih ni bil. Vrednosti MCV so bile pri vseh lažno negativnih vzorcih normalne (19).



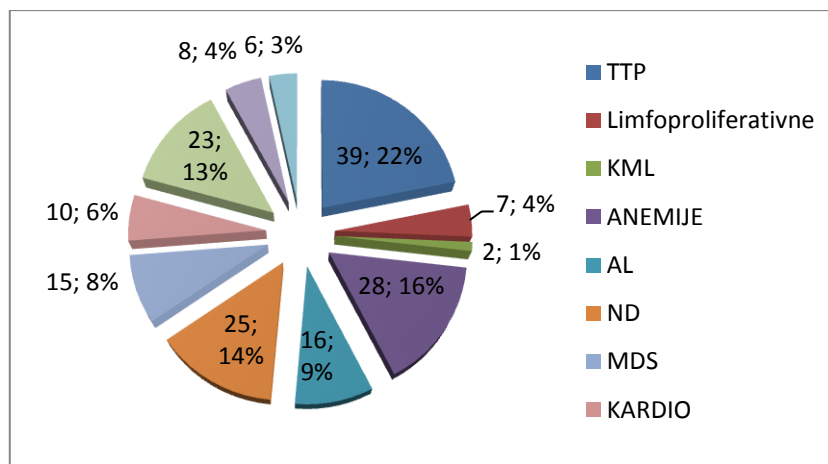
Slika 27: Porazdelitev vrednosti mediane za parameter MCV pri preiskovancih z deležem shizocitov manjšim ter večjim kot 1% (N=272).

4.6 DOLOČANJE SHIZOCITOV Z METODO PO PRIPOROČILIH ICSH PRI TREH SKUPINAH BOLNIKOV

Shizocite skladno s priporočili ICSH smo določali pri 272 vzorcih preiskovancev. V našo raziskavo smo vključili tri glavne skupine, ki smo jih ločili na preiskovance s pretežno hematološkim obolenjem, skupino novorojenčkov ter skupino otrok (**Slika 28**). Preiskovance smo vključili, če so se pojavila opozorila na FRC oziroma je bila njihova določitev vnaprej naročena s strani zdravnika.



Slika 28: Število vzorcev glede na skupine preiskovancev (N=272).



Seznam okrajšav: TTP - trombotična trombocitopenična purpura, ANEMIJE (avtoimunska hemolitična anemija, sideropenična anemija, hemolitična anemija), LIMFOPROLIFERATIVNE BOLEZNI (kronična limfatična levkemija, disemeniran plazmocitom, dlkastocelična levkemija), MDS - MIELODISPLASTIČNI SINDROM (esencialna trombocitemija, citopenija), MPB – MIELOPROLIFERATIVNE BOLEZNI (prava policitemija), KML - kronična mieloična levkemija, NEFRO (nefrotski sindrom)

Slika 29: Število vzorcev glede na diagnozo pri skupini bolnikov s pretežno hematološkim obolenjem (N=179).

V skupini novorojenčkov smo imeli 60 vzorcev. Med njimi je bilo 10 takšnih, pri katerih preparati tehnično niso bili ustrezni za vrednotenje shizocitov. V skupini otrok smo imeli 33 krvnih razmazov. Med njimi so bili 3 preparati tehnično neustrezni za vrednotenje shizocitov. Pri skupini hematoloških pacientov so bili vsi preparati primerni za vrednotenje. Najvišja vrednost mediane je bila pri skupini novorojenčkov, ki je znašala 0,85% (**Preglednica IX**). V študijah so pokazali, da je delež shizocitov najvišji pri nedonošenčkih, kjer je mediana znašala 1,7% (0,90-2,45%). Shizociti so pri nedonošenčkih prisotni ob rojstvu, zato je okvirni referenčni interval zanje med 4,9-5,5% (7).

Preglednica IX: Delež shizocitov pri treh skupinah preiskovancev.

	Mediana (%)	Min (%)	Max (%)	95% interval
Novorojenci (N=50)	0,85	0,10	3,8	0,89-1,42
Otroci (N=30)	0,65	0,1	4	0,60-1,34
Hematološki bolniki (N=179)	0,7	0	26,0	1,34-2,42

4.6.1 Določanje fragmentiranih eritrocitov pri skupini bolnikov s TTP

Podrobno smo primerjali shizocite določene z rutinsko metodo in novo metodo (po priporočilih ICSH), pri preiskovancih z napotno diagnozo TTP. V raziskavo so bili vključeni štiri pacienti s potrjeno diagnozo TTP. Pri vseh 4-ih pacientih smo dnevno spremljali delež shizocitov. Ovrednotili smo 24 preparatov z obema metodama (**Preglednica X**). Opazen je bil trend padanja deleža shizocitov, istočasno pa je številčna koncentracija trombocitov naraščala po terapiji s plazmaferezo (**Priloga I, slika 30**).

Preglednica X: Delež shizocitov pri preiskovancih v s TTP določen z obema metodama (N=24).

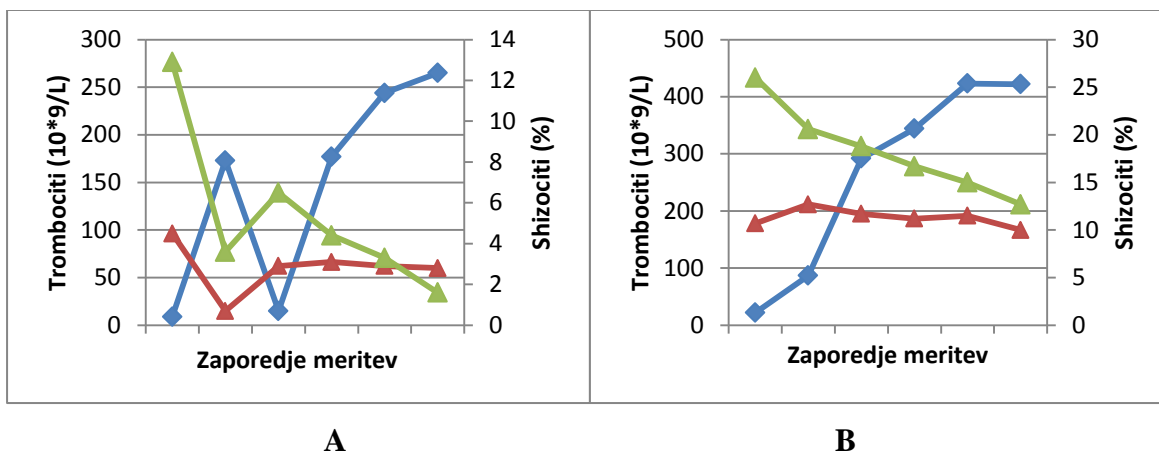
	Mediana (%)	Min (%)	Max (%)	95% interval zaupanja
Rutinska metoda	2,85	0,2	12,7	1,10-3,98
Nova metoda	3,45	0,3	26,0	1,94-8,07

Spodnja **slika 30** prikazuje spremljanje deleža shizocitov in številčne koncentracije trombocitov med zdravljenjem bolnikov s TTP s plazmaferezami. Na sliki je vidna razlika v krivuljah med rutinsko in novo metodo. Pri novi metodi je viden trend padanja deleža shizocitov, medtem ko pri rutinski metodi ni tako opazen.

Sklepamo lahko, da z novo metodo lahko bolj natančno določimo delež shizocitov, zato je bolj primerna za spremljanje deleža shizocitov med zdravljenjem. Rezultati shizocitov določeni z novo metodo zelo dobro prikazujejo dinamiko bolezni, kar je lahko v pomoč zdravniku hematologu med zdravljenjem.

Slika 30A prikazuje primer bolnice z novo odkrito TTP. Ko je prišla na pregled k specialistu hematologu, je bila vrednost shizocitov 12,9% in trombocitov $9 \times 10^9/L$. Pričeli so zdravljenje s plazmaferezami in kortikosteroidi. Po 4-ih dneh je vrednost trombocitov narasla na $173 \times 10^9/L$ delež shizocitov je bil 3,6%. Ker so se po 3-eh dneh trombociti znižali na $18 \times 10^9/L$, je bilo potrebno povečati število plazmaferez na dvakrat dnevno. Po šestih dneh so trombociti narasli na $177 \times 10^9/L$, delež shizocitov je bil 4,4%. V nadaljnjih 4-ih dneh je prejela zdravljenje, vrednost trombocitov je narasla na $265 \times 10^9/L$, delež shizocitov je padel na 1,6% in bolnica je bila odpuščena iz bolnišnice.

Slika 30B prikazuje primer pacienta ob 3. zagonu bolezni. Gospod je imel ob prvem merjenju $22 \times 10^9/L$ trombocitov, delež shizocitov pa 26,0%. Pričeli so zdravljenje s plazmaferezo in visoko koncentracijo kortikosteroidov. Enkrat dnevno šest dni zapored so izvajali plazmaferezo, da so trombociti narastli na $292 \times 10^9/L$, delež shizocitov pa je padel na 18,8%. Do konca zdravljenja je bolnik prejel 10 plazmaferez, delež shizocitov je padel pod 10,0%, številčna koncentracija trombocitov pa porastla na $422 \times 10^9/L$.



Slika 30: Spremljanje številčne koncentracije trombocitov (modra) in delež shizocitov z rutinsko metodo (rdeča) ter z novo metodo (zelena) pri bolnikih s TTP zdravljenih s plazmaferezami. **A)** Bolnica 1A- 6A. **B)** Bolnik 1B- 6B (Priloga I, Preglednica XIII).

4.6.2 Določitev mejne vrednosti za delež shizocitov pri bolnikih s TTP

S pomočjo ROC krivulje lahko ločimo bolnike od zdravih preiskovancev. ROC krivuljo lahko uporabljamo za primerjavo diagnostične učinkovitosti dveh ali več diagnostičnih testov (40, 41). Z ROC- analizo smo želeli postaviti mejno vrednost, pri kateri bi dosegli najboljšo diagnostično občutljivost ter diagnostično specifičnost. Naš namen je bil določiti mejne vrednosti za delež shizocitov, pri katerem bi pri preiskovancih z največjo verjetnostjo sumili na TTP.

S pomočjo površine pod krivuljo (AUC) lahko določimo diagnostično zanesljivost testa. Večja kot je AUC, boljše je uporabnost testa (40, 41):

0,90-1 = izvrsten test

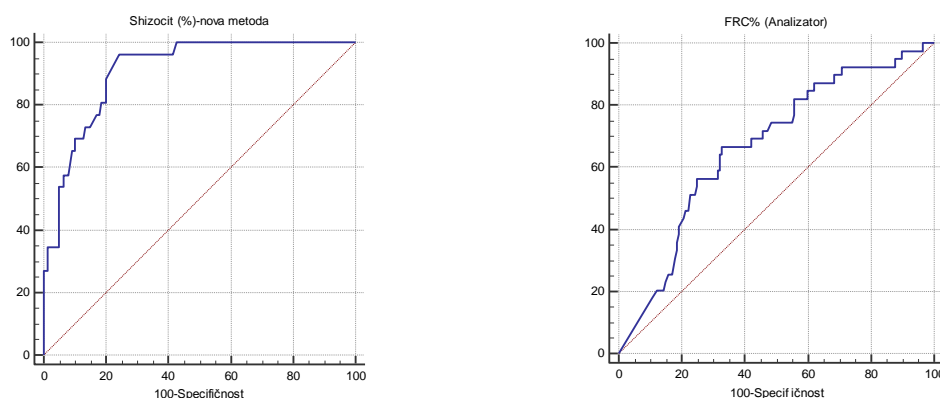
0,80-0,90 = dober test

0,70-0,80 = srednje dober test

0,60-0,70 = slabši test

Zanimalo nas je, katera je mejna vrednost določena mikroskopsko z novo metodo, pri kateri bi lahko sklepali, da gre najverjetneje za TTP. V spodnji **preglednici XI** so zbrane mejne vrednosti za parameter FRC ter shizocite. AUC, občutljivost ter specifičnost so izračunane za analizator ter za mikroskopsko določitev z novo metodo. ROC krivulja pri mejni vrednosti 1,1% shizocitov za mikroskopsko oceno je pokazala statistično značilno višjo diagnostično zanesljivost meritev. Pri mejni vrednosti >1,1%, smo dobili specifičnost 75,7% in občutljivost 96,1%. Površina pod krivuljo je znašala 0,909, kar pomeni, da je test izvrsten (**Slika 31A**). Delež shizocitov v razmazu krvi nad 1,1% torej zanesljivo kaže na TTP.

Mejna vrednost za FRC je bila <0,49%, specifičnost 67,1% ter občutljivost 61,5%, AUC pa 0,648 (**Slika 31B**). Določitev parametra FRC na analizatorju nima pomembne klinične vrednosti, test je glede na vrednost AUC slab.



Slika 31: ROC krivulja za zaznavanje TTP. **A)** Mejna vrednost za TTP pri mikroskopski določitvi shizocitov. **B)** Mejna vrednost za parameter FRC (N=179).

Preglednica XI: Določitev mejnih vrednosti za FRC in shizocite.

	Mejna vrednost (%)	AUC (/)	Občutljivost (%)	Specifičnost (%)
Mikroskop- nova metoda	>1,1	0,909	96,1	75,7
Analizator (FRC)	≤0,49	0,669	66,67	67,41

V študijah, ki so bile narejene za analizatorja ADVIA in Sysmex, so s pomočjo ROC krivulje določili mejno vrednost za analizator, kjer je zelo verjetno, da so shizociti prisotni v razmazu krvi. Mejna vrednost za patološki vzorec za parameter FRC je bila določena >0,5%. Za analizator Sysmex so določili mejno vrednost za parameter FRC 0,5%, AUC je znašala 0,78, diagnostična občutljivost 95% in negativna napovedna vrednost 99%. Tudi smernice navajajo, da je mejna vrednost za parameter FRC >1%, kjer je shizocite potrebno določiti v razmazu krvi. Mi smo določili mejno vrednost za parameter FRC na analizatorju >0,49%. Ker je specifičnost nizka, bi bilo smiselno vključiti še parameter HIPO-He, da bi zvišali diagnostično specifičnost parametra FRC in hkrati znižali delež lažno pozitivnih rezultatov (17).

5. ZAKLJUČEK

1. Uvedli smo določanje shizocitov v skladu s priporočili ICSH. Pri tem smo ugotovili, da je ključna predhodna ocena ustreznosti kakovosti preparatov ter izločitev vzorcev s poikilocitozo. Najbolj težavno je vrednotenje vzorcev s številnimi mikrosferociti.
2. Ugotovili smo odlično ujemanje med rutinsko in novo metodo skladno s priporočili ICSH ($r=0,79$). Ugotovili smo, da so vrednosti shizocitov pri mikroskopski določitvi z novo metodo za 0,8% višje od vrednosti, določenimi z rutinsko metodo. Ponovljivost mikroskopskega določanja shizocitov je bila boljša z novo metodo.
3. Ugotovili smo, da ima raziskovalni parameter FRC 95% občutljivost in 95% negativno napovedno vrednost. Le 4% vzorcev je bilo lažno negativnih, kar pomeni, da lahko parameter FRC uporabljamo pri odločanju za mikroskopski pregled krvnega razmaza. Njegova vrednost pa ima majhno uporabnost, ker je pri nizkih vrednostih shizocitov precenjena, pri visokih pa podcenjena.
4. Delež FRC je bil za 1,5% večji kot delež shizocitov pri rutinski mikroskopski določitvi, oziroma za 0,6% večji od rezultatov dobljenih z metodo po priporočilih ICSH. Vrednosti parametra FRC bolje korelirajo z deležem shizocitov določenim z novo metodo.
5. Delež shizocitov smo določali v skupini bolnikov s pretežno hematološkimi in nekaterimi drugimi obolenji ter v skupini otrok in novorojenčkov. Najvišja vrednost deleža shizocitov v skupini otrok je bila 4,0%, v skupini novorojenčkov 3,8%, v skupini bolnikov s pretežno hematološkim obolenjem pa 26,0% pri bolniku s TTP.
6. Za postavitev mejne vrednosti pri preiskovancih s TTP smo ugotovili, da je klinično pomembna mejna vrednost $>1,1\%$ shizocitov, kar je blizu literaturnim navedbam (1%). Mejna vrednost za analizator $>0,49\%$, a ima slabo diagnostično vrednost. Da bi povečali specifičnost parametra FRC, bi bilo smiselno upoštevati parameter $1,1\% < \text{HIPO-HE} < 5,2\%$. Nova metoda je zelo primerna tudi za spremljanje kinetike deleža shizocitov med zdravljenjem bolnika.

6. LITERATURA

1. Zini G, D'onofrio G, Briggs C, Erber W, Jou JM, Lee SH, Mcfadden S, Vives-Corrans JL, Yutaka N, Lesesve JF: ICSH recommendations for identification, diagnostic value, and quantitation of schistocytes. *Int J Lab Hem* 2012; 34: 107-116.
2. Košnik M, Mrevlje F, Štajer D, Černelč P, Koželj M: *Interna medicina, Slovensko medicinsko društvo, Ljubljana 2011: 1244- 1247.*
3. Blum A: The possible role of red blood cell microvesicles in atherosclerosis. *Euro J Int Med* 2009; 20: 101-105.
4. Podgornik H, Pretnar J, Černelč P: *Atlas krvnih celic, Slovensko društvo za hematookološko diagnostiko, Ljubljana 2013: 31-41.*
5. Bain BJ: Blood cell morphology in health and disease. In *Dacie and Lewis Practical Haematology. Eleventh Edition, Churchill Livingstone 2011: 71.*
6. Reinhart WH: Peculiar red cell shapes: Fahraeus Lecture. *Clin Hem Microcircu* 2011; 49: 11-27.
7. Huh HJ, Chung JW, Chae SL: Microscopic schistocyte determination according to International Council for Standardization in Hematology recommendations in various diseases. *Int J Lab Hem* 2013; 35: 542-547.
8. Standardni operativni postopek, Diferencialna krvna slika (SHL-20-012-03). Dostopno v specializiranem hematološkem laboratoriju. (Dostopano: 23. 9. 2015)
9. Turgeon ML: *Clinical Hematology. 5th Edition. Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia 2012: 436-442.*
10. Provan D: *ABC of Clinical Haematology. 3rd Edition. Blackwell Publishing Ltd, Massachusetts 2007: 33-37.*
11. Nizić KT, Zver S, Breclj E: Trombotična mikroangiopatija pri bolniku z metastatskim kolorektalnim karcinomom. *Zdrav Vest* 2015; 84: 572-8.
12. Longo DL: *Harrison's Hematology and Oncology. 17th Edition. McGraw-Hill Companies, Baltimore 2010: 230-232.*

13. Benie TC, SH, I, ART, MLT: The red Cell Histogram and The Dimorphic Red cell Population, Lab Med 2011; 300-308.
14. Burns ER, Yenmay L, Anjali P: Morfologic Diagnosis of Thrombotic Trombocytopenic Purpura. Int J Lab Hem 2004; 75: 18-21.
15. <https://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/ttp/treatment>
(Dostopano: 5.10. 2015)
16. Sever M: Zdravljenje trombotične trombocitopenične purpуре- naše izkušnje. Klinični oddelek za hematologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana. Zdrav Vestn 2008; 77: I-105-9.
17. Lesesve JF, Asnafi V, Braun F, Zini G: Fragmented red blood cells automated measurement is a useful parameter to exlude schistocytes on the blood film. Int J Lab Hem 2012; 34: 566-576.
18. Lesesve JF, Speyer E, Perol JP: Fragmented red cells reference range for the Sysmex XN®- series of automated blood cell counters. Int J Lab Hem 2015; 37: 583-587.
19. Chalvatzi K, Spiroglou S, Nikolaidou A, Diza E: Evaulation of fragmented red cell (FRC) counting using Sysmex XE-5000- Does hypochromia play role? Int J Lab Hem 2012; 35: 193-199.
20. <https://www.sysmex.com/us/en/Products/Hematology/XNSeries/Pages/XN-1000R-Hematology-Analyzer.aspx> (Dostopano, 27. 4. 2015).
21. Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide, BD Biosciences San Jose, CA 2000; 11: 11032-01.
22. Matsushita Hiromichi: Clinical Case Report Vol.2. Department of Laboratory Medicine, 2012; 6.
23. Sysmex corporation: Reshaping compact automation. Dostopno na: http://www.sysmex.com/us/en/Broshures/XN_Compact_Automation_MKT-10-1175.pdf
(Dostopano: 23. 09. 2015)
24. Sysmex Europe: Professional service. Dostopno na: <http://www.sysmex-europe.com/products/diagnostics/haematology/professional-services.html> (Dostopano: 23. 09. 2015)

25. Sysmex corporation: Navodila za uporabo XN serije. Dostopno v Specializiranem hematološkem laboratoriju. (Dostopano: 23. 09. 2015)
26. <http://www.sysmex-europe.com/academy/knowledge-centre/calendar-2014/september.html> (Dostopano: 23. 09. 2015)
27. <http://www.sysmex-europe.com/academy/knowledge-centre/calendar-2014/measurement-technology-and-scattergram.html> (Dostopano: 23. 09. 2015)
28. Buttarello M, MD, Plebani M, MD: Automated Blood Cell Counts, State of the Art. Am J Clin Pathol 2008; 130: 104-116.
29. Briggs C: Quality counts: New parameters in blood cell counting. Int J Lab Hem 2009; 31: 277-297.
30. Stasi R: How to approach thrombocytopenia. Hem Am Soc Hematol Educ Prog 2012; 191-197.
31. Berce K, Božnar Alič E, Pogornik H, Trampuš Bakija A, Žontar D: Priporočeni postopki za mikroskopski pregled krvnega razmaza, Slovensko združenje za klinično kemijo (SZKK), Ljubljana, 2012: 3-20.
32. Bain BJ: Blood cells, A Practical Guide. 4th Edition. Blackwell Publishing Ltd, London 2006: 8-14.
33. Standardni operativni postopek, Barvanje preparatov venske krvi SOP SHL-20-002-03. Dostopno v specializiranem hematološkem laboratoriju. (Dostopano: 23. 9. 2015)
34. Bland MJ, Altman GD: Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurements. Dostopno na: <http://www.medicine.mcgill.ca/epidemiology/hanley/tmp/Surveys/ba.pdf> (Dostopano: 23. 09. 2015)
35. Lajovic J: Ujemanje metod merjenja - praktični pristop. ISIS 2010; 10: 1581-161.
36. Marc J: Navodila in dnevniki za vaje iz klinične biokemije I. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Visokošolski študijski program biomedicine, Ljubljana 2001.
37. Lesesve JF, MD, Sylvain Salignac, Francois Alla, Michael Defente, Mohamed Benbih, Pierre Bordigoni, Thomas Lecompte: Comparative Evaluation of Schistocyte Counting by

- an Automated method and by Microscopic Determination. Am J Clin Pathol 2004; 121: 739-745.
38. http://c.ymcdn.com/sites/www.clma.org/resource/group/31D2EB56-F567-40B3-98E1-DE3CF2371997/to_diff_or_not_to_diff_feb20.pdf (Dostopano: 23. 09. 2015)
39. Banno S, Ito Y, Hori T: Quantification of red blood cell fragmentation by the automated hematology analyzer XE-2100 in patients with living donor liver transplantation. Clin Lab Hem 2005; 27: 292-296.
40. <https://www.medcalc.org/manual/roc-curves.php> (Dostopano: 8. 10. 2015)
41. Zhu Wen, Zeng Nancy, Wang Ning: Sensitivity, Specificity, Accuracy, Associated Confidence Interval and ROC Analysis with Practical SAS® Implementations, Inc, Fort Washington, PA 2Octagon Research Solutions, Wayne, PA 1. INTRUCTION
Diagnosis tests include different kinds of information, such as medical tests (e.g. blood tests, X-rays, MRA), <http://www.cpdm.ufpr.br/documentos/ROC.pdf> (Dostopano: 8. 10. 2015)

PRILOGA I

Preglednica XII: Rezultati določitve shizocitov s hematološkim analizatorjem ter mikroskopsko določitvijo z rutinsko in novo metodo pri preiskovancih v skupini hematoloških bolnikov.

ZAPOREDNA ŠTEVILKA	FRC(%) ^A	MCV (fL)	RDW (%)	TROMBOCITI (10 ⁹ /L)	SHIZOCITI (%) - rutinska metoda	SHIZOCITI(%) - nova metoda	HIPO-He
1	9,42	113,1	17,7	244	0,6	1,1	0,9
2	0,01	97,9	15,9	138	0	0	0,3
3	0,64	88,6	14,5	73	0,2	0,5	0,3
4	0,02	95,9	21,7	34	0	0	0,9
5	0,47	101,9	17,3	159	2,9	3,8	0,4
6	0,00	92,4	14,1	88	0	0	2,1
7	0,01	103,1	14,6	146	0	0	5,4
8	3,64	103,2	17,7	152	0	0,5	1,2
9	1,74	99,4	NP	139	0,1	0,1	0,5
10	2,09	91,9	17,2	54	0	0,7	17,4
11	13,62	100	24,9	643	0,8	0,9	18,5
12	2,83	89,1	18,6	2	0	0,1	7,7
13	0,12	96,5	11,9	248	0	0,3	6,6
14	1,97	87,7	20,6	119	0	0,5	10,2
15	0	93,4	11,5	230	0	0,2	8,6
16	5,51	86,3	19,6	716	0	0,3	17,2
17	0,55	55,3	27,1	1093	0	1,1	23,8
18	4,39	82,2	18,9	41	1,1	2,2	0,7
19	3,88	85	13,8	27	0	0,3	3,9
20	8,53	81,8	26,2	157	0,3	0,2	0,8
21	5,61	93,1	17,6	7	0,2	0	2,7
22	2	85,4	24,6	223	0,8	1,6	2,9
23	0,06	102,8	15,7	146	0	0,3	4,2
24	3,24	82,9	19	160	1,5	1,2	3,9
25	4,82	82,1	19,9	339	0	0,1	4
26	0,54	89,3	14	53	1,5	0,2	69,6
27	5,05	71	21,1	697	0,2	0,4	36,8
28	0,07	96	14	282	2,2	3,8	3,8
29	0,00	95,1	13,6	359	1,1	2,9	0,2
30	0,13	91,3	13,9	3	0,9	1,5	3,5
31	0,00	94,6	13	216	1,3	1,3	0,2
32	0,00	94,3	12,6	161	1,1	1,8	1,5
33	0,00	104	21,6	320	0	0,5	13,2

34	0,00	95	12,4	191	0,2	0,3	66,9
35	0,00	94,4	12,1	348	0,2	2	60,6
36	0,05	93,1	14,8	138	0,2	0,8	77,7
37	0,01	93,5	15,3	139	0,2	0,4	0,1
38	0,06	94,8	15,7	131	0,2	0,8	0,7
39	0,04	102,9	14,3	285	0	0,1	56,3
40	0,25	102,4	15,6	214	0	0,2	24,5
41	0,04	94,5	15,4	85	0,2	0,8	2,5
42	0,02	92,4	14,9	123	0,4	0,5	4,1
43	0,02	96,4	16,5	89	0,2	0,8	3,4
44	0,43	97,6	17,5	39	2,9	6,8	3,1
45	0,02	98,1	16,6	161	0,2	0,2	3,5
46	0,4	81,5	14,1	10	0,6	1	3,8
47	0,07	96,6	14,9	48	0,5	0,9	3,4
48	4,46	70,2	17,5	349	0,1	0,3	56,6
49	1,08	88,2	16,9	9	4,5	12,9	11,2
50	8,14	83,5	23,2	987	1,3	0,6	0,8
51	8,84	88	25	168	3,8	4,4	0,3
52	6,68	87,5	15,5	168	0,2	0,3	40,3
53	4,86	81	18,6	112	2,4	2,8	0,5
54	0,25	59,8	23,9	725	1,7	2,2	15,3
55	2,23	105,5	26,8	74	2,2	3,1	8
56	1	89,5	18	213	0,3	1,1	8,1
57	9,87	83,9	19,9	338	0,4	0,7	2,6
58	8,2	80,5	15,1	325	0,4	0,6	0,3
59	0,49	97,1	18,3	173	0,7	3,6	10,5
60	7,04	86,4	24,3	105	3,2	3	7,9
61	0,47	95	18,8	15	2,9	6,5	0,1
62	7,76	84,7	18,3	58	1,3	1,1	0,2
63	0	86,4	11,9	162	0	0,1	0,2
64	0,28	87,8	14	34	0,7	1,1	0,2
65	2,26	81,9	17,2	80	0	0,2	0,2
66	0	87,6	11,9	1	0	0,1	0,3
67	0,45	84,2	15,7	110	0	0,2	0,1
68	0	91,1	13	80	0	0	0,4
69	0,61	89,4	14,2	306	0,5	0,5	6,8
70	2,26	84,5	24,4	250	0,7	1,2	5,4
71	1,23	62,5	22	223	1,3	1,3	2,8
72	2,51	86,7	NP	193	0,1	0,9	36,3
73	4,11	83,4	20,5	26	2,1	1,4	85,2
74	0,2	96,4	17,9	177	3,1	4,4	36,1
75	0,7	93	19,9	430	0	0,2	40,3

76	0,04	96,1	17,7	244	2,9	3,3	8,4
77	0,06	89,7	17,2	13	0	0,2	1,1
78	3,09	83,8	21	66	3,1	5,2	1
79	0,17	118,4	17,3	148	0	0,4	0,1
80	0,17	96,6	17,8	265	2,8	1,6	0,2
81	4,17	80	19,6	5	1,1	1,4	0,2
82	1,25	89,7	11,9	85	0,8	1,1	0,6
83	0,33	85,4	14,8	230	0	0,5	0,6
84	0	87,8	12,2	280	0	0,2	27,2
85	4,99	67,8	19,7	364	0,3	1,2	1
86	0,29	62,4	19,2	286	0,3	3	56,7
87	0	106,2	17,9	139	0	0	1,8
88	5,7	81	16,8	260	0	0,6	5
89	0	100,7	14,7	332	0	0,6	13,5
90	5,41	80,8	22,9	170	3	3,4	8,8
91	0,14	86,4	16,5	38	0,1	0,1	8,1
92	3,84	84,4	22,6	68	3,8	6	3,2
93	0,8	66,5	20,4	298	0,2	0,9	1
94	1,64	69,6	22,9	366	0,2	0,4	2
95	4,3	92,3	15,4	100	0,9	1,9	8,9
96	4,67	92	20,4	290	0,1	0,4	0,9
97	4,15	85,3	21,2	282	0,1	0,9	12,5
98	0,28	58,3	27,8	464	0	0,3	15,3
99	2,62	85	14,5	24	0,3	1,7	1,4
100	5,04	80,1	19,5	82	0,2	0,9	3
101	3,58	119,3	20,9	98	0,5	2,9	0,6
102	6,53	87,7	26,2	46	0,2	2,4	0,7
103	0,11	90,5	13,5	225	0	0	0,1
104	5,73	87,1	24,7	312	0,1	0,9	0,2
105	11,09	86,7	20,6	164	6,7	7,6	0,6
106	8,78	90,8	22,4	1619	0,7	1	0,3
107	4,34	70,1	20,2	255	0	0,6	0,2
108	12,24	90,6	25,6	30	4,9	5,7	19,8
109	0,2	85,1	16,8	296	0,2	1,1	0,7
110	4,32	81,7	19,9	208	0	0,2	0,2
111	3,12	72,6	17,9	247	0,1	1,3	0,1
112	0,92	91,7	14,8	175	0,3	0,4	0,4
113	5,37	91,3	27,8	54	0,3	0,7	2,9
114	2,55	79,7	18,9	474	0,1	0,6	8,3
115	0,29	90,5	14,4	38	0,4	3,2	0,3
116	4,7	94,5	14,2	343	0	0,7	6,9
117	1,42	63,2	27,3	272	0,3	1,8	0,3

118	5,15	85	21,5	58	1,9	2,2	0,4
119	4,55	80,2	20	127	0,1	0,2	0,3
120	3,74	82,4	19,4	442	0	0,1	0,5
121	0,19	89,1	17,6	34	0,1	0,5	0,3
122	2,64	81,1	17,3	20	1,3	1,8	0,3
123	1,31	90,7	17,3	129	0,9	0,9	0,3
124	0	97,6	15,6	97	0	0	0,7
125	0,32	109,1	16,7	124	0	0,2	11,9
126	1,52	65,5	16,9	237	0,6	1,3	3,7
127	0,77	60,6	19,9	264	0,2	1	23,2
128	0,62	96,4	15,7	46	0,7	0,9	4,6
129	0,19	54,7	22,2	505	0	5,8	14,3
130	4,06	86,1	13,4	78	0	0,4	52,5
131	6,24	82,1	22,2	426	0	1,5	90,9
132	0,80	72,4	NP	675	0,4	0,5	5
133	5,19	80,7	22,5	129	2	2,2	2,4
134	0,00	92,2	17,1	402	0,2	0,4	8,2
135	0,09	92,2	17,1	402	0	0,1	7,4
136	6,65	92,5	23,4	226	0,5	0,6	0,4
137	2,77	75	NP	220	0,1	0,6	10,2
138	3,94	90,1	19,9	31	0,6	0,9	0,2
139	3,93	81	22,5	333	0,1	0,7	0,3
140	6,21	83,4	19,4	271	0,2	2	10,4
141	7,26	81,8	13,9	132	0,1	1	0,3
142	2,17	69,8	26,3	180	0,1	0,5	2,1
143	6,62	79,3	27,4	333	0,5	1,1	25,9
144	0,13	105,5	17	66	0	0,2	0,6
145	0,00	92,5	15,6	194	0	0,8	1,7
146	1,76	81,1	16,9	37	2,5	3,4	2,9
147	7,61	82,4	18,5	13	0,1	0,2	22,5
148	4,14	89,5	17,9	17	0,2	1	23,2
149	2,81	80,5	18,9	36	4,2	11,4	45,4
150	3,70	82,4	14,5	50	0	1,1	1,4
151	0,25	58	27,9	406	0,1	0,1	1,9
152	1,75	70,2	26,5	287	0,4	0,6	0,8
153	8,27	91,9	24,7	260	0,9	1,9	1
154	1,84	82,8	17,2	50	0,1	0,2	0,7
155	4,14	75	28,8	550	0,8	1,2	12
156	5,99	82,2	18,9	25	0	0,3	9,1
157	1,74	90,2	17,1	32	0,2	0,5	0,1
158	0,00	84,1	13,1	104	0	0	8,5
159	1,29	96,9	14,4	67	0	0,4	5,7

160	0	89,6	15,3	36	0	0,1	0,2
161	0,52	84,1	17,2	19	0,9	1,8	0,1
162	0,05	90,2	15,1	448	0,2	0,2	22,1
163	0,02	102	18,2	236	0	0,1	5,6
164	0,00	85,8	13,3	373	0,1	0,5	5,4
165	7,07	92,4	27,5	45	4,4	5,5	4,6
166	1,85	82,9	23,1	196	0	0	4,7
167	0,48	93,5	18,4	78	0,1	0,2	8
168	0,15	92,7	14	12	0,1	0,2	0,3
169	5,08	83,1	16	223	0,5	0,8	9,8
170	0,99	94,5	15,7	72	0	0	8,1
171	0,01	98,2	14,6	216	0	0,2	2,6
172	0,00	102,8	13,8	57	0	0,2	22,3
173	0,03	86,2	13	227	0,4	0,6	0,3
174	3,31	84,4	17,2	22	10,7	26	36,4
175	2,94	83,4	18,3	87	12,7	20,6	1,4
176	2,29	86,2	17,1	292	11,7	18,8	0,1
177	2,34	86,6	16,8	344	11,2	16,7	35,7
178	1,74	86,6	17	423	11,5	15	0,4
179	1,48	88	17,2	422	10	12,7	1,8

Preglednica XIII: Rezultati določitve shizocitov s hematološkim analizatorjem ter mikroskopsko določitvijo z rutinsko in novo metodo pri preiskovancih z diagnozo TTP.

ZAPOREDNA ŠTEVILKA.	FRC% (A)	TROMBOCITI (10 ⁹ /L)	SHIZOCITI (%)-rutinska metoda	SHIZOCITI (%)-nova metoda
1a	1,08	9	4,5	12,9
2a	0,49	173	0,7	3,6
3a	0,47	15	2,9	6,5
4a	0,2	177	3,1	4,4
5a	0,04	244	2,9	3,3
6a	0,17	265	2,8	1,6
1b	3,31	22	10,7	26
2b	2,94	87	12,7	20,6
3b	2,29	292	11,7	18,8
4b	2,34	344	11,2	16,7
5b	1,74	423	11,5	15
6b	1,48	422	10	12,7
1c	0,07	282	2,2	3,8
2c	0,00	359	1,1	2,9
3c	0,00	216	1,3	1,3
4c	0,00	161	1,1	1,8
5c	0,00	191	0,2	0,3
6c	0,00	348	0,2	2
1d	8,84	168	3,8	4,4
2d	7,04	105	3,2	3
3d	4,11	26	2,1	1,4
4d	4,17	5	1,1	1,4
5d	5,37	54	0,3	0,7
6d	6,53	46	0,2	2,4

Preglednica XIV: Rezultati določitve shizocitov s hematološkim analizatorjem ter mikroskopsko določitvijo z novo metodo pri preiskovancih v skupini otrok.

ZAPOREDNA ŠTEVILKA	MCV (fL)	RDW (%)	TROMBOCITI (10 ⁹ /L)	SHIZOCITI (%) - nova metoda
1	94,4	23,6	134	NP
2	93,5	20,1	329	0,2
3	82,9	13,4	273	0,5
4	82,7	13,3	288	0,2
5	82,1	20,4	305	1,1
6	100	17,6	158	1,5
7	83,6	13,9	459	0,7
8	107,6	16	133	0,6
9	95	20,1	61	0,1
10	57,7	21,2	605	1,5
11	54,8	18,3	255	1,1
12	92,1	14,9	375	1,2
13	101,3	19,5	218	0,8
14	101,7	30,4	76	0,6
15	78,5	26,7	524	NP
16	89,2	17,5	334	0,6
17	72,6	18,5	802	0,4
18	88,5	21,8	396	1,2
19	61,8	27,7	409	0,2
20	98,7	17,2	466	1,6
21	84,3	14,6	167	1,1
22	74,8	26,4	337	4
23	50,9	21,4	259	2,7
24	90,9	15,5	509	0,4
25	83,8	14,4	177	NP
26	101	13,5	172	1,1
27	83,6	14,6	193	0,2
28	88,7	17,1	209	0,2
29	74,7	25,8	212	3,8
30	98	23,6	378	0,2
31	84,5	14,6	197	0,8
32	50,9	21,6	289	0,4
33	84,3	18,7	377	0,2

Preglednica XV: Rezultati določitve shizocitov s hematološkim analizatorjem ter mikroskopsko določitvijo z novo metodo pri preiskovancih v skupini novorojenčkov.

ZAPOREDNA ŠTEVILKA	MCV (fI)	RDW (%)	TROMBOCITI (10*9/L)	SHIZOCITI(%)-nova metoda
1	126,1	19,8	112	0
2	113	17,1	377	0,8
3	107,5	17,3	252	NP
4	117,3	16,8	237	NP
5	119,1	22,8	78	1,8
6	113,2	23,6	50	3,6
7	129,6	15,9	175	0,7
8	128	16,4	163	0,6
9	116,2	16,5	68	NP
10	118,3	16,4	170	1,1
11	110,8	191	191	0,1
12	118,6	16	53	1,7
13	120,4	20,9	201	0,7
14	104,9	16,4	294	1,4
15	114,9	16,8	233	0,8
16	126,9	18,6	207	NP
17	117,3	19,3	141	0,5
18	102,4	163	163	1
19	113	14,6	78	0,2
20	110,2	18,4	290	2,2
21	111,5	14,4	80	0,7
22	117,2	15,2	248	1,7
23	103,4	21,1	112	NP
24	114,8	16,1	214	0,5
25	105,5	16,5	332	0,2
26	107,3	18,7	262	1,1
27	108,8	19,3	291	1
28	115,9	17,6	309	0,7
29	123,3	16,1	103	0,4
30	126,2	17,1	99	1
31	127	17	95	0,9
32	105,7	16,4	188	NP
33	96,5	19,4	317	0,3
34	120,2	17	73	NP
35	112,9	15,7	150	0,5
36	132,8	18,7	307	0,4
37	118,6	17,9	239	0,5
38	126,2	17,7	97	NP
39	124,7	18,1	108	0,6
40	109,5	16,9	325	1,5
41	112,2	17,6	209	1,9
42	103,7	280	280	2,9
43	129,8	18,7	184	1
44	112,9	18	262	NP
45	124,5	16,7	134	NP

46	105,3	17,1	225	1,3
47	109,9	19,1	235	0,8
48	113,4	16,8	181	1,9
49	116,6	17,3	228	0,5
50	94,4	15,9	294	3,2
51	105,7	NP	11	1,3
52	106,3	28,4	11	1,4
53	59,9	18	355	0,7
54	105,8	NP	8	3,8
55	106,3	25,9	7	3,8
56	95,7	19,1	362	0,9
57	102,8	22,7	7	1,3
58	100,4	19	207	0,3
59	90,8	26,2	366	0,6
60	97,4	22,3	260	0,6