

Ispitivanje preciznosti izrade diferencijalne krvne slike primjenom digitalne morfologije na uređaju Sysmex DI-60 (Cellavision) i svjetlosne mikroskopije

Filipaj, Elena

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:328265>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-29**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Elena Filipaj

**Ispitivanje preciznosti izrade diferencijalne
krvne slike primjenom digitalne morfologije na
uređaju Sysmex DI-60 (*Cellavision*) i svjetlosne
mikroskopije**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Kliničkom bolničkom centru Zagreb pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Désirée Coen Herak te suvoditeljstvom doc. dr. sc. Marije Miloš.

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Coen Herak, te doc. dr. sc. Miloš na pruženoj pomoći, korisnim savjetima i idejama te uloženom vremenu i trudu prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Hvala mojim prijateljima na svim lijepim i sretnim trenucima tijekom studiranja.

Najveće hvala mojoj obitelji i zaručniku na ljubavi, strpljenju, razumijevanju i podršci od samog početka. Bez vas ne bih uspjela.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Kompletna krvna slika.....	1
1.2. Diferencijalna krvna slika.....	3
1.2.1. Automatizirana metoda izrade diferencijalne krvne slike na hematološkim brojačima.....	4
1.2.2. Ručna metoda izrade diferencijalne krvne slike primjenom svjetlosne mikroskopije	7
1.2.3. Izrada diferencijalne krvne slike primjenom digitalne morfološke analize stanica periferne krvi	10
1.3. Prednosti i nedostaci metoda izrade diferencijalne krvne slike	12
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	15
3. MATERIJALI I METODE.....	16
3.1. Uzorci i postupak uzorkovanja.....	16
3.2. Izrada razmaza periferne krvi na uređaju Sysmex SP-50.....	16
3.3. Izrada diferencijalne krvne slike	17
3.3.1. Izrada diferencijalne krvne slike metodom svjetlosne mikroskopije	18
3.3.2. Izrada diferencijalne krvne slike metodom digitalne morfološke analize na uređaju Sysmex DI-60.....	19
3.4. Protokol ispitivanja preciznosti metoda izrade diferencijalne krvne slike svjetlosnom mikroskopijom i digitalnom morfološkom analizom.....	20
3.5. Statistička obrada podataka.....	20
4. REZULTATI	23
4.1. Preciznost u seriji (ponovljivost).....	24
4.2. Preciznost iz dana u dan (međupreciznost).....	40
5. RASPRAVA.....	50
6. ZAKLJUČCI	54
7. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA.....	55
8. LITERATURA	57
9. SAŽETAK/SUMMARY	59
Temeljna dokumentacijska kartica	61

1. UVOD

1.1. Kompletna krvna slika

Rutinska hematološka pretraga kompletne krvne slike (KKS) je jedna od najčešće primjenjivanih laboratorijskih pretraga. KKS obuhvaća određivanje broja eritrocita, trombocita i leukocita, te diferencijalnu krvnu sliku (DKS) koja daje informaciju o udjelu pojedinih leukocitnih subpopulacija. U današnje se vrijeme KKS izvodi pomoću suvremenih automatiziranih analizatora - hematoloških brojača različite izvedbe i veličine, dok su ručne metode brojenja staničnih elemenata u komorici (hemocitometru), koje su bile osnova hematološke prakse dugi niz godina prošloga stoljeća, u potpunosti napuštene. (Labar i sur., 2007.)

Za izradu KKS-a koriste se svježiji uzorci venske ili kapilarne, rijetko arterijske krvi, uzeti na antikoagulant kalij etilendiamin-tetraoctena kiselina (K_3 -EDTA). Iako se uzorci krvi mogu uzeti u bilo koje doba dana, zbog moguće pojave malih razlika u vrijednostima tijekom dana, preporučeno je da se uzorci krvi uzimaju ujutro (Celkan, 2020.).

Nalaz KKS-a podrazumijeva veći ili manji broj parametara, ovisno o tipu analizatora, ali u pravilu podrazumijeva sljedeće osnovne parametre:

- ✓ broj eritrocita (Erc, $\times 10^{12}/L$)
- ✓ vrijednost hematokrita (Hct, L/L) - udjel sabijenih eritrocita u određenom volumenu pune krvi
- ✓ koncentraciju hemoglobina (Hb, g/L)
- ✓ eritrocitne konstante: prosječni volumen eritrocita MCV (engl. *mean corpuscular volume*, fL), prosječan sadržaj hemoglobina u eritrocitu MCH (engl. *mean corpuscular hemoglobin*, pg), prosječnu koncentraciju hemoglobina u jednoj litri eritrocita MCHC (engl. *mean corpuscular hemoglobin concentration*, g/L)
- ✓ raspodjelu eritrocita po volumenu RDW (engl. *red cell distribution width*, %)
- ✓ broj trombocita (Trc, $\times 10^9/L$)
- ✓ prosječni volumen trombocita MPV (engl. *mean platelet volume*)
- ✓ broj leukocita (L, $\times 10^9/L$)
- ✓ DKS - udio pojedinih vrsta leukocita u ukupnome broju leukocita izraženo u postotcima i u apsolutnome broju

Eritrocitne konstante (MCV, MCH i MCHC) korisne su za morfološku klasifikaciju anemija, dok je RDW pokazatelj anizocitoze, ali i učinkovitosti terapije pri liječenju anemija. MPV je trombocitni parametar koji pruža podatke o veličini Trc i pomaže u diferencijalnoj dijagnostici trombocitopenije. U tablici 1. prikazani su referentni intervali parametara KKS-a u odraslih osoba dobi ≥ 20 godina (Premužić-Lampič 2000.; Labar i sur., 2007.).

Tablica 1. Referentni intervali parametara kompletne krvne slike za odrasle osobe (Labar i sur., 2007.; Čvorišćec i sur., 2004.)

Analit/Pretraga	Referentni interval	
	Žene	Muškarci
Eritrociti	$3,86 - 5,08 \times 10^{12}/L$	$4,34 - 5,72 \times 10^{12}/L$
Hemoglobin	119 - 157 g/L	138 - 175 g/L
Hematokrit	0,356 - 0,470 L/L	0,415 - 0,530 L/L
MCV	83,0 - 97,2 fL	
MCH	27,4 - 33,9 pg	
MCHC	320 - 345 g/L	
RDW	9,0 - 13,8 %	
Trombociti	$158 - 424 \times 10^9/L$	
MPV	7,4 - 10,4 fL	
Leukociti	$3,3 - 9,3 \times 10^9/L$	$3,5 - 10,0 \times 10^9/L$
Diferencijalna krvna slika (DKS) (relativni i apsolutni broj)	Eozinofilni granulociti	0 - 7 %
	Bazofilni granulociti	0 - 1 %
	Nesegmentirani neutrofilni granulociti	0 - 2 %
	Segmentirani neutrofilni granulociti	44 - 72 %
	Limfociti	20 - 46 %
	Monociti	2 - 12 %
	Eozinofilni granulociti	$0 - 0,43 \times 10^9/L$
	Bazofilni granulociti	$0 - 0,06 \times 10^9/L$
	Nesegmentirani neutrofilni granulociti	$0 - 0,19 \times 10^9/L$
	Segmentirani neutrofilni granulociti	$2,06 - 6,49 \times 10^9/L$
	Limfociti	$1,19 - 3,35 \times 10^9/L$
	Monociti	$0,12 - 0,84 \times 10^9/L$

Izrada KKS-a je nužna u dijagnostici anemija, infekcija, hematoloških zloćudnih bolesti, akutnih hemoragijskih stanja, alergija i imunodeficijencija. Također se koristi za praćenje nuspojava određenih lijekova. Potpuno razumijevanje nalaza KKS-a i dijagnostičkog značenja svakog pojedinog parametra neizostavno je za pružanje kvalitetne skrbi pacijentima (Celkan, 2020.).

1.2. Diferencijalna krvna slika

DKS pruža informacije o udjelu pojedinih vrsta leukocita u ukupnome broju leukocita, izraženom u postocima i u apsolutnome broju (Labar i sur., 2007.). Neizostavna je analiza u dijagnostici i praćenju benignih i malignih bolesti krvotvornog sustava, ali i bolesti drugih organa i organskih sustava koje mogu imati utjecaj na leukocite i subpopulacije leukocita (Topić i sur., 2004.). Izrada DKS-a moguća je korištenjem tri metode (Slika 1):

- automatizirana metoda na hematološkim brojačima
- ručna metoda diferenciranja obojenog razmaza periferne krvi svjetlosnom mikroskopijom
- automatizirana metoda diferenciranja obojenog razmaza periferne krvi digitalnom morfološkom analizom stanica

Bez obzira na metodu koja se primjenjuje za izradu DKS-a, nužno je provoditi postupak unutarnje analitičke kontrole kao i vanjske procjene kvalitete. Kod automatizirane metode na hematološkim brojačima unutarnja analitička kontrola se provodi analizom komercijalnih pripravaka kontrolnih uzoraka dobivenih od proizvođača, dok za metodu svjetlosne mikroskopije i digitalne morfološke analize svaki laboratorij treba osmisliti i provoditi vlastiti protokol unutarnje analitičke kontrole kvalitete. Svaki laboratorij, odabire provoditelja i provodi vanjsku procjenu kvalitete, ovisno o svojim potrebama i mogućnostima.



Created in **BioRender.com** **bio**

Slika 1. Prikaz dostupnih metoda za izradu diferencijalne krvne slike u obliku dijagrama (izrađeno pomoću programa BioRender)

1.2.1. Automatizirana metoda izrade diferencijalne krvne slike na hematološkim brojačima

U svakodnevnoj se laboratorijskoj praksi već dugi niz godina za određivanje DKS-a i probiranje patoloških nalaza koriste hematološki analizatori (Topić i sur., 2004.). Leukociti se ovisno o tipu hematološkog analizatora, razvrstavaju u tri ili pet skupina, pri čemu dobivamo trodijelnu (granulociti, limfociti, monociti) ili peterodijelnu DKS (neutrofilni, eozinofilni i bazofilni granulociti te monociti i limfociti) (Labar i sur., 2007.). U hematološkim se analizatorima primjenjuju dva temeljna načela mjerenja: metoda promjene otpora (impedancija) i rasap svjetlosti.

Metoda promjene otpora (impedancije) je uvedena pedesetih godina prošloga stoljeća, te je još uvijek najčešće rabljena metoda. Osnova načela brojenja stanica promjenom otpora je otkrivanje i mjerenje promjena u električnom otporu koje proizvode stanice suspendirane u elektrolitskoj otopini. Otpor između dviju elektroda se mijenja kako stanice

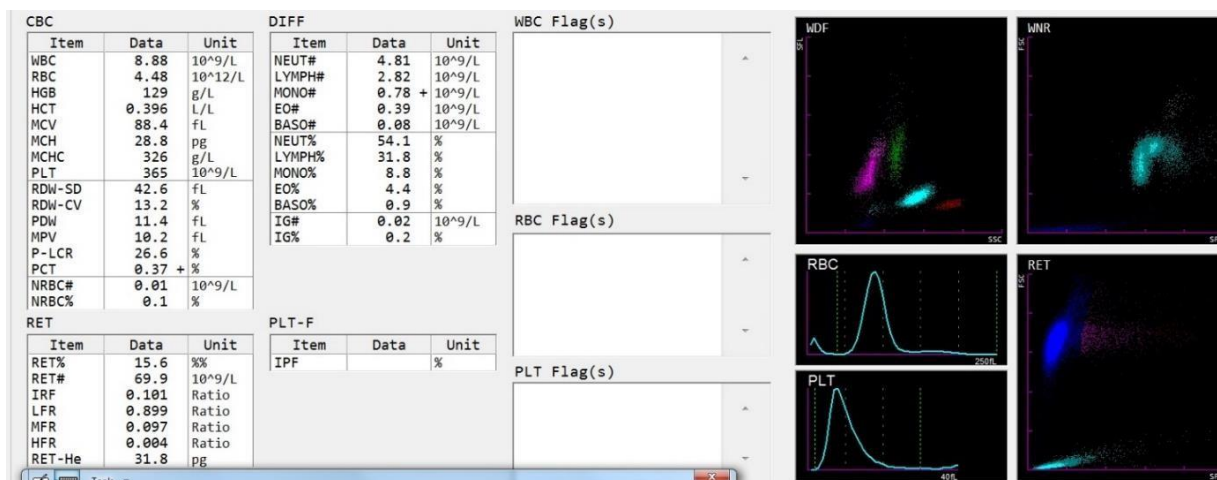
prolaze kroz otvor u cijevi, što posljedično dovodi do mjerljivih promjena napona. Broj promjena razmjernan je broju stanica, a veličina promjene napona izravno je razmjerna volumenu stanice. Time je omogućeno razlikovanje i brojenje stanica određene veličine. Dobiveni se impulsi skupljaju i razvrstavaju prema njihovoj amplitudi. Grafičkim prikazom podataka na apscisi prikazana je veličina stanice, a na ordinati njihov relativni broj (Premužić-Lampič, 2000.). Ako se metoda promjene otpora primjenjuje u kombinaciji s radiofrekvencijom, ukupni je volumen stanice razmjernan promjeni otpora, a volumen stanične jezgre je razmjernan veličini impulsa ili promjeni u signalu radiofrekvencije. Pomoću radiofrekvencije mjeri se vodljivost koja se smanjuje povećanjem nukleocitoplazmatskog omjera, gustoće jezgre i granuliranosti citoplazme. Prikaže li se ovisnost impedancije i vodljivosti grafički, dobije se dvodimenzionalni citogram koji grupira stanične populacije, a broj točkica u svakoj populaciji označuje broj pojedine vrste stanica. Kombinacijom više metoda u jednom analizatoru za utvrđivanje barem dvaju staničnih svojstava omogućuje podjelu leukocita na pet osnovnih vrsta, odnosno izradu peterodijelne DKS (Labar i sur., 2007.).

Rasap svjetlosti je metoda brojenja stanica koja se može koristiti samostalno ili u kombinaciji s drugim metodama. Načelo rada takvog sustava, odnosno protočnog citometra, je usmjeravanje hidrodinamički fokusirane struje uzorka kroz kvarcnu kivetu na izvor svjetla (volfram-živina žarulja ili helij-neonski laser). Brojenje i diferenciranje vrsta stanica omogućuju karakteristike laserskog monokromatskog svjetla (intenzitet, koherentnost i širenje kao jedna valna duljina). Rasap svjetlosti koristi se s ciljem proučavanja leukocita, eritrocita i trombocita. Prolaskom stanice kroz područje detekcije, prekida se snop zrake svjetlosti, te se ona zbog procesa apsorpcije, ogiba, refrakcije i refleksije rasipa u svim smjerovima. Fotodetektor (fotodioda i fotomultiplikatori) postavljeni pod određenim kutovima detektiraju raspršene zrake te ih pretvaraju u električne signale. Fotodiode fotone svjetla zatim pretvaraju u elektronske signale koji su po svojoj veličini razmjerni količini skupljenoga svjetla. Zadaća fotomultiplikatora je skupljanje slabijih signala i pojačavanje fotona u jače, korisnije signale koji se pretvaraju u digitalne signale za kompjutorsku analizu (Labar i sur., 2007.). Raspršeno lasersko svjetlo pod malim kutom ($1-19^\circ$) smjera je veličine odnosno volumena stanice zbog ogiba svjetlosti. Rezultat refrakcije i refleksije svjetla je rasap svjetlosti pod velikim kutom od 90° koji pruža podatke o unutarnoj složenosti stanice, točnije nukleocitoplazmatskom omjeru i prisutnosti granula u citoplazmi (Čvorišec i sur., ured., 2009.). Mjerenje rasapa svjetlosti u kombinaciji s drugim metodama određivanja pruža mnogo preciznije, osjetljivije i

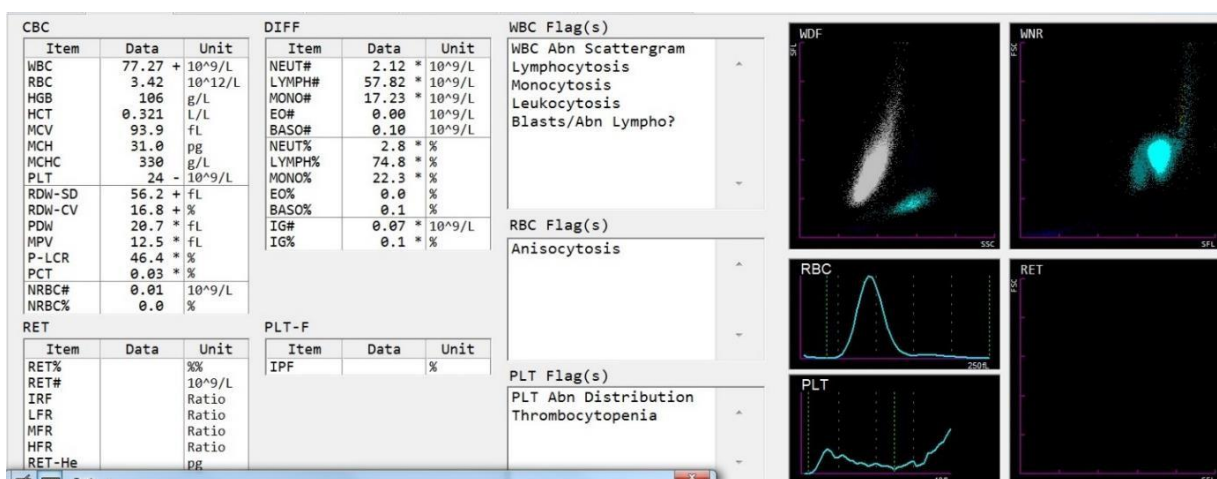
reproducibilnije rezultate analiza hematoloških parametara. Primjer su kombinacije s metodom mjerenja intenziteta fluorescencije nakon bojenja nukleinskih kiselina u jezgri leukocita fluorescentnom bojom ili s metodom mjerenja peroksidazne aktivnosti koja je različita u različitim leukocitnim subpopulacijama što omogućuje poboljšano diferenciranje stanica (Labar i sur., 2007.).

Hematološki brojači tvrtke Sysmex primjenjuju metodu fluorescentne protočne citometrije kod koje intenzitet raspršenog svjetla daje informacije o fizikalno-kemijskim svojstvima stanice: rasap svjetla prema naprijed (engl. *forward scatter*, FSC) govori o veličini stanice; rasap svjetla lateralno (engl. *side scatter*, SSC) govori o granuliranosti ili unutarnjoj složenosti stanice, a intenzitet fluorescencije koji se također očitava na fotodetektoru koji svjetlost prevodi u električne impulse, govori o sadržaju DNA i/ili RNA u stanicama. Time je omogućeno poboljšano diferenciranje leukocita a dobiveni rezultati prikazuju se u obliku dijagrama rasap/fluorescencija. (Slika 2. i 3.).

Hematološki brojači tvrtke Siemens korištenjem reagensa koji sadrži vodikov peroksid i elektron kao akceptor kromogena, pri endogenoj aktivnosti peroksidaze u granulama leukocita, stvara se tamno obojeni talog. Značajnu peroksidaznu aktivnost posjeduju normalni neutrofilni i eozinofilni granulociti, dok monociti sadrže nisku peroksidaznu aktivnost. Limfociti, bazofilni granulociti i velike nezrele stanice se neće obojiti jer ne sadrže peroksidazu. Slijedi prolaz suspenzije stanica kroz optičku protočnicu, gdje se svaka stanica obasjava laserskom zrakom pri čemu se mjeri skretanje zraka svjetlosti pod malim kutom (što odgovara veličini stanice) i apsorpcija svjetla (sukladno obojenosti peroksidazom). Prikaz histograma i citograma dobije se nakon što se optički signali elektronički umnože (Labar i sur., 2007.). Peroksidaza predstavlja važan čimbenik u mehanizmu mikrobicidne aktivnosti granulocita i monocita, čime se dobiva uvid i u samu funkcijsku aktivnost tih stanica (Topić i sur., 2004.).



Slika 2. Prikaz nalaza kompletne krvne slike s nepatološkim nalazom diferencijalne krvne slike i pripadajućim citogramom leukocita, dobivenog na automatiziranom hematološkom brojaču Sysmex XN-1000



Slika 3. Prikaz nalaza kompletne krvne slike s patološkim nalazom diferencijalne krvne slike i pripadajućim promijenjenim citogramom leukocita, dobivenog na automatiziranom hematološkom brojaču Sysmex XN-1000 kod pacijenta s dijagnozom akutne mijeloidne leukemije

1.2.2. Ručna metoda izrade diferencijalne krvne slike primjenom svjetlosne mikroskopije

Mikroskopskim pregledom razmaza periferne krvi obojanog metodom po Pappenheimu (May-Grünwald-Giemsa) omogućen je uvid u citomorfološke karakteristike svih staničnih populacija. Metoda bojenja po Pappenheimu je referentna metoda koja se rabi u

europskim zemljama pri čemu se koristi dobro osušeni razmaz periferne krvi pripremljen iz kapljice kapilarne krvi izravno nakon uboda jagodice prsta, uške ili pete ili iz venske krvi s antikoagulansom (Topić i sur., 2004.; Labar i sur., 2007.). Kap venske ili kapilarne krvi na predmetnom stakalcu mora biti tanko i jednolično razmazan kako razmaz periferne krvi ne bi bio ni pretanak niti pregust (Labar i sur., 2007.). Bez obzira je li postupak bojenja proveden ručno ili automatizirano, postiže se sljedeće obojenje stanica: eritrociti su obojeni ružičasto, citoplazma neutrofilnih granulocita blijedoružičasto, citoplazma limfocita svijetloplavo, citoplazma monocita sivoplavo, citoplazma koja sadrži RNA ribosoma i endoplazmatskog retikuluma plavo; neutrofilne granule boje se nježno smeđe, eozinofilne granule narančasto, bazofilne granule tamnoljubičasto do crno, azurofilne granule ljubičastocrveno; jezgre se boje crvenoljubičasto ili ružičasto.

Na obojeni i osušeni preparat se stavlja umerzijsko ulje te se svjetlosnim mikroskopom pri povećanju 800 - 1000 puta promatra morfologija:

- eritrocita (anizocitoza, poikilocitoza, polikromazija, inkluzije)
- trombocita (veličina, oblik i obojenost)
- leukocita (stupanj zrelosti i kvalitativne promjene) (Labar i sur., 2007.)

U obojenom razmazu periferne krvi određuje se DKS, brojenjem pojedinih subpopulacija leukocita, najčešće na ukupnom broju od 100 stanica. Nalaz DKS-a (leukogram) sadrži relativni udio izražen u postotcima i apsolutni broj izražen kao broj $\times 10^9/L$ svake subpopulacije leukocita (Slika 4.). Broje se i eritroblasti te se u nalazu DKS-a izdaje relativni broj eritroblasta na 100 leukocita i apsolutni broj eritroblasta. Leukociti se svrstavaju u šest osnovnih skupina (segmentirani i neselementirani neutrofilni granulociti, eozinofilni granulociti, bazofilni granulociti, limfociti i monociti), a u slučaju patološkog nalaza navodi se postotak i apsolutni broj nađenih mlađih staničnih oblika, reaktivnih ili morfološki promijenjenih stanica (Slika 5.). Istodobno se provodi i morfološka analiza svih vrsta stanica (leukocita, eritrocita i trombocita). Broj nezrelih stanica, posebice blasti u razmazu periferne krvi te u punkatuu koštane srži, temelj je za klasifikaciju leukemija prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (engl. *World Health Organization*, WHO), uzimajući u obzir i rezultate ostalih diferencijalno-dijagnostičkih pretraga kojima se prate značajke

leukemijskih stanica (citokemijske, imunološke, citogenetske i molekularne) (Topić i sur., 2004.).

HEMATOLOGIJA				
	Rezultat	Jedinica	Referentni interval	Opaska
(K) Eritrociti	4.50	$\times 10^{12}/L$	4.00 - 5.00	
(K) Hemoglobin	120	g/L	109 - 138	
(K) Hematokrit	0.345	L/L	0.320 - 0.404	
(K) MCV	76.7	fl	73.8 - 89.4	
(K) MCH	26.7	pg	24.3 - 29.2	
(K) MCHC	348	g/L	300 - 350	
(K) RDW	12.5	%	11.9 - 16.2	
(K) Eritroblasti	0.0	$\times 10^9/L$	0.0	
(K) Eritroblasti	< 0.4	/100 Lkc	0	
	Rezultat	Jedinica	Referentni interval	Opaska
(K) Leukociti	5.1	$\times 10^9/L$	6.0 - 16.0	
(K) Eozinofilni granulociti	1.8	%	0 - 6	
(K) Bazofilni granulociti	0.0	%	0 - 2	
(K) Segmentirani granulociti	46.0	%	30 - 72	
(K) Limfociti	38.9	%	15 - 55	
(K) Monociti	13.3	%	5 - 13	
(K) Eozinofilni granulociti	0.09	$\times 10^9/L$	0.00 - 0.70	
(K) Bazofilni granulociti	0.00	$\times 10^9/L$	0.00 - 0.20	
(K) Segmentirani granulociti	2.35	$\times 10^9/L$	1.40 - 8.00	
(K) Limfociti	1.98	$\times 10^9/L$	1.40 - 5.00	
(K) Monociti	0.68	$\times 10^9/L$	0.22 - 1.51	
	Rezultat	Jedinica	Referentni interval	Opaska
(K) Trombociti	146	$\times 10^9/L$	150 - 450	
(K) MPV	8.7	fl	9.0 - 13.0	

Slika 4. Prikaz nalaza diferencijalne krvne slike zdrave osobe dobiven ručnom metodom primjenom svjetlosne mikroskopije

HEMATOLOGIJA				
	Rezultat	Jedinica	Referentni interval	Opaska
(K) Eritrociti	3.25	$\times 10^{12}/L$	4.34 - 5.72	
(K) Hemoglobin	97	g/L	138 - 175	
(K) Hematokrit	0.304	L/L	0.415 - 0.530	
(K) MCV	93.5	fl	83.0 - 97.2	
(K) MCH	29.8	pg	27.4 - 33.9	
(K) MCHC	319	g/L	320 - 345	
(K) RDW	19.7	%	9.0 - 15.0	
(K) Eritroblasti	3.1	$\times 10^9/L$	0.0	
(K) Eritroblasti	1.3	/100 Lkc	0	
	Rezultat	Jedinica	Referentni interval	Opaska
(K) Leukociti	242.9 †	$\times 10^9/L$	3.4 - 9.7	
(K) Eozinofilni granulociti	4.0	%	0 - 7	
(K) Bazofilni granulociti	6.0	%	0 - 1	
(K) Nesegmentirani granulociti	16.0	%	0 - 2	
(K) Segmentirani granulociti	44.0	%	44 - 72	
(K) Limfociti	3.0	%	20 - 46	
(K) Monociti	2.0	%	2 - 12	
(K) Mijelociti	20.0	%		
(K) Promijelociti	2.0	%		
(K) Blasti	3.0 †	%		
(K) Eozinofilni granulociti	9.72	$\times 10^9/L$	0.00 - 0.43	
(K) Bazofilni granulociti	14.57	$\times 10^9/L$	0.00 - 0.06	
(K) Nesegmentirani granulociti	38.86	$\times 10^9/L$	0.00 - 0.19	
(K) Segmentirani granulociti	106.88	$\times 10^9/L$	2.06 - 6.49	
(K) Limfociti	7.29	$\times 10^9/L$	1.19 - 3.35	
(K) Monociti	4.86	$\times 10^9/L$	0.12 - 0.84	
(K) Mijelociti	48.58	$\times 10^9/L$		
(K) Promijelociti	4.86	$\times 10^9/L$		
(K) Blasti	7.29	$\times 10^9/L$		
	Rezultat	Jedinica	Referentni interval	Opaska
(K) Trombociti	765	$\times 10^9/L$	158 - 424	
(K) MPV	10.7	fl	9.0 - 13.0	

Slika 5. Prikaz patološkog nalaza diferencijalne krvne slike dobivene ručnom metodom primjenom svjetlosne mikroskopije

1.2.3. Izrada diferencijalne krvne slike primjenom digitalne morfološke analize stanica periferne krvi

Prema podjeli Američke Uprave za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA), uređaji za automatiziranu izradu DKS-a dijele su u dvije osnovne skupine: automatizirani hematološki brojači stanica i uređaji za lociranje stanica, odnosno uređaji za digitalnu slikovnu analizu stanica. Neki od uređaja za digitalnu morfološku analizu stanica koje treba istaknuti su: CellaVision® Image Capture System (CellaVision AB, Lund, Švedska) i EasyCell® assistant (Medica Corporation, Bedford, SAD). Bloodhound™ Integrated Hematology System (Constitution Medical Inc) je integrirani sustav koji uključuje i automatizirano brojenje stanica i digitalnu slikovnu analizu, no još uvijek je u fazi razvoja i FDA ga zasada nije odobrila za rutinsku primjenu (Miloš, 2015.).

Uređaj za digitalnu morfološku analizu razmaza periferne krvi Sysmex DI-60 (*CellaVision*) sastoji se od automatiziranog skenirajućeg mikroskopa, digitalne kamere visoke kvalitete i računalnog sustava sa programskom podrškom *CellaVision software* koja omogućuje digitalnu slikovnu analizu stanica periferne krvi (Yoon i sur., 2023.).

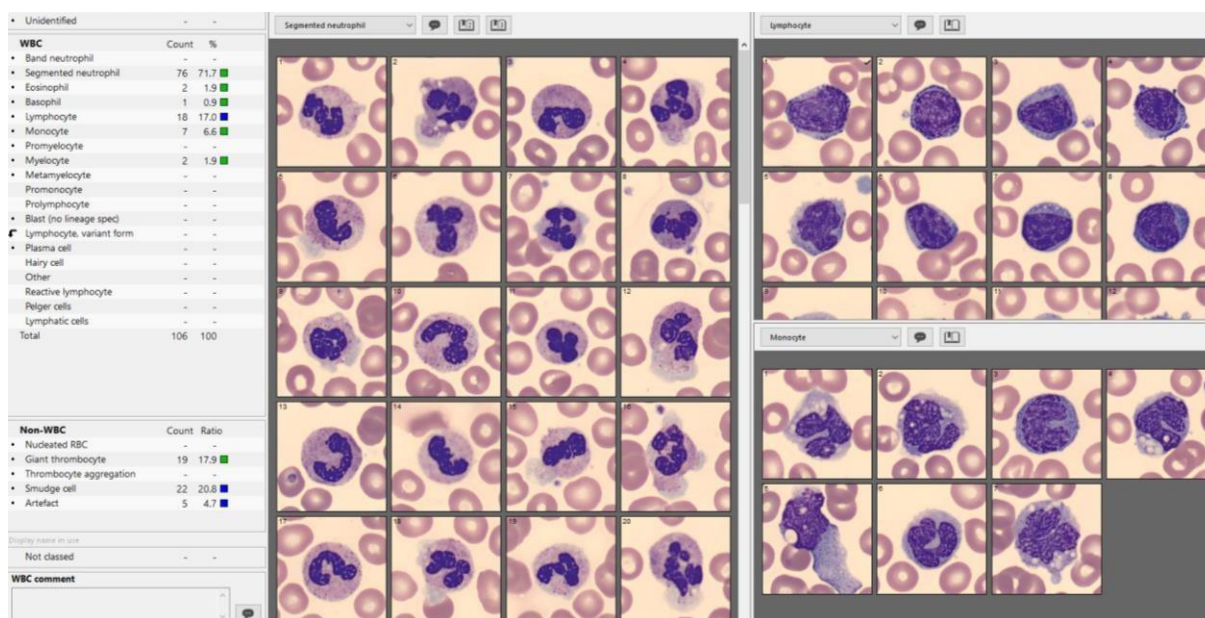
Analiza se provodi na način da se u prvom koraku pronalazi dio razmaza s jednoslojnim eritrocitima, nakon čega slijedi pretraživanje razmaza pod malim povećanjem tijekom kojeg uređaj pronalazi stanice s jezgrama, pri čemu izrađuje i pohranjuje visoko kvalitetne digitalne slike pronađenih stanica pod velikim povećanjem. Nakon napredne digitalne obrade slika i analize stanica, slijedi preliminarno razvrstavanje stanica od strane uređaja tj. kategoriziranje u pojedine leukocitne subpopulacije, tzv. preklasifikacija. Rezultat analize na DI-60 u ovoj fazi uključuje rezultat preklasifikacije leukocita tj. relativne udjele (%) pojedinih leukocitnih subpopulacija, kao i slikovni prikaz preklasificiranih stanica na zaslonu visoke razlučivosti (Slika 6.), te se pohranjuje u bazi podataka. Uređaj analizira minimalno 100 stanica (Miloš, 2015.).

Nakon opisanog postupka slijedi pregled i analiza preklasificiranih stanica na zaslonu računala koje provodi analitičar (laboratorijsko osoblje) te ih ili potvrđuje ili, u slučaju kada su stanice pogrešno razvrstane, svrstava u odgovarajuću kategoriju, tj. provodi postupak klasifikacije.

U postupku preklasifikacije, uređaj preliminarno razvrstava stanice u:

- **leukocitne kategorije:** nesegmentirani i segmentirani neutrofilni granulociti, eozinofilni i bazofilni granulociti, monociti, limfociti, metamijelociti, mijelociti, promijelociti, blasti, varijantni oblici limfocita i plazma-stanice i
- **ne-leukocitne kategorije:** eritroblasti, divovski trombociti, agregati trombocita, raspadnute stanice i artefakt.

Uređaj daje mogućnost slikovne analize i drugih loza krvnih stanica, eritrocita i trombocita, te procjenu broja trombocita. Kategoriju neidentificiranih stanica čine stanice koje uređaj nije prepoznao s odgovarajućom sigurnošću. Osim navedenih, postoji mogućnost razvrstavanja leukocita u dodatne kategorije, ovisno o potrebama laboratorija (npr. reaktivni limfociti, abnormalni limfociti, nezreli eozinofilni i bazofilni granulociti, promonociti, prolimfociti, veliki granulirani limfociti, vlasaste stanice, Sezarijeve stanice, megakariociti itd.). Rezultati DKS-a se pohranjuju u bazu podataka, što omogućava dostupnost svake stanice za moguću reevaluaciju, ukoliko je to potrebno (Miloš, 2015.).

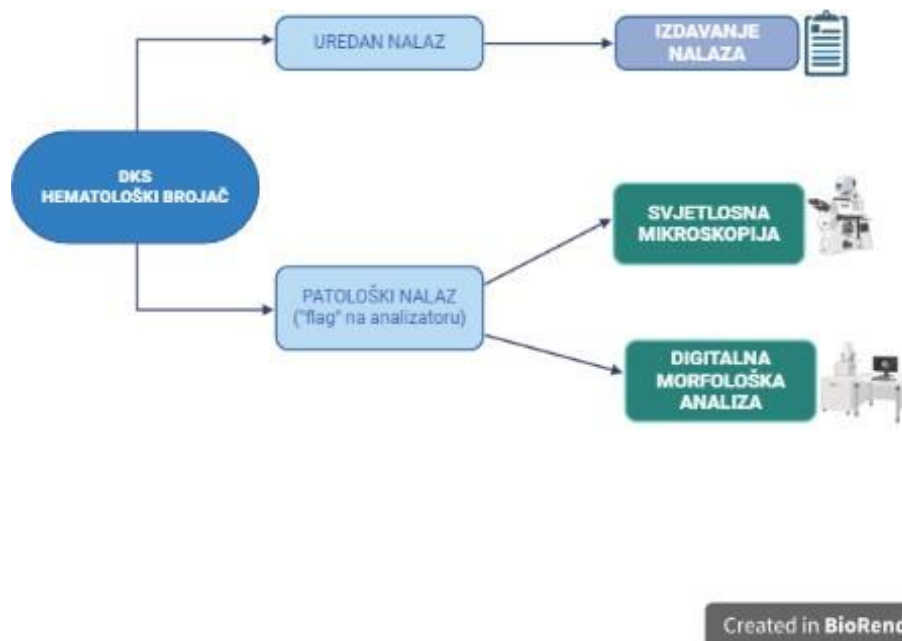


Slika 6. Prikaz leukocitnog podizbornika sa rezultatima diferencijalne krvne slike i slikovnim prikazom odabranih leukocitnih subpopulacija na uređaju Sysmex DI-60

1.3. Prednosti i nedostaci metoda izrade diferencijalne krvne slike

Automatizirana izrada DKS-a na hematološkim brojačima primjenom modernih tehnoloških rješenja omogućila je dobivanje visoko preciznog i točnog rezultata peterodijelnog DKS-a jer se analiza provodi mjerenjem različitih svojstava stanica (ovisno o proizvođaču i tipu analizatora) i to na velikom broju stanica. To se, međutim, odnosi na izradu DKS-a kod zdravih osoba tj. bez prisutnosti stanica koje se normalno ne nalaze u perifernoj krvi. U slučaju prisutnosti patoloških stanica i stanica s morfološkim abnormalnostima koje hematološki brojači nisu u mogućnosti prepoznati i klasificirati, analizator daje upozorenje o patološkom nalazu (engl. *flag*) (Miloš, 2015.).

S obzirom na navedeno, automatizirana izrada DKS-a obično predstavlja prvi korak u analizi DKS-a periferne krvi, a spomenuta upozorenja predstavljaju signal za potrebu izrade DKS-a svjetlosnom mikroskopijom i/ili digitalnom morfološkom analizom. U slučaju urednog nalaza DKS-a isti se izdaje s hematološkog brojača, dok se u slučaju postojanja ili sumnje na postojanje patološkog DKS-a nalaz izdaje nakon analize svjetlosnom mikroskopijom i/ili digitalnom morfološkom analizom (Slika 7.). Kriteriji za izradu razmaza i analizu svjetlosnom mikroskopijom i/ili digitalnom morfološkom analizom definiraju se u svakom laboratoriju temeljem kvantitativnih parametara (promjene broja leukocita i/ili leukocitnih subpopulacija) i kvalitativnih abnormalnosti u nalazu DKS-a s hematološkog brojača (upozorenje uređaja o patološkom DKS-u) (Miloš, 2015.).



Slika 7. Protokol izrade nalaza diferencijalne krvne slike primjenom različitih metoda (izrađeno pomoću programa BioRender)

Dakle, unatoč tehnološkom napretku izrada DKS-a svjetlosnom mikroskopijom ima neizostavnu ulogu u provjeri rezultata hematoloških brojača i važan je dio analize KKS-a. Glavna indikacija za primjenu ove metode je sumnja na prisutnost nezrelih / patoloških / atipičnih / reaktivno promijenjenih stanica koje automatizirani hematološki brojači ne mogu klasificirati, ali daju upozorenje. Svjetlosna mikroskopija omogućuje prepoznavanje klinički značajnih morfoloških abnormalnosti stanica i kao takva, još uvijek predstavlja zlatni standard (Gulati i sur., 2013.). Međutim, metoda je dugotrajna, prepoznavanje morfoloških karakteristika stanica je izrazito subjektivno, stanice se diferenciraju na malom broju leukocita (100 ili rijetko 200), pa je stoga podložna velikim varijabilnostima i zahtjeva dobro obučeno osoblje. Subjektivnost i tzv. "ljudski faktor" je jedan od najvažnijih nedostataka metode izrade DKS-a svjetlosnom mikroskopijom. Iako je ručna metoda jeftina jer uključuje samo uobičajene postavke svjetlosnog mikroskopa, istodobno je napornija i dugotrajnija za laboratorijsko osoblje te zbog subjektivnosti podložnija pogreškama. (Fuentes-Arderiu i sur., 2007.).

S porastom broja i složenosti patoloških uzoraka javlja se potreba za automatiziranim hematološkim sustavima, uključujući automatizirane hematološke brojače te uređaje za izradu DKS-a slikovnom analizom (Cornet i sur., 2008.). Automatizirani instrumenti za izradu DKS-a daju rezultate s većom preciznošću i točnošću od onih dobivenih ručnim pregledom razmaza (Fuentes-Arderiu i sur., 2007.). Automatiziranim metodama broji se veliki broj stanica iz čega proizlazi statistički točniji rezultat, ali je nedostatak visoka cijena specijalizirane opreme (Chung i sur., 2015.). Velika prednost primjene uređaja za digitalnu morfološku analizu je ušteda vremena uz istovremeno povećanje učinkovitosti tijekom rada te jednostavan i jasan prikaz stanica pacijenata na zaslonu računala. Osim toga, jednom pohranjene slike mogu se naknadno pregledavati, a mogu se i radi konzultacija poslati na udaljena računala (Cornet i sur., 2008.).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

KKS i DKS, kao njezin sastavni dio, predstavljaju rutinske hematološke pretrage koje se vrlo često primjenjuju u laboratorijskoj dijagnostici i praćenju velikog broja hematoloških, ali i nehematoloških bolesti. Automatizirana izrada DKS-a na hematološkim brojačima primjenom modernih tehnoloških rješenja dovedena je gotovo do savršenstva u uzorcima zdravih osoba tj. kod normalnog nalaza DKS-a. Međutim, unatoč dramatičnim poboljšanjima svojstava hematoloških analizatora posljednjih godina, još uvijek nije postignut značajan napredak u automatiziranom ispitivanju stanica periferne krvi kod patološkog nalaza DKS-a. Uloga hematološkog brojača u slučaju patološkog nalaza DKS-a i dalje je slanje upozorenja o patološkom nalazu koji predstavlja poticaj (signal) za izradu DKS-a svjetlosnom mikroskopijom ili, u novije vrijeme, digitalnom morfološkom analizom. Ovisno o korištenom analizatoru, ali i o populaciji bolesnika koja se obrađuje u nekom laboratoriju, otprilike 15% uzoraka krvi zahtjeva izradu DKS-a ručnom metodom, svjetlosnom mikroskopijom zbog sumnje na nalaz patološkog DKS-a (Cornet i sur., 2008.; Miloš, 2015.). Metoda svjetlosne mikroskopije je dugotrajna i osjetljiva na interindividualne i intraindividualne varijabilnosti i poznato je da ima izrazito nisku preciznost mjerenja, kako ponovljivost, tako i međupreciznost. Smatra se da uređaji za digitalnu slikovnu analizu pružaju nedvojbene prednosti u odnosu na ručno brojenje u pogledu laboratorijske učinkovitosti u sprječavanju rizika, smanjenju radnog opterećenja, pojednostavljenja tijeka rada i skraćivanja vremena obrade, ali i povećanja preciznosti mjerenja (Nam i sur., 2022.).

Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati i usporediti preciznost dviju metoda za izradu DKS-a: svjetlosne mikroskopije i digitalne morfološke analize stanica primjenom uređaja Sysmex DI-60 (*CellaVision*) na normalnim i patološkim razmazima periferne krvi. Pritom je na uređaju Sysmex DI-60 preciznost zasebno ispitana za rezultate DKS-a dobivene na temelju preklasifikacije koju inicijalno provodi sam uređaj, te za rezultate nakon klasifikacije stanica od strane analitičara.

Postavljena je hipoteza o većoj preciznosti automatizirane metode digitalne morfologije u odnosu na klasičnu metodu svjetlosne mikroskopije, kao i većoj preciznosti postupka klasifikacije na uređaju Sysmex DI-60 u odnosu na postupak preklasifikacije.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorci i postupak uzorkovanja

U svrhu izrade ovog diplomskog rada korištena su tri rutinska uzorka periferne venske krvi iz kojih su zatim izrađeni razmazi. Izabrani su uzorci od dva pacijenta s dijagnozom akutne leukemije i jedan uzorak bez patologije u nalazu DKS-a. Razmazi su označeni na sljedeći način:

- razmaz BP (dijagnoza: bez patologije)
- razmaz AL 1 (dijagnoza: akutna leukemija)
- razmaz AL 2 (dijagnoza: akutna leukemija)

Također, iz programa vanjske procjene kvalitete njemačkog organizatora Reference Institute for Bioanalytics (RfB) izabrana su četiri razmaza periferne venske krvi. Razmazi su označeni na sljedeći način:

- razmaz RfB 2/21 A (dijagnoza: kronična mijeloična leukemija)
- razmaz RfB 4/17 A (dijagnoza: virusna infekcija, reaktivne promjene)
- razmaz RfB 4/17 B (dijagnoza: bez patologije)
- razmaz RfB 4/19 B (dijagnoza: bez patologije)

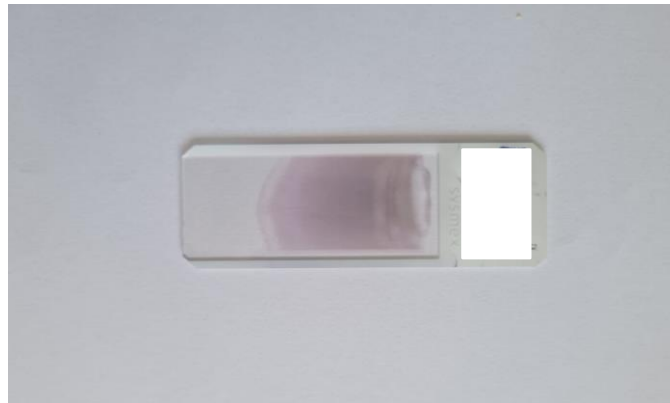
Uzorkovanje periferne krvi provedeno je standardiziranom metodom sukladno smjernicama Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu.

(<https://www.hdmblm.hr/images/preporuke/Nacionalne-preporuke-za-uzorkovanje-venske-krvi.pdf>) Pritom je korištena epruveta s podtlakom s ljubičastim čepom koja sadrži K₃-EDTA kao antikoagulant, koja je ujedno i standardizirana epruveta za hematološke pretrage.

3.2. Izrada razmaza periferne krvi na uređaju Sysmex SP-50

Razmazi BP, AL1 i AL2 izrađeni su i obojeni May-Grünwald-Giemsa bojama na uređaju Sysmex SP-50 (Sysmex, Kobe, Japan). Uređaj Sysmex SP-50 je potpuno automatizirani uređaj za izradu i bojenje razmaza periferne krvi koji aspirira uzorak pune krvi iz zatvorene epruvete, izrađuje razmaz na predmetnom staklu, pisačem utiskuje identifikacijske podatke uzorka na predmetno staklo, provodi postupak bojenja, te potom ispiranje i sušenje. (Rodak i

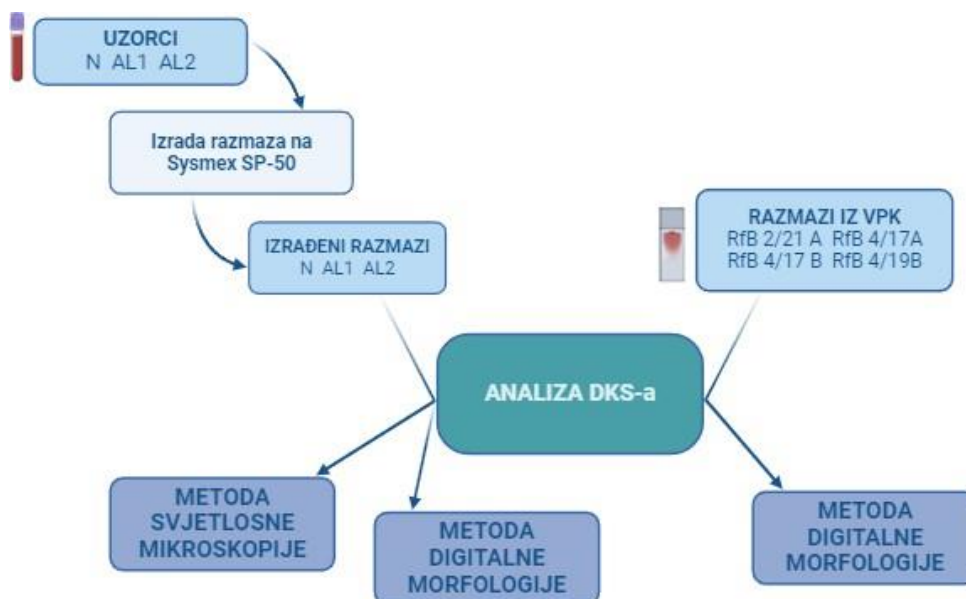
sur., 2013.) Uređaj automatizirano priprema razmaze periferne krvi na način da volumen kapljice potrebne za pripremu razmaza kao i brzinu i kut pripravljanja razmaza određuje temeljem vrijednosti hematokrita dobivenog na hematološkom analizatoru. (Upute proizvođača Sysmex SP-50, 2019.) Ovako dobiveni razmazi korišteni su za analizu DKS-a (Slika 8.)



Slika 8. Razmaz periferne krvi izrađen na uređaju Sysmex SP-50

3.3. Izrada diferencijalne krvne slike

U razmazima koji su priređeni iz rutinskih uzoraka periferne krvi (razmazi BP, AL 1 i AL 2) ispitana je preciznost izrade DKS-a svjetlosnom mikroskopijom i digitalnom morfološkom analizom, dok je u razmazima periferne krvi iz programa vanjske procjene kvalitete (RfB 2/21 A, RfB 4/17 A, RfB 4/17 B, RfB 4/19 B) ispitana preciznost izrade DKS-a digitalnom morfološkom analizom. Slika 9. prikazuje postupnik izrade razmaza periferne krvi te izvođenja analize DKS-a.



Slika 9. Postupnik izrade razmaza periferne krvi i izvođenja analize diferencijalne krvne slike (izrađeno pomoću programa BioRender) (DKS-diferencijalna krvna slika; VPK-vanjska procjena kvalitete)

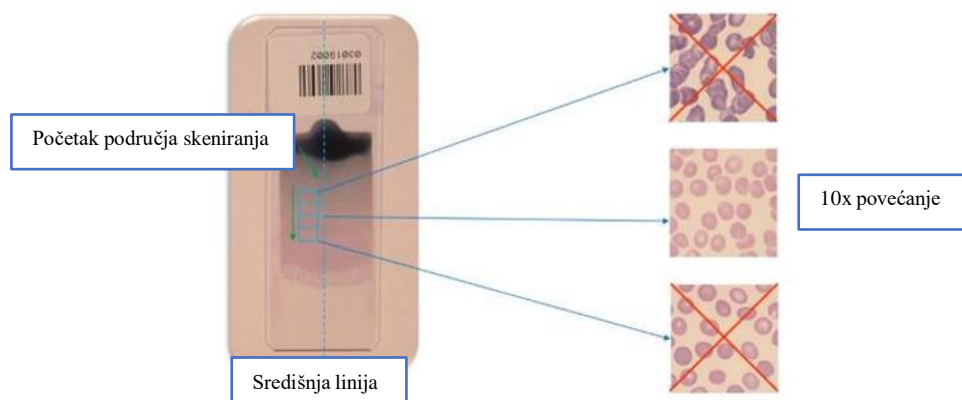
3.3.1. Izrada diferencijalne krvne slike metodom svjetlosne mikroskopije

Za početak je cilj pronaći sliku korištenjem makrovijka i pomoću mikrovijka izoštriti pronađenu sliku. Nakon toga se na predmetno stakalce kapne jedna do dvije kapi imerzijskog ulja. Mikroskopska analiza obojenog razmaza periferne krvi izvodi se pod imerzijskim objektivom mikroskopa pod povećanjem od 1000x.

Izrada DKS-a svjetlosnom mikroskopijom provedena je na ukupno 100 leukocita, ravnomjerno na dijelu razmaza optimalne debljine (gdje su eritrociti raspoređeni jedan do drugoga), pomičući preparat okomito i vodoravno. Na tipkovnici za diferenciranje tipkanjem se registrira jedna po jedna stanica, sve dok se ne dosegne broj od ukupno 100 stanica.

3.3.2. Izrada diferencijalne krvne slike metodom digitalne morfološke analize na uređaju Sysmex DI-60

Analiza razmaza započinje određivanjem područja analize pod povećanjem od 10x, te 33 mm od rubnog dijela stakalca, niz središnju liniju stakalca prema kraju razmaza (Slika 10.). Nakon umetanja stakalca u analizator, robotska jedinica za hvatanje pomiče stakalce pod objektiv mikroskopa. Nakon što analizator pronađe područje odgovarajuće gustoće eritrocita (dio razmaza s jednoslojnim eritrocitima), slijedi pretraživanje razmaza pod malim povećanjem, pronalaženje stanica s jezgrama i izrada digitalnih slika (fotografija) nađenih stanica pod velikim povećanjem. Uređaj provodi naprednu obradu slika te analizu stanica na temelju bogate baze podataka tj. provodi preklasifikaciju u prethodno definirane subpopulacije. Dobivene rezultate i slike stanica pohranjuje u bazu podataka. Nakon završene preklasifikacije, na zaslonu uređaja, u podizborniku WBC provedena je klasifikacija leukocitnih subpopulacija na minimalno 100 leukocita (Upute proizvođača Sysmex DI-60, 2018.).



Slika 10. Prikaz odgovarajućeg područja skeniranja leukocita analizom na uređaju Sysmex DI-60 (<https://uk.caresphere-academy.com/archive/file/55245>)

3.4. Protokol ispitivanja preciznosti metoda izrade diferencijalne krvne slike svjetlosnom mikroskopijom i digitalnom morfološkom analizom

Protokol ispitivanja temelji se na CLSI (engl. *Clinical and Laboratory Standards Institute*) (EP15-A3) smjernicama i uključuje sljedeća ispitivanja:

- ✓ preciznost u seriji (ponovljivost)
- ✓ preciznost iz dana u dan (međupreciznost)

Preciznost predstavlja bliskost slaganja između neovisnih rezultata mjerenja dobivenih u postavljenim uvjetima. Ona je to bolja što je bliskost slaganja između dobivenih rezultata veća. Ponovljivost (engl. „*within-run*“) jest preciznost u uvjetima pod kojima isti analitičar, koristeći istu opremu u istom laboratoriju, dobije nezavisne rezultate ispitivanja primjenjujući istu metodu na istovjetnim ispitivanim uzorcima. Međupreciznost (engl. „*between-run*“) je preciznost koja se odnosi na neslaganja unutar istog laboratorija u duljem vremenskom razdoblju (Gašljević, 2010.).

Za svaki razmaz periferne krvi (BP, AL1 i AL2 te za razmaze iz vanjske procjene kvalitete) izračunata je preciznost u seriji (ponovljivost) i preciznost iz dana u dan (međupreciznost).

Statistička analiza podataka je zasebno izračunata za parametre DKS-a dobivene na temelju preklasifikacije koju inicijalno provodi sam uređaj Sysmex DI-60, klasifikacije koja slijedi kao korekcija rezultata dobivenih preklasifikacijom te ručne metode svjetlosne mikroskopije. Razmazi su analizirani u peteroplikatu kroz 5 uzastopnih dana.

3.5. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka korišten je računalni program *Microsoft Office Excel 2016*. U svrhu ispitivanja preciznosti u seriji (ponovljivosti) i preciznosti iz dana u dan (međupreciznosti) za svaki pojedini razmaz i za sve leukocitne subpopulacije, izračunati su sljedeći parametri:

- ✓ aritmetička sredina (srednja vrijednost, \bar{x})
- ✓ standardna devijacija (SD)
- ✓ koeficijent varijacije (CV)

Standardna devijacija i koeficijent varijacije su mjere kojima se iskazuje nepreciznost, a računaju se prema ispod navedenim općim formulama. SD je mjera prosječnog odstupanja rezultata od aritmetičke sredine, dok CV govori o odnosu standardne devijacije prema aritmetičkoj sredini. Sukladno definicijama, ta se dva parametra uvijek računaju i prikazuju uz aritmetičku sredinu svih vrijednosti.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N}}$$

$$CV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$$

Aritmetička sredina izračunata je za svaki dan mjerenja u peteroplikatu (\bar{x}_d , oznaka X u pogl. Rezultati). Standardna je devijacija (s_d) izračunata iz standardnih aritmetičkih sredina svakog dana određivanja.

$$\bar{x}_d = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + x_4 + x_5}{n}$$

$$s_d = \sqrt{\frac{\sum (x_n - \bar{x}_d)^2}{n - 1}}$$

Pritom je n ukupan broj ponavljanja u danu (peteroplikat), x_n oznaka za vrijednost dobivenu mjerenjem.

Preciznost u seriji procjenjuje se prema skupnoj standardnoj devijaciji (s_r , oznaka SD u pogl. 4.1.) i koeficijentu varijacije (CV). Izračunata s_r je skupna standardna devijacija izračunata iz standardnih devijacija dobivenih svakog dana tijekom 5 dana mjerenja.

$$s_r = \sqrt{\frac{s_{d1}^2 + s_{d2}^2 + s_{d3}^2 + s_{d4}^2 + s_{d5}^2}{D}}$$

$$\bar{X} = \frac{(\bar{x}_{d1} + \bar{x}_{d2} + \bar{x}_{d3} + \bar{x}_{d4} + \bar{x}_{d5})}{D}$$

$$CV = \frac{s_r}{\bar{X}} \times 100$$

D označava ukupan broj dana, d označava dan, a \bar{X} je tzv. *grand mean*, aritmetička sredina aritmetičkih sredina svih pet dana.

Preciznost iz dana u dan izračunata je prema standardnoj devijaciji aritmetičkih sredina dobivenih za svaki dan (seriju) mjerenja (s_b , oznaka SD u pogl. 4.2.) i koeficijentu varijacije.

$$s_b = \sqrt{\frac{\sum (\bar{x}_d - \bar{X})^2}{D - 1}}$$

$$CV = \frac{s_b}{\bar{X}} \times 100$$

Dobivene vrijednosti standardne devijacije za ponovljivost i međupreciznost (s_r i s_b) pokazuju disperziju ili varijaciju pojedinačnih vrijednosti oko aritmetičke sredine. Na standardnu devijaciju imaju utjecaj ekstremne vrijednosti mjerenja, što je vrlo važno kod interpretacije njene vrijednosti.

4. REZULTATI

Rezultati preciznosti u seriji (ponovljivosti) i preciznosti iz dana u dan (međupreciznosti) za parametre DKS-a metodom svjetlosne mikroskopije i digitalne morfološke analize na uređaju Sysmex DI-60 prikazani su u tabličnom obliku. Rezultati dobiveni digitalnom morfološkom analizom prikazani su zasebno za preklasifikaciju i klasifikaciju.

Za parametre DKS-a metodom svjetlosne mikroskopije i digitalne morfologije ne postoje dostupni literaturni podatci (EFLM, Westgard ili drugi) za poželjnu, optimalnu ili minimalnu preciznost u seriji niti preciznost iz dana u dan. Podatci postoje samo za metodu na hematološkim brojačima, koja očekivano ima veću preciznost od gore spomenutih metoda. Stoga su i rezultati ispitivanja preciznosti u seriji (ponovljivosti) i rezultati ispitivanja preciznosti iz dana u dan (međupreciznosti) uspoređeni s deklariranim vrijednostima za preciznost u seriji (ponovljivost) od strane proizvođača za uređaj Sysmex DI-60 koji su prikazani u Tablici 2.

Tablica 2. Vrijednosti za preciznost u seriji (ponovljivost) na uređaju Sysmex DI-60 prema proizvođaču izražene kao standardna devijacija (Upute proizvođača Sysmex DI-60, 2018.)

Parametar	Standardna devijacija (SD)
Segmentirani granulociti (%)	4,2
Nesegmentirani granulociti (%)	0,9
Limfociti (%)	3,5
Monociti (%)	1,9
Eozinofilni granulociti (%)	0,9
Bazofilni granulociti (%)	0,7
Promijelociti (%)	nije navedeno
Mijelociti (%)	nije navedeno
Metamijelociti (%)	nije navedeno
Blasti (%)	nije navedeno
Reaktivni limfociti (%)	nije navedeno
Neidentificirane stanice (%)	nije navedeno
Eritroblasti (%)	nije navedeno

4.1. Preciznost u seriji (ponovljivost)

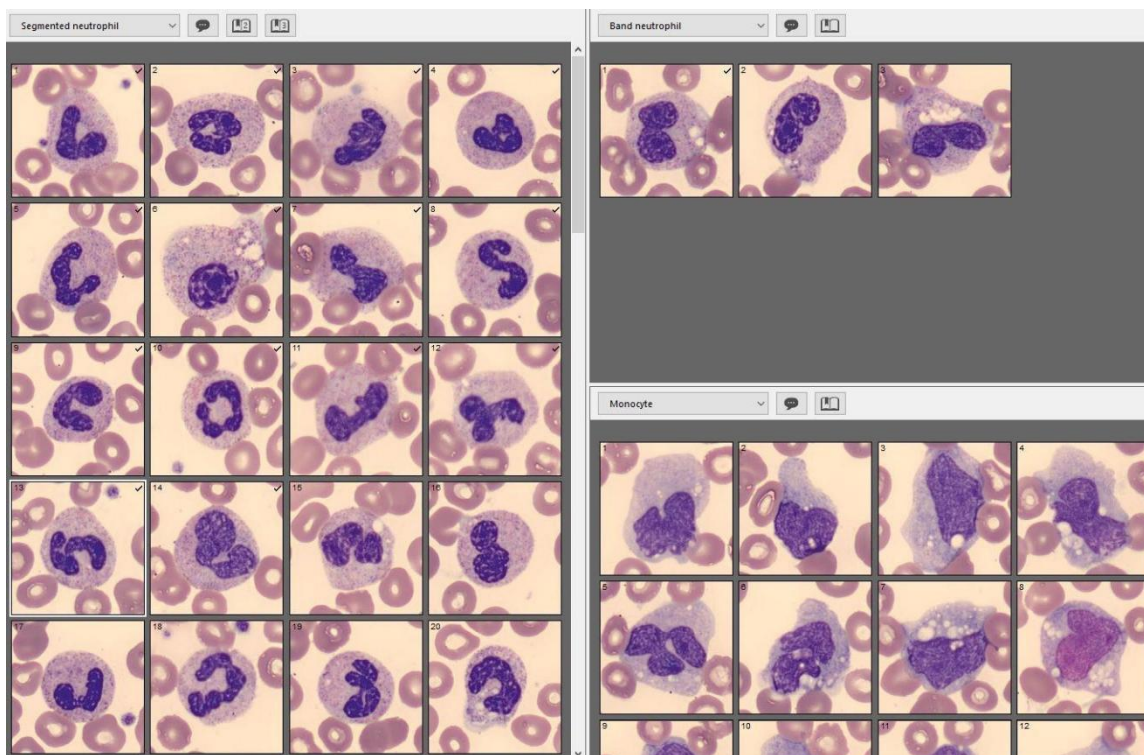
Tablica 3. Preciznost u seriji (ponovljivost) za razmaz BP (bez patologije) za diferencijalnu krvnu sliku svjetlosnom mikroskopijom i digitalnom morfologijom na uređaju Sysmex DI-60

Razmaz bez patologije (BP)	X (%)			SD (%)			CV (%)		
	Svjetlosna mikroskopija	Sysmex DI-60		Svjetlosna mikroskopija	Sysmex DI-60		Svjetlosna mikroskopija	Sysmex DI-60	
		Preklasifikacija	Klasifikacija		Preklasifikacija	Klasifikacija		Preklasifikacija	Klasifikacija
Segmentirani granulociti	78,7	67,1	79,9	2,0	2,7	1,8	2,5	4,0	2,2
Nesegmentirani granulociti	3,8	15,1	3,6	1,0*	2,5*	0,5	26,6	16,6	14,3
Limfociti	4,2	4,2	4,0	1,1	1,6	1,3	25,2	37,6	32,9
Monociti	12,9	11,4	10,9	1,8	2,2*	2,3*	13,6	19,4	21,4
Eozinofilni granulociti	0,3	1,0	0,8	0,5	0,5	0,4	165,4	54,8	46,8
Bazofilni granulociti	0,04	0,8	0,8	0,2	0,0	0,4	500,0	55,8	55,8
Metamijelociti	0,0	0,4	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	127,5	0,0
Neidentificirane stanice	0,0	0,6	0,0	0,0	0,8	0,0	0,0	124,7	0,0

*vrijednost standardne devijacije iznad kriterija navedenog od proizvođača

U razmazu BP (nalaz DKS bez patologije) vidljivo je odstupanje vrijednosti SD-a navedenog od proizvođača za monocite u preklasifikaciji (2,2%) i klasifikaciji (2,3%) na uređaju Sysmex DI-60 te za nesegmentirane granulocite u preklasifikaciji (2,5%) i metodom svjetlosne mikroskopije (1,0%) (Tablica 3). Ostali parametri DKS-a su unutar kriterija proizvođača za preciznost u seriji (ponovljivost).

Za sve parametre DKS-a osim za monocite dobivena je niža vrijednost CV-a u klasifikaciji u odnosu na preklasifikaciju na uređaju Sysmex DI-60 (21,4% vs 19,4%). Za sve parametre DKS-a osim za monocite i limfocite metodom svjetlosne mikroskopije dobivene su više vrijednosti CV-a u odnosu na klasifikaciju na Sysmex DI-60. Izrazito visoke vrijednosti CV-a u preklasifikaciji na uređaju Sysmex DI-60 dobivene su za metamijelocite (127,5%) i neidentificirane stanice (124,7%), te metodom svjetlosne mikroskopije za eozinofilne granulocite (165,4%) i bazofilne granulocite (500,0%) jer se radi o parametrima s izrazito malim udjelom u DKS-u (0,0% do 0,6%) gdje dobivene razlike nisu klinički značajne. U preklasifikaciji na uređaju Sysmex DI-60 dobiven je značajno viši udio nesegmentiranih granulocita (15,1%) u odnosu na klasifikaciju (3,6%) i svjetlosnu mikroskopiju (3,8%).



Slika 11. Stanice odabranih leukocitnih subpopulacija razmaza BP (bez patologije) na zaslonu uređaja Sysmex DI-60

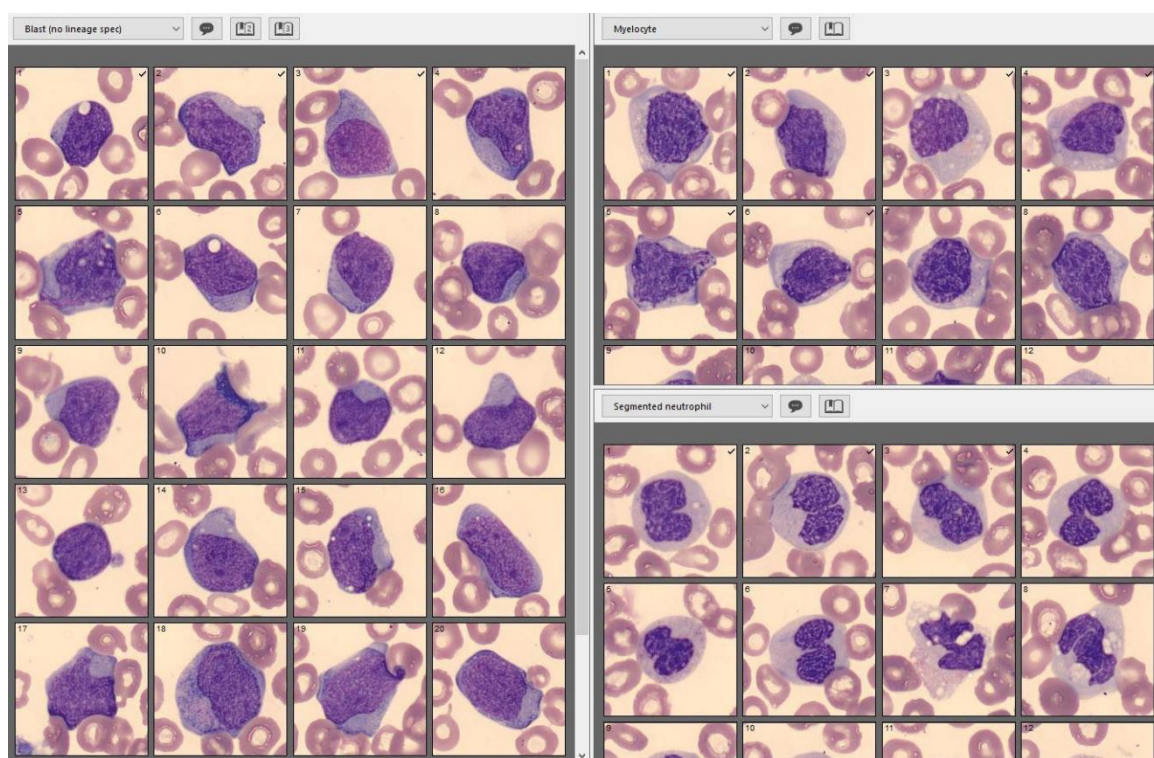
Tablica 4. Preciznost u seriji (ponovljivost) za razmaz AL 1 (akutna leukemija) za diferencijalnu krvnu sliku svjetlosnom mikroskopijom i digitalnom morfologijom na uređaju Sysmex DI-60

Razmaz akutna leukemija (AL 1)	X (%)			SD (%)			CV (%)		
	Svjetlosna mikroskopija	Sysmex DI-60		Svjetlosna mikroskopija	Sysmex DI-60		Svjetlosna mikroskopija	Sysmex DI-60	
		Preklasifikacija	Klasifikacija		Preklasifikacija	Klasifikacija		Preklasifikacija	Klasifikacija
Segmentirani granulociti	25,2	24,0	26,8	3,0	3,4	3,0	12,0	14,0	11,1
Nesegmentirani granulociti	2,8	4,7	6,8	1,3*	2,5*	1,9*	46,0	53,1	28,1
Limfociti	12,7	24,4	20,5	2,2	5,1*	4,6*	17,2	20,8	22,5
Monociti	5,0	11,6	5,8	1,9	2,3*	1,9	38,6	20,1	33,0
Eozinofilni granulociti	0,0	0,04	0,6	0,0	0,2	0,8	0,0	500,0	136,0
Bazofilni granulociti	0,0	0,1	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	353,6	0,2
Promijelociti	0,0	1,0	0,0	0,0	0,8	0,0	0,0	83,7	0,0
Mijelociti	30,3	15,0	24,7	2,9	2,3	3,0	9,4	15,4	12,0
Metamijelociti	0,0	3,8	0,0	0,0	1,7	0,0	0,0	44,2	0,0
Blasti	24,0	15,3	20,6	2,6	3,5	2,8	10,8	22,8	13,4
Plazma stanice	0,0	0,1	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	353,6	0,0
Neidentificirane stanice	0,0	10,3	0,0	0,0	3,2	0,0	0,0	31,0	0,0

*vrijednost standardne devijacije iznad kriterija navedenog od proizvođača

U razmazu AL 1 (dijagnoza akutne leukemije) vidljivo je odstupanje vrijednosti SD-a navedenog od proizvođača za nesegmentirane granulocite u sve tri metode određivanja DKS-a (1,3%, 2,5% i 1,9%), za limfocite u preklasifikaciji (5,1%) i klasifikaciji (4,6%) na uređaju Sysmex DI-60 te za monocite u preklasifikaciji (2,3%) (Tablica 4). Ostali parametri DKS-a su unutar kriterija proizvođača za preciznost u seriji (ponovljivost).

Za sve parametre DKS-a osim za limfocite i monocite dobivena je niža vrijednost CV-a u klasifikaciji u odnosu na preklasifikaciju na uređaju Sysmex DI-60 (22,5% vs 20,8% i 33,0% vs 20,1%). Metodom svjetlosne mikroskopije za limfocite, eozinofilne i bazofilne granulocite te mijelocite i blaste dobivene su niže vrijednosti CV-a u odnosu na klasifikaciju na uređaju Sysmex DI-60. Za eozinofilne i bazofilne granulocite, promijelocite, metamijelocite i plazma stanice metodom svjetlosne mikroskopije dobivene su vrijednosti CV=0,0% jer u razmazu višestrukim analizama nisu nađene navedene stanice. U preklasifikaciji na uređaju Sysmex DI-60 je dobiven značajan udio neidentificiranih stanica (10,3%) i značajno niži udio mijelocita (15,0%) u odnosu na klasifikaciju (24,7%) i na metodu svjetlosne mikroskopije (30,3%). Izrazito visoke vrijednosti CV-a u preklasifikaciji na uređaju Sysmex DI-60 dobivene su za bazofilne granulocite (353,6%) i plazma stanice (353,6%), te za eozinofilne granulocite u preklasifikaciji (500,0%) i klasifikaciji (136,0%) jer se radi o parametrima s izrazito malim udjelom u DKS-u (0,0% do 0,1%) gdje dobivene razlike nisu klinički značajne.



Slika 12. Stanice odabranih leukocitnih subpopulacija razmaza AL 1 (akutna leukemija) na zaslonu uređaja Sysmex DI-60

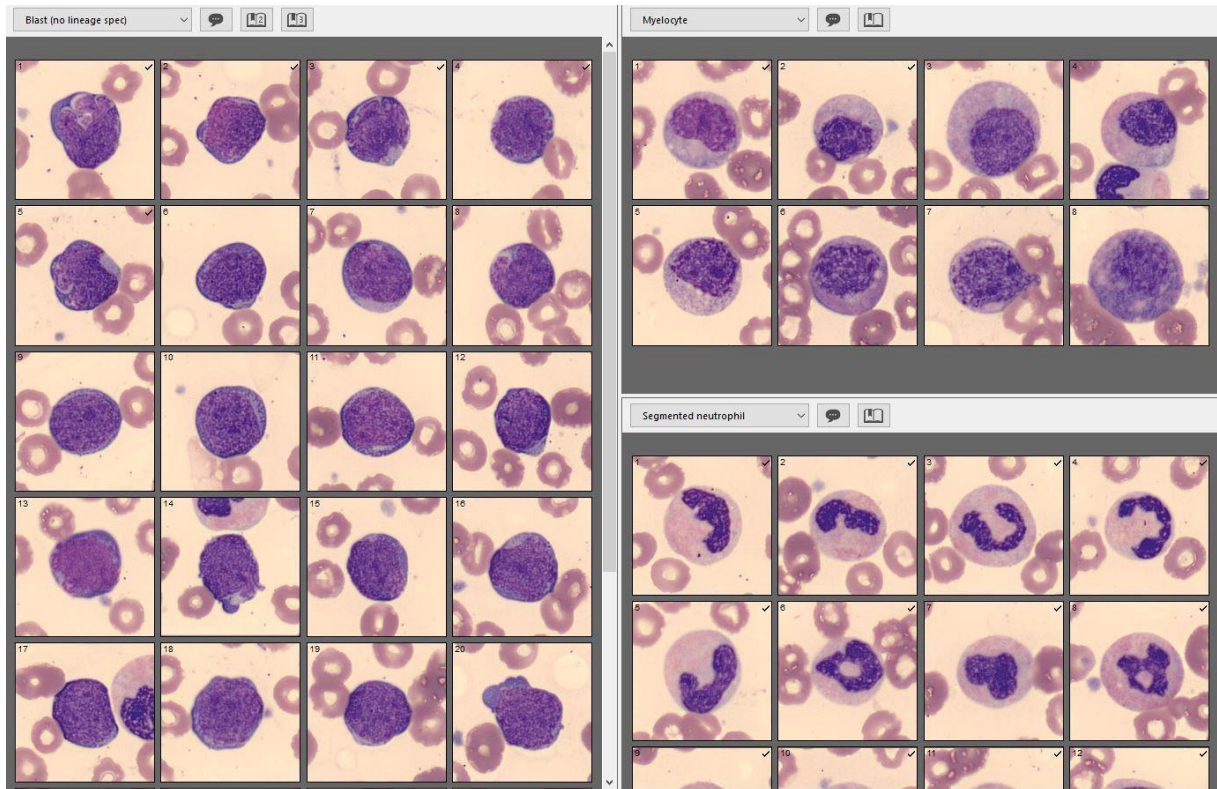
Tablica 5. Preciznost u seriji (ponovljivost) za razmaz AL 2 (akutna leukemija) za diferencijalnu krvnu sliku svjetlosnom mikroskopijom i digitalnom morfologijom na uređaju Sysmex DI-60

Razmaz akutna leukemija (AL 2)	X (%)			SD (%)			CV (%)		
	Svjetlosna mikroskopija	Sysmex DI-60		Svjetlosna mikroskopija	Sysmex DI-60		Svjetlosna mikroskopija	Sysmex DI-60	
		Preklasifikacija	Klasifikacija		Preklasifikacija	Klasifikacija		Preklasifikacija	Klasifikacija
Segmentirani granulociti	40,4	27,0	45,4	3,5	2,2	3,9	8,6	8,3	8,5
Nesegmentirani granulociti	2,4	22,6	3,6	1,1*	3,6*	1,1*	46,7	15,9	30,6
Limfociti	4,0	13,6	10,8	1,1	2,9	2,4	26,2	21,4	22,2
Monociti	0,5	2,9	2,4	0,5	1,2	1,2	90,2	42,2	48,6
Eozinofilni granulociti	0,2	0,5	1,0	0,4	0,7	0,5	200,0	141,3	52,9
Bazofilni granulociti	0,0	0,1	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	288,7	0,0
Promijelociti	0,0	0,2	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	176,8	0,0
Mijelociti	16,3	5,5	9,2	2,6	1,8	2,5	16,0	32,3	26,7
Metamijelociti	0,0	3,1	0,0	0,0	1,2	0,0	0,0	38,5	0,0
Blasti	36,1	24,2	29,9	2,6	3,8	3,9	7,1	15,8	12,9
Plazma stanice	0,0	0,2	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	200,0	0,0
Neidentificirane stanice	0,0	4,4	0,0	0,0	1,7	0,0	0,0	39,5	0,0

*vrijednost standardne devijacije iznad kriterija navedenog od proizvođača

U razmazu AL 2 (dijagnoza akutne leukemije) vidljivo je odstupanje vrijednosti SD-a navedenog od proizvođača za nesegmentirane granulocite u sve tri metode određivanja DKS-a (1,1%, 3,6% i 1,1%) (Tablica 5). Ostali parametri DKS-a su unutar kriterija proizvođača za preciznost u seriji (ponovljivost).

Za sve parametre DKS-a osim za segmentirane i nesegmentirane granulocite, limfocite i monocite dobivena je niža vrijednost CV-a u klasifikaciji u odnosu na preklasifikaciju na uređaju Sysmex DI-60 (8,5% vs 8,3%, 30,6% vs 15,9%, 22,2% vs 21,4% i 48,6% vs 42,2%). Metodom svjetlosne mikroskopije za mijelocite i blaste dobivene su niže vrijednosti CV-a u odnosu na klasifikaciju na uređaju Sysmex DI-60. Za bazofilne granulocite, promijelocite, metamijelocite i plazma stanice u klasifikaciji na uređaju Sysmex DI-60 i metodom svjetlosne mikroskopije dobivene su vrijednosti CV=0,0% jer u razmazu višestrukim analizama nisu nađene navedene stanice. U preklasifikaciji na uređaju Sysmex DI-60 je dobiven značajno niži udio segmentiranih granulocita (27,0%) u odnosu na klasifikaciju (45,4%) i svjetlosnu mikroskopiju (40,4%), te značajno viši udio nesegmentiranih granulocita (22,6%) u odnosu na klasifikaciju (3,6%) i svjetlosnu mikroskopiju (2,4%). Izrazito visoke vrijednosti CV-a u preklasifikaciji na uređaju Sysmex DI-60 (141,3%) i metodom svjetlosne mikroskopije (200,0%) dobivene su za eozinofilne granulocite, te u preklasifikaciji za bazofilne granulocite (288,7%), promijelocite (176,8%) i plazma stanice (200,0%) jer se radi o parametrima s izrazito malim udjelom u DKS-u (0,1% do 0,5%) gdje dobivene razlike nisu klinički značajne.



Slika 13. Stanice odabranih leukocitnih subpopulacija razmaza AL 2 (akutna leukemija) na zaslonu uređaja Sysmex DI-60

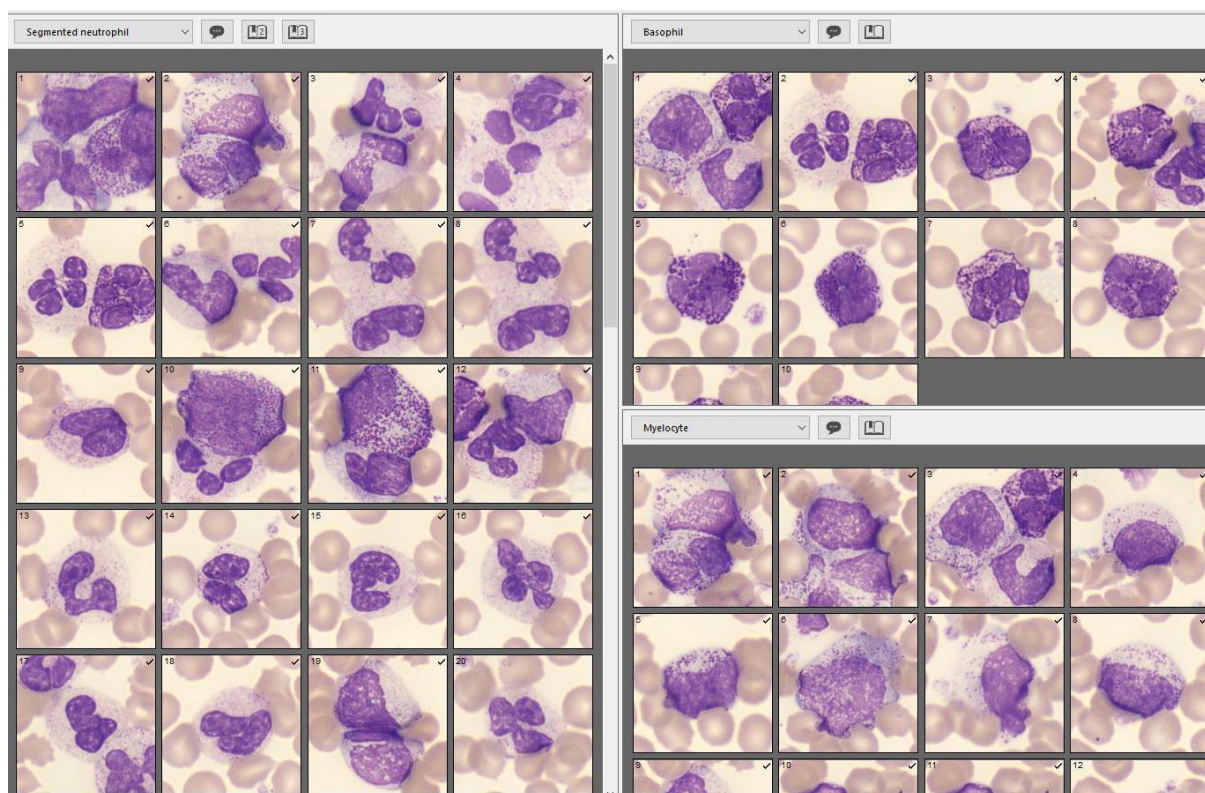
Tablica 6. Preciznost u seriji (ponovljivost) za razmaz RfB 2/21 A (kronična mijeloična leukemija) za diferencijalnu krvnu sliku digitalnom morfologijom na uređaju Sysmex DI-60

Razmaz kronična mijeloična leukemija (RfB 2/21 A)	X (%)		SD (%)		CV (%)	
	Preklasifikacija	Klasifikacija	Preklasifikacija	Klasifikacija	Preklasifikacija	Klasifikacija
Segmentirani granulociti	39,4	39,2	3,2	2,4	8,1	6,2
Nesegmentirani granulociti	10,6	14,3	2,2*	1,6*	20,7	11,3
Limfociti	16,0	10,7	1,4	1,1	8,9	10,6
Monociti	5,4	30,2	1,7	1,0	32,4	30,2
Eozinofilni granulociti	2,2	2,3	0,7	0,7	30,7	30,1
Bazofilni granulociti	5,1	6,5	1,4*	0,8*	27,7	12,9
Promijelociti	4,8	6,0	1,5	0,7	31,2	12,3
Mijelociti	9,9	13,3	2,1	1,5	21,7	11,2
Metamijelociti	5,4	3,3	1,4	0,9	25,1	25,9
Blasti	1,3	1,1	0,7	0,9	54,6	77,2
Neidentificirane stanice	13,5	0,0	4,2	0,0	31,2	0,0

*vrijednost standardne devijacije iznad kriterija navedenog od proizvođača

U razmazu RfB 2/21 A (dijagnoza kronična mijeloična leukemija) dobiveno je odstupanje vrijednosti SD-a navedenog od proizvođača u preklasifikaciji i klasifikaciji na uređaju Sysmex DI-60 za nesegmentirane granulocite (2,2% i 1,6%) i za bazofilne granulocite (1,4% i 0,8%) (Tablica 6). Ostali parametri DKS-a su unutar kriterija proizvođača za preciznost u seriji (ponovljivost).

Za sve parametre DKS-a osim za limfocite, metamijelocite i blaste dobivena je niža vrijednost CV-a u klasifikaciji u odnosu na preklasifikaciju (10,6% vs 8,9%, 25,9% vs 25,1% i 77,2% vs 54,6%). U preklasifikaciji na uređaju Sysmex DI-60 je dobiven značajan udio neidentificiranih stanica (13,5%), te značajno niži udio monocita (5,4%) u odnosu na klasifikaciju (30,2%).



Slika 14. Stanice odabranih leukocitnih subpopulacija razmaza RfB 2/21 A (kronična mijeloična leukemija) na zaslonu uređaja Sysmex DI-60

Tablica 7. Preciznost u seriji (ponovljivost) za razmaz RfB 4/17 A (virusna infekcija) za diferencijalnu krvnu sliku digitalnom morfologijom na uređaju Sysmex DI-60

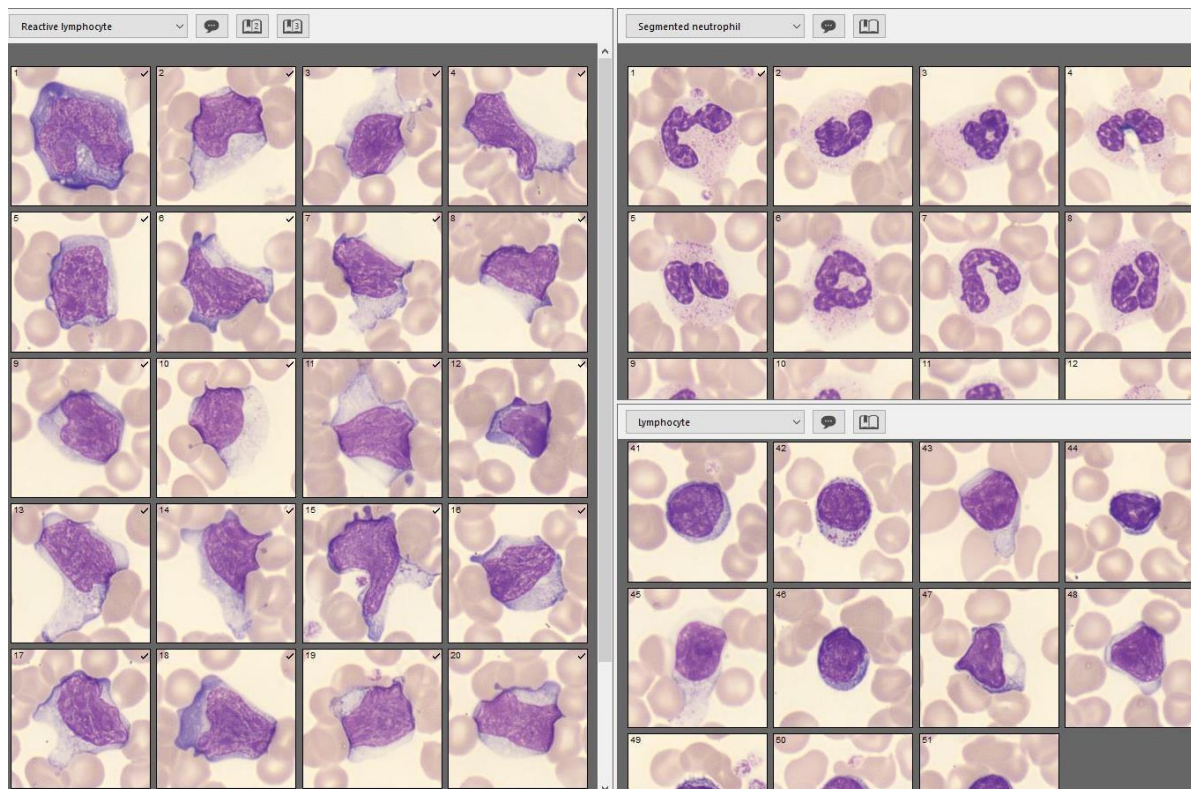
Razmaz virusna infekcija (RfB 4/17 A)	X (%)		SD (%)		CV (%)	
	Preklasifikacija	Klasifikacija	Preklasifikacija	Klasifikacija	Preklasifikacija	Klasifikacija
Segmentirani granulociti	20,8	17,3	2,8	1,2	13,7	6,8
Nesegmentirani granulociti	2,9	1,4	1,5*	0,9	52,8	61,8
Limfociti	60,0	48,2	2,8	1,7	4,7	3,5
Monociti	12,4	10,7	2,1*	1,5	17,1	14,2
Eozinofilni granulociti	0,04	0,0	0,2	0,0	500,0	0,0
Bazofilni granulociti	0,4	0,04	0,5	0,2	141,6	500,0
Promijelociti	0,0	0,04	0,0	0,2	0,0	500,0
Mijelociti	1,1	1,1	0,4	0,3	39,9	0,0
Metamijelociti	2,2	0,1	1,0	0,3	44,9	263,5
Blasti	0,2	0,0	0,4	0,0	176,8	0,0
Reaktivni limfociti	0,0	21,0	0,0	1,5	0,0	7,3
Neidentificirane stanice	7,7	0,0	1,8	0,0	23,7	0,0

*vrijednost standardne devijacije iznad kriterija navedenog od proizvođača

U razmazu RfB 4/17 A (virusna infekcija) dobiveno je odstupanje vrijednosti SD-a navedenog od proizvođača u preklasifikaciji na uređaju Sysmex DI-60 za nesegmetirane granulocite (1,5%) i monocite (2,1%) (Tablica 7). Ostali parametri DKS-a su unutar kriterija proizvođača za preciznost u seriji (ponovljivost).

Za sve parametre DKS-a osim za nesegmetirane granulocite, bazofilne granulocite, promijelocite i metamijelocite dobivena je niža vrijednost CV-a u klasifikaciji na uređaju Sysmex DI-60 u odnosu na preklasifikaciju (61,8% vs 52,8%, 500,0% vs 141,6%, 500,0% vs 0,0% i 263,5% vs 44,9%). U preklasifikaciji na uređaju Sysmex DI-60 dobiven je udio neidentificiranih stanica u vrijednosti 7,7%. Izrazito visoke vrijednosti CV-a u preklasifikaciji na uređaju Sysmex DI-60 dobivene su za eozinofilne granulocite (500,0%), bazofilne granulocite (141,6%) i blaste (176,8%), te u klasifikaciji za bazofilne granulocite (500,0%),

promijelocite (500,0%) i metamijelocite (263,5%) jer se radi o parametrima s izrazito malim udjelom u DKS-u (0,0% i 0,4%) gdje dobivene razlike nisu klinički značajne.



Slika 15. Stanice odabranih leukocitnih subpopulacija razmaza RfB 4/17 A (virusna infekcija) na zaslonu uređaja Sysmex DI-60

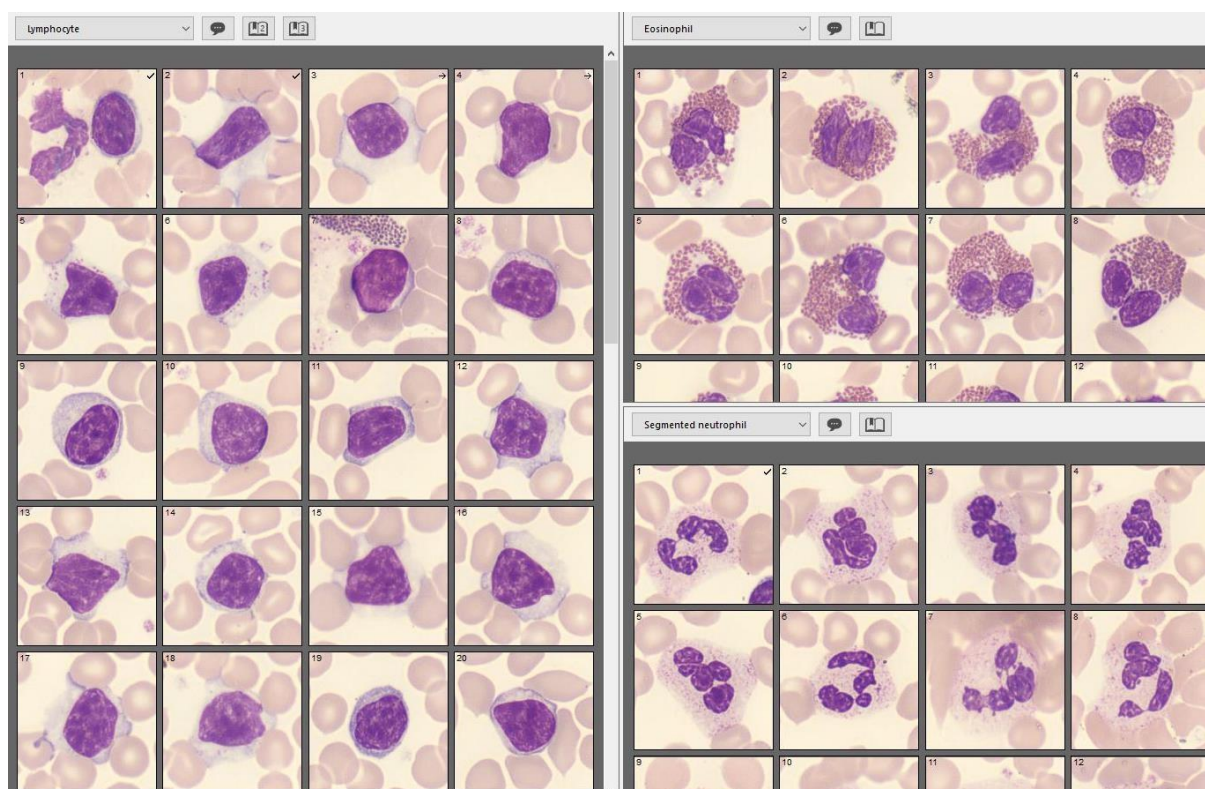
Tablica 8. Preciznost u seriji (ponovljivost) za razmaz RfB 4/17 B (bez patologije) za diferencijalnu krvnu sliku digitalnom morfologijom na uređaju Sysmex DI-60

Razmaz bez patologije (RfB 4/17 B)	X (%)		SD (%)		CV (%)	
	Preklasifikacija	Klasifikacija	Preklasifikacija	Klasifikacija	Preklasifikacija	Klasifikacija
Segmentirani granulociti	33,2	33,0	3,1	3,7	9,3	11,3
Nesegmentirani granulociti	0,1	0,6	0,3	0,4	288,7	79,7
Limfociti	45,2	46,1	3,4	3,8*	7,6	8,7
Monociti	3,6	3,2	0,7	0,4	20,6	13,5
Eozinofilni granulociti	16,3	15,8	1,5*	1,4*	16,3	9,0
Bazofilni granulociti	1,4	1,3	0,9*	0,9*	63,9	68,3
Mijelociti	0,1	0,0	0,3	0,0	353,6	0,0
Metamijelociti	0,2	0,04	0,3	0,2	197,6	500,0
Blasti	0,04	0,0	0,2	0,0	500,0	0,0
Neidentificirane stanice	0,6	0,0	0,6	0,0	108,0	0,0

*vrijednost standardne devijacije iznad kriterija navedenog od proizvođača

U razmazu RfB 4/17 B (nalaz DKS bez patologije) vidljivo je odstupanje vrijednosti SD-a navedenog od proizvođača za limfocite u klasifikaciji na uređaju Sysmex DI-60 (3,8%), te za eozinofilne granulocite u preklasifikaciji (1,5%) i klasifikaciji (1,4%) i bazofilne granulocite u preklasifikaciji (0,9%) i klasifikaciji (0,9%) (Tablica 8). Ostali parametri DKS-a su unutar kriterija proizvođača za preciznost u seriji (ponovljivost).

Za segmentirane granulocite, limfocite, bazofilne granulocite i metamijelocite dobivena je viša vrijednost CV-a u klasifikaciji na uređaju Sysmex DI-60 u odnosu na preklasifikaciju (11,3% vs 9,3%, 8,7% vs 7,6%, 68,3% vs 63,9% i 500,0% vs 197,6%), dok je za ostale parametre DKS-a dobivena niža vrijednost CV-a u klasifikaciji nego u preklasifikaciji. Izrazito visoke vrijednosti CV-a u preklasifikaciji na uređaju Sysmex DI-60 dobivene su za nesegmentirane granulocite (288,7%), mijelocite (353,6%), blaste (500,0%) i neidentificirane stanice (108,0%), te u preklasifikaciji i klasifikaciji za metamijelocite (197,6% i 500,0%) jer se radi o parametrima s izrazito malim udjelom u DKS-u (0,0% do 0,6%) gdje dobivene razlike nisu klinički značajne.



Slika 16. Stanice odabranih leukocitnih subpopulacija razmaza RfB 4/17 B (bez patologije) na zaslonu uređaja Sysmex DI-60

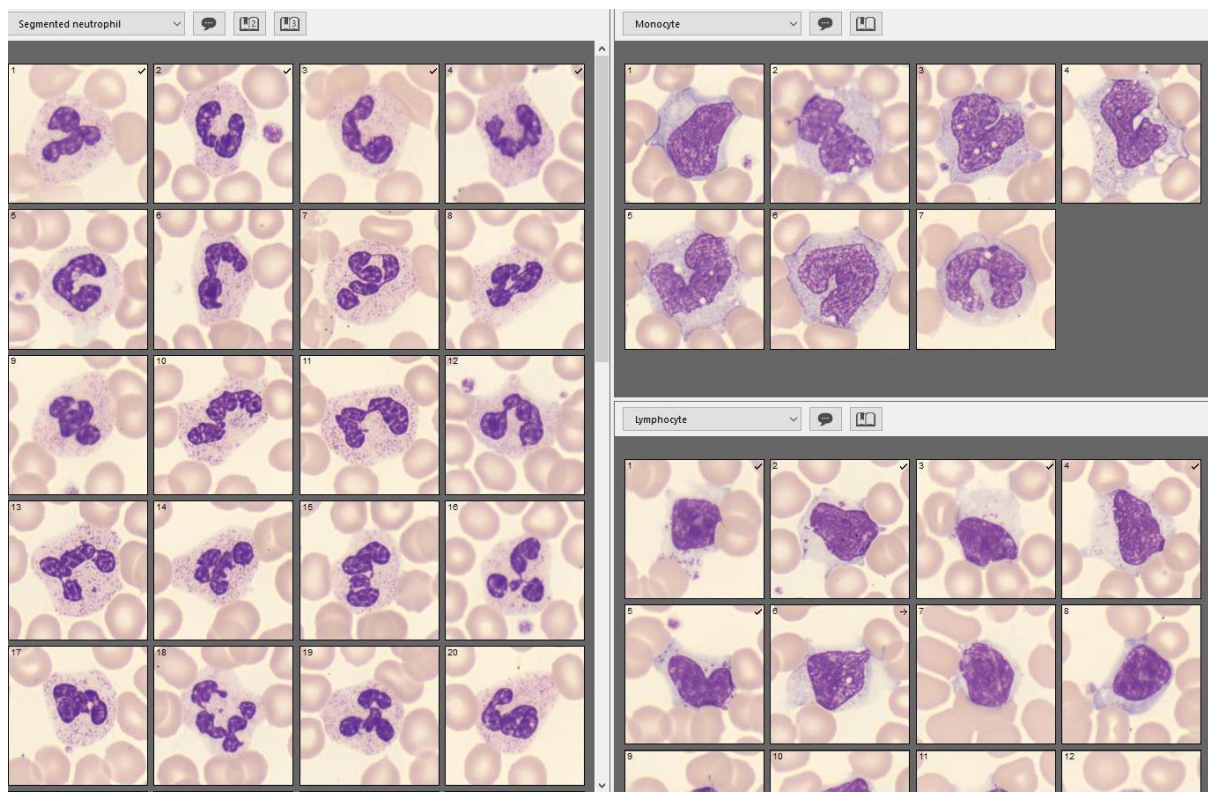
Tablica 9. Preciznost u seriji (ponovljivost) za razmaz RfB 4/19 B (bez patologije) za diferencijalnu krvnu sliku digitalnom morfologijom na uređaju Sysmex DI-60

Razmaz bez patologije (RfB 4/19 B)	X (%)		SD (%)		CV (%)	
	Preklasifikacija	Klasifikacija	Preklasifikacija	Klasifikacija	Preklasifikacija	Klasifikacija
Segmentirani granulociti	48,4	48,1	3,1	3,3	6,3	6,9
Nesegmentirani granulociti	1,8	0,1	1,3*	0,3	72,3	353,6
Limfociti	40,0	42,9	3,4	3,5	8,4	8,2
Monociti	6,3	6,0	1,3	1,3	20,6	21,5
Eozinofilni granulociti	1,4	1,4	0,7	0,6	51,0	44,8
Bazofilni granulociti	1,0	1,0	0,0	0,03	0,0	2,9
Mijelociti	0,04	0,1	0,2	0,3	500,0	353,6
Metamijelociti	1,1	0,4	1,0	0,3	88,8	70,7
Neidentificirane stanice	0,4	0,0	0,5	0,0	152,1	0,0

*vrijednost standardne devijacije iznad kriterija navedenog od proizvođača

U razmazu RfB 4/19 B (nalaz DKS bez patologije) vidljivo je odstupanje vrijednosti SD-a navedenog od proizvođača za nesegmentirane granulocite u preklasifikaciji na uređaju Sysmex DI-60 (1,3%) (Tablica 9). Ostali parametri DKS-a su unutar kriterija proizvođača za preciznost u seriji (ponovljivost).

Za segmentirane granulocite, nesegmentirane granulocite, monocite i bazofilne granulocite dobivena je viša vrijednost CV-a u klasifikaciji na uređaju Sysmex DI-60 u odnosu na preklasifikaciju (6,9% vs 6,3%, 353,6% vs 72,3%, 21,5% vs 20,6% i 2,9% vs 0,0%), dok je za ostale parametre DKS-a dobivena niža vrijednost CV-a u klasifikaciji nego u preklasifikaciji. Izrazito visoke vrijednosti CV-a u klasifikaciji na uređaju Sysmex DI-60 dobivene su za nesegmentirane granulocite (353,6%), u preklasifikaciji i klasifikaciji za mijelocite (500,0% i 353,6%), te u preklasifikaciji za neidentificirane stanice (152,1%) jer se radi o parametrima s izrazito malim udjelom u DKS-u (0,0% do 0,4%) gdje dobivene razlike nisu klinički značajne.



Slika 17. Stanice odabranih leukocitnih subpopulacija razmaza RfB 4/19 B (bez patologije) na zaslonu uređaja Sysmex DI-60

4.2. Preciznost iz dana u dan (međupreciznost)

Tablica 10. Preciznost iz dana u dan (međupreciznost) za razmaz BP (bez patologije) za diferencijalnu krvnu sliku svjetlosnom mikroskopijom i digitalnom morfologijom na uređaju Sysmex DI-60

Razmaz bez patologije (BP)	X (%)			SD (%)			CV (%)		
	Svjetlosna mikroskopija	Sysmex DI-60		Svjetlosna mikroskopija	Sysmex DI-60		Svjetlosna mikroskopija	Sysmex DI-60	
		Preklasifikacija	Klasifikacija		Preklasifikacija	Klasifikacija		Preklasifikacija	Klasifikacija
Segmentirani granulociti	78,7	67,1	79,9	1,7	1,6	0,5	2,2	2,3	0,6
Nesegmentirani granulociti	3,8	15,1	3,6	0,7	1,5*	0,4	18,9	9,8	10,8
Limfociti	4,2	4,2	4,0	0,8	0,7	0,6	18,1	16,8	14,9
Monociti	12,9	11,5	10,9	0,5	0,7	0,9	4,2	6,0	7,9
Eozinofilni granulociti	0,3	1,0	0,8	0,3	0,5	0,3	94,8	44,7	30,6
Bazofilni granulociti	0,04	0,8	0,8	0,1	0,2	0,2	223,6	28,8	28,8
Metamijelociti	0,0	0,4	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	50,0	0,0
Neidentificirane stanice	0,0	0,6	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	33,3	0,0

*vrijednost standardne devijacije iznad kriterija navedenog od proizvođača

U razmazu BP (nalaz DKS bez patologije) vidljivo je odstupanje vrijednosti SD-a navedenog od proizvođača za nesegmentirane granulocite u preklasifikaciji na uređaju Sysmex DI-60 (1,5%) (Tablica 10). Ostali parametri DKS-a su unutar kriterija proizvođača za preciznost u seriji (ponovljivost).

Za sve parametre DKS-a osim za nesegmentirane granulocite i monocite dobivena je niža vrijednost CV-a u klasifikaciji na uređaju Sysmex DI-60 u odnosu na preklasifikaciju (10,8% vs 9,8% i 7,9% vs 6,0%). Za sve parametre DKS-a osim za monocite metodom svjetlosne mikroskopije dobivene su više vrijednosti CV-a u odnosu na klasifikaciju na uređaju Sysmex DI-60. Izrazito visoke vrijednosti CV-a metodom svjetlosne mikroskopije dobivene su za bazofilne granulocite (223,6%) jer se radi o parametru s izrazito malim udjelom u DKS-u (0,04%) gdje dobivena razlika nije klinički značajna. U preklasifikaciji na uređaju Sysmex DI-60 je dobiven značajno viši udio nesegmentiranih granulocita (15,1%) u odnosu na klasifikaciju (3,6%) i svjetlosnu mikroskopiju (3,8%).

Tablica 11. Preciznost iz dana u dan (međupreciznost) za razmaz AL 1 (akutna leukemija) za diferencijalnu krvnu sliku svjetlosnom mikroskopijom i digitalnom morfologijom na uređaju Sysmex DI-60

Razmaz akutna leukemija (AL 1)	X (%)			SD (%)			CV (%)		
	Svjetlosna mikroskopija	Sysmex DI-60		Svjetlosna mikroskopija	Sysmex DI-60		Svjetlosna mikroskopija	Sysmex DI-60	
		Preklasifikacija	Klasifikacija		Preklasifikacija	Klasifikacija		Preklasifikacija	Klasifikacija
Segmentirani granulociti	25,2	24,0	26,8	2,1	0,9	0,8	8,4	3,9	2,8
Nesegmentirani granulociti	2,8	4,7	6,8	0,7	1,2*	0,5	24,1	25,7	7,5
Limfociti	12,7	24,4	20,5	2,3	3,0	1,8	18,4	12,3	8,7
Monociti	5,0	11,6	5,8	1,0	1,5	0,6	20,8	12,5	10,1
Eozinofilni granulociti	0,0	0,04	0,6	0,0	0,1	0,5	0,0	223,6	85,3
Bazofilni granulociti	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	136,9	0,0
Promijelociti	0,0	1,0	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0	70,7	0,0
Mijelociti	30,3	15,0	24,7	3,5	1,0	2,7	11,6	6,5	10,8
Metamijelociti	0,0	3,8	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	11,2	0,0
Blasti	24,0	15,3	20,6	3,0	1,5	1,7	12,4	9,5	8,4
Plazma stanice	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	136,9	0,0
Neidentificirane stanice	0,0	10,3	0,0	0,0	1,3	0,0	0,0	12,9	0,0

*vrijednost standardne devijacije iznad kriterija navedenog od proizvođača

U razmazu AL 1 (dijagnoza akutne leukemije) vidljivo je odstupanje vrijednosti SD-a navedenog od proizvođača za nesegmentirane granulocite u preklasifikaciji na uređaju Sysmex DI-60 (1,2%) (Tablica 11). Ostali parametri DKS-a su unutar kriterija proizvođača proizvođača za preciznost u seriji (ponovljivost).

Za sve parametre DKS-a osim za mijelocite dobivena je niža vrijednost CV-a u klasifikaciji na uređaju Sysmex DI-60 u odnosu na preklasifikaciju (10,8% vs 6,5%). Metodom svjetlosne mikroskopije za eozinofilne granulocite je dobivena niža vrijednost CV-a u odnosu na klasifikaciju na uređaju Sysmex DI-60. Za eozinofilne i bazofilne granulocite, promijelocite, metamijelocite i plazma stanice metodom svjetlosne mikroskopije te za bazofilne granulocite, promijelocite, metamijelocite i plazma stanice u klasifikaciji na uređaju Sysmex DI-60 dobivene su vrijednosti CV=0,0% jer u razmazu višestrukim analizama nisu nađene navedene stanice. U preklasifikaciji na uređaju Sysmex DI-60 je dobiven značajan udio neidentificiranih stanica (10,3%). Izrazito visoke vrijednosti CV-a u preklasifikaciji na uređaju Sysmex DI-60 dobivene su za eozinofilne (223,6%) i bazofilne granulocite (136,9%) te plazma stanice (136,9%) jer se radi o parametru s izrazito malim udjelom u DKS-u (0,0% do 0,1%) gdje dobivena razlika nije klinički značajna.

Tablica 12. Preciznost iz dana u dan (međupreciznost) za razmaz AL 2 (akutna leukemija) za diferencijalnu krvnu sliku svjetlosnom mikroskopijom i digitalnom morfologijom na uređaju Sysmex DI-60

Razmaz akutna leukemija (AL 2)	X (%)			SD (%)			CV (%)		
	Svjetlosna mikroskopija	Sysmex DI-60		Svjetlosna mikroskopija	Sysmex DI-60		Svjetlosna mikroskopija	Sysmex DI-60	
		Preklasifikacija	Klasifikacija		Preklasifikacija	Klasifikacija		Preklasifikacija	Klasifikacija
Segmentirani granulociti	40,4	27,0	45,4	2,1	0,9	2,9	5,2	3,3	6,4
Nesegmentirani granulociti	2,4	22,6	3,6	0,8	2,4*	1,0	34,5	10,4	26,7
Limfociti	4,0	13,6	10,8	1,1	2,0	1,9	27,4	14,8	17,4
Monociti	0,5	2,9	2,4	0,3	0,6	0,7	58,3	20,9	30,6
Eozinofilni granulociti	0,2	0,5	1,0	0,2	0,2	0,4	100,0	47,5	34,6
Bazofilni granulociti	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	91,3	0,0
Promijelociti	0,0	0,2	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	91,3	0,0
Mijelociti	16,3	5,5	9,2	1,2	0,4	0,9	7,2	6,6	9,5
Metamijelociti	0,0	3,1	0,0	0,0	0,8	0,0	0,0	26,7	0,0
Blasti	36,1	24,2	29,9	1,7	1,3	1,2	4,8	5,3	4,1
Plazma stanice	0,0	0,2	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	100,0	0,0
Neidentificirane stanice	0,0	4,4	0,0	0,0	1,1	0,0	0,0	24,4	0,0

*vrijednost standardne devijacije iznad kriterija navedenog od proizvođača

U razmazu AL 2 (dijagnoza akutne leukemije) vidljivo je odstupanje vrijednosti SD-a navedenog od proizvođača za nesegmentirane granulocite u preklasifikaciji na uređaju Sysmex DI-60 (2,4%) (Tablica 12). Ostali parametri DKS-a su unutar kriterija proizvođača za preciznost u seriji (ponovljivost).

Za segmentirane i nesegmentirane granulocite, limfocite, monocite i mijelocite dobivene su više vrijednosti CV-a u klasifikaciji preklasifikaciji na uređaju Sysmex DI-60 u odnosu na preklasifikaciju (6,4% vs 3,3%, 26,7% vs 10,4%, 17,4% vs 14,8%, 30,6% vs 20,9% i 9,5% vs 6,6%), dok su za ostale parametre DKS-a dobivene niže vrijednosti. Metodom svjetlosne mikroskopije za segmentirane granulocite i mijelocite dobivene su niže vrijednosti CV-a u odnosu na klasifikaciju na uređaju Sysmex DI-60. Za bazofilne granulocite, promijelocite, metamijelocite i plazma stanice metodom svjetlosne mikroskopije i klasifikacijom na uređaju Sysmex DI-60 dobivene su vrijednosti CV=0,0% jer u razmazu višestrukim analizama nisu nađene navedene stanice. U preklasifikaciji na uređaju Sysmex DI-60 dobiven je udio neidentificiranih stanica od 4,4%, te značajno niži udio segmentiranih granulocita (27,0%) u odnosu na klasifikaciju (45,4%) i svjetlosnu mikroskopiju (40,4%), te značajno viši udio nesegmentiranih granulocita u preklasifikaciji (22,6%) u odnosu na klasifikaciju (3,6%) i svjetlosnu mikroskopiju (2,4%).

Tablica 13. Preciznost iz dana u dan (međupreciznost) za razmaz RfB 2/21 A (kronična mijeloična leukemija) za diferencijalnu krvnu sliku digitalnom morfologijom na uređaju Sysmex DI-60

Kronična mijeloična leukemija (RfB 2/21 A)	X (%)		SD (%)		CV (%)	
	Preklasifikacija	Klasifikacija	Preklasifikacija	Klasifikacija	Preklasifikacija	Klasifikacija
Segmentirani granulociti	39,4	39,2	1,3	1,5	3,3	3,8
Nesegmentirani granulociti	10,6	14,3	0,9	1,2*	8,5	8,7
Limfociti	16,0	10,7	1,6	0,5	9,8	5,0
Monociti	5,4	30,2	0,6	0,4	10,8	11,4
Eozinofilni granulociti	2,2	2,3	0,5	0,2	22,1	9,0
Bazofilni granulociti	5,1	6,5	0,3	0,4	6,6	6,7
Promijelociti	4,8	6,0	0,7	0,6	14,4	10,8
Mijelociti	9,9	13,3	0,6	0,5	6,1	3,6
Metamijelociti	5,4	3,3	0,9	0,6	17,2	16,8
Blasti	1,3	1,1	0,3	0,3	17,3	23,9
Neidentificirane stanice	13,5	0,0	1,7	0,0	12,3	0,0

*vrijednost standardne devijacije iznad kriterija navedenog od proizvođača

U razmazu RfB 2/21 A (dijagnoza kronična mijeloična leukemija) dobiveno je odstupanje vrijednosti SD-a navedenog od proizvođača u klasifikaciji na uređaju Sysmex DI-60 za nesegmentirane granulocite (1,2%) (Tablica 13). Ostali parametri DKS-a su unutar kriterija proizvođača za preciznost u seriji (ponovljivost).

Za segmentirane i nesegmentirane granulocite, monocite, bazofilne granulocite i blaste dobivena je viša vrijednost CV-a u klasifikaciji na uređaju Sysmex DI-60 u odnosu na preklasifikaciju (3,8% vs 3,3%, 8,7% vs 8,5%, 11,4% vs 10,8%, 6,7% vs 6,6% i 23,9% vs 17,3%). Za ostale parametre DKS-a dobivene su niže vrijednosti CV-a u klasifikaciji na uređaju Sysmex DI-60 u odnosu na preklasifikaciju. U preklasifikaciji na uređaju Sysmex DI-60 dobiven je značajan udio neidentificiranih stanica (13,5%), te značajno niži udio monocita (5,4%) u odnosu na klasifikaciju (30,2%).

Tablica 14. Preciznost iz dana u dan (međupreciznost) za razmaz RfB 4/17 A (virusna infekcija) za diferencijalnu krvnu sliku digitalnom morfologijom na uređaju Sysmex DI-60

Razmaz virusna infekcija (RfB 4/17 A)	X (%)		SD (%)		CV (%)	
	Preklasifikacija	Klasifikacija	Preklasifikacija	Klasifikacija	Preklasifikacija	Klasifikacija
Segmentirani granulociti	20,8	17,3	1,8	1,4	8,8	8,3
Nesegmentirani granulociti	2,9	1,4	0,6	0,7	19,1	51,3
Limfociti	60,0	48,2	3,3	1,0	5,5	2,1
Monociti	12,4	10,7	1,5	0,5	12,0	4,7
Eozinofilni granulociti	0,04	0,0	0,1	0,0	223,6	0,0
Bazofilni granulociti	0,4	0,04	0,2	0,1	46,5	223,6
Promijelociti	0,0	0,04	0,0	0,1	0,0	223,6
Mijelociti	1,1	1,1	0,2	0,1	16,0	9,7
Metamijelociti	2,2	0,1	0,5	0,2	22,1	149,1
Blasti	0,2	0,0	0,2	0,0	91,3	0,0
Reaktivni limfociti	0,0	21,0	0,0	1,5	0,0	6,9
Neidentificirane stanice	7,7	0,0	0,9	0,0	11,4	0,0

*vrijednost standardne devijacije iznad kriterija navedenog od proizvođača

U razmazu RfB 4/17 A (virusna infekcija) svi su parametri DKS-a su unutar kriterija proizvođača za preciznost u seriji (ponovljivost) (Tablica 14).

Za sve parametre DKS-a osim za nesegmentirane granulocite, bazofilne granulocite, promijelocite i metamijelocite dobivena je niža vrijednost CV-a u klasifikaciji na uređaju Sysmex DI-60 u odnosu na preklasifikaciju (51,3% vs 19,1%, 223,6% vs 46,5%, 223,6% vs 0,0%, 149,1% vs 22,1% i 6,9% vs 0,0%). U preklasifikaciji na uređaju Sysmex DI-60 je dobiveno 7,7% neidentificiranih stanica u preklasifikaciji. Izrazito visoke vrijednosti CV-a dobivene su u preklasifikaciji na uređaju Sysmex DI-60 za eozinofilne granulocite (223,6%), te u klasifikaciji za bazofilne granulocite (223,6%), promijelocite (223,6%) i metamijelocite (149,1%) jer se radi o parametrima s izrazito malim udjelom u DKS-u (0,0% do 0,1%) gdje dobivena razlika nije klinički značajna.

Tablica 15. Preciznost iz dana u dan (međupreciznost) za razmaz RfB 4/17 B (bez patologije) za diferencijalnu krvnu sliku digitalnom morfologijom na uređaju Sysmex DI-60

Razmaz bez patologije (RfB 4/17 B)	X (%)		SD (%)		CV (%)	
	Preklasifikacija	Klasifikacija	Preklasifikacija	Klasifikacija	Preklasifikacija	Klasifikacija
Segmentirani granulociti	33,2	33,0	1,8	1,4	5,5	4,3
Nesegmentirani granulociti	0,1	0,6	0,1	0,3	91,3	59,0
Limfociti	45,2	46,1	3,2	2,9	7,0	6,3
Monociti	3,6	3,2	0,5	0,3	14,5	7,7
Eozinofilni granulociti	16,3	15,8	0,8	0,6	4,6	4,0
Bazofilni granulociti	1,4	1,3	1,3*	1,4*	93,1	106,7
Mijelociti	0,1	0,0	0,1	0,0	136,9	0,0
Metamijelociti	0,2	0,04	0,3	0,1	163,0	223,6
Blasti	0,04	0,0	0,1	0,0	223,6	0,0
Neidentificirane stanice	0,6	0,0	0,3	0,0	47,1	0,0

*vrijednost standardne devijacije iznad kriterija navedenog od proizvođača

U razmazu RfB 4/17 B (nalaz DKS bez patologije) vidljivo je odstupanje vrijednosti SD-a navedenog od proizvođača za bazofilne granulocite u preklasifikaciji (1,3%) i klasifikaciji (1,4%) na uređaju Sysmex DI-60 (Tablica 15). Ostali parametri DKS-a su unutar kriterija proizvođača za preciznost u seriji (ponovljivost).

Za sve parametre DKS-a osim za bazofilne granulocite i metamijelocite dobivena je niža vrijednost CV-a u klasifikaciji na uređaju Sysmex DI-60 u odnosu na preklasifikaciju (106,7% vs 93,1% i 223,6% vs 163,0%). Izrazito visoke vrijednosti CV-a u preklasifikaciji na uređaju Sysmex DI-60 dobivene su za mijelocite (136,9%) i blaste (223,6%), u klasifikaciji za bazofilne granulocite (106,7%), te u preklasifikaciji i klasifikaciji za metamijelocite (163,0% i 223,6%) jer se radi o parametrima s izrazito malim udjelom u DKS-u (0,0% do 1,3%) gdje dobivene razlike nisu klinički značajne.

Tablica 16. Preciznost iz dana u dan (međupreciznost) za razmaz RfB 4/19 B (bez patologije) za diferencijalnu krvnu sliku digitalnom morfologijom na uređaju Sysmex DI-60

Razmaz bez patologije (RfB 4/19 B)	X (%)		SD (%)		CV (%)	
	Preklasifikacija	Klasifikacija	Preklasifikacija	Klasifikacija	Preklasifikacija	Klasifikacija
Segmentirani granulociti	48,4	48,1	1,4	0,8	2,9	1,7
Nesegmentirani granulociti	1,8	0,1	0,7	0,1	40,5	136,9
Limfociti	40,0	42,9	2,3	1,3	5,8	2,9
Monociti	6,3	6,0	0,5	0,4	8,3	6,8
Eozinofilni granulociti	1,4	1,4	0,3	0,3	18,1	19,4
Bazofilni granulociti	1,0	1,0	0,0	0,01	0,0	1,1
Mijelociti	0,04	0,1	0,1	0,1	223,6	136,9
Metamijelociti	1,1	0,4	0,7	0,5	63,6	117,4
Neidentificirane stanice	0,4	0,0	0,3	0,0	82,4	0,0

*vrijednost standardne devijacije iznad kriterija navedenog od proizvođača

U razmazu RfB 4/19 B (nalaz DKS bez patologije) svi su parametri DKS-a su unutar kriterija proizvođača za preciznost u seriji (ponovljivost) (Tablica 16).

Za nesegmentirane granulocite, eozinofilne granulocite, bazofilne granulocite i metamijelocite dobivena je viša vrijednost CV-a u klasifikaciji na uređaju Sysmex DI-60 u odnosu na preklasifikaciju (136,9% vs 40,5%, 19,4% vs 18,1%, 1,1% vs 0,0% i 117,4% vs 63,6%), dok je za ostale parametre DKS-a dobivena niža vrijednost CV-a u klasifikaciji nego u preklasifikaciji. Izrazito visoke vrijednosti CV-a u klasifikaciji na uređaju Sysmex DI-60 dobivene su za nesegmentirane granulocite (136,9%) i metamijelocite (117,4%), te u preklasifikaciji i klasifikaciji za mijelocite (223,6% i 136,9%) jer se radi o parametrima s izrazito malim udjelom u DKS-u (0,0% do 0,4%) gdje dobivene razlike nisu klinički značajne.

5. RASPRAVA

U sklopu KKS, određuje se i DKS koja daje informaciju o udjelu pojedinih leukocitnih subpopulacija. Izrada DKS-a uobičajeno se provodi primjenom triju metoda: automatizirana metoda na hematološkim brojačima, ručna metoda diferenciranja obojenog razmaza periferne krvi svjetlosnom mikroskopijom i automatizirana metoda diferenciranja obojenog razmaza periferne krvi digitalnom morfološkom analizom stanica.

Unatoč dramatičnim poboljšanjima svojstava hematoloških analizatora posljednjih godina, još uvijek nije postignut značajan napredak u automatiziranom ispitivanju stanica periferne krvi kod patološkog nalaza DKS-a. Uloga hematološkog brojača u takvim je slučajevima ograničena na slanje poruka upozorenja o patološkom nalazu (signal, engl. *flag*) za izradu DKS-a svjetlosnom mikroskopijom ili, u novije vrijeme, digitalnom morfološkom analizom. Izrada DKS-a svjetlosnom mikroskopijom i dalje ima neizostavnu ulogu u provjeri rezultata, bez obzira na tehnološki napredak. Glavna indikacija za primjenu ove metode je sumnja na prisutnost nezrelih / patoloških / atipičnih / reaktivno promijenjenih stanica. Svjetlosna mikroskopija omogućava prepoznavanje klinički značajnih morfoloških abnormalnosti stanica i kao takva, još uvijek predstavlja zlatni standard (Gulati i sur., 2013.). Osim što je ova metoda dugotrajna, prepoznavanje morfoloških karakteristika stanica je izrazito subjektivno, te je stoga podložna velikoj varijabilnosti. S druge strane, velika prednost primjene uređaja za digitalnu morfološku analizu je ušteda vremena uz rezultate s većom preciznošću i točnošću od onih dobivenih ručnim pregledom razmaza svjetlosnom mikroskopijom (Fuentes-Arderiu i sur., 2007.). Nakon napredne digitalne obrade slika i analize stanica, uređaj preliminarno razvrstava stanice tj. kategorizira ih u pojedine leukocitne subpopulacije (tzv. preklasifikacija). Sljedeći korak je pregled i analiza preklasificiranih stanica na zaslonu računala kojeg provodi analitičar te ih ili potvrđuje ili, u slučaju kada su stanice pogrešno razvrstane, svrstava u odgovarajuću kategoriju, tj. provodi postupak klasifikacije. (Upute proizvođača Sysmex DI-60, 2018.)

Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati i usporediti preciznost dviju metoda za izradu DKS-a: svjetlosne mikroskopije i digitalne morfološke analize stanica na normalnim i patološkim razmazima periferne krvi. Preciznost izrade DKS-a koja je uključivala preciznost u seriji (ponovljivost) i preciznost iz dana u dan (međupreciznost) temeljem CLSI smjernica EP15-A3, ispitana je u ukupno sedam razmaza, bez patologije i s različitim patologijama (reaktivne i zloćudne promjene), svjetlosnom mikroskopijom i digitalnom morfološkom

analizom na uređaju Sysmex DI-60 (postupci preklasifikacije i klasifikacije). U razmazima koji su priređeni iz rutinskih uzoraka periferne krvi (razmazi BP, AL 1 i AL 2) ispitana je preciznost izrade DKS-a svjetlosnom mikroskopijom i digitalnom morfološkom analizom, dok je u razmazima periferne krvi iz programa vanjske procjene kvalitete RfB (RfB 2/21 A, RfB 4/17 A, RfB 4/17 B, RfB 4/19 B) ispitana preciznost izrade DKS-a samo digitalnom morfološkom analizom. Na uređaju Sysmex DI-60 preciznost je zasebno ispitana i za rezultate DKS-a dobivene na temelju preklasifikacije koju inicijalno provodi sam uređaj, te za rezultate nakon klasifikacije stanica od strane analitičara.

Za parametre DKS-a metodom svjetlosne mikroskopije i metodom digitalne morfologije ne postoje dostupni literaturni podatci (EFLM, Westgard ili drugi) za poželjnu, optimalnu ili minimalnu preciznost u seriji niti preciznost iz dana u dan. Stoga su rezultati ispitivanja preciznosti u seriji (ponovljivosti) izraženi kao SD uspoređeni s dostupnim vrijednostima za preciznost u seriji navedenima od strane proizvođača uređaja Sysmex DI-60, uzimajući u obzir da navedeni kriteriji postoje samo za određene parametre DKS-a (segmentirane i nesegmentirane granulocite, limfocite, monocite, te eozinofilne i bazofilne granulocite). Pri tome proizvođač uređaja Sysmex DI-60 naglašava ograničenje metode digitalne morfološke analize zbog inter-individualne varijabilnosti, tj. subjektivnosti u razlikovanju segmentiranih i nesegmentiranih granulocita, metamijelocita i mijelocita, mijelocita i promijelocita, te limfocita i varijanti limfocita (Upute proizvođača Sysmex DI-60, 2018.).

Vrijednosti parametara DKS-a koje odstupaju od SD-ova navedenih od strane proizvođača za uređaj Sysmex DI-60 u tabličnom su prikazu označene sa zvjezdicom. U većini razmaza (nepatološki i patološki) najčešće odstupanje SD-a od navedenih kriterija proizvođača za ponovljivost uočeno je za nesegmentirane granulocite (odstupanje u 6/7 razmaza). Zatim slijedi odstupanje SD-a za monocite (3/7 razmaza), limfocite (2/7 razmaza), bazofilne granulocite (2/7 razmaza) te eozinofilne granulocite (1/7 razmaza). Prilikom procjene međupreciznosti u većini razmaza (nepatološki i patološki) uočeno je najčešće odstupanje SD-a od navedenih kriterija proizvođača također za nesegmentirane granulocite (4/7 razmaza). Dobiveni su rezultati pokazali bolju preciznost izraženu kao SD za međupreciznost u odnosu na ponovljivost što se može objasniti većim brojem mjerenja pri određivanju međupreciznosti u odnosu na ponovljivost. Brojenje nesegmentiranih granulocita pokazuje najveće odstupanje zbog nedovoljno definiranih morfoloških kriterija za prepoznavanje stanica, što je prepoznato i opisano u literaturi. Također, autori propituju i

klinički doprinos nesegmentiranih granulocita u nalazu DKS-a tim više jer postoje drugi parametri u određenim patološkim stanjima koji ih dijagnostički mogu zamijeniti (van der Meer i sur., 2006.).

Zbog nedostatka kriterija za CV, dobivene su vrijednosti CV-a uspoređivane međusobno za preklasifikaciju i klasifikaciju na uređaju Sysmex DI-60, te za klasifikaciju na uređaju Sysmex DI-60 i metodu svjetlosne mikroskopije. Hipoteza ovog rada bila je veća preciznost postupka klasifikacije odnosu na preklasifikaciju na uređaju Sysmex DI-60, kao i veća preciznost postupka klasifikacije na uređaju Sysmex DI-60 u odnosu na metodu svjetlosne mikroskopije. U svakom je razmazu nađen barem jedan parametar čija je vrijednost CV-a viša u klasifikaciji u odnosu na preklasifikaciju (bez obzira na patologiju razmaza), uzimajući u obzir i normalne i patološke stanice. Iz navedenog se može izvesti zaključak da preciznost dobivena klasifikacijom nije uvijek veća u odnosu na preklasifikaciju. Pokazana heterogenost rezultata proizlazi iz nejasno definiranih morfoloških kriterija kao i ograničene individualne mogućnosti primjene jedinstvene morfološke definicije određenih parametara i subjektivnosti u njihovoj procjeni. Usporedbom vrijednosti CV-a dobivenih klasifikacijom na uređaju Sysmex DI-60 i metodom svjetlosne mikroskopije, potvrđena je pretpostavka o većoj preciznosti automatizirane metode jer je u svakom razmazu dobivena niža vrijednost CV-a u postupku klasifikacije za većinu parametara. Iznimka je razmaz AL 1 (akutna leukemija) u kojem su za preciznost u seriji metodom svjetlosne mikroskopije dobivene niže vrijednosti CV-a za pet leukocitnih subpopulacija (limfociti, eozinofilni i bazofilni granulociti, mijelociti i blasti), što je vjerojatno posljedica specifične patologije. S obzirom kako su u razmazu AL 2 dobivene niže vrijednosti CV-a metodom svjetlosne mikroskopije samo za mijelocite i blaste, zaključujemo da je svjetlosna mikroskopija preciznija u brojenju patoloških, nezrelih stanica periferne krvi. Zbog ograničenih mogućnosti uređaja Sysmex DI-60 u prepoznavanju patoloških stanica, nužan je mikroskopski pregled razmaza periferne krvi kod pacijenata s dijagnozom leukemije ili sumnje na prisutnost patoloških vrsta stanica (uključujući blaste, plazma stanice i nezrele granulocite).

Uređaj Sysmex DI-60 provodi postupak preklasifikacije i svrstava stanice u prethodno definirane kategorije. Ako se radi o patološkom DKS-u, uređaj često u postupku preklasifikacije ne može identificirati sve stanice, te ih svrstava u kategoriju neidentificiranih stanica. U razmazima bez patologije (BP, RfB 4/17 B i RfB 4/19 B) udio neidentificiranih stanica iznosio je 0,4-0,6% dok je u razmazu virusne infekcije (RfB 4/17 A) udio neidentificiranih stanica je bio značajno veći (7,7%). U patološkim razmazima s kroničnom i

akutnim leukemijama (RfB 2/21 A, AL 1 i AL 2) uočen je također značajan udio neidentificiranih stanica (4,4-13,5%). Dobiveni rezultati potvrđuju ključnu ulogu iskusnog analitičara u prepoznavanju patoloških stanica prilikom diferenciranja patoloških razmaza periferne krvi.

Poseban slučaj predstavlja razmaz virusne infekcije (RfB 4/17 A) u kojem je udio reaktivnih limfocita u klasifikaciji na uređaju Sysmex DI-60 iznosio 21,0%, dok je u preklasifikaciji vrijednost bila 0,0%. Reaktivni limfociti pripadaju grupi dodatnih parametara, definiranih prema potrebama laboratorija, koje uređaj u postupku preklasifikacije ne prepoznaje, te se oni naknadno u postupku klasifikacije razvrstavaju u pripadajuću kategoriju.

U svim razmazima (neovisno radi li se o patologiji ili ne) s izrazito niskim udjelom leukocitnih subpopulacija u DKS-u (najčešće < 1%), dobivene su izrazito visoke vrijednosti CV-a za preciznost u seriji i preciznost iz dana u dan. Unatoč statistički značajnim vrijednostima koje su posljedica malih brojeva, one nisu klinički značajne. Primjerice, u svrhu određivanja međupreciznosti je provedeno 25 mjerenja (5 dana u petroplikatu) i pronalaženje jedne stanice nekog parametra DKS-a u samo jednom od 25 mjerenja (dok je u 24 mjerenja rezultat 0,0%) rezultira udjelom od 0,04% u ukupnom broju leukocita i vrijednosti CV-a od 500,0% za ponovljivost i 223,6% za međupreciznost.

6. ZAKLJUČCI

1. Preciznost izrade DKS-a koja je uključivala preciznost u seriji (ponovljivost) i preciznost iz dana u dan (međupreciznost) ispitana je u ukupno sedam razmaza periferne krvi svjetlosnom mikroskopijom i digitalnom morfološkom analizom na uređaju Sysmex DI-60.
2. Ispitana je preciznost izrade DKS-a svjetlosnom mikroskopijom i digitalnom morfološkom analizom (preklasifikacija i klasifikacija) u tri razmaza koji su priređeni iz rutinskih uzoraka periferne krvi (razmazi BP, AL 1 i AL 2), dok je u četiri razmaza periferne krvi iz programa vanjske procjene kvalitete (RfB 2/21 A, RfB 4/17 A, RfB 4/17 B, RfB 4/19 B) ispitana preciznost izrade DKS-a digitalnom morfološkom analizom.
3. Od svih leukocitnih subpopulacija najmanja preciznost (SD iznad navedenog kriterija u 6/7 razmaza periferne krvi) je uočena za nesegmentirane granulocite za sve tri metode i za ponovljivost i za međupreciznost, što je sukladno literaturnim navodima.
4. Dobiveni rezultati pokazuju bolju preciznost izraženu kao SD za međupreciznost u odnosu na ponovljivost.
5. Usporedbom vrijednosti CV-a dobivenih klasifikacijom na uređaju Sysmex DI-60 i metodom svjetlosne mikroskopije, potvrđena je pretpostavka o većoj preciznosti automatizirane metode. Iznimka su patološki razmazi s akutnim leukemijama (AL 1 i AL 2) u kojima se metoda svjetlosne mikroskopije pokazala preciznijom u brojenju patoloških, nezrelih stanica periferne krvi- mijelocita i blasta.
6. Preciznost dobivena postupkom klasifikacije na uređaju Sysmex DI-60 nije uvijek veća u odnosu na postupak preklasifikacije.
7. U postupku preklasifikacije na uređaju Sysmex DI-60 pokazan je veći udio neidentificiranih stanica u razmazima periferne krvi s patologijom u odnosu na razmaze periferne krvi bez patologije.
8. Mikroskopski pregled razmaza periferne krvi uvijek je nužan kod sumnje na patološki nalaz DKS-a, a posebno kod dijagnoze leukemije i sumnje na prisutnost patoloških vrsta stanica (uključujući blaste, plazma stanice i nezrele granulocite).
9. Bez obzira na primjenjenu metodu, izrazito mali udjeli parametara DKS-a rezultiraju visokim vrijednostima CV-a za preciznost u seriji i preciznost iz dana u dan, što dovodi do statistički značajnih razlika koje nisu klinički značajne.

7. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

AL 1- akutna leukemija 1

AL 2- akutna leukemija 2

BP- bez patologije

CLSI- Institut za kliničke i laboratorijske standarde (engl. *Clinical and Laboratory Standards Institute*)

CV- koeficijent varijacije

d- dan

DKS- diferencijalna krvna slika

DNA- deoksiribonukleinska kiselina engl. *deoxyribonucleic acid*

D- ukupan broj dana

EFLM- Europska federacija kliničke kemije i laboratorijske medicine (engl. *European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*)

Erc- broj eritrocita

FDA- Američka Uprava za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*)

FSC- rasap svjetla prema naprijed (engl. *forward scatter*)

Hb- hemoglobin

Hct- hematokrit

K₃-EDTA- kalij etilendiamin-tetraoctena kiselina (engl. *Tripotassium thylenediaminetetraacetic*)

KKS- kompletna krvna slika

L- broj leukocita

MCH- prosječan sadržaj hemoglobina u eritocitu (engl. *mean corpuscular hemoglobin*)

MCHC- prosječnu koncentraciju hemoglobina u jednoj litri eritrocita (engl. *mean corpuscular hemoglobin concentration*)

MCV- prosječni volumen eritrocita (engl. *mean corpuscular volume*)

MPV- prosječni volumen trombocita (engl. *mean platelet volume*)

n- ukupan broj ponavljanja u danu

RDW- raspodjelu eritrocita po volumenu (engl. *red cell distribution width*)

RfB- Reference Institute for Bioanalytics

RNA- ribonukleinska kiselina eng. engl. *ribonucleic acid*

SD- standardna devijacija

s_b - standardna devijacija za međupreciznost

s_d - standardna devijacija izračunata iz standardnih aritmetičkih sredina svakog dana određivanja

s_r - standardna devijacija za ponovljivost

SSC- rasap svjetla lateralno (engl. *side scatter*)

Trc- broj trombocita

VPK- vanjska procjena kvalitete

WHO- Svjetska zdravstvena organizacija (engl. World Health Organization)

\bar{X} - aritmetička sredina aritmetičkih sredina (engl. *grand mean*)

\bar{x} - aritmetička sredina (srednja vrijednost)

\bar{x}_d - aritmetička sredina izračunata za svaki dan mjerenja

x_n -oznaka za vrijednost dobivenu mjerenjem

8. LITERATURA

- Celkan TT. What does a hemogram say to us? *Turk Pediatry Ars*, 2020, 55(2):103-116.
- Chung J, Ou X, Kulkarni RP, Yang C. Counting White Blood Cells from a Blood Smear Using Fourier Ptychographic Microscopy. *PLoS One*, 2015, 10(7).
- Cornet E, Perol JP, Troussard X. Performance evaluation and relevance of the CellaVision DM96 system in routine analysis and in patients with malignant hematological diseases. *Int J Lab Hematol*, 2008, 30(6):536-42.
- Čvorišćec D, Čepelak I. Štrausova medicinska biokemija. Zagreb, Medicinska naklada, 2009., str. 31.
- Čvorišćec D, Flegar-Meštrić Z, Harmonizacija općih pretraga iz područja opće medicinske biokemije. Medicinska naklada, Zagreb, 2004., str. 9-11.
- Fuentes-Arderiu X, Garcia-Panyella M, Dot-Bach D. Between-examiner reproducibility in manual differential leukocyte counting. *Accreditation and Quality Assurance*, 2007, 12(12):643-645
- Gašljević V, Validacija i mjerna nesigurnost. *Biochem Med*, 2010, 20(1), 57-63.
- Gulati G, Song J, Florea AD, Gong J. Purpose and criteria for blood smear scan, blood smear examination, and blood smear review. *Ann Lab Med*, 2013, 33(1):1-7.
- Hematology: Clinical Principles and Applications, 2013.,
https://books.google.hr/books?hl=hr&lr=&id=tHsAwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=hematology+rodak&ots=ePNRyRFJJ&sig=6qbIcE1HN0TZ7mC-ZSJt-V5lC2M&redir_esc=y#v=onepage&q&f=true, pristupljeno 11. 08. 2024.
- Hrvatsko društvo za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu: Nacionalne preporuke za uzorkovanje venske krvi, 2014., <https://www.hdmbim.hr/images/preporuke/Nacionalne-preporuke-za-uzorkovanje-venske-krvi.pdf>, pristupljeno 08.08.2024.
- Labar B, Hauptmann E i suradnici. Hematologija. Zagreb, Školska knjiga, 2017., str. 388-392, 395.

Miloš M. Automatizacija izrade razmaza i slikovna analiza stanica kao mogući smjer potpune automatizacije morfološke hematologije. U: Getaldić-Švarc B, Analiza krvnih stanica – mogućnosti i ograničenja tehnologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2015., 45-56.

Nam M, Yoon S, Hur M, Lee GH, Kim H, Park M, Kim HN. Digital Morphology Analyzer Sysmex DI-60 vs. Manual Counting for White Blood Cell Differentials in Leukopenic Samples: A Comparative Assessment of Risk and Turnaround Time. Ann Lab Med, 2022, 42(4):398-405.

Premužić-Lampič M, Hematologija: klinička i laboratorijska. Medicinska naklada., 2000., str. 15-18, 217-263.

Sysmex, Upute proizvođača Sysmex DI-60, Kobe, Japan, 2018.

Sysmex, Upute proizvođača za Sysmex SP-50, Kobe, Japan, 2019.

Theory Training Workbook Digital Morphology (DI-60/DM-Series), <https://uk.caresphere-academy.com/archive/file/55245>, pristupljeno 14. 08. 2024.

Topić E, Primorac D, Janković S. Medicinskobiokemijska dijagnostika u kliničkoj praksi. Zagreb, Medicinska naklada, 2004., str. 200

Van der Meer W, van Gelder W, de Keijzer R, Willems H. Does the band cell survive the 21st century?. Eur J Haematol, 2006, 76(3):251-4.

Yoon S, Kim HR. Analytical performance of the digital morphology analyzer Sysmex DI-60 for body fluid cell differential counts. PLoS One, 2023, 18(7).

9. SAŽETAK/SUMMARY

SAŽETAK

Izrada DKS-a uobičajeno se provodi primjenom triju metoda: automatiziranom metodom na hematološkim brojačima, svjetlosnom mikroskopijom i digitalnom morfološkom analizom stanica. Izrada DKS-a na hematološkim brojačima predstavlja prvi korak u analizi DKS-a periferne krvi. U slučaju prisutnosti patoloških stanica i stanica s morfološkim abnormalnostima, analizator daje upozorenje o patološkom nalazu što upućuje na potrebu izrade DKS-a svjetlosnom mikroskopijom i/ili digitalnom morfološkom analizom. Bez obzira na tehnološki napredak, izrada DKS-a svjetlosnom mikroskopijom i dalje predstavlja zlatni standard. Međutim, prednost primjene uređaja za digitalnu morfologiju je ušteda vremena uz visoku preciznost i točnost. Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati i usporediti preciznost izrade DKS-a metodom svjetlosne mikroskopije i digitalne morfološke analize (postupak preklasifikacije i klasifikacije) u razmazima periferne krvi sa i bez patologije, primjenom uređaja Sysmex DI-60. Ukupno je analizirano sedam razmaza periferne krvi: tri razmaza rutinskih uzoraka u kojima je ispitana preciznost svjetlosne mikroskopije i digitalne morfološke analize, te četiri razmaza iz programa vanjske procjene kvalitete u kojima je ispitana preciznost digitalne morfološke analize. Temeljem dobivenih rezultata potvrđena je hipoteza o većoj preciznosti digitalne morfološke analize u odnosu na metodu svjetlosne mikroskopije. Iznimka su bili patološki razmazi s akutnim leukemijama u kojima se metoda svjetlosne mikroskopije pokazala preciznijom u brojenju patoloških, nezrelih stanica periferne krvi. Nadalje, preciznost dobivena postupkom klasifikacije na uređaju Sysmex DI-60 nije uvijek bila veća u odnosu na postupak preklasifikacije zbog nejasno definiranih morfoloških kriterija i subjektivnosti u njihovoj procjeni. Također, u postupku preklasifikacije na uređaju Sysmex DI-60, uočen je veći udio neidentificiranih stanica u patološkim razmazima periferne krvi u odnosu na razmaze bez patologije, što potvrđuje nužnost primjene svjetlosne mikroskopije u takvim slučajevima. Najmanja preciznost uočena je za nesegmentirane granulocite za sve tri metode i za ponovljivost i za međupreciznost u razmazima sa i bez patologije.

SUMMARY

Preparation of a differential blood count (DBC) is commonly carried out using three methods: automated analysis on hematology analyzers, light microscopy, and digital morphological cell analysis. Performing a DBC on hematology analyzers is the first step in the analysis of peripheral blood DBC. In the presence of pathological cells and cells with morphological abnormalities, the analyser provides a warning indicating a pathological finding, suggesting the need for DBC analysis using light microscopy and/or digital morphological analysis. Despite technological advancements, DBC performed using light microscopy remains the gold standard. However, the advantage of using digital morphology analyzers lies in time savings, along with high precision and accuracy. The aim of this thesis was to examine and compare the precision of DBC performed by light microscopy and digital morphological analysis (reclassification and classification processes) on peripheral blood smears with and without pathology, using the Sysmex DI-60 analyzer. A total of seven peripheral blood smears were analyzed: three smears of routine samples in which the precision of light microscopy and digital morphological analysis was examined, and four smears from the external quality assessment program in which the precision of digital morphological analysis was assessed. Based on the obtained results, the hypothesis of greater precision of digital morphological analysis compared to the light microscopy method was confirmed. Exceptions were pathological smears with acute leukemias, in which light microscopy proved to be more precise in counting pathological, immature peripheral blood cells. Furthermore, the precision obtained by the classification process on the Sysmex DI-60 analyzer was not always higher compared to the reclassification process, due to poorly defined morphological criteria and subjectivity in their assessment. Additionally, in the reclassification process on the Sysmex DI-60 analyzer, a higher proportion of unidentified cells was observed in pathological peripheral blood smears compared to non-pathological smears, confirming the necessity of using light microscopy in such cases. The lowest precision was observed for non-segmented granulocytes across all three methods, for both repeatability and intermediate precision, in smears with and without pathology.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Ispitivanje preciznosti izrade diferencijalne krvne slike primjenom digitalne morfologije na uređaju Sysmex DI-60 (*Cellvision*) i svjetlosne mikroskopije

Elena Filipaj

SAŽETAK

Izrada DKS-a uobičajeno se provodi primjenom triju metoda: automatiziranom metodom na hematološkim brojačima, svjetlosnom mikroskopijom i digitalnom morfološkom analizom stanica. Izrada DKS-a na hematološkim brojačima predstavlja prvi korak u analizi DKS-a periferne krvi. U slučaju prisutnosti patoloških stanica i stanica s morfološkim abnormalnostima, analizator daje upozorenje o patološkom nalazu što upućuje na potrebu izrade DKS-a svjetlosnom mikroskopijom i/ili digitalnom morfološkom analizom. Bez obzira na tehnološki napredak, izrada DKS-a svjetlosnom mikroskopijom i dalje predstavlja zlatni standard. Međutim, prednost primjene uređaja za digitalnu morfologiju je ušteda vremena uz visoku preciznost i točnost. Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati i usporediti preciznost izrade DKS-a metodom svjetlosne mikroskopije i digitalne morfološke analize (postupak preklasifikacije i klasifikacije) u razmazima periferne krvi sa i bez patologije, primjenom uređaja Sysmex DI-60. Ukupno je analizirano sedam razmaza periferne krvi: tri razmaza rutinskih uzoraka u kojima je ispitana preciznost svjetlosne mikroskopije i digitalne morfološke analize, te četiri razmaza iz programa vanjske procjene kvalitete u kojima je ispitana preciznost digitalne morfološke analize. Temeljem dobivenih rezultata potvrđena je hipoteza o većoj preciznosti digitalne morfološke analize u odnosu na metodu svjetlosne mikroskopije. Iznimka su bili patološki razmazi s akutnim leukemijama u kojima se metoda svjetlosne mikroskopije pokazala preciznijom u brojenju patoloških, nezrelih stanica periferne krvi. Nadalje, preciznost dobivena postupkom klasifikacije na uređaju Sysmex DI-60 nije uvijek bila veća u odnosu na postupak preklasifikacije zbog nejasno definiranih morfoloških kriterija i subjektivnosti u njihovoj procjeni. Također, u postupku preklasifikacije na uređaju Sysmex DI-60, uočen je veći udio neidentificiranih stanica u patološkim razmazima periferne krvi u odnosu na razmaze bez patologije, što potvrđuje nužnost primjene svjetlosne mikroskopije u takvim slučajevima. Najmanja preciznost uočena je za nesegmentirane granulocite za sve tri metode i za ponovljivost i za međupreciznost u razmazima sa i bez patologije.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 62 stranica, 17 grafičkih prikaza, 16 tablica i 20 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Diferencijalna krvna slika, digitalna morfologija, Sysmex DI-60, svjetlosna mikroskopija, preciznost

Mentor: **Dr. sc. Désirée Coen Herak**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Marija Miloš, *docent Sveučilišta u Mostaru Farmaceutskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Désirée Coen Herak**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Marija Miloš, *docent Sveučilišta u Mostaru Farmaceutskog fakulteta.*
Dr. sc. Ana Kozmar, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan 2024.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medical Biochemistry
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Determination of the precision of differential blood count preparation using digital morphology on the Sysmex DI-60 (*Cellavision*) analyzer and light microscopy

Elena Filipaj

SUMMARY

Preparation of a differential blood count (DBC) is commonly carried out using three methods: automated analysis on hematology analyzers, light microscopy, and digital morphological cell analysis. Performing a DBC on hematology analyzers is the first step in the analysis of peripheral blood DBC. In the presence of pathological cells and cells with morphological abnormalities, the analyser provides a warning indicating a pathological finding, suggesting the need for DBC analysis using light microscopy and/or digital morphological analysis. Despite technological advancements, DBC performed using light microscopy remains the gold standard. However, the advantage of using digital morphology analyzers lies in time savings, along with high precision and accuracy. The aim of this thesis was to examine and compare the precision of DBC performed by light microscopy and digital morphological analysis (reclassification and classification processes) on peripheral blood smears with and without pathology, using the Sysmex DI-60 analyzer. A total of seven peripheral blood smears were analyzed: three smears of routine samples in which the precision of light microscopy and digital morphological analysis was examined, and four smears from the external quality assessment program in which the precision of digital morphological analysis was assessed. Based on the obtained results, the hypothesis of greater precision of digital morphological analysis compared to the light microscopy method was confirmed. Exceptions were pathological smears with acute leukemias, in which light microscopy proved to be more precise in counting pathological, immature peripheral blood cells. Furthermore, the precision obtained by the classification process on the Sysmex DI-60 analyzer was not always higher compared to the reclassification process, due to poorly defined morphological criteria and subjectivity in their assessment. Additionally, in the reclassification process on the Sysmex DI-60 analyzer, a higher proportion of unidentified cells was observed in pathological peripheral blood smears compared to non-pathological smears, confirming the necessity of using light microscopy in such cases. The lowest precision was observed for non-segmented granulocytes across all three methods, for both repeatability and intermediate precision, in smears with and without pathology.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 62 pages, 17 figures, 16 tables and 20 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Differential blood count, digital morphology, Sysmex DI-60, light microscopy, precision.

Mentor: **Désirée Coen Herak, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Marija Miloš, Ph.D. Assistant Professor, University of Mostar Faculty of Pharmacy

Reviewers: **Désirée Coen Herak, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Marija Miloš, Ph.D. Assistant Professor, University of Mostar Faculty of Pharmacy

Ana Kozmar, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2024.

