

Provjera granice kvantifikacije leukocita i trombocita na hematološkom brojaču Sysmex XN-1000

Šebečić, Domagoj

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:163:905256>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-28**



Repository / Repozitorij:

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



Domagoj Šebečić

**Provjera granice kvantifikacije leukocita i
trombocita na hematološkom brojaču
Sysmex XN-1000**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, godina. 2018.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Specijalna područja kliničke biokemije Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod stručnim vodstvom izv.prof.dr.sc. Dunje Rogić i suvoditeljstvom dr.sc. Ivane Rako.

Zahvaljujem se izv.prof.dr.sc. Dunji Rogić i dr.sc. Ivani Rako koje su mi omogućile izradu praktičnog dijela rada.

Također, zahvaljujem se roditeljima na cjeloživotnom ulaganju u moje obrazovanje, ženi Ani na beskrajnoj vjeri u mene i kćeri Mariji na prekrasnim osmjesima kojima me obasipala cijelo vrijeme pisanja rada.

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Leukociti	1
1.1.1 Uloga i diferencijacija leukocita	1
1.1.2 Subpopulacije leukocita	2
1.1.3 Leukopenija	3
1.1.3.1 Neutropenija	3
1.2. Trombociti	5
1.2.1. Uloga trombocita.....	5
1.2.2. Trombocitopenija	5
1.3. Validacijske metode	6
1.3.1 Validacija metode.....	6
1.3.2 Granica pozadine (engl. „limit of blank“ – LoB).....	6
1.3.3 Granica detekcije (engl. limit of detection – LoD)	7
1.3.4 Granica kvantifikacije (engl. limit of quantification – LoQ)	7
2. Obrazloženje teme	8
3. Materijali i metode	9
3.1. Hematološki brojač	9
3.1.1 Princip rada hematološkog brojača	10
3.1.1.1 Metoda promjene otpora – impedanca	10
3.1.1.2 Metoda rasapa svjetlosti – optička metoda	10
3.1.2 WDF kanal	11
3.1.3 Low white blood cell mode (L-WBC mode)	11
3.1.4. Brojanje trombocita.....	12
3.2. Reagensi	12
3.2.1. Lysercell WDF	12
3.2.2. Fluorocell WDF.....	13
3.2.3. Fluorocell PLT	13
3.3. Uzorci	13
3.3.1. Uzorci za određivanje granice kvantifikacije leukocita u L-WBC modu	13
3.3.2. Uzorci za određivanje granice kvantifikacije trombocita	14
4. Rezultati	15
4.1. Rezultati provjere granice pozadine (LoB) leukocita i trombocita.....	15
4.2. Rezultati provjere granice kvantifikacije leukocita (LoQ) u L-WBC modu.....	16
4.2.1. Grafički prikaz rezultata za leukocite.....	17
4.3. Rezultati provjere granice kvantifikacije (LoQ) trombocita	18
4.3.1. Grafički prikaz rezultata za trombocite	19
5. Rasprava	20
5.1. Laboratorijske granice kritičnih vrijednosti i rezultati	20
5.2. Podatci iz Sysmexovih studija o granicama pozadine, detekcije i kvantifikacije	20
6. Zaključci	22
7. Sažetak	23
Summary	24
8. Popis literature	25
9. Temeljna dokumentacijska kartica	27

Popis kratica

LoB – granica pozadine

LoD – granica detekcije

LoQ – granica kvantifikacije

Erc – eritrociti

Lkc – leukociti

Trc – trombociti

CV – koeficijent varijacije

SD – standardna devijacija

IL – interleukin

CSF – stimulirajući faktor rasta kolonija

GM – granulocitno – makrofagni

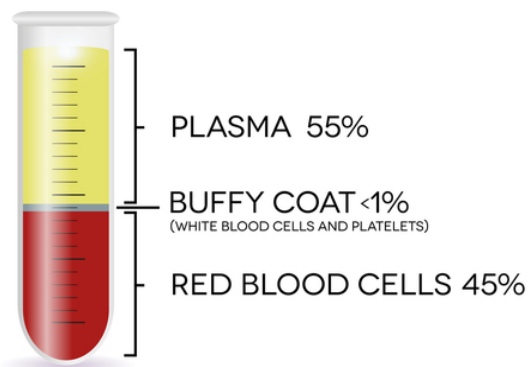
TGF β – tkivni faktor rasta beta

TNF α – faktor nekroze tumora alfa

1.Uvod

1.1. Leukociti

Leukociti (grč. *leukos* – bijel + *kytos* - stanica) su bijele krvne stanice, nazvane po izgledu u uzorku krvi nakon centrifugiranja. Naime, nalaze se u tzv. „buffy coatu“ – tankom, obično bijelom sloju leukocita i trombocita koje se nalaze između sedimentiranih eritrocita i krvne plazme u centrifugiranom uzorku pune krvi. (Slika 1.)



Slika 1: Prikaz centrifugiranog uzorka krvi izvađenog na antikoagulans

1.1.1 Uloga i diferencijacija leukocita

Leukociti su stanice imunskog sustava čija je uloga zaštita organizma od patogena i parazita. Svi leukociti su potekli od multipotentne stanice u koštanoj srži, odnosno hematopoetske matične stanice procesom maturacije i diferencijacije (Slika 1) Mogu se podijeliti s obzirom na strukturu na:

- 1) granulocite i
- 2) agranulocite,

ili s obzirom na sazrijevanje loza na:

- 1) mijeloidne i
- 2) limfoidne stanice.

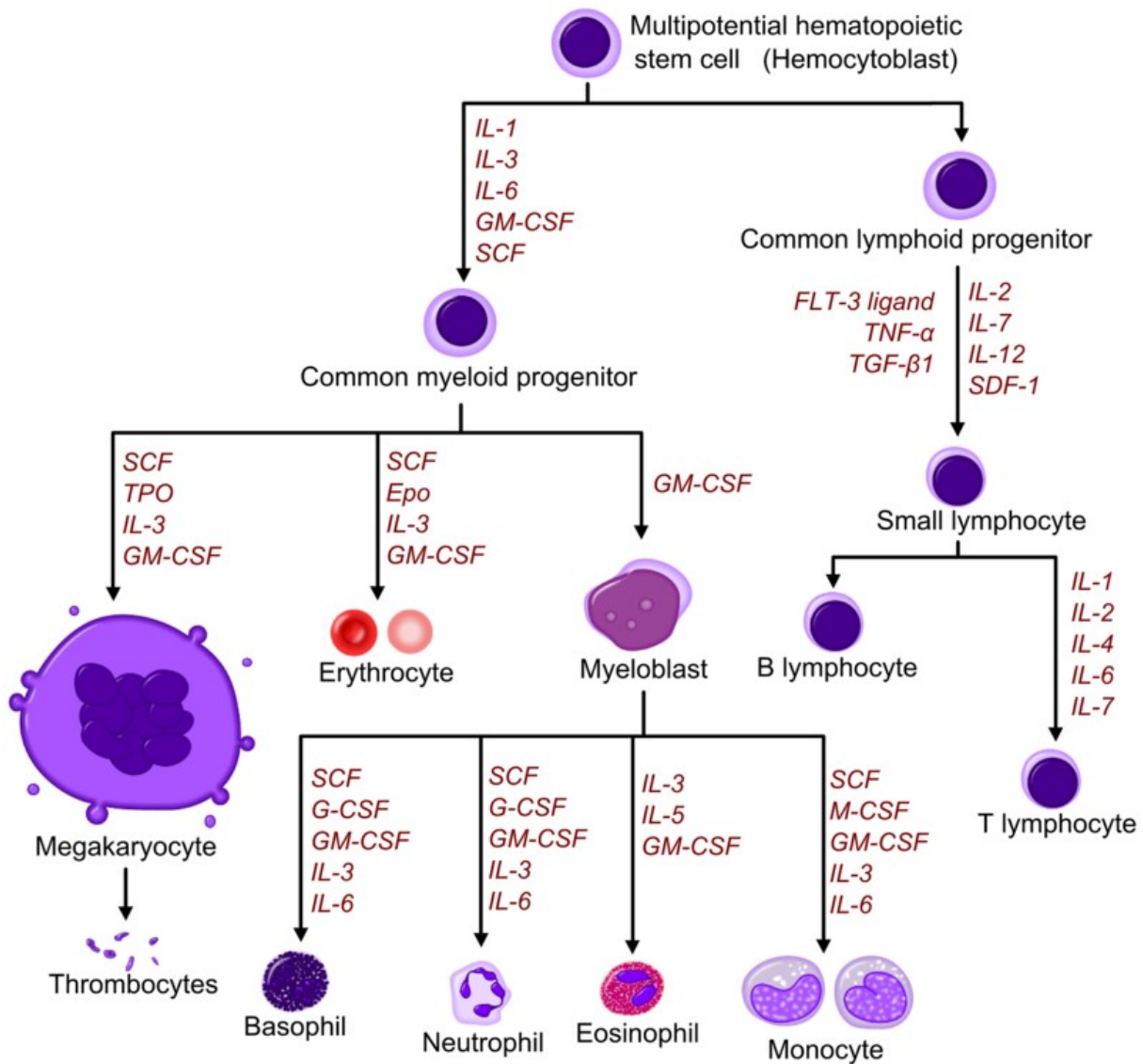
Daljnjom podjelom dolazimo do klasičnih pet vrsta zrelih leukocita:

- 1) neutrofilnih,
- 2) bazofilnih i
- 3) eozinofilnih polimorfonuklearnih granulocita,

te mononuklearnih agranulocita:

4) monocita i




5) limfocita.



Slika 2. Prikaz hematopoeze– diferencijacija krvnih stanica iz zajedničkog

1.1.2 Subpopulacije leukocita

Analizu pojedinih leukocita i izražavanje njihova međusobnog brojčanog odnosa u postocima predložuje leukogram ili diferencijalna krvna slika. (Kaushansky i sur., 2016)

Type	Appearance (micrograph)	Appearance (illustration)	Approx. % in adults See also: Blood values	Diameter (μm) ^[7]	Main targets ^[4]	Nucleus ^[4]	Granules ^[4]	Lifetime ^[7]
Neutrophil			62%	10–12	<ul style="list-style-type: none"> Bacteria Fungi 	Multilobed	Fine, faintly pink (H&E stain)	6 hours–few days (days in spleen and other tissue)
Eosinophil			2.3%	10–12	<ul style="list-style-type: none"> Larger parasites Modulate allergic inflammatory responses 	Bi-lobed	Full of pink-orange (H&E stain)	8–12 days (circulate for 4–5 hours)
Basophil			0.4%	12–15	<ul style="list-style-type: none"> Release histamine for inflammatory responses 	Bi-lobed or tri-lobed	Large blue	A few hours to a few days
Lymphocyte			30%	Small lymphocytes 7–8 Large lymphocytes 12–15	<ul style="list-style-type: none"> B cells: releases antibodies and assists activation of T cells T cells: <ul style="list-style-type: none"> CD4+ Th (T helper) cells: activate and regulate T and B cells CD8+ cytotoxic T cells: virus-infected and tumor cells. $\gamma\delta$ T cells: bridge between innate and adaptive immune responses; phagocytosis Regulatory (suppressor) T cells: Returns the functioning of the immune system to normal operation after infection; prevents autoimmunity Natural killer cells: virus-infected and tumor cells. 	Deeply staining, eccentric	NK-cells and cytotoxic (CD8+) T-cells	Years for memory cells, weeks for all else.
Monocyte			5.3%	15–30 ^[8]	Monocytes migrate from the bloodstream to other tissues and differentiate into tissue resident macrophages, Kupffer cells in the liver.	Kidney shaped	None	Hours to days

Tablica 1. Prikaz pet subpopulacija leukocita, njihovog brojčanog odnosa, veličine i funkcija

1.1.3 Leukopenija

Leukopenija je patofiziološko stanje koje se definira kvantitativno, kao broj leukocita $<3 \times 10^9 / \text{L}$. Obično je posljedica smanjenog broja neutrofila, te se tada govori o neutropeniji, dok je limfocitopenija manje učestala.

1.1.3.1 Neutropenija

Neutropenija se definira kao smanjen apsolutni broj granulocita ($<1,5 \times 10^9 / \text{L}$). Obično se na temelju izraženosti dijeli na:

- blagu ($1,0 - 1,5 \times 10^9 / \text{L}$),
- umjerenu ($0,5 - 1,0 \times 10^9 / \text{L}$)
- tešku neutropeniju ($<0,5 \times 10^9 / \text{L}$).

Agranulocitoza je određena teško granulocitopenijom, kad je broj granulocita u krvi $<0,2 \times 10^9 / \text{L}$, dok se povećani rizik za razvoj infekcije javlja već kad granulociti padnu ispod 1×10^9 .

Praktičnija je podjela neutropenija prema uzroku, koji ih dijeli na

1) stečene: uzrokovane infekcijama (HIV, HCV, HBV), lijekovima, kemoterapijom.

2) nasljedne neutropenije.

Pri izradi ovog rada najviše pacijenata koje smo obrađivali imali su neki oblik stečene leukopenije. Vrlo često to su bile leukopenije uzrokovane nekom vrstom kemoterapije, odnosno citostatika.

Lijekovima izazvana agranulocitoza je najteži oblik neutropenije, a lijekovi koji najčešće dovode do nje i teške neutropenije su antitiroidni lijekovi, metotreksat te imunosupresivi kao što su ciklosporin, takrolimus.

1.2. Trombociti

Trombociti (grč. *trombos* – ugrušak i *kytos* – stanica) su krvne pločice nastale u koštanoj srži fragmentacijom citoplazme zrelih megakariocita nastalih iz nezrelih hematopoeznih stanica (Slika 1.) Sam proces diferencijacije u megakariocite te njihovo sazrijevanje i stvaranje trombocita zove se megakariocitopoeza.

1.2.1. Uloga trombocita

Trombociti sudjeluju u sustavu zgrušavanja krvi, čiji su najvažniji čimbenik. Na površini trombocita nalaze se brojni glikoproteini koji imaju važnu ulogu u reakcijama adhezije i agregacije. To su početni događaji u stvaranju trombocitnog ugruška tijekom hemostaze. Naime, nakon oštećenja endotela bazalna membrana krvne žile i kolagen izlažu se cirkulaciji što dovodi do aktivacije trombocita. Adhezija za kolagen zbiva se vezanjem za von Willebrandov faktor i glikoprotein Ia na trombocitu. Kod vezanja trombocita i stijenke krvne žile uključeni su brojni adhezijski proteini, integrini. Adhezija trombocita izaziva niz metaboličkih reakcija, oslobađanje aktivnih trombocitnih tvari, promjenu oblika, kao i agregaciju trombocita. (Labar, 2007)

1.2.2. Trombocitopenija

Trombocitopenija može biti životno ugrožavajuće stanje, te je jedna od najčešćih slučajeva potrebe za hematološkim pregledom. Iako je normalan broj trombocita kod ljudi ($150 - 400 \times 10^9/L$) daleko viši od minimalne razine potrebne kako bi se izbjeglo patološko krvarenje ($<50 \times 10^9/L$) postoji velik broj medicinskih stanja koja ili pojačano razaraju trombocite ili smanjuju njihovu produkciju, na taj način povećavajući rizik krvarenja.

Uzroci trombocitopenije mogu biti sljedeći :

- 1) Splenomegalija – u povećanoj slezeni mogu biti zarobljeni brojni trombociti.
- 2) Smanjena proizvodnja trombocita izazvana: leukemijom, virusnim infekcijama HIVa i HBV, pojačanim unosom alkohola, te kemoterapeutskim lijekovima
- 3) Pojačan raspad trombocita izazvan: trudnoćom, bakteremijom (sepsom), diseminiranom intravaskularnom koagulopatijom, kao i lijekovima. (Labar, 2007)

1.3. Validacijske metode

1.3.1 Validacija metode

Cilj svakog medicinsko-biokemijskog laboratorija je kontinuirano praćenje i podizanje ukupna kvalitete usluga koje pruža svojim korisnicima, kao i pravovremeno izdavanje točnih, preciznih i vjerodostojnih nalaza na temelju kojih će biti postavljena ispravna dijagnoza. Jedan od načina podizanja kvalitete usluga je i uvođenje novih metoda i analitičkih sustava u rutinski rad. Kod takvog postupka, važno je ustanoviti je li uvođenje novog sustava potrebno, i prilikom odabira, obratiti pažnju na kliničku prihvatljivost, praktične zahtjeve (npr. „mrtvi“ volumen uzorka – minimalni volumen uzorka potreban za analizu) i cijenu sustava. Prije korištenja novih metoda i/ili analitičkih sustava u rutinskom radu, potrebno je odrediti kriterije prihvatljivosti za određene značajke metode i napraviti postupak evaluacije. Evaluacija je postupak koji nam služi za neovisnu, objektivnu procjenu ili utvrđivanje karakteristika same metode koju uvodimo u rutinski rad, te saznanje jesu li one primjenjive za kliničku svrhu za koju je metoda i namijenjena. Dobiveni eksperimentalni rezultati postupka evaluacije, statistički se obrađuju, te se procjenjuje pogreška metode. Pogreška metode se zatim uspoređuje sa unaprijed određenim kriterijima prihvatljivosti, i na temelju usporedbe, donosi se odluka o prikladnosti ili neprikladnosti uvođenja nove metode u rutinski rad.

1.3.2 Granica pozadine (engl. „limit of blank“ – LoB)

Granica pozadine definirana je kao najviša vrijednost koja se izmjeri u replikatima uzorka koji ne sadrži ispitivani analit. Iako su uzorci testirani kako bi se odredio LoB lišeni analita, „slijep“ uzorak može proizvesti analitički signal koji je istovjetan niskoj koncentraciji analita. (Armbruster, 2008) LoB se procjenjuje mjerenjem 20 replikata uzorka bez mjernog analita, tzv. slijepog uzorka i računanjem aritmetičke sredine i standardne devijacije, po formuli:

$$\text{LoB} = \text{mean}_{\text{blank}} + 1.645 * \text{SD}_{\text{blank}}$$

1.3.3 Granica detekcije (engl. limit of detection – LoD)

Granica detekcije definira se kao najniža koncentracija analita koja se može pouzdano razlučiti od granice pozadine, te na kojoj je detekcija ostvariva. Tradicionalan način procjene LoD sastoji se od mjerenja replikata praznog uzorka, određivanja njegove srednje vrijednosti i standardne devijacije. (Armbruster, 2008) Zatim se LoD izračunava najčešće po formuli:

$$\text{LoD} = \text{LoB} + 3\text{SD}_{\text{blank}}$$

No, također, može se odrediti i koristeći empirijski pristup, mjereći progresivno razrjeđenije koncentracije ciljnog analita.

1.3.4 Granica kvantifikacije (engl. limit of quantification – LoQ)

Granica kvantifikacije definirana je kao najniža koncentracija kod koje se analit može ne samo pouzdano detektirati, nego su kod nje zadovoljeni prethodno definirani uvjeti za nepreciznost i netočnost. Pojam funkcionalne osjetljivosti je određen kao koncentracija kod koje rezultati zadovoljavaju kriterij od CV=20% (ili neki drugi predodređeni koeficijent varijacije), međutim bez kriterija za netočnost. Granica kvantifikacije može biti istovjetna granici detekcije, no često je to viša, nekad i znatno viša koncentracija. Također, kao i LoD može se određivati statistički i empirijski.

Formula za statistički izračun granice kvantifikacije se najčešće uzima kao:

$$\text{LoQ} = \text{LoB} + 10\text{SD}_{\text{blank}}$$

Pri izradi ovog rada, odlučili smo se za empirijski pristup, koristeći kriterije prihvatljivosti od 10% za nepreciznost i netočnost.

2. Obrazloženje teme

Klinički bolnički centar Zagreb najveća je zdravstvena ustanova u Republici Hrvatskoj i jedina bolnica nulte kategorije. Hematološki brojač Sysmex XN-1000 je često korišten i pouzdan analitički uređaj u hematološkim laboratorijima diljem svijeta. Cilj istraživanja bio je provjeriti granice kvantifikacije (LoQ) leukocita u tzv. „low white blood cell“ načinu rada uređaja koji se sve češće koristi, posebno kod imunosuprimiranih pacijenata, koji čine značajan udio bolesnika, posebno Klinike za plućne bolesti Jordanovac. Laboratorijskom osoblju je izuzetno važno koju dobivenu vrijednost može s pouzdanjem izdati kao točnu i preciznu. Također smo provjerili i granicu kvantifikacije trombocita u uobičajenom načinu rada.

3. Materijali i metode

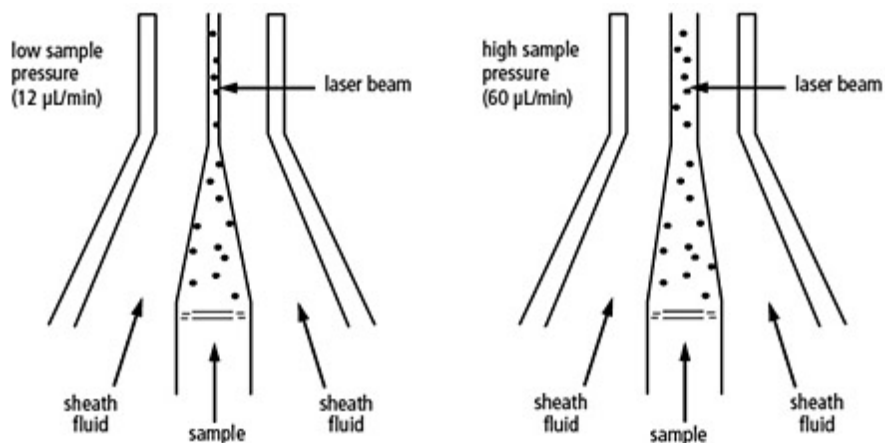
3.1. Hematološki brojač

Hematološki brojač je osnovni hematološki aparat koji se koristi za izradu kompletne krvne slike. (slika 3)



Slika 3: Hematološki brojač XN - 1000

Današnji hematološki brojači koriste metodu hidrodinamičkog fokusiranja kako bi osigurali protok uzorka krvi kroz aparat na način da je struja uzorka obavijena omotačem tekućine i stanice pojedinačno prolaze kroz otvor. Omotač tekućine maksimalno sprječava odlaganje proteina i recirkulaciju stanica koja izaziva pojavu lažnih impulsa. (Slika 4)



Slika 4: Shema hidrodinamičkog fokusiranja

3.1.1 Princip rada hematološkog brojača

Dva su osnovna načela mjerenja koja se primjenjuju u hematološkim analizatorima:

- 1) promjena otpora, ili impedanca
- 2) rasap svjetlosti ili optička metoda

3.1.1.1 Metoda promjene otpora – impedanca

Pedesetih godina prošlog stoljeća uveo ju je Wallace Coulter i to je sve do danas najčešće korištena metoda za brojanje stanica na hematološkom brojaču. Načelo brojenja zasniva se na otkrivanju i mjerenju promjena u električnom otporu koji proizvode stanice suspendirane u elektrolitskoj otopini. Kako stanice prolaze kroz otvor u cijevi, mijenja se električni otpor između dviju elektroda (ili impedanca u struji), što uzrokuje pojavu mjerljivih promjena u naponu. Broj nastalih promjena u proporcionalnom je odnosu s brojem stanica. Intenzitet promjene napona izravno je proporcionalan volumenu stanice, čime se omogućava razlikovanje i brojanje stanica određene veličine. Impulsi se skupljaju i razvrstavaju prema amplitudama, dobiveni se podatci prikazuju grafički: na apscisi je veličina stanice, a na ordinati njihov relativni broj. Tako dobiveni histogram odražava raspodjelu stanica prema volumenu i može se rabiti za evaluaciju jedne populacije stanica ili skupine u toj populaciji.

3.1.1.2 Metoda rasapa svjetlosti – optička metoda

Ova metoda može se rabiti kao jedina metoda brojenja stanica ili u kombinaciji s drugim metodama. Načelo rada takvog sustava (protočnog citometra) jest da se hidrodinamički fokusirana struja uzorka usmjeri kroz kvarcnu kivetu na izvor svjetla (volfram-živina žarulja ili helij-neonski laser). Karakteristike monokromatskog svjetla omogućuju brojenje i diferenciranje vrsta stanica. Rasap svjetlosti rabi se za proučavanje leukocita, eritrocita i trombocita. Kako stanice prolaze kroz područje detekcije i prekidaju zraku svjetlosti, ona se rasipa u svim smjerovima, a rasap svjetlosti rezultat je procesa apsorpcije, ogiba, refrakcije i refleksije. Detekcija i pretvaranje raspršenih zraka u električne signale izvodi se pomoću fotodetektora (fotodioda i fotomultiplikatora) postavljenih pod različitim kutovima.

Rasap svjetlosti pod 0° mjera je volumena stanice.

Rasap pod malim kutom, od $2-3^\circ$ također korelira s veličinom stanice, dok pod većim kutom, od $5-15^\circ$ korelira s unutarnjom složenošću stanice.

Rasap svjetlosti pod 90° rezultat je refrakcije i refleksije svjetla iz većih struktura unutar stanice i korelira sa stupnje unutarnje složenosti stanice.

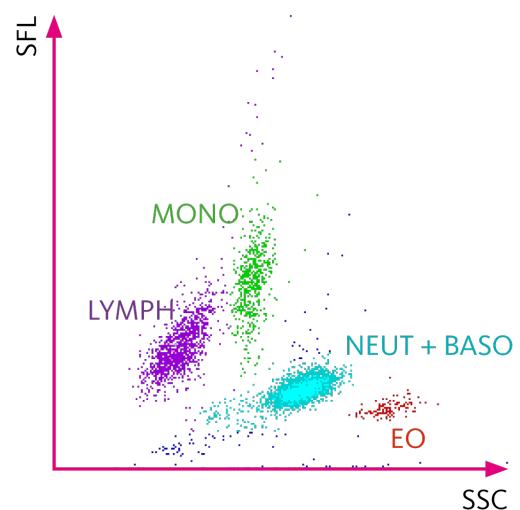
Upravo je metoda rasapa svjetlosti korištena u radu uređaja Sysmex XN-1000 na kojem je izveden praktični dio ovog rada.

3.1.2 WDF kanal

WDF (engl. „white cell differential“) kanal hematološkog brojača Sysmex XN-1000 koristi se za izradu diferencijalne krvne slike. Pomoću njega se diferenciraju i broje neutrofil, limfociti, monociti te eozinofili. Također, otkrivaju se i abnormalne stanice kao što su nezreli leukociti, te atipični limfociti.

Surfaktanti u Lysercell WDF (opisan u poglavlju 3.2. Reagensi) uzrokuju hemolizu i odvajanje eritrocita i trombocita, te penetriraju stanične membrane leukocita. Stupanj prodora, a samim tim i promjene u staničnoj morfologiji ovisi o različitim karakteristikama vrsta leukocita. (Tablica 2) Te razlike se ističu uporabom bočno raspršenog svjetla. Zatim fluorescentna boja u Fluorocell WDF ulazi u stanice i veže se na nukleinske kiseline i stanične organele. Intenzitet fluorescencije varira između različitih tipova leukocita, ovisno o broju nukleinskih kiselina i staničnih organela. (Slika 5)

			Side fluorescent light (SFL)	Side-scattered light (SSC)
Lymphocytes			Average	Weak
Monocytes			Average	Weak
Neutrophils			Weak	Average
Eosinophils			Weak	Strong
Aberrant lymphocytes			Average	Weak
Immature white blood cells			~Strong	~Average



Tablica 2: WDF kanal - specifičnosti obojenja i signala

Slika 5: Dijagram raspršenosti WDF kanala

3.1.3 Low white blood cell mode (L-WBC mode)

„Low white blood cell mode“, odnosno način rada s niskim brojem leukocita je poseban program koji nam uređaj Sysmex XN serije nude. Pritom se koristi WDF kanalom za

brojanje i diferencijaciju stanica, a njegova posebnost je u tome što svako mjerenje izvodi u triplikatu. Na taj način osigurava se povećana preciznost, dok je potreban volumen uzorka jednak kao za izvođenje redovnog testa, odnosno 88 μ L / uzorku. Potencijalan nedostatak je u tome što se testovi moraju izvoditi ručno, što usporava proces rada. Također, „mrtvi“ volumen, odnosno minimalan volumen potreban za adekvatnu aspiraciju uzorka i izvođenje preciznog testa je 160 μ L. Epruvete koje su prikladne za izvođenje testova u Low-WBC modu su: epruveta s K₃-EDTA antikoagulansom (ljubičasti čep), te male epruvete, tzv. „ependorfice“. (Sysmex, 2015) Potencijalan razlog sniženog rezultata leukocita je zbog prisutnosti nakupina leukocita. (Kaushansky i sur. 2016)

3.1.4. Brojanje trombocita

Trombociti se, kao i eritrociti uglavnom broje metodom impedance, iako uređaji XN serije imaju i mogućnost optičkog brojanja trombocita. Kako metoda impedance ima svoje nedostatke i ograničenja, mogući su slučajevi rezultata niskog broja trombocita zbog:

- 1) nakupina trombocita
- 2) pseudotrombocitopenije
- 3) velikih trombocita. (Kaushansky i sur., 2016)

3.2. Reagensi

Reagensi koji su korišteni za izradu diferencijalne krvne slike i brojanje leukocita u ovom radu su: Lysercell WDF i Fluorocell WDF. Za brojanje leukocita i diferencijaciju bazofila od nebazofilnih leukocita i eritroblasta još se koristi i WNR kanal s reagensom Fluorocell WNR. Za brojanje trombocita XN-1000 koristi se reagensom Fluorocell PLT. (Sysmex, 2015)

3.2.1. Lysercell WDF

Reagens Lysercell WDF je lizirajući agens za hematološke analizatore, namijenjen isključivo in vitro primjeni. Surfaktanti iz Lysercell WDF reagensa uzrokuju hemolizu i odvajanje eritrocita i trombocita, te penetriraju stanične membrane leukocita. Stupanj prodora, a samim tim i promjene u staničnoj morfologiji ovisi o različitim karakteristikama vrsta leukocita. Sam reagens namijenjen je kombiniranju s Fluorocell WDF bojom.

3.2.2. Fluorocell WDF

Reagens Fluorocell WDF je boja za hematološke analizatore, namijenjena isključivo in vitro uporabi. Nakon perforacije stanice leukocita od strane Lysercell WDF reagensa, polimetinska boja iz Fluorocell WDF ulazi u stanice i veže se na nukleinske kiseline i bioreaktivne proteine u citoplazmatskim organelima.

3.2.3. Fluorocell PLT

Reagens Fluorocell PLT koristi se za bojanje trombocita u hematološkim analizatorima. Namijenjen je isključivo za in vitro dijagnostičku uporabu. (Sysmex, 2015) Princip bojanja je sličan Fluorocell WDF, a boja koju koristi je bazirana na oksadinu. (Briggs i sur. 2012)

3.3. Uzorci

Za potrebu izvođenja provjere granice kvantifikacije leukocita i trombocita, korišteno je 25 uzoraka. Svi uzorci krvi izvađeni su u epruvete s K_3 -EDTA antikoagulansom (epruvete s ljubičastim čepom) proizvođača Greiner Bio-One. Stabilnost uzorka na sobnoj temperaturi je do 4h, a na 4°C do 24h.

3.3.1. Uzorci za određivanje granice kvantifikacije leukocita u L-WBC modu

Za određivanje granice kvantifikacije leukocita koristili smo nativne uzorke s iznimno niskim brojem leukocita ($<0,2 \times 10^9/L$), te uzorke s višim brojem leukocita ($>1 \times 10^9/L$) razrijeđene plazmom kako bi razrijeđeni uzorak bio što vjerniji matriksu nativnog uzorka. Plazmu smo dobili centrifugiranjem „pool“-a uzoraka na 4000okretaja/min x 15min, te zatim objedinili plazme iz praktičnog razloga, naime često je bio potreban velik volumen plazme kao diluensa kako bi se postigla konačna koncentracija. Odlučili smo se za empirijski pristup u određivanju

granice kvantifikacije, s obzirom da iz statističkog pristupa ne bismo mogli dobiti pouzdane podatke u našem slučaju. Naime, formula za izračun granice kvantifikacije ovisi o eksperimentalno dobivenim podacima o granici pozadine (LoB) i njejoj standardnoj devijaciji. Međutim, kako je u našem slučaju i LoB i SD_{LoB} bio jednak nuli, bili smo primorani odabrati eksperimentalni pristup. On se sastoji od mjerenja sve nižih koncentracija analita, dok su zadovoljeni prethodno postavljeni kriteriji, mi smo se odlučili za kriterij prihvatljivosti od 10% za CV i bias (preciznost i netočnost). Tako smo odradili deseterostruka mjerenja u za koncentracije od (1.0, 0.8, 0.5, 0.2, 0.1, 0.09, 0.07, 0.05, 0.03 i 0.02) $\times 10^9/L$.

3.3.2. Uzorci za određivanje granice kvantifikacije trombocita

Kod razrjeđivanja uzoraka za mjerenja trombocita korištena je plazma dobivena dvostrukim centrifugiranjem više uzoraka na 4000 okretaja/min \times 15min, kako bi bili sigurni da nema prisutnih trombocita u plazmi nakon centrifugiranja. Također smo objedinili plazme iz istog praktičnog razloga; velikog potrebnog volumena plazme kao diluenta za postizanje željene koncentracije trombocita.

Uz iste kriterije prihvatljivosti od 10% za CV i bias (preciznost i netočnost) empirijski smo odlučili odrediti i granicu kvantifikacije trombocita, u nizu od (60, 10, 5, 3) $\times 10^9/L$, iz jednakog razloga, LoB i SD_{LoB} trombocita je također bio jednak nuli.

4. Rezultati

4.1. Rezultati provjere granice pozadine (LoB) leukocita i trombocita

Kao početak provjere granice kvantifikacije leukocita i trombocita bilo je potrebno utvrditi granicu pozadine (LoB), kako bi znali postoje li i kolike su moguće interferencije matriksa. Svaka provjera granice kvantifikacije; zasebno leukocita i trombocita rađena je u 10-eroplkatu, iz odijeljene plazme dobivene centrifugiranjem nekoliko uzoraka. Rezultati su prikazani u tablici (Tablica 3).

LoB	Leukociti	Trombociti
1.	0,00	0,00
2.	0,00	0,00
3.	0,00	0,00
4.	0,00	0,00
5.	0,00	0,00
6.	0,00	0,00
7.	0,00	0,00
8.	0,00	0,00
9.	0,00	0,00
10.	0,00	0,00
\bar{X}_{sr}	0,00	0,00
SD	0,00	0,00

Tablica 3: Rezultati dobiveni provjerom granice pozadine (LoB) leukocita i trombocita

Iz dobivenih rezultata jasno je vidljivo kako u tako odijeljenoj plazmi nije bilo nikakvih ostatnih stanica. Na taj način ujedno smo dobili i potvrdu kako je sam proces centrifugiranja krvi i odvajanja plazme bio dobro izveden. Eksperimentalno dobivene granice pozadine za trombocite i leukocite su sljedeće:

$$\mathbf{LoB_{Lkc} = 0,0 \times 10^9 \text{ Lkc/L}}$$

$$\mathbf{LoB_{Trc} = 0,0 \times 10^9 \text{ Trc/L .}}$$

4.2. Rezultati provjere granice kvantifikacije leukocita (LoQ) u L-WBC modu

Zatim je uslijedio postupak kojim smo eksperimentalno željeli odrediti granicu kvantifikacije leukocita koristeći Low-white blood cell način rada. Testovi su također izvođeni u 10-eroplikatu, a rezultati su prikazani u tablici. (Tablica 4)

Zeleno su označene ciljne vrijednosti koncentracija leukocita ($\times 10^9/L$), kao i broj ponavljanja.

Žuto su označene izmjerene vrijednosti leukocita za koje smo primijetili da odskaku, naime, kod nižih koncentracija redovito bi 9. ili 10. mjerenje bilo znatno viša vrijednost. Stoga smo odlučili u računu zanemariti jednu takvu vrijednost od 10, ako bi se pojavila, pa je čitav račun u tim slučajevima izrađen na 9 mjerenja.

Plavo su označene izračunate vrijednosti, kao što su srednja vrijednost (X_{sr}), standardna devijacija (SD), te koeficijent varijacije / preciznost (CV) i bias / netočnost u postocima.

Crveno su označene izračunate vrijednosti koeficijenta varijacije (CV) i biasa (netočnosti) koje su više od prethodno definiranih kriterija prihvatljivosti od 10%.

Ciljna vrijednost	0,02	0,03	0,05	0,07	0,09	0,10	0,20	0,50	0,80	1,00
1.	0,02	0,03	0,07	0,07	0,09	0,10	0,21	0,47	0,80	0,99
2.	0,02	0,02	0,07	0,08	0,10	0,10	0,19	0,48	0,82	1,00
3.	0,03	0,02	0,06	0,08	0,09	0,10	0,18	0,50	0,80	1,00
4.	0,04	0,02	0,05	0,08	0,10	0,11	0,20	0,50	0,81	1,02
5.	0,04	0,03	0,07	0,08	0,10	0,09	0,21	0,48	0,81	1,00
6.	0,04	0,02	0,06	0,09	0,10	0,10	0,21	0,49	0,82	1,01
7.	0,03	0,04	0,06	0,08	0,11	0,11	0,22	0,49	0,84	1,02
8.	0,03	0,03	0,06	0,09	0,09	0,10	0,21	0,48	0,87	1,05
9.	0,04	0,04	0,08	0,10	0,11	0,11	0,23	0,49	0,85	1,04
10.	0,05	0,03	0,07	0,11	0,11	0,12	0,21	0,49	0,83	1,05
X_{sr}	0,032	0,028	0,065	0,083	0,100	0,104	0,207	0,487	0,825	1,018
SD	0,0083	0,0079	0,0071	0,0087	0,0082	0,0084	0,0142	0,0100	0,0240	0,0201
CV %	25,86	28,17	10,88	10,39	8,16	8,11	6,85	2,05	2,91	1,97
Bias %	37,93	7,14	23,08	16,00	10,00	3,85	3,38	2,67	3,03	1,77

Tablica 4: prikaz rezultata eksperimentalnog određivanja granice kvantifikacije leukocita u L-WBC modu

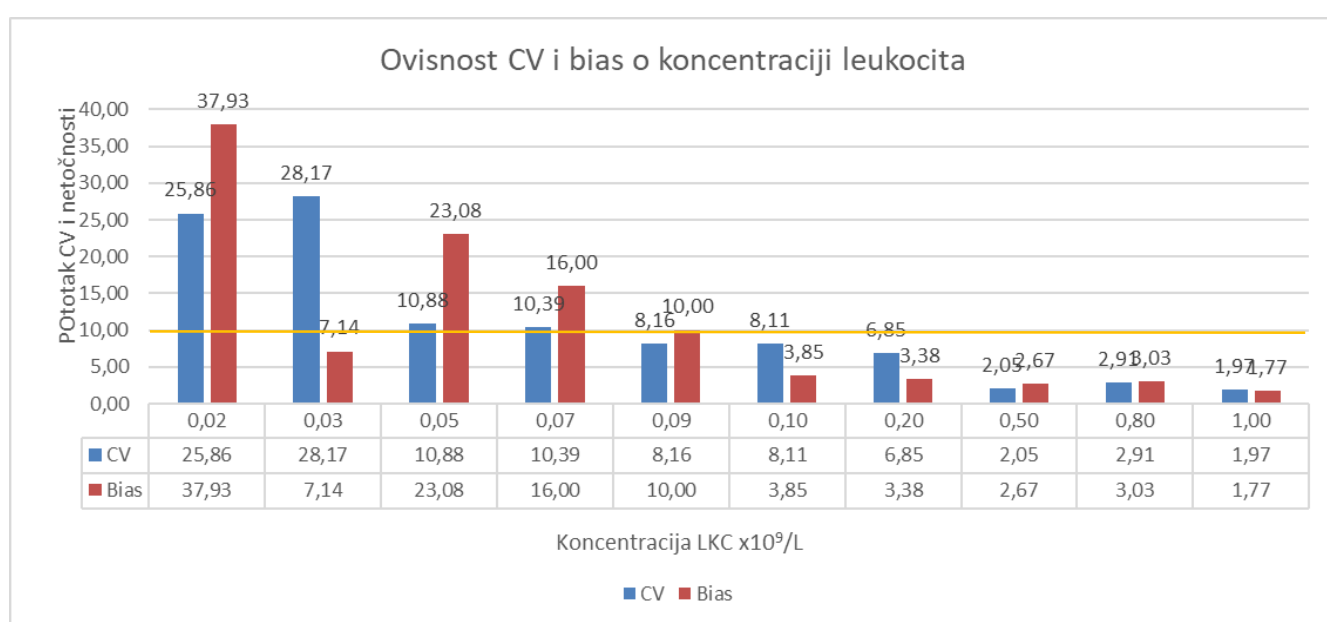
4.2.1. Grafički prikaz rezultata za leukocite

Pregledniji prikaz rezultata dobivenih računski prikazan je u grafu. (Graf 1.)

Plavim stupcima prikazani su izračunati podatci koeficijenta varijacije (preciznosti).

Crvenim stupcima prikazani su izračunati podatci biasa (netočnosti).

Žuta linija predstavlja unaprijed dogovoreni kriterij prihvatljivosti od 10% za preciznost i netočnost. Stoga su sve koncentracije leukocita s vrijednosti za CV i bias većom ili jednakom od 10% odbačene kao moguća granica kvantifikacije.



Graf 1: grafički prikaz ovisnosti CV i bias o koncentraciji leukocita

Iz prikazanih podataka jasno je vidljivo kako je eksperimentalnim načinom dobivena granica kvantifikacije leukocita u L-WBC načinu rada od

$$\text{LoQ}_{\text{Lkc}} = 0,10 \times 10^9 \text{ Lkc/L} .$$

4.3. Rezultati provjere granice kvantifikacije (LoQ) trombocita

Potom je slijedio postupak kojim smo eksperimentalno odredili granicu kvantifikacije trombocita, isprva mjereći koncentracije iz nativnog uzorka (59×10^9 Trc/L) te niza razrjeđenja. Rezultati izvedenih mjerenja nalaze se u tablici. (Tablica 5)

Zelena su označene ciljne vrijednosti koncentracija trombocita ($\times 10^9/L$), kao i broj ponavljanja.

Plava su označene izračunate vrijednosti, kao što su srednja vrijednost (X_{sr}), standardna devijacija (SD), te koeficijent varijacije / preciznost (CV) i bias / netočnost u postocima

Crvena su označene izračunate vrijednosti koeficijenta varijacije (CV) i biasa (netočnosti) koje su više od prethodno definiranih kriterija prihvatljivosti od 10%.

Ciljna vrijednost	59,00	10,00	5,00	3,00
1.	58	9	5	3
2.	58	9	7	4
3.	60	10	5	3
4.	56	10	6	3
5.	59	10	6	3
6.	61	11	6	4
7.	59	10	6	4
8.	63	10	5	3
9.	58	10	5	3
10.	59	11	5	3
X_{sr}	59,100	10,000	5,444	3,300
SD	1,9120	0,6667	0,5270	0,4830
CV %	3,24	6,67	9,68	14,64
Bias %	0,17	0,00	8,16	9,09

Tablica 5: prikaz rezultata provjere granice kvantifikacije trombocita

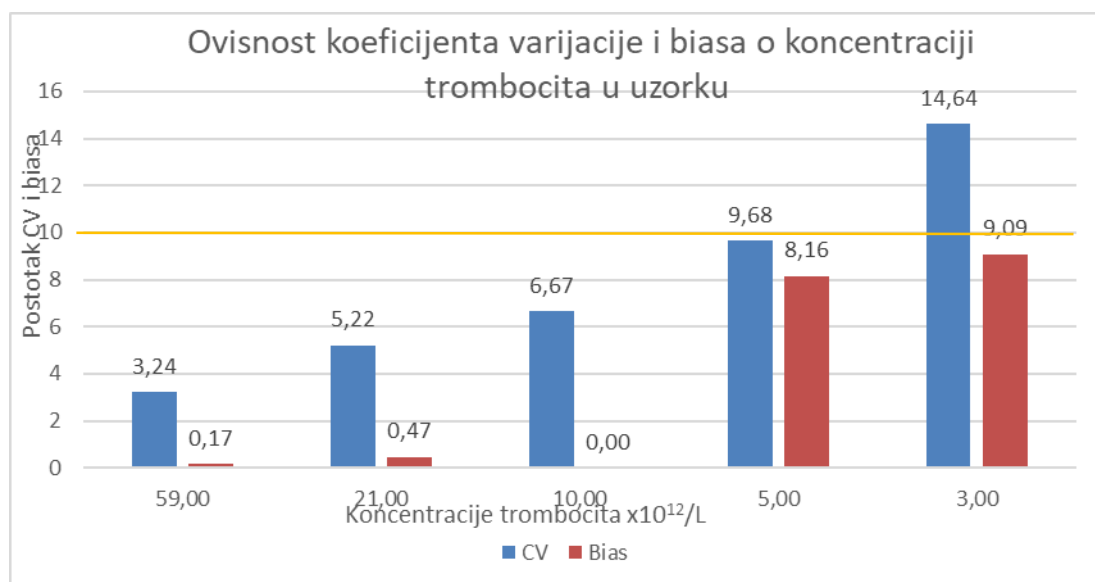
4.3.1. Grafički prikaz rezultata za trombocite

Pregledniji prikaz računski dobivenih podataka iz Tablice 5 prikazan je u grafu (Graf 2)

Plavim stupcima prikazani su izračunati podatci koeficijenta varijacije (preciznosti).

Crvenim stupcima prikazani su izračunati podatci biasa (netočnosti).

Žuta linija predstavlja unaprijed dogovoreni kriterij prihvatljivosti od 10% za preciznost i netočnost. Stoga su sve koncentracije leukocita s vrijednosti za CV i bias većom ili jednakom od 10% odbačene kao moguća granica kvantifikacije.



Graf 2: grafički prikaz ovisnosti CV i bias o koncentraciji trombocita

Iz prikazanih podataka jasno je vidljivo kako je eksperimentalnim načinom dobivena granica kvantifikacije trombocita od:

$$\text{LoQ}_{\text{Trc}} = 5 \times 10^9 \text{ Trc/L} .$$

5. Rasprava

5.1. Laboratorijske granice kritičnih vrijednosti i rezultati

Kritična vrijednost je ona vrijednost ispod ili iznad koje je medicinski biokemičar dužan hitno (obično telefonski) dobiveni rezultat analize dojaviti kliničaru.

Donja granica kritične vrijednosti za leukocite je $< 2 \times 10^9$ Lkc/L.

Za trombocite donja granica kritične vrijednosti je $< 20 \times 10^9$ Trc/L.

Dobivene granice kvantifikacije za leukocite i trombocite su značajno niže od pripadajućih kritičnih vrijednosti. Stoga ne postoji opasnost da bi loša osjetljivost testova mogla uzrokovati prelazak granica kritičnih vrijednosti za ove parametre.

5.2. Podatci iz Sysmexovih studija o granicama pozadine, detekcije i kvantifikacije

Analizirajući nove Sysmexove studije o izvedbenim karakteristikama XN serije uređaja došli smo do sljedećih podataka za leukocite u Low-WBC načinu rada.

1) Granica pozadine (LoB_{Lkc}) je $0,00 \times 10^9$ Lkc/L

2) Granica detekcije (LoD_{Lkc}) je $0,02 \times 10^9$ Lkc/L

3) Granica kvantifikacije (LoQ_{Lkc}) je $0,03 \times 10^9$ Lkc/L. (Sysmex, 2017.)

4) Pozadinska granica za kontrole (engl. „background limit“) je $0,10 \times 10^9$ Lkc/L. (Sysmex, 2015)

5) Preciznost od 3% garantirana je za uzorke koncentracije Lkc $> 4,0 \times 10^9$ Lkc/L.

Zanimljiva je nepodudarnost samih podataka iz dva dokumenta dobivenih od Sysmexa: Dokument uputstva za uporabu iz 2017. godine ukazuje na pozadinsku granicu za kontrole od $0,10 \times 10^9$ Lkc/L. Ta vrijednost indicira da ako slijepa (engl. „blank“) proba bude izmjerena s više ili jednako $0,10 \times 10^9$ Lkc/L potrebno je ponoviti kontrolu ili isprati uređaj.

Međutim, ono što upada u oči je činjenica da je deklarirana vrijednost granice kvantifikacije leukocita iz dokumenta: Regionalna dopuna uputstva za uporabu jednaka $0,03 \times 10^9$ Lkc/L.

Dakle, prihvatljiv rezultat za slijepu probu je 3 puta viši od deklarirane granice kvantifikacije.

Uspoređeni podatci za trombocite su sljedeći:

- 1) Granica pozadine (LoB_{Trc}) je 0×10^9 Trc/L.
- 2) Granica detekcije (LoD_{Trc}) je 1×10^9 Trc/L.
- 3) Granica kvantifikacije (LoQ_{Trc}) je 2×10^9 Trc/L. (Sysmex, 2017.)
- 4) Pozadinska granica za kontrole (engl. „background limit“) je 10×10^9 Trc/L. (Sysmex, 2017.)
- 5) Preciznost od 4% deklarirana je za uzorke s brojem Trc $>100 \times 10^9$ Trc/L.

Također je vidljiva značajna razlika između deklarirane granice kvantifikacije trombocita i pozadinske granice za kontrolu. Naime, u ovom slučaju ona je 5 puta viša od granice kvantifikacije trombocita, što je zbilja zapanjujuć podatak. To ukazuje na nekonzistentnost pri pisanju uputa za korisnike, kao i na potrebu da medicinski biokemičari validiraju svaki uređaj i reagens prije uvođenja u rutinski rad.

6. Zaključci

Kako bismo mogli usporediti podatke naših rezultata s prikupljenim podacima od Sysmexovih studija potrebno je istaknuti razlike u izvedbi samih studija.

Naime, Sysmex deklarira da je za određivanje granica pozadine (LoB) koristio reagens za razrjeđivanje, Cellpack DCL, za razliku od našeg testa s plazmom kao uzorkom.

Također, za određivanje LoD i LoQ Sysmex deklarira da su testovi izvedeni na serijskim razrjeđenjima s reagensom za razrjeđivanje, Cellpack DCL dok smo mi koristili plazmu kao diluens, kako bismo što bolje oponašali moguće interferencije matriksa.

Uspoređujući rezultate mjerenja izvedenih za izradu ovog rada i podataka dobivenih od proizvođača, uočavam da su rezultati za LoB trombocita i leukocita jednaki, te iznose 0×10^9 /L što upućuje na dobro izvedene testove.

S druge strane, vidljive su razlike u rezultatima za granice kvantifikacije leukocita i trombocita. Međutim, Sysmex nije priložio podatke o kriterijima prihvatljivosti za nepreciznost i netočnost, koje smo mi postavili na 10%.

Rezultati našeg ispitivanja su vrlo korisni u svakodnevnoj praksi, posebice u specijalističkim laboratorijima ustanova kojima gravitira velik broj onkoloških bolesnika.

7. Sažetak

Hematološki brojač Sysmex XN-1000 je često korišten i pouzdan analitički uređaj u hematološkim laboratorijima. Cilj istraživanja bio je provjeriti granice kvantifikacije (LoQ) leukocita u tzv. „low white blood cell“ načinu rada uređaja koji se sve češće koristi, posebno kod imunosuprimiranih pacijenata, te je laboratorijskom osoblju važno koju dobivenu vrijednost može s pouzdanjem izdati kao točnu i preciznu. Također smo provjerili i granicu kvantifikacije trombocita u uobičajenom načinu rada. Za određivanje granice kvantifikacije leukocita koristili smo nativne uzorke s iznimno niskim brojem leukocita ($<0,2 \times 10^9/L$), te uzorke s višim brojem leukocita ($>1 \times 10^9/L$) razrijeđene plazmom kako bi razrijeđeni uzorak bio što vjerniji matriksu nativnog uzorka. „Low-WBC“ način rada koristi tzv. WDF kanal, te svako mjerenje izvodi u triplikatu čime se povećava preciznost postupka. Kod razrjeđivanja uzoraka za mjerenja trombocita korištena je plazma dobivena dvostrukim centrifugiranjem na 4000 okretaja/min. Isprva smo odredili razinu signala pozadine (limit of blank), te se uvjerali da ona iznosi $0,00 \times 10^9/L$. Granicu kvantifikacije leukocita dobili smo eksperimentalno, sustavnim mjerenjem replikata sve nižim koncentracijama leukocita (1.0, 0.8, 0.5, 0.2, 0.1, 0.09, 0.07, 0.05, 0.03, 0.02) $\times 10^9/L$. Zatim smo uz prethodno dogovoren kriterij za maksimalno prihvatljivu netočnost i nepreciznost od 10% utvrdili kako je granica kvantifikacije $0,1 \times 10^9/L$. Uz iste uvjete odredili smo i granicu kvantifikacije trombocita, u nizu od (60, 10, 5, 3) $\times 10^9/L$, te dobili granicu od $5 \times 10^9/L$. Usporedbom dobivenih rezultata iz naših mjerenja i podataka dobivenih iz priručnika za hematološki brojač XN-1000, utvrdili smo kako su rezultati za LoB podudarni s deklaracijom proizvođača za leukocite i trombocite. Dobiveni rezultat za LoQ leukocita i trombocita bio je viši od deklariranog od strane proizvođača. Možemo reći kako smo očekivali takav ishod zbog vrlo optimističnih podataka dobivenih od Sysmexa. Rezultati našeg ispitivanja su vrlo korisni u svakodnevnoj praksi, posebice u specijalističkim laboratorijima ustanova kojima gravitira velik broj onkoloških bolesnika.

Summary

Sysmex XN-1000 hematology analyzer is widely used and reliable analyzer in hematology laboratories. Goal of this research was to check the limit of quantification (LoQ) for leukocytes using „low white blood cell“ mode which is being used ever more frequently, especially for samples of immunosuppressed patients. Therefore, it is very important that laboratory personnel knows which given value can be validated as accurate and precise. Also, as part of our research, we have checked the limit of quantification of platelets in whole blood mode.

To determine limit of quantification of leukocytes we used native samples with an extremely low leukocyte count ($<0,2 \times 10^9/L$), as well as samples with higher white blood cell count ($>1 \times 10^9/L$) diluted with plasma, so it would be as close to matrix of a native sample. „Low-WBC“ mode uses so called WDF channel. It performs every measurement in triplicate which increases procedure accuracy. Dilution of samples for measurements of platelet count was made using plasma obtained by double centrifugation at 4000 rpm. Firstly, we have measured the limit of blank (LoB), which turned out to be $0.00 \times 10^9/L$. Leukocyte limit of quantification was determined experimentally, by continuous measurements of ever lower leukocyte concentrations (1.0, 0.8, 0.5, 0.2, 0.1, 0.09, 0.07, 0.05, 0.03, 0.02) $\times 10^9/L$. Furthermore, using the previously agreed criteria for highest acceptable imprecision and inaccuracy (bias and CV) of 10% we determined the leukocyte LoQ at $0.1 \times 10^9/L$. Using the same criteria the platelet LoQ was determined at $5 \times 10^9/L$ after testing series of samples of (60, 10, 5, 3) $\times 10^9/L$. Comparing our test results and data provided by Sysmex XN-1000 manual, we have concluded that the LoB results match the data provided by the producer. Results for platelet and leukocyte LoQ were higher than the one claimed by the manufacturer. To be honest, we have expected these relations of results because of too optimistic declared values for LoQ provided by Sysmex. To conclude, these findings are very useful in day-to-day practise, especially for the specialized laboratories within medical institutions that take care of a large number of oncological patients.

8. Popis literature

Armbruster DA, Pry T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *Clin Biochem Rev.* 2008; 29:49–52

Armbruster DA, Tillman MD, Hubbs LM. Limit of detection (LOD)/limit of quantitation (LOQ): comparison of the empirical and the statistical methods exemplified with GC-MS assays of abused drugs. *Clin Chem.* 1994;40:1233–38.

Briggs C, Longair I, Kumar P, Singh D, Machin SJ, Performance evaluation of the Sysmex haematology XN modular system, *J Clin Pathol* 2012;65:1024–1030

CLSI Guidelines. User Verification of Performance for Precision and Trueness: Approved Guideline, CLSI Document EP15-A2, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005.

Golden JP, Justin GA, Nasir M, Ligler FS, Hydrodynamic focusing – a versatile tool, *Anal Bioanal Chem.* 2012; 402(1): 325–335

Jensen GL, Blanchard PGunn GB1, Garden AS, David Fuller C, Sturgis EM, Gillison ML, Phan J, Morrison WH, Rosenthal DI, Frank SJ, Prognostic impact of leukocyte counts before and during radiotherapy for oropharyngeal cancer, *Clin Transl Radiat Oncol.* 2017;7:28-35

Kaushansky K, Lichtman AM, Prchal JT, Levi MM, Press OW, Burns LJ, Caligiuri, MA, Williams Hematology – ninth edition, New York, McGraw Hill Medical 2016. 11-27, 991-1004.

Labar B, Hauptmann E, i sur., Hematologija, Zagreb, Školska knjiga, 2007. str. 39-47, 60-64.

Saračević A. Validacija i verifikacija metoda. U: Upravljanje kvalitetom laboratorijskog rada. Šimundić AM, Zagreb, Medicinska naklada, 2013, str. 7-20.

Sysmex, Regional IFU Amendment (RIAm) for Instructions For Use (IFU) of Sysmex XN series: additional performance characteristics, Kobe, Japan, 2017. 1-7, 10-18

Sysmex, XN series, Upustva za uporabu (XN-1000), Kobe, Japan, 2015. 45-61, 143-153, 393-405

9. Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Provjera granice kvantifikacije leukocita i trombocita na hematološkom brojaču Sysmex XN-1000

Domagoj Šebečić

SAŽETAK

Tekst sažetka:

Hematološki brojač Sysmex XN-1000 je često korišten i pouzdan analitički uređaj u hematološkim laboratorijima. Cilj istraživanja bio je provjeriti granice kvantifikacije (LoQ) leukocita u tzv. „low white blood cell“ načinu rada uređaja koji se sve češće koristi, posebno kod imunosuprimiranih pacijenata, te je laboratorijskom osoblju važno koju dobivenu vrijednost može s pouzdanjem izdati kao točnu i preciznu. Također smo provjerili i granicu kvantifikacije trombocita u uobičajenom načinu rada. Za određivanje granice kvantifikacije leukocita koristili smo native uzorke s iznimno niskim brojem leukocita ($<0,2 \times 10^9/L$), te uzorke s višim brojem leukocita ($>1 \times 10^9/L$) razrijeđene plazmom kako bi razrijeđeni uzorak bio što vjerniji matriksu native uzorka. „Low-WBC“ način rada koristi tzv. WDF kanal, te svako mjerenje izvodi u triplikatu čime se povećava preciznost postupka. Kod razrijeđivanja uzoraka za mjerenja trombocita korištena je plazma dobivena dvostrukim centrifugiranjem na 4000 okretaja/min. Isprva smo odredili razinu signala pozadine (limit of blank), te se uvjerali da ona iznosi $0,00 \times 10^9/L$. Granicu kvantifikacije leukocita dobili smo eksperimentalno, sustavnim mjerenjem sve nižih koncentracija leukocita (1.0, 0.8, 0.5, 0.2, 0.1, 0.09, 0.07, 0.05, 0.03) $\times 10^9/L$. Zatim smo uz prethodno dogovoren kriterij za maksimalno prihvatljivu netočnost i preciznost od 10% utvrdili kako je granica kvantifikacije $0,1 \times 10^9/L$. Uz iste uvjete odredili smo i granicu kvantifikacije trombocita, u nizu od (60, 10, 5, 3) $\times 10^9/L$, te dobili granicu od $5 \times 10^9/L$. Usporedbom dobivenih rezultata iz naših mjerenja i podataka dobivenih iz priručnika za hematološki brojač XN-1000, utvrdili smo kako su rezultati za leukocite podudarni s deklaracijom proizvođača. Dobiveni rezultat za trombocite bio je bolji od deklariranog od strane proizvođača ($10 \times 10^9/L$) pri našim uvjetima prihvaćanja netočnosti i preciznosti. To je vrlo korisno u svakodnevnoj praksi, posebice u specijalističkim laboratorijima ustanova kojima gravitira velik broj onkoloških bolesnika.

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

Rad sadrži: 27 stranica, 7 grafičkih prikaza, 5 tablica i 11 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Leukociti, trombociti, hematološki brojač, Sysmex XN-1000, granica kvantifikacije

Mentor: **Dr. sc. Dunja Rogić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Dunja Rogić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr.sc. Ivana Rako, *Klinički bolnički centar Zagreb*

Dr. sc. Suzana Inić, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2018.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medical Biochemistry
Department of Clinical Chemistry and Hematology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Limit of quantification check for leukocyte and platelet count using Sysmex XN-1000 hematology analyzer

Domagoj Šebečić

SUMMARY

Text:

Sysmex XN-1000 hematology analyzer is widely used and reliable analyzer in hematology laboratories. Goal of this research was to check the limit of quantification (LoQ) of leukocytes using „low white blood cell“ mode which is being used ever more frequently, especially for samples of immunosuppressed patients. Therefore, it is very important that laboratory personnel knows which given value can be validated as accurate and precise. Also, as part of our research, we have checked the limit of quantification of platelets in whole blood mode.

To determine limit of quantification of leukocytes we used native samples which had extremely low leukocyte count ($<0,2 \times 10^9/L$), as well as samples with higher white blood cell count ($>1 \times 10^9/L$) diluted with plasma, so it would be as close to matrix of a native sample. „Low-WBC“ mode uses so called WDF channel. It performs every measurement in triplicate which increases procedure accuracy. Dilution of samples for measurements of platelet count was made using plasma obtained by twicely repeated centrifuge at 4000 rpm. Firstly, we have measured the limit of blank (LoB), it turned out to be $0.00 \times 10^9/L$. Leukocyte limit of quantification was determined experimentally, by continuous measurements of ever lower leukocyte concentrations (1.0, 0.8, 0.5, 0.2, 0.1, 0.09, 0.07, 0.05, 0.03) $\times 10^9/L$. Furthermore, using the previously agreed criteria for highest acceptable imprecision and inaccuracy (bias and CV) of 10% we determined the leukocyte LoQ at $0.1 \times 10^9/L$. Using the same criteria the platelet LoQ was determined at $5 \times 10^9/L$ after testing series of samples of (60, 10, 5, 3) $\times 10^9/L$. Comparing our test results and data provided by Sysmex XN-1000 manual, we have concluded that the leukocyte LoQ results match the data provided by the producer. Result of platelet LoQ was even better than the one provided (at $10 \times 10^9/L$), using our criteria of accepting 10% bias and CV. To conclude, these findings are very useful in day-to-day practise, especially for the specialized laboratories of medical institutions that take care of a large number of oncological patients.

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

Thesis includes: 27 pages, 7 figures, 5 tables and 11 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Leukocytes, thrombocytes, hematology analyzer, Sysmex XN-1000, limit of quantification

Mentor: **Dunja Rogić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Dunja Rogić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ivana Rako, Ph.D., University Hospital Center Zagreb

Suzana Inić, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2018.