

# Pouzdanost provjere trombocita digitalnom morfologijom na uređaju Sysmex DI-60

---

**Dorotić, Marija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

*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:163:484196>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-07**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Marija Dorotić**

**Pouzdanost provjere trombocita digitalnom  
morfologijom na uređaju Sysmex DI-60**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

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 prof.dr.sc. Dunje Rogić

Srdačno se zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Dunji Rogić na stručnom vodstvu te pomoći pri izradi ovoga diplomskog rada.

Zahvalila bih se i spec. med. biochem. Ivani Lapić na nesebičnoj pomoći, velikom trudu, strpljenju i savjetima prilikom pisanja ovog rada.

## SADRŽAJ:

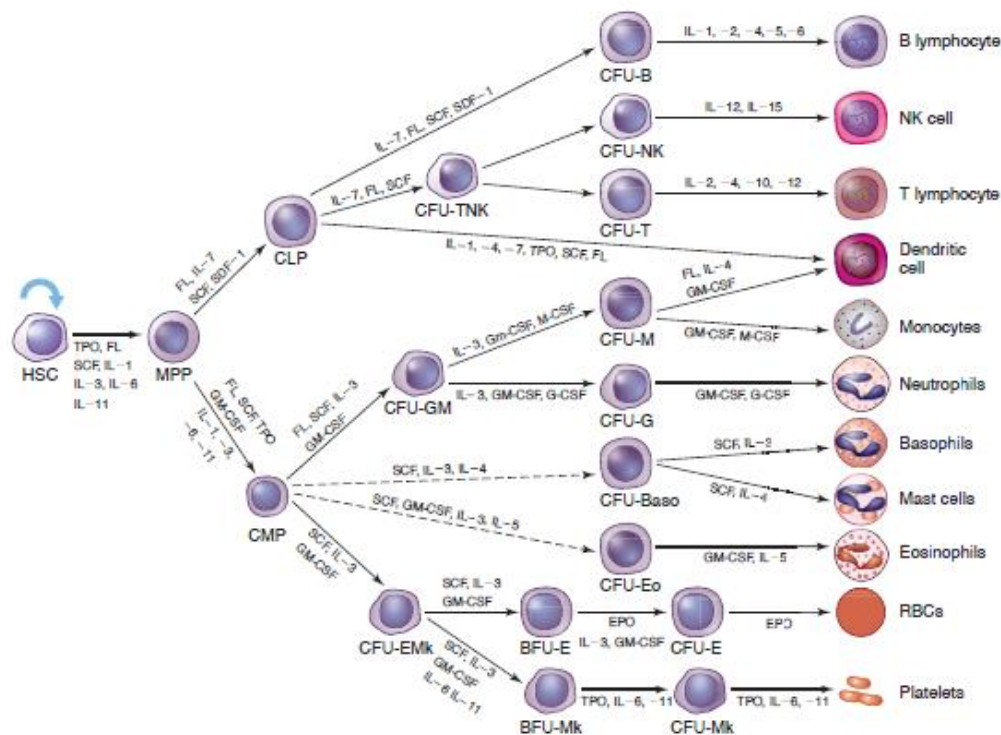
1. UVOD .....	5
1.1. Kompletna krvna slika .....	5
1.2. Trombociti.....	6
1.2.1. Struktura trombocita.....	8
1.2.2. Uloga trombocita.....	9
1.2.3. Bolesti trombocita .....	10
1.2.4. Trombocitne konstante .....	13
1.3. Automatizirane metode određivanja broja trombocita.....	14
1.3.1. Metoda impedance .....	14
1.3.2. Optička metoda .....	15
1.3.3. Imunološka metoda .....	16
1.4. Kriteriji za mikroskopsku provjeru trombocita .....	17
1.5. Ručna metoda određivanja broja trombocita .....	18
1.6. Digitalna mikroskopija.....	18
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	20
3. MATERIJALI I METODE .....	21
3.1. Uzorci i uzorkovanje .....	21
3.2. Opis uređaja.....	21
3.2.1. Sysmex XN-10 .....	21
3.2.2. Sysmex SP-50 .....	23
3.2.3. Sysmex DI-60.....	23
3.3. Analiza uzoraka.....	24
3.4. Statistička obrada .....	27
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	31
4.1. Rezultati .....	31
4.1.1. Usporedba prisutnosti nakupina trombocita svjetlosnom mikroskopijom i digitalnom mikroskopijom na uređaju Sysmex DI-60 .....	31
4.1.2. Usporedba broja trombocita .....	33
4.2. Rasprava .....	35
5. ZAKLJUČAK .....	40

6. LITERATURA.....	41
7. SAŽETAK/SUMMARY .....	45
Temeljna dokumentacijska kartica.....	47

# 1. UVOD

## 1.1. Kompletna krvna slika

Krv (grč. *Haima*, krv) se sastoji od stanica i tekućine (plazma) unutar zatvorenog žilnog sustava (Junqueira i sur., 1999.). U krvne stanice svrstavamo eritrocite ili crvene krvne stanice (engl. *Red blood cell*; RBC), leukocite ili bijele krvne stanice (engl. *White blood cell*; WBC) i trombocite ili krvne pločice (engl. *Platelet*; PLT). Leukociti se sastoje od neutrofilnih, eozinofilnih i bazofilnih granulocita te limfocita i monocita. Limfociti se dodatno dijele na limfocite T, limfocite B i stanice prirodnih ubojica (engl. *Natural killer cell*; NK cell). Krvne se stanice u koštanoj srži procesom hematopoeze diferenciraju djelovanjem različitih faktora (Slika 1.).



Slika 1. Dijagram hematopoeze od pluripotentne matične stanice do visokodiferenciranih stanica (McKenzie, 2010.).

Kompletna krvna slika (KKS) jedna je od najčešćih laboratorijskih pretraga ključnih za hematološku analizu (Brereton i sur., 2016.). Izrađuje se iz pune periferne krvi uzete u standardiziranu epruvetu s kalij etilendiamin-tetraoctenom kiselinom (engl. *Tripotassium thylenediaminetetraacetic*; K<sub>3</sub>-EDTA) kao antikoagulansom. Parametri koje KKS uključuje su crvena krvna slika, bijela krvna slika i trombocitni parametri. Crvena krvna slika se sastoji od broja eritrocita, koncentracije hemoglobina i hematokrita, morfologije eritrocita te

eritrocitnih parametara. Eritrocitni parametri KKS-a su sljedeći: prosječan volumen eritrocita (engl. *Mean corpuscular volume*; MCV), prosječan sadržaj hemoglobina u eritrocitu (engl. *Mean corpuscular hemoglobin*; MCH) i prosječna koncentracija hemoglobina u jednoj litri eritrocita (engl. *Mean corpuscular hemoglobin concentration*; MCHC). Leukociti i diferencijalna krvna slika (DKS) su parametri bijelih krvnih stanica koji se određuju u sklopu KKS-a. Trombocitni parametri koji se određuju su prosječni volumen trombocita (engl. *Mean platelet volume*; MPV) i broj trombocita (Premužić-Lampič, 2000.).

KKS daje uvid u brojnost svih loza krvnih stanica te identificira kapacitet prijenosa kisika procjenom indeksa crvenih krvnih stanica, hemoglobina i hematokrita. Dodatno, imunološki status pacijenta moguće je odrediti iz broja bijelih krvnih stanica i diferencijalne krvne slike. Brojnost leukocita se mijenja kod kroničnih i akutnih upalnih stanja. Određivanje KKS ključno je u početnoj laboratorijskoj dijagnostici anemija, leukemija, limfoma, ali i različitih infekcija, akutnih hemoragijskih stanja, alergija i imunodeficijencija, kao i u praćenju nuspojava određenih lijekova koji uzrokuju poremećaje krvnih stanica. Ispravno i cjelokupno tumačenje nalaza ključno je za pružanje kvalitetne skrbi (George-Gay i sur., 2003.; Incir i sur., 2020.).

Kako bi se dobio detaljni i potpuni pregled KKS-a, potrebno je napraviti razmaz periferne krvi i pogledati ga svjetlosnim mikroskopom. Važnost pregleda razmaza periferne krvi leži u proučavanju kompletnog hematološkog statusa pacijenta kako niti jedan klinički značajan segment ne bi bio izostavljen prilikom dijagnosticiranja od strane liječnika (Gulati i sur., 2013.).

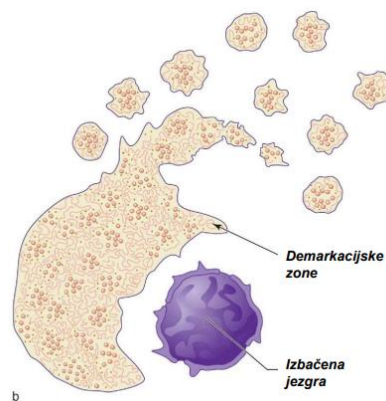
## 1.2. Trombociti

Trombociti su sastavni dio krvi čiji se broj i karakteristike određuju u sklopu analize KKS-a (pogl. 1.1.). Proces cjelokupne trombocitopoeze prikazan je na Slici 1., gdje se pluripotentna hematopoetska matična stanica na koju djeluju faktor matičnih stanica (engl. *Stem cell factor*; SCF), interleukin-3 (engl. *Interleukin-3*; *IL-3*), trombopoetin, faktor stimulacije granulocitno-monocitnih kolonija (engl. *Granulocyte-monocyte colony-stimulating factor*; GM-CSF), interleukin-1, interleukin-6 i interleukin-11 diferencira u multipotentnu matičnu stanicu. Ona se dalje, pod utjecajem faktora matičnih stanica, interleukina-3, faktora stimulacije granulocitno-monocitnih kolonija, interleukina-1a i interleukina-11, diferencira u megakariocitno-eritroidnu matičnu stanicu. Na nju pak utječu interleukin-3, trombopoetin i faktor stimulacije granulocitno-monocitnih kolonija te iz nje

nastaje megakariocit koji otpušta trombocite. Cjelokupni proces sazrijevanja i stvaranja trombocita naziva se megakariocitopoeza.

Megakariocitopoeza se sastoji od tri razvojna stadija. Započinje razvojem proliferativne progenitorske stanice koja se zatim diferencira u nezrele megakariocite koji su prijelazni odjeljak prema zrelim megakariocitima. Potom slijedi treći stadij razvoja, a to su zreli postmitotički megakariociti (Labar, 2017.).

U stadiju prethodnih nezrelih stanica dolazi do povećanja broja megakariocita i njihove proliferacije kao odgovor na mitotičke faktore rasta. Promegakarioblasti prijelazni su tip stanica od prethodnih nezrelih do zrelijih, postmitotičkih stanica. Zreli megakariociti gube sposobnost proliferacije, ali posjeduju sposobnost povećane sinteze DNA, bez diobe. Daljnji koraci megakariocitopoeze su sinteza trombocitnih proteina te pojačano stvaranje citoskeletnih dijelova membranskog sustava i receptora pri čemu megakariocit postaje sve bogatiji sa specifičnim trombocitnim granulama (više o trombocitnim granulama bit će opisano u pogl. 1.2.1.). Stvaranje samih trombocita počinje u trenutku agregacije mikrotubula u staničnom kortikalnom dijelu pri čemu se na jednome kraju megakariocita spontano stvaraju pseudopodiji. U početku su to veliki i široki pseudopodiji koji postupno prelaze u tanke razgranate protrombocite. Trombociti nastaju na krajevima protrombocita odakle se otpuštaju, a ostatak stanice odlazi u apoptozu (Slika 2.) (Labar, 2017.).



Slika 2. Oslobađanje trombocita (Sučić, 2019.)

Tijekom jednog dana u koštanoj srži se iz megakariocita oslobađa  $1 \times 10^{11}$  trombocita, a njihovo stvaranje se ovisno o potrebama može povećati i 10-20 puta.  $\frac{2}{3}$  trombocita cirkulira u perifernoj krvi dok  $\frac{1}{3}$  sekvestira u slezeni (Sučić, 2019.). Iz jednog megakariocita može se stvoriti 3000-4000 trombocita. Potrebno je prosječno 10 dana od diferencijacije matične hematopoezne stanice do stvaranja trombocita, a životni vijek trombocita u perifernoj krvi je prosječno 9 (7 – 10) dana (Topić i sur., 2018.). Eliminiraju se putem slezene. Konstantna



ravnoteža tih dvaju odjeljaka je zadovoljena uslijed stalne izmjene trombocita. Spontano krvarenje se događa ako je broj trombocita manji od  $10 \times 10^9/L$  u krvi.

### 1.2.1. Struktura trombocita

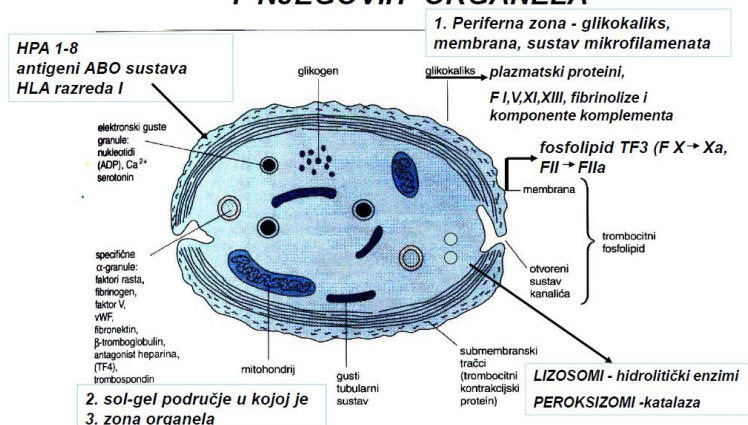
Trombociti su diskoidni ulomci stanice bez jezgre. Promjer im je 1.5-3  $\mu m$ . Diskoidni oblik neaktiviranih trombocita nije do kraja razjašnjen, ali za pretpostaviti je da im pomaže u savladavanju tlakova i brzina smicanja u cirkulaciji krvi (Getaldić Švarc B., 2017.). Sudjeluju u procesu zgrušavanja krvi na način da dolazi do njihove adhezije i agregacije na mjestu ozljede krvne žile i stvaranja trombocitnog ugruška koji sprječava gubitak krvi.

Ultrastruktura trombocita pokazuje nekoliko zona ili regija s definiranom funkcionalnom aktivnosti: periferna i strukturna zona membranskog sustava te citoplazmatska zona s organelama i granulama (Slika 3.). Periferna zona trombocita obložena je glikokaliksom koji se sastoji od 9 glikoproteina (GpI - GpIX), glikolipida, kolesterola, fosfolipida, mukopolisaharida te faktora koagulacije (I, V, VII, XII, XIII), a na površini membrane nalaze se receptori za von Willebrandov faktor, komplement i fibrinogen (Slika 3.). Periferna zona odgovorna je za adheziju i agregaciju trombocita (Sučić, 2019.).

Ispod glikokaliksa nalazi se negativno nabijena fosfolipidna membrana sastavljena od konglomerata lipidnih i proteinskih molekula (glikoproteini, glikolipidi, kolesterol), a naziva se sol-gel zona (Slika 3.; Sučić, 2019.). Sol-gel zona je odgovorna za retrakciju/kontrakciju i oblik trombocita (Sučić, 2019.). Duž ruba trombocita nalazi se marginalni snop mikrotubula koji omogućuje održavanje ovalnog oblika. Unutar hijalomere nalaze se i nepravilne, elektronski guste cjevčice koje čine gusti tubularni sustav. Filamenti aktina i miozina u hijalomeri mogu se preraspodijeliti u kontraktilni sustav koji sudjeluje u gibanju i agregaciji.

Zona organela je odgovorna za skladištenje i oslobađanje sadržaja trombocita, a sadrži dvije vrste granula i lizosome. Jedne od granula su *delta/* guste/ tamne granule, u kojima se nalaze adenzin-trifosfat (ATP), adenzin-difosfat (ADP), kalcij, serotonin, magnezij, a druge su alfa-granule s tromboglobulinom, faktorom trombocita (engl. *Platelet factor 4*; PF4), trombocitnim faktorom rasta (engl. *Platelet-derived growth factor*; PDGF), fibrinogenom, faktorom V, faktorom VIII, von Willebrandovim faktorom, plazminogenom,  $\alpha_1$ -antiplazminom i visokomolekularnim kininogenom (engl. *High molecular weight kininogen*, HMWK; Slika 3.). Osim alfa i gustih granula prisutni su lizosomi koji sadrže proteolitičke i hidrolitičke enzime koji probavljaju matriks i ostatke stijenke krvne žile te mikroperoksizomi (Slika 3.) (Premužić-Lampič, 2000. ; Labar, 2017. ; Junqueira i sur., 1999.; Zadro, 2021.; Getaldić Švarc B., 2017.).

## SHEMATSKI PRIKAZ TROMBOCITA I NJEGOVIH ORGANELA

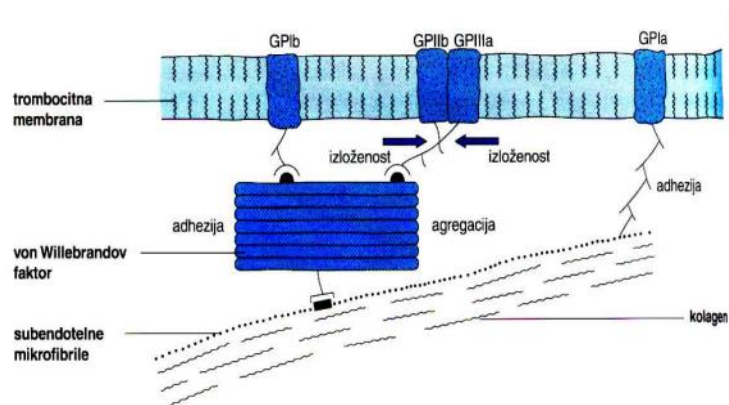


Slika 3. Shematski prikaz trombocita i njegovih organela (Sučić, 2019.)

### 1.2.2. Uloga trombocita

Trombociti imaju važnu *in vivo* ulogu u procesu normalnog hemostatskog odgovora nakon ozljede krvne žile, ali i u patofiziološkim zbivanjima u arterijskoj trombozi. Održavaju hemostazu očuvanjem integriteta endotelnih stanica krvožilnog sustava te sudjeluju u zacjeljivanju rana. Primarna hemostaza započinje oštećenjem krvne žile te nastankom trombocitnog ugruška. U tom procesu dolazi do agregacije trombocita na ogoljeni kolagen preko veznih proteina na membrani trombocita (Slika 4.). Adhezija za kolagen zbiva se vezanjem za von Willebrandov faktor i glikoprotein Ia na trombocitu (Slika 4.). Aktivaciju trombocita obilježava niz morfoloških i funkcionalnih promjena trombocita (promjena oblika iz glatkog diskoidnog oblika u sferični oblik s izdancima, povećanje membranske površine, premještanje membranskih fosfolipida na vanjsku stranu membrane, izlaganje membranskih glikoproteinskih receptora i lučenje sadržaja granula), s posljedičnim uzajamnim sljepljivanjem ili agregacijom trombocita, čime nastaje primarni/ trombocitni ugrušak. U procesima adhezije, aktivacije i agregacije sudjeluju brojni membranski receptori i adhezivni proteini trombocita (pogl. 1.2.1.). Osim u procesu primarne hemostaze, trombociti imaju središnju ulogu u procesu sekundarne hemostaze, tj. u kontroli i usmjeravanju cjelokupnog hemostatskog procesa. Služe kao površina za faktore zgrušavanja jer agregirani trombociti otpuštaju adhezivni glikoprotein (integrin) i ADP što dodatno povećava veličinu trombocitnog ugruška (Labar, 2017. ; Junqueira i sur., 1999.; Getaldić Švarc B., 2017.). Uloga trombocitnog ugruška je zaustavljanje krvarenja, dok se aktivacijom sustava zgrušavanja i stvaranjem

trombina slijedom međusobno povezanih reakcija nastali trombocitni ugrušak stabilizira i pričvršćuje pomoću fibrinskih polimera (Slika 4.; Getaldić Švarc B., 2017.).



Slika 4. Interakcija trombocita, kolagena i von Willebrandova faktora (Labar, 2017.)

### 1.2.3. Bolesti trombocita

Pretrage bitne prilikom dijagnosticiranja bolesti trombocita su slijedeće: broj trombocita, MPV, raspon veličine trombocita (engl. *Platelet distribution width*; PDW; više u pogl. 1.2.4.), retikulirani trombociti (ret PLT/IPF), morfološki pregled trombocita u razmazu periferne krvi, vrijeme krvarenja, analiza funkcije trombocita, agregometrija trombocita, protočna citometrija sa specifičnim antitijelima (više u pogl. 3.2.3.), antitrombocitna antitijela, punkcija koštane srži.

Kvantitativni poremećaji trombocita se dijele na stanja sa sniženim brojem trombocita (trombocitopenije) i stanja s povišenim brojem trombocita (trombocitoze).

Trombocitopenija se klinički prezentira krvarenjem u kožu i sluznice, a nastaje zbog smanjenog broja trombocita kada su vrijednosti niže od  $100 \times 10^9 / L$ . Može se podijeliti na nasljedne i stečene oblike (Premužić-Lampič, 2000.). Uzroci trombocitopenije mogu biti brojni: smanjeno stvaranje trombocita u koštanoj srži, sinteza defektnih trombocita, povećana potrošnja/ razgradnja i povećano izdvajanje trombocita u slezeni. Stupanj trombocitopenije korelira s težinom kliničkog stanja (Tablica 1).

Tablica 1. Odnos stupnja trombocitopenije i broja trombocita u uzorku (Topić i sur., 2018.)

Težina trombocitopenije	Raspon broja trombocita	Mjerna jedinica
Umjerene	50 – 150	$\times 10^9 / L$
Srednje	30 – 50	$\times 10^9 / L$
Teške	10 – 30	$\times 10^9 / L$
Vrlo teške (spontana i teška krvarenja)	<10	$\times 10^9 / L$

Niz je patoloških stanja s povišenim brojem trombocita. Ona se mogu podijeliti na primarnu trombocitozu (klonalna bolest pluripotentne matične stanice) i sekundarnu ili reaktivnu trombocitozu (Premužić-Lampič, 2000.; Topić i sur., 2018.). Stupanj trombocitoze se određuje prema broju trombocita u uzorku. Vrijednosti od  $450$  do  $700 \times 10^9 /L$  odgovaraju blagoj trombocitozi, od  $700$  do  $900 \times 10^9 /L$  umjerenoj, dok su vrijednosti veće od  $900 \times 10^9 /L$  znak teške trombocitoze (<https://www.clinical-laboratory-diagnostics-2020.com>).

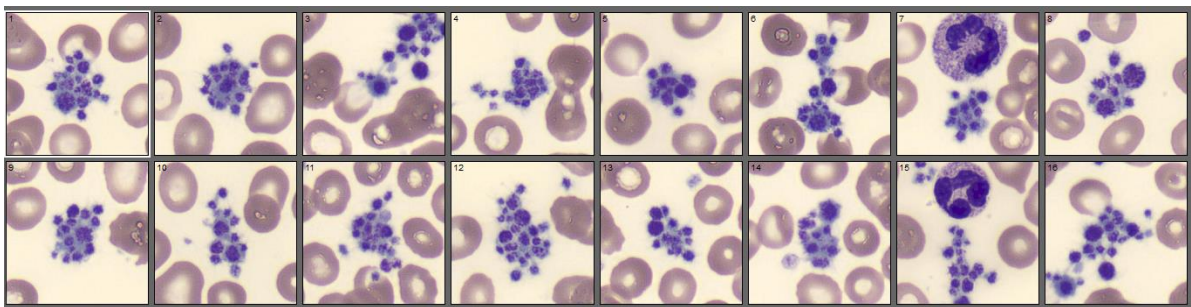
Kvalitativne promjene ili poremećaji funkcije trombocita kod kojih dolazi do promjene u adheziji, agregaciji trombocita ili otpuštanju sadržaja granula trombocita nazivaju se trombocitopatije (Premužić-Lampič, 2000.; Topić i sur., 2018.). Tablica 2. prikazuje referentne intervale za broj trombocita.

Tablica 2. Referentni interval broja trombocita izmjeren u području 2,5 – 97,5 percentile procijenjen na populaciji Grada Zagreba (Čvorišćec i sur., 2007.)

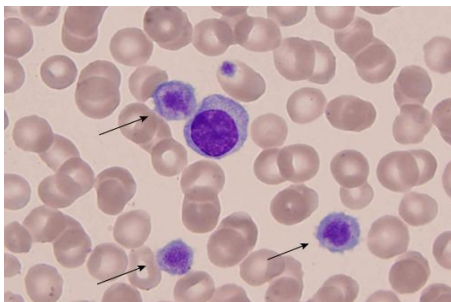
Laboratorijska pretraga	Preporučena metoda	Mjerna jedinica	Spol	Dob	Interval
Trombociti	Elektronski brojač	$x 10^9/L$	muški, ženski	1 dana - 7 god.	150 - 450
Trombociti	Elektronski brojač	$x 10^9/L$	muški, ženski	8 - 19 god.	178 - 420
Trombociti	Elektronski brojač	$x 10^9/L$	muški, ženski	$\geq 20$ god.	158 - 424

Pseudotrombocitopenija je prividna pojava niskog broja trombocita. Sreće se u klinički zdravih osoba s prevalencijom 0,1%. Nastaje uslijed stvaranja nakupina trombocita (Slika 5.) prilikom uzorkovanja u epruvetu s EDTA antikoagulansom zbog poticaja procesa agregacije antikoagulansom (Casonato, 1994.). Nadalje, može nastati zbog prisutnosti nasljednih ili stečenih poremećaja kod kojih su prisutni veliki trombociti (Slika 6.) te fenomena satelitizma trombocita (Slika 7.) gdje se trombociti vežu za površinu segmentiranih granulocita čiji broj prilikom analize ostaje izostavljen. Također, jedan od razloga pseudotrombocitopenije su i hladni aglutinini. U tom slučaju se događa *in vitro* aglutinacija trombocita uslijed pojave antitijela na trombocite koji se vežu za glikoprotein IIb na površini trombocita. Ovakav tip aglutinacije nije uzrokovan EDTA antikoagulansom (<https://www.clinical-laboratory-diagnostics-2020.com>). Nepodudarnost broja trombocita u

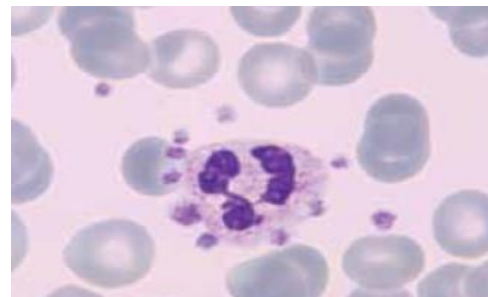
uzorcima s EDTA i citratnim antikoagulansom te prisutnost nakupina trombocita u razmazu periferne krvi upućuju na pseudotrombocitopeniju dok su sniženi trombociti u oba uzorka pokazatelj prave trombocitopenije. Kod stvaranja hladnih aglutinina stvaraju se autoprotutijela IgM klase usmjerena na kompleks GPIIb/IIIa s najvećom aktivnošću vezanja na trombocite pri niskim temperaturama (4°C). Kod sumnje na njihovu prisutnost, uzorkovanje je potrebno ponoviti u spremniku zagrijanom na 37°C i analizu KKS učiniti u što kraćem roku (Kurata i sur. 2006.). Ukoliko se pseudotrombocitopenija ne otkrije, bolesnika se može podvrgnuti dodatnim nepotrebnim dijagnostičkim i terapijskim postupcima pa čak i transfuziji krvi.



Slika 5. Prisutnost nakupina trombocita u razmazu periferne krvi uočen pomoću Sysmex DI-60 (Sysmex, Kobe, Japan) analizatora



Slika 6. Prikaz velikih trombocita u razmazu periferne krvi (<https://www.uptodate.com>)



Slika 7. Satelitizam trombocita (Vidranski i sur., 2015.)

U svrhu izdavanja pouzdanog broja trombocita, nakon uočene prisutnosti nakupina trombocita i sumnje na pseudotrombocitopeniju uzrokovanu EDTA antikoagulansom, primjenjuje se nekoliko pristupa, a najčešći je uzorkovanje krvi u epruvetu s drugim antikoagulansom (Na-citrat ili Li-heparin) (<https://www.clinical-laboratory-diagnostics-2020.com>).

#### 1.2.4. Trombocitne konstante

Trombocitni parametri su sljedeći: srednji volumen trombocita, udio retikuliranih trombocita (engl. *Reticulated platelets*; ret-PLT), tj. frakcija nezrelih trombocita (engl. *Immature platelet fraction*; IPF, rPI, %), trombokrit (engl. *Plateletcrit*; Pct) i raspon veličina trombocita (MPV).

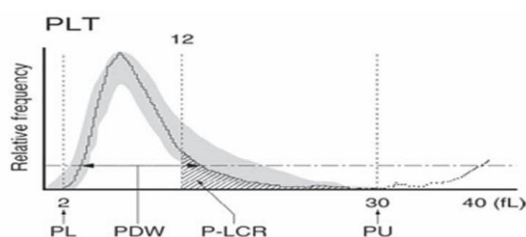
MPV pomaže u diferencijalnoj dijagnostici trombocitopenije. Kod trombocitopenije nastale zbog smanjenog ili nefunkcionalnog trombocita MPV vrijednost je snižena kao i broj trombocita. Za razliku od toga, kod trombocitopenije nastale uslijed pojačane razgradnje ili potrošnje trombocita vrijednost MPV-a će biti povišena uz sniženi broj trombocita. MPV se izvodi iz histogramске krivulje i predstavlja najčešći volumen trombocita u uzorku bolesnika (Slika 8). Referentni interval iznosi 8,5 – 10,5 fL, iako se te vrijednosti mogu razlikovati ovisno o korištenom hematološkom analizatoru. Povećane vrijednosti pronalazimo u trombocitopoezi, a smanjene vrijednosti prilikom smanjene proizvodnje i u hipersplenizmu. Također se smanjuje starenjem (Premužić-Lampič, 2000.). Vrijednosti mogu biti lažno povišene kod *in vitro* nakupljanja trombocita zbog prisutnosti autoantitijela (pogl. 1.2.3.).

Udio retikuliranih trombocita ili frakcija nezrelih trombocita je laboratorijski pokazatelj ubrzane trombopoeze. Neovisno o razlikama koje različite tehnologije hematoloških analizatora upotrebljavaju za ovaj udjel (IPF) on predstavlja udio trombocita koji imaju ostatak citoplazmatske ribonukleinske kiseline. Referentni intervali više ne predstavljaju problem jer se u literaturi nalaze brojna klinička ispitivanja u kojima se na različitim etničkim skupinama pokazalo da je udjel retikuliranih trombocita u rasponu 0,3 – 7,7 % odraz normalne dinamike trombocita (Getaldić Švarc B., 2017.).

Trombokrit je udio volumena pune krvi koji zauzimaju trombociti (Premužić-Lampič, 2000.).

PDW pokazuje raspon veličine trombocita. Izražava se u femtolitrima fL ( $1 \text{ fL} = 1 \times 10^{-15} \text{ L}$ ).

P-LCR (engl. *Platelet-large cell ratio*) je udjel trombocita smještenih iza fiksnog diskriminatora na 12 fL. Izračunava se kao omjer broja trombocita između fiksnog i gornjeg diskriminatora te donjeg i gornjeg diskriminatora (Slika 8).



Slika 8. Histogramska raspodjele trombocita po volumenu. Analiza raspodjele trombocita po volumenu vrši se pomoću tri diskriminatora: donjeg diskriminatora (LD), koji se prema potrebi automatski smješta između 2–6 fL, gornjeg diskriminatora između 12 – 30 fL i fiksnog diskriminatora na 12 fL (Briggs i sur., 2007.)

### 1.3. Automatizirane metode određivanja broja trombocita

Automatizacija je jedan od najvažnijih napredaka u laboratorijskoj medicini. Iako su automatizacijom analizatori postali neovisniji o pomoći laboratorijskog osoblja, održavanje i nadzor rada ključni su za pouzdan i kvalitetan rad uređaja. Automatizacija je pridonijela i standardizaciji analitičkih metoda, čime je omogućena kontrola kvalitete rada samih uređaja. Potpuno automatizirani sustavi u hematologiji sastoje se od hematoloških analizatora koji su povezani s uređajima za izradu razmaza periferne krvi i uređajima za digitalnu morfologiju stanica.

Dva osnovna načela mjerenja automatiziranim hematološkim analizatorima su promjena otpora ili impedanca te rasap svjetlosti ili optička metoda (više o metodama u narednim poglavljima).

#### 1.3.1. Metoda impedance

Početak automatizacije brojanja krvnih stanica vezan je uz primjenu impedancijske metode 50-ih godina prošlog stoljeća, za što je zaslužan Wallace Coulter (1913.-1998.). Načelo metode temelji se na promjeni električnog otpora (impedancije) nastalog prolaskom krvnih stanica suspendiranih u elektrolitskoj otopini kroz otvor cijevi koje su kalibrirane za veličine eritrocita, leukocita i trombocita. Pri prolasku kroz cijevi/ dvije elektrode, stanice zakoče prolaz električne struje (jer su loš vodič elektriciteta) te se pojavi signal u obliku pulsog vala za svaku stanicu. Amplituda ili intenzitet tog pulsog vala govori o veličini stanice. Analizator registrira amplitudu, tj. veličinu stanice te broj stanica iste veličine. Podaci se prikazuju grafički tako da je na apscisi veličina stanice, a na ordinati njihov relativni broj.

Dobiveni prikaz naziva se histogramom i koristi se za evaluaciju jedne populacije stanica ili skupine u toj populaciji (Premužić-Lampič, 2000.; Sullivan, 2006.). Razvojem tehnologije napredovao je i automatizirani sustav brojača kojemu je dodano hidrodinamičko fokusiranje (Bacus i sur., 1980.).

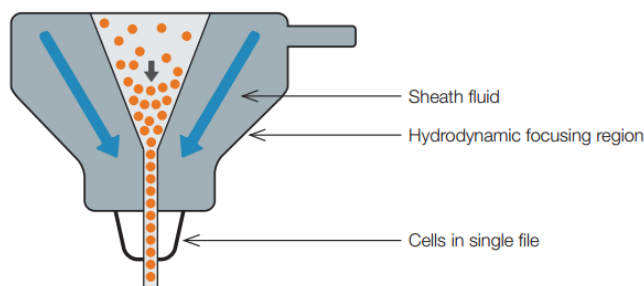
### 1.3.2. Optička metoda

Optičkim mjerenjem određuju se fizikalne osobine bioloških čestica i stanica tijekom njihova prolaska kroz mjerni uređaj u struji tekućine. Glavna značajka optičkog mjerenja je istodobno mjerenje više parametara svake stanice u suspenziji što nazivamo multiparametrijskom protočnom citometrijom (MFC). Sastoji se od tri osnovna dijela: sustava za protok stanica, optičkog sustava i elektroničkog sustava.

Sustav za protok stanica uvodi stanice iz epruvete u tekućinski protok i osigurava da pri susretu s laserskom zrakom stanice protječu pojedinačno (stanica za stanicom). Kako bi samo jedna stanica prošla kroz lasersku zraku u određenom trenutku zaslužno je hidrodinamičko fokusiranje. Hidrodinamičkim fokusiranjem uzorak se ubrizgava u tok obložne tekućine (engl. *Sheath fluid*) unutar protočne komore te tako ubrzava čestice i usmjerava ih u središte jezgre uzorka, kao što Slika 9. prikazuje. Od izrazite je važnosti da su tlak uzorka i tlak oblažuće tekućine različiti (tlak uzorka je veći od tlaka oblažuće tekućine). Ubrizgavanjem uzorka u sredinu toka omotača, razlike u gustoći ili brzini dviju tekućina dopuštaju stanicama da prolaze kroz cijev odvojeno. Korištenjem tekuće ovojnice, stanice ili čestice se mogu ograničiti i pojedinačno analizirati. Brzina središnje tekućine mijenja se kako se tekućina omotača kreće oko protočnih stanica. Postiže se parabolični profil strujanja s višim brzinama u središtu, dok na stijenkama komore nema strujanja ( $v=0$ ). Pod laminarnim strujanjem, što je optimalni uvjet za hidrodinamičko fokusiranje, suspenzija stanica se ne miješa s tekućinom omotača zbog razlika u tlaku. Stanice su prisiljene proći jedna za drugom. Jedan problem svojstven dvodimenzionalnim (2D) hidrodinamičkim protočnim komorama jest sklonost stanica da izranjaju na površinu kanala, što može dovesti do blokada kanala za uzorkovanje. Trodimenzionalne (3D) tehnike hidrodinamičkog fokusiranja zaobilaze ovaj problem. Rad iz 2011. predložio je novu 3D tehniku koja koristi jednostavan i integriran hidrodinamički fokusirajući mikrofluidni uređaj. Ovaj uređaj se sastoji od tri kanala za protok omotača koji se nalaze s obje strane i ispod kanala za uzorkovanje. Time se formira mekana stijenka tekućine koja može spriječiti izranjanje stanica na površinu komore. Omotač tekućine maksimalno sprječava odlaganje proteina i recirkulaciju stanica koja izaziva pojavu lažnih



impulsa (<https://www.news-medical.net> ; Sheehan, 2009.; Sullivan, 2006.; Getaldić Švarc B., 2017.).



Slika 9. Prikaz hidrodinamičkog fokusiranja i protoka stanica jedna za drugom  
(<https://www.bio-rad.com/featured/en/flow-cytometer.html>)

Optički se sustav sastoji od dva osnovna dijela: ekscitacijskog sustava i sustava za prikupljanje svjetlosnih signala tj fotodetektora. Ekscitacijski sustav građen je od izvora, tj. lasera i pripadajuće leće koji oblikuju i fokusiraju lasersku zraku, dok filteri služe za dobivanje zrake određene valne duljine. Rasap svjetlosti se događa kada čestice reflektiraju upadno lasersko svjetlo. Opseg u kojemu se to zbiva ovisi o fizičkim osobinama čestice, posebice o njezinoj veličini i unutarnjoj kompleksnosti. Stanični dijelovi koji imaju utjecaj na rasap su stanična membrana, jezgra i granulirani materijal unutar stanice. Na taj način dobivamo dvije vrste rasapa svjetlosti kao rezultat. Prvi je prednji rasap (engl. *Forward – scattered light*; FSC) koji je proporcionalan staničnoj površini ili veličini te je on mjera (uglavnom) difrakcije svjetla. Prednji rasap se detektira fotodiodom koja je postavljena u osovini (smjeru) upadne laserske zrake. Drugi je bočni rasap (engl. *Side – scatter light*; SSC) koji nastaje zbog refrakcije i refleksije te je proporcionalan stupnju granuliranosti, tj. kompleksnosti unutarnje strukture stanice (organele). Njega mjerimo fotodiodom koja je smještena postranično, obično pod kutem od  $90^\circ$  u odnosu na smjer upadne laserske zrake (Sheehan, 2009.; Sullivan, 2006.; Graham, 2003.; Getaldić Švarc B., 2017.). Treći dio sustava protočne citometrije je elektronički sustav koji prevodi zabilježene svjetlosne signale u elektroničke signale (Sheehan, 2009.).

### 1.3.3. Imunološka metoda

Impedancijska i optička metoda brojanja trombocita imaju svoja ograničenja s obzirom na točnost brojanja u određenim kliničkim situacijama što se primarno očituje u uzorcima s izrazito sniženim brojem trombocita ( $< 50 \times 10^9/L$ ). Stoga se i ukazala potreba za daljnjim razvojem novih tehnologija brojanja trombocita kao što je brojanje trombocita u

protočnom citometru primjenom specifičnih monoklonskih protutijela (CD41, CD42, CD61) za antigene na površini trombocita konjugiranih odgovarajućim fluorokromom (npr. fluorescein-izotiocijanat, FITC). Broj trombocita dobiven ovom metodom temelji se na izračunu omjera broja trombocita koji fluoresciraju i eritrocita koji ne fluoresciraju. Imunološka metoda brojanja trombocita na protočnom citometru uz primjenu monoklonskih protutijela CD41 i CD61 uz kromogen FITC, metoda je najveće točnosti brojanja trombocita te je 2001. godine od strane Međunarodnog odbora za standardizaciju hematologije (engl. *International Committee for Standardization in Haematology*; ICSH) postala referentna metoda brojanja trombocita (Margetić, 2015.; <https://www.sysmex-europe.com>). Brojanje trombocita imunološkom metodom uz primjenu specifičnog monoklonskog protutijela nije namijenjeno rutinskom brojanju trombocita u svim uzorcima. Tu metodu rabimo isključivo u svrhu provjere broja trombocita u uzorcima za koje impedancijska i optička metoda ne pokazuju zadovoljavajuću točnost brojanja. To je najčešće u slučaju interferencija netrombocitnih čestica te u uzorcima bolesnika s izrazito niskim brojem trombocita manjim od  $20 \times 10^9/L$  (Briggs i sur., 2007.).

Nadalje, protočna citometrija se koristi za procjenu funkcije trombocita, uz povećano zanimanje za procjenu aktiviranih trombocita. Prije same analize pojedinačne stanice u suspenziji obilježene su fluorescentnim bojama konjugiranim s monoklonskim protutijelima. Procjena trombocita protočnom citometrijom pokazala se korisnom u istraživanju mnogih bolesnih stanja, uključujući nasljedne bolesti kao što je Bernard-Soulierov sindrom i Glanzmannova trombastenija (Getaldić Švarc B., 2017.).

#### 1.4. Kriteriji za mikroskopsku provjeru trombocita

Mikroskopski pregled može biti ograničen na morfološki pregled svih loza krvnih stanica u razmazu krvi, a može uključivati i ručno diferenciranje broja leukocita (Gulati i sur., 2013.). Situacije koje zahtijevaju izradu i mikroskopski pregled odgovarajuće pripremljenih razmaza periferne krvi od strane laboratorijskog stručnjaka su provjera i potvrda broja stanica izmjerenih hematološkim analizatorom, diferenciranje leukocitne frakcije, morfološka analiza eritrocita i trombocita, provjera pojave nakupina trombocita i fenomena satelitizma trombocita, provjera prisutnosti toksičnih i degenerativnih staničnih promjena i infektivnih patogena/ parazita, uslijed kliničke slike pacijenta, prijašnjih poremećaja stanica, pozitivne obiteljske anamneze morfoloških poremećaja stanica itd. (Gulati i sur., 2013.).

Pregled razmaza krvi u svrhu provjere trombocita uključuje morfološki pregled trombocita, procjenu trombocita i pregled razmaza bez diferenciranja bijelih krvnih stanica.

Takav tip pregleda razmaza se koristi kako bismo potvrdili broj trombocita dobiven na hematološkom analizatoru, posebice ako postoji opaska od strane hematološkog uređaja ili ukoliko je broj trombocita dobiven na hematološkom analizatoru značajno niži od donje granice referentnog intervala. Veliki broj laboratorija određuje donju granicu za provjeru trombocita od  $100 \times 10^9 / L$  ili kada delta-provjera (engl. *Delta-check*) pokaže da se radi o drastičnom padu broja trombocita (više od 50%) u odnosu na prethodno mjereni rezultat istog pacijenta (Gulati i sur., 2013.). Provjera trombocita kod izrazito niskih vrijednosti je neophodna zbog pseudotrombocitopenije (pogl. 1.2.3.).

Za provjeru broja trombocita, sva područja razmaza (lateralni rubovi, tanka područja i sl.) se pregledavaju pod povećanjem od 100 do 1000 puta pod imerzijom kako bi se pronašle nakupine trombocita svih veličina. Isto tako, pozornost treba obratiti i na fragmente crvenih krvnih stanica, organizme poput gljivica i bakterija te na pojavu velikih trombocita. Prisutnost značajnog broja fragmenata eritrocita i prisutnost mikroorganizama može se povezati s lažno povišenim brojem trombocita, dok se značajan broj velikih trombocita može povezati s lažno niskim vrijednostima trombocita. Nadalje, zbog prisutnosti nakupina trombocita, broj dobiven hematološkim analizatorom nije moguće izdati kao pouzdan (Gulati i sur., 2013.).

#### 1.5. Ručna metoda određivanja broja trombocita

Ručna metoda određivanja broja trombocita je metoda po Fonio-u. Korisna je za provjeru točnosti broja trombocita dobivenog na hematološkom analizatoru. Izvodi se mikroskopskim pregledom razmaza periferne krvi uz povećanje od 1000 puta (okular 10, objektiv 100).

Trombociti se broje u pet vidnih polja koja sveukupno sadrže otprilike 200 eritrocita u svakom vidnom polju. Zbrojeni trombociti se potom množe s brojem eritrocita, čime se dobiva apsolutni broj trombocita u analiziranom uzorku. Vrijednosti procijenjene ovom metodom su samo aproksimacija, a ne točan i precizan broj trombocita u perifernoj krvi (<https://www.sysmex-europe.com>).

#### 1.6. Digitalna mikroskopija

Prvi uvedeni automatizirani sustavi morfološke analize datiraju iz 1960-ih godina, a to su: CELLSCAN, Hematrak, i Cydac Scanning Microscope System (Cydac). Međutim, rani sustavi nisu pružili značajna poboljšanja u tijeku rada jer su bili relativno spori i ograničenih mogućnosti (Kratz, 2019.). Informatizacijom i razvojem umjetne inteligencije postignut je veliki napredak u razvoju automatizirane digitalne morfologije. Takav jedan sustav je i CellaVision koji se temelji na automatskom lociranju i snimanju digitalne slike stanica s

dijapozitiva. Sustav potom identificira monosloj stanica, locira pojedinačne stanice i snima visokokvalitetne slike stanica. CellaVision sustav koristi inovativnu tehnologiju analize slike kako bi izvršio prethodnu klasifikaciju bijelih krvnih stanica i pre-karakterizaciju morfologije crvenih krvnih stanica. Leukociti su prethodno razvrstani u 17 kategorija stanica, a eritrociti su unaprijed okarakterizirani na temelju 21 morfološke karakteristike. Prethodno razvrstane i unaprijed okarakterizirane stanice se prikazuju za pregled i provjeru. Strukturirana sučelja i ugrađeni alati pomažu ubrzati proces pregleda i provjere, istovremeno promičući točnost i dosljednost (<https://www.cellavision.com/en/introducing-digital-cell-morphology-by-cellavision> ; Kim, 2018.).

Rad analizatora se bazira na optičkoj jedinici koja se sastoji od međusobno povezanog mikroskopa, kamere i računalnog sustava sa softverom CellaVision DM. Mikroskop se sastoji od dva objektiva s povećanjima 10x i 100x te međuobjektiva koji se prebacuje između povećanja 1,0x i 0,5x, što u konačnici stvara sliku s povećanjima od 5x, 10x, 50x ili 100x (Kim, 2018.).

Kontrolu kvalitete lociranja stanica potrebno je provoditi na redovnoj bazi jednom ili dva puta dnevno u laboratorijima s velikim opsegom posla nakon promjene postupka ili otopine za bojanje. Koristi se svježa krv s normalnim brojem bijelih krvnih stanica te ukoliko sustav ne može locirati minimalno 100 stanica s jezgrom, rezultat se odbacuje. Također, postotak stanica bez jezgre ne bi trebao prelaziti 30% ukupnog broja stanica u uzorku (Kim, 2018.).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Provjera trombocita je neophodna zbog izdavanja točnih i pouzdanih vrijednosti trombocita te pravovremenog uočavanja promjena u morfologiji i broju trombocita, a istovremeno i sprječavanja izdavanja netočnih nalaza zbog utjecaja predanalitičkih ili analitičkih čimbenika.

Standardizacijom i automatizacijom metode uvelike bi se poboljšala rutinska analiza. Prvenstveno bi se skratilo vrijeme pripreme i analize uzorka i vrijeme izdavanja nalaza te tako omogućilo ranije izdavanje nalaza i dostava istih liječniku kako bi on brže intervenirao kod kritičnih pacijenata. Isto tako, izbjegla bi se različita razina edukacije osoblja čime bi se smanjila subjektivnost analize i slučajna ljudska pogreška prilikom same morfološke analize i brojanja stanica. U tom slučaju bi se mogla provoditi pravilna kontrola kvalitete rada, tj. analize razmaza periferne krvi kao i međulaboratorijska usporedba rada analizatora (Kim, 2018.).

Prije uvođenja nove metode u rutinski rad, potrebno je verificirati njenu izvedbu. Analiza pouzdanosti provjere trombocita digitalnom morfologijom na uređaju Sysmex DI-60 (Sysmex, Kobe, Japan) provedena je kao dio verifikacije novog uređaja za digitalnu morfologiju Sysmex DI-60, a u svrhu uvođenja automatizirane provjere broja trombocita. Na taj način automatizirao bi se i optimizirao ovaj dio radnog procesa u hematološkom laboratoriju, smanjila bi se i potreba za ručnim pregledom razmaza svjetlosnom mikroskopijom te bi se značajno skratilo vrijeme izdavanja nalaza (Kim, 2018.).

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Uzorci i uzorkovanje

Za potrebe izrade ovog diplomskog rada korišteni su rutinski uzorci pune periferne krvi koji su prikupljeni za potrebe određivanja KKS (pogl. 1.1.) u Odjelu za laboratorijsku hematologiju i koagulaciju Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku, Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Istraživanje je obuhvatilo 389 uzoraka bolničkih i ambulantnih bolesnika kojima je temeljem rezultata analize KKS, dobivene na hematološkom analitičkom sustavu Sysmex XN-3100 (Sysmex, Kobe, Japan; o sustavu će biti govora u pogl. 3.2.1.) te uspoređeni s postojećim kriterijima unutar međuprograma Extended IPU, bilo potrebno mikroskopski provjeriti trombocite. Extended IPU je programska podrška koja analizira i prikazuje podatke dobivene od analizatora te služi za pregled, validaciju i upravljanje hematološkim sustavom Sysmex XN-3100.

Periferna krv je uzorkovana standardiziranom metodom, prema smjernicama Hrvatskog društva medicinske biokemije i laboratorijske medicine HDMBLM (<https://www.hdmblm.hr/images/preporuke/Nacionalne-preporuke-za-uzorkovanje-venske-krvi.pdf>). Uzorkovalo se u standardiziranu epruvetu za hematološke pretrage - epruvetu s ljubičastim čepom (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria) koja sadrži K<sub>3</sub>-EDTA kao antikoagulans. Neki od uzoraka su prikupljeni u epruvetu s 3,2% natrij citratnim antikoagulansom (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, SAD) tj. epruvetu s plavim čepom koja se uobičajeno koristi za koagulacijske pretrage.

#### 3.2. Opis uređaja

Automatizirana linija Sysmex XN-3100 na kojoj se provodila analiza tijekom izrade rada sastoji se od dva hematološka analizatora Sysmex XN-10 (Sysmex, Kobe, Japan; XN-10L i XN-10R), Sysmex SP-50 analizatora za izradu i bojanje razmaza periferne krvi, uređaja za uzorkovanje (SA-31, CF-70) i uređaja za digitalnu morfološku analizu Sysmex DI-60.

##### 3.2.1. Sysmex XN-10

Sysmex XN-10 je multi-parametarski hematološki analizator kojemu je glavna metoda rada optička metoda, tj. protočna citometrija (pogl. 1.3.2.). Kao uzorak se koristi puna venska ili kapilarna krv te ostale tjelesne tekućine i izlučevine.

Na analizatoru XN-10L omogućeno je mjerenje KKS s peterodijelnom diferencijalnom krvnom slikom, apsolutnog i relativnog broja eritroblasta i retikulocita, broja

trombocita, eritrocita i koncentracije hemoglobina optičkom metodom te broja trombocita fluorescentnom metodom u punoj krvi, a na XN-10R - KKS s peterodijelnom diferencijalnom krvnom slikom, apsolutni i relativni broj eritroblasta i retikulocita te broj trombocita, eritrocita i koncentracija hemoglobina optičkom metodom u punoj krvi. Dodatno, desni uređaj XN-10-R ima mogućnost rada u modelu tjelesne tekućine (engl. *Body Fluid Mode*; BF) na kojemu se analiziraju likvori i ostale tjelesne tekućine.

Hidrodinamičkim fokusiranjem (pogl. 1.3.2.) direktno se mjeri broj eritrocita (RBC) i trombocita (PLT), a istodobno se provodi izračun vrijednosti hematokrita (HCT) metodom detekcije kumulativnih eritrocitnih impulsa.

Jedna od metoda rada Sysmex XN-10 analizatora jest protočna citometrija (pogl. 1.3.2.). Njome se, primjenom poluvodičkog lasera, određuje broj leukocita, relativni i apsolutni broj leukocitnih subpopulacija, relativni i apsolutni broj eritroblasta, broj trombocita optičkom (PLT-O) i fluorescentnom metodom (PLT-F) i broj eritrocita optičkom metodom (RBC-O).

Program optimizacije rada trombocitopoeze (engl. *Thrombopoiesis Workflow Optimisation*; TWO) uključuje pravila na temelju kojih sustav, nakon što je na analizatorima Sysmex XN-10L ili XN-10R završeno mjerenje trombocita metodom impedancije, automatizirano, refleksno provodi analizu PLT-F na XN-10L. Trombociti se određuju fluorescentnom metodom ako je metodom impedancije određen broj trombocita manji od  $20 \times 10^9/L$ , ako postoji poruka na analizatoru da je uočena interferencija prilikom mjerenja trombocita impedancijskom metodom (engl. *PLT action message*). Nadalje, ako je određen broj trombocita impedancijskom metodom manji od  $150 \times 10^9/L$  u kombinaciji s porukom na analizatoru o prisutnosti gigantskih trombocita (engl. *Giant platelets*) i ako je dobiven nepouzdan rezultat MPV-a, tj. kada analizator ne izda rezultat MPV-a nakon prvog mjerenja analizatora. Potom, temeljem dobivenih rezultata, program TWO donosi odluku o rezultatu koji je točniji i koji se izdaje u nalazu, a u pravilu je to broj trombocita dobiven fluorescentnom metodom.

Nakon analize uzorka na Sysmex XN-10 analizatoru (tj. analizatorima), programska podrška Extended IPU, analizira rezultate svih parametara KKS-a na temelju prethodno definiranih i oblikovanih pravila za automatizirani način rada. Na temelju važećih kriterija za ponavljanje mjerenja, kriterija za izvođenje postupka DKS svjetlosnom mikroskopijom uz morfološku analizu stanica i kriterija za mikroskopsku provjeru trombocita, definirana su pravila u programskoj podršci analizatora Extended IPU. Kriteriji i pravila su definirani prema preporuci međunarodne dogovorne skupine za hematologiju (Barnes PW. i sur., 2005.).

Na temelju zadanih pravila, programska podrška Extended IPU automatizirano potvrđuje rezultate i prenosi ih u LIS (rezultati koji nisu „zahvaćeni“ niti jednim pravilom) ili ostavlja rezultate u mapi za pregled i za ručnu potvrdu od strane tehničkog osoblja (rezultati „zahvaćeni“ jednim ili više pravila). Pravila vezana uz pregled razmaza periferne krvi dodatno aktiviraju zahtjeve na uređaju DI-60.

### 3.2.2. Sysmex SP-50

Automatiziranom linijom uzorak, ukoliko odgovara Extended IPU pravilima mikroskopske provjere trombocita, dolazi do Sysmex SP-50 analizatora (Sysmex, Kobe, Japan; pogl. 3.2.2.) gdje se izrađuje razmaz periferne krvi tako što se tanki sloj krvi fiksira na stakalcu.

Analizator automatski priprema razmaze ljudske krvi s dodanim antikoagulansom. Ovisno o vrijednostima hematokrita dobivenih na hematološkom analizatoru, uređaj određuje volumen kapljice potrebne za pripremu razmaza, brzinu i kut pripravljanja razmaza. Zatim se razmaz suši te distribuira na bojanje (Rodak i sur., 2013.), gdje je moguće dvostruko bojanje otopinama May-Grünwald i Giemsa ili prvo Wrightovom pa Giemsa bojom ili jednostruko bojanje Wrightovom bojom. Metoda dvostrukog bojanja prvenstveno uključuje čišćenje pomoću razrjeđivača svih područja koja su u kontaktu s krvlju kojom je pripremljen prethodni razmaz. Uzorak se boji bojom broj 1, ispire vodom za ispiranje, boji bojom broj 2 i ponovno ispire. Uzorak se nakon sušenja može mikroskopski pregledati (Upute proizvođača Sysmex SP-50, 2019.). Takav razmaz je spreman za morfološku analizu. Morfološka analiza može biti ručna pomoću svjetlosnog mikroskopa ili digitalna analiza pomoću analizatora digitalne morfologije.

### 3.2.3. Sysmex DI-60

Analiza digitalne morfologije se provodi na Sysmex DI-60 analizatoru. Analizator provodi samoprovjeru prilikom pokretanja programske podrške. Umetanjem stakalca analizator čita identifikacijski broj naloga s naljepnice s crtičnim kodom na stakalcu. Putem identifikacijskog broja naloga analizator traži informacije o nalogu iz laboratorijskog informacijskog sustava. Robotska jedinica za hvatanje pomiče stakalce pod objektiv mikroskopa. Digitalni mikroskop koristi digitalnu kameru, koja je sposobna generirati slike leukocita, crvenih krvnih stanica i trombocita visoke razlučivosti. Analizator traži monosloj u razmazu te nakon što ga nađe, skenira ga „battlement“ (poprečni uzorak) metodom skeniranja. Usto, tijekom skeniranja analizator locira i leukocite. Također locira i sprema sliku dijela monosloja eritrocita te snima i sprema slike visoke kvalitete svakog lociranog leukocita.



Analizator pretklasificira svaki locirani leukocit i pretkarakterizira morfologiju eritrocita. Svi preliminarni rezultati, to jest, pretklasifikacije, prekarakterizacije i slike spremaju se u bazu podataka koji se potom analiziraju od strane laboratorijskog osoblja (Upute proizvođača Sysmex DI-60, 2018.).

### 3.3. Analiza uzoraka

Protokol rutinske analize KKS započinje analizom samih uzoraka na hematološkom uređaju XN-3100 koji je povezan s laboratorijskim informacijskim sustavom (LIS), potom je sukladno predefiniranim laboratorijskim pravilima indicirana mikroskopska provjera trombocita za pojedine uzorke. Pravila za selekciju pojedinih uzoraka koji se podvrgavaju daljnjoj mikroskopskoj analizi trombocita postavljena su u međuprogramu (engl. *Middleware*) Extended IPU, integriranoj komponenti XN-3100 analitičkog sustava, a ona glase:

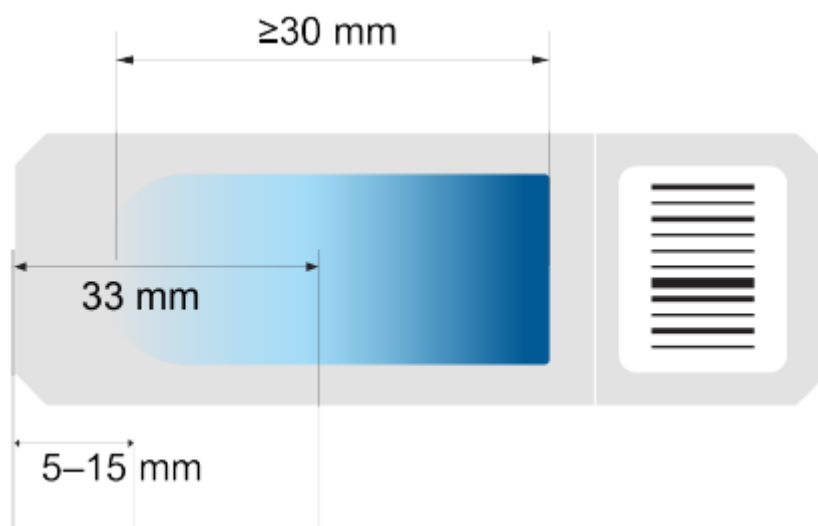
1. Ukoliko je broj trombocita niži od  $100 \times 10^9/L$  za odraslu populaciju (>18 godina) prvi put unatrag 90 dana, odnosno niži od  $150 \times 10^9/L$  za pedijatrijsku populaciju unatrag 30 dana, provodi se pregled razmaza periferne krvi.
2. Ukoliko je broj trombocita viši od  $450 \times 10^9/L$  prvi put unatrag 90 dana, provodi se pregled razmaza periferne krvi.
3. Ukoliko hematološki analizator izmjeri vrijednost MPV-a (pogl. 1.2.4.) nižu od 7 fL uz vrijednosti trombocita niže od  $150 \times 10^9/\mu L$  provodi se pregled razmaza periferne krvi.
4. Ukoliko je delta-provjera pozitivna, tj. razlika broja trombocita iznosi više od 50% unutar 90 dana i ranije vrijednosti su više od trenutnih, provodi se pregled razmaza periferne krvi.

Nadalje, ukoliko je zadovoljen jedan od prethodno navedenih kriterija za provjeru trombocita, automatiziranom metodom na Sysmex SP-50 uređaju napravljen je razmaz periferne krvi.

Ručna mikroskopija vrlo je zahtjevan analitički proces. Mikroskopski pregled se koristi za određivanje diferencijalne krvne slike kao metoda potvrde i provjere potonje te utvrđivanja morfoloških promjena krvnih stanica i broja trombocita s hematološkog analizatora. Prethodno se pripremljeni razmaz periferne krvi (pomoću Sysmex SP-50 uređaja) stavi pod najmanje povećanje (40x). Slika se, korištenjem makrovijka, pronade, a mikrovijkom izoštri. Potom se na stakalce razmaza kapne jedna do dvije kapi imerzijskog ulja, a mikroskop se podesi na najveće povećanje (1000x). Obojeni razmaz se pregledava u području tanjeg dijela

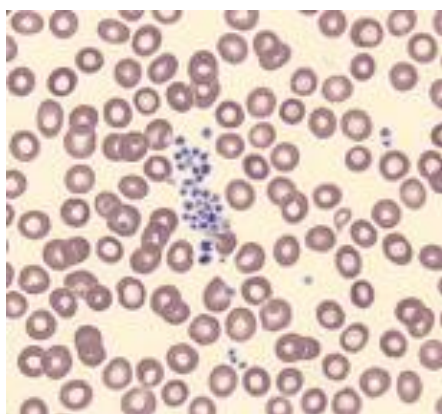
razmaza gdje su eritrociti u jednom sloju raspoređeni jedan do drugoga. Rutinskim pregledom razmaza periferne krvi svjetlosnim mikroskopom prvenstveno se pregledava brojnost leukocitne, eritrocitne i trombocitne skupine stanica, a zatim citomorfološke karakteristike svih staničnih populacija. Rezultati mikroskopske analize se usporede s porukama i signalima sa hematološkog analizatora.

U svrhu izrade ovog diplomskog rada, svaki pregled razmaza svjetlosnom mikroskopijom slijedio je pregled razmaza na uređaju Sysmex DI-60. Kada analizator obrađuje stakalce, obradu započinje 33 mm od ruba stakalca, stoga razmaz krvi mora biti dug najmanje 30 mm, mora završavati 5 do 15 mm od ruba i mora započeti u blizini označenog ili matiranog kraja stakalca čime bi trebalo doći do postupnog prijelaza u deblji bez pojave zrnatih potočića, korita, grebena, rupa ili mjehurića (Slika 10.). DI-60 analizator je optimiziran za analizu uzoraka obojenih May Grünwald Giemsa (MGG), Wrightovom ili Wright-Giemsa (Muto Pure chemicals, Tokyo, Japan) bojom (Upute proizvođača Sysmex DI-60, 2018.).

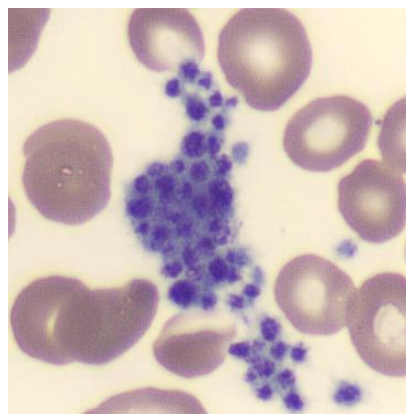


Slika 10. Prikaz područja pregleda razmaza periferne krvi na uređaju Sysmex DI-60 (Upute proizvođača Sysmex DI-60, 2018.)

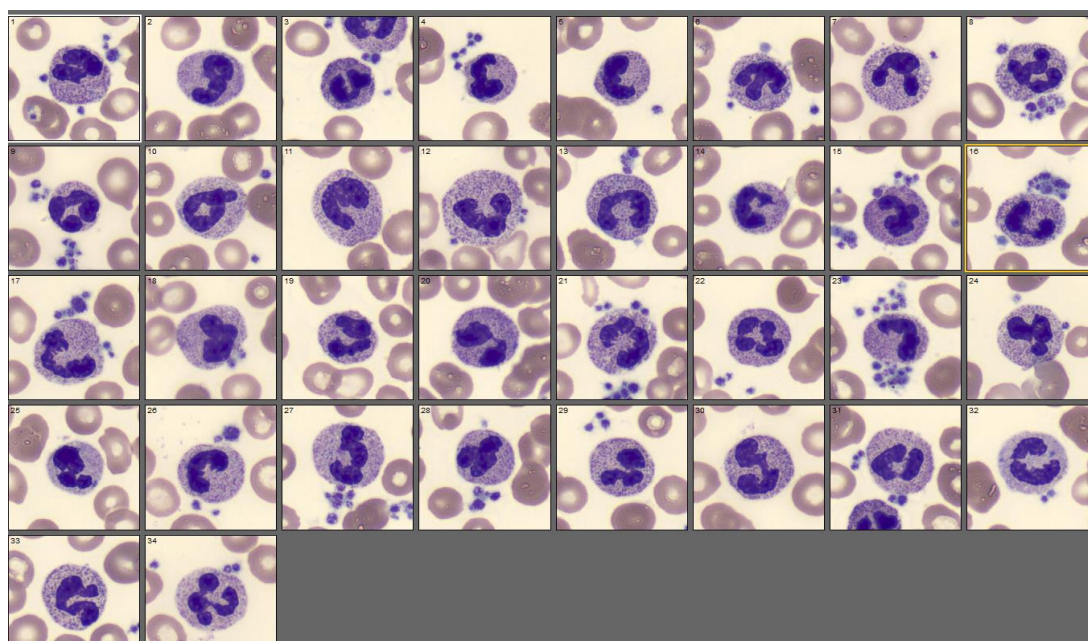
Ukoliko su razmazi periferne krvi zadovoljavajuće kvalitete, uređaj pretražuje i snima preglednu sliku monosloja eritrocita. Nakon toga slijedi lokalizacija leukocita te diferenciranje subpopulacija leukocita. Rezultati za pojedine stanične populacije pregledavaju se u pripadajućim podizbornicima (WBC – leukociti, RBC – eritrociti, PLT – trombociti). Za potrebe ovog ispitivanja, a u svrhu provjere prisutnosti nakupina trombocita u uzorcima, pregledana su sva tri navedena podizbornika. Nakupine trombocita su definirane kao mnogo trombocita koje nije moguće pojedinačno izbrojati. Slike 11.-13. prikazuju nakupine prisutne u razmazu periferne krvi vidljive u svakom pojedinom podizborniku.



Slika 11. Nakupine trombocita vidljive u eritrocitnom podizborniku analize digitalnom morfologijom na uređaju Sysmex DI-60



Slika 12. Nakupine trombocita vidljive u trombocitnom podizborniku analize digitalnom morfologijom na uređaju Sysmex DI-60



Slika 13. Nakupine trombocita vidljive u leukocitnom podizborniku analize digitalnom morfologijom na uređaju Sysmex DI-60

Ukoliko nije nađena nakupina trombocita ni u jednom od navedenih podizbornika, određen je broj trombocita Fonio metodom unutar podizbornika PLT na uređaju Sysmex DI-60. Određivanje broja trombocita Fonio metodom je provedeno tako što su trombociti brojani u svakom dijelu kvadratne rešetke pregledne slike posebno. Kvadratna rešetka se sastoji od 9

polja. Izbrojani broj trombocita u pojedinoj rešetci je unesen za svaku kvadratnu rešetku. Softverska podrška analizatora je, pomoću izbrojanih trombocita u pojedinoj rešetci i korekcijskog faktora (engl. *Platelet estimate factor*), procijenila broj trombocita u uzorku. Korekcijski faktor definiran je prilikom verifikacije uređaja i iznosi 12,4.

U svrhu procjene pouzdanosti provjere trombocita za svaki analizirani uzorak prikupljeni su sljedeći podaci: broj trombocita izmjeren na uređaju Sysmex XN-3100, prisutnost/oduststvo nakupina trombocita određenih svjetlosnom mikroskopijom te prisutnost/odsustvo nakupina trombocita digitalnom mikroskopijom na uređaju Sysmex DI-60 za sva tri podizbornika (WBC, RBC, PLT). Za uzorke kod kojih nisu nađene nakupine trombocita prikupljeni su podaci o procijenjenom broju trombocita određenih metodom po Fonio-u na uređaju Sysmex DI-60.

### 3.4. Statistička obrada

Statistička analiza je provedena u MedCalc statističkom programu, verzija 20.015 (MedCalc, Ostend, Belgija). Normalnost raspodjele podataka ispitana je Shapiro-Wilk testom, i rezultati su prikazani kao aritmetičke sredine i standardne devijacije u slučaju normalne raspodjele, odnosno kao medijani i interkvartilni rasponi, ako je utvrđeno odstupanje od normalne raspodjele (Razali i Yap, 2011.).

Za usporedbu prisutnosti i odsutnosti nakupina trombocita, pregledom razmaza periferne krvi svjetlosnom mikroskopijom i digitalnom mikroskopijom na uređaju Sysmex DI-60, primijenjena je metoda međusobnog slaganja rezultata (engl. *Inter-rater agreement*) te je izračunat Cohenov kappa koeficijent ( $\kappa$ ). Usporedba je provedena za sva tri podizbornika (WBC, PLT, RBC) na uređaju Sysmex DI-60. Ovom se metodom ispituje međusobno slaganje rezultata, odnosno jednaka kategorizacija (McHugh, 2012.). Prema prikazanoj tablici 3., svaki kappa koeficijent manji od 0.6 ukazuje na nezadovoljavajuće slaganje rezultata.

Tablica 3. Tumačenje Cohenov kappa ( $\kappa$ ) koeficijenta (Topić i sur, 2018.)

Vrijednost kappa koeficijenta	Stupanj slaganja	Postotak podudarnih rezultata
0-0,20	Nema slaganja	0-4%
0,21-0,40	Minimalno	4-15%
0,41-0,59	Slabo	15-35%
0,60-0,79	Umjereno	35-63%
0,80-0,90	Snažno	64-81%
0,90-1,00	Izvršno	82-100%

Za određivanje postojanja statistički značajne razlike u otkrivanju prisutnosti nakupina trombocita među pojedinim metodama i ovisno o korištenom podizborniku unutar Sysmex DI-60, provedena je analiza Hi-kvadrat testom. Ako je P vrijednost manja od 0,05, rezultat se smatra statistički značajnim.

Pregled razmaza periferne krvi svjetlosnom mikroskopijom i rezultati dobiveni pomoću Sysmex XN-3100 uređaja smatrani su zlatnim standardom za svaku usporedbu. Kvantitativno su analizirani i uspoređeni podaci dobiveni određivanjem broja trombocita Fonio metodom s rezultatima dobivenima automatiziranom metodom na uređaju Sysmex XN-3100.

Korelacija broja trombocita određenih na hematološkom analizatoru Sysmex XN-3100 i onoga izbrojenoga metodom po Fonio-u na uređaju Sysmex DI-60 ispitana je pomoću Spearmanovog koeficijenta korelacije ( $\rho$ ).

Korelacija je stupanj slaganja ili podudarnosti dviju varijabli. Raspon koeficijenta korelacije ( $r$ ) je od -1 (savršena negativna povezanost) do 1 (savršena pozitivna povezanost), gdje 0 označava nepostojanje linearne povezanosti (Tablica 4.). Ako se jedna varijabla povećava istovremenim povećavanjem druge, korelacija će biti pozitivna, a ako se jedna varijabla smanjuje dok se druga povećava, korelacija će biti negativna. Koeficijent korelacije može se interpretirati jedino ukoliko je P statistički značajan. Pogrešno je interpretirati koeficijent korelacije uz P-vrijednost veću od 0,05 (Schober i sur., 2018., Topić i sur., 2018.; Yue i sur., 2002.)

Tablica 4. Tumačenje koeficijenta korelacije (Udovičić i sur., 2007.)

Koeficijent korelacije (r)	Razina korelacije
0 do $\pm 0,25$	nema povezanosti
$\pm 0,026$ do $\pm 0,50$	slaba povezanost
$\pm 0,51$ do $\pm 0,75$	umjerena do dobra povezanost
$\pm 0,76$ do $\pm 1$	vrlo dobra do izvrsna povezanost
$\pm 1$	savršena pozitivna/negativna povezanost

U svrhu usporedbe rezultata broja trombocita određenih automatiziranom metodom na uređaju Sysmex XN-3100 s ručnom metodom brojanja po Fonio-u korištene su Passing-Bablok regresija i Bland-Altman analiza.

Passing-Bablok regresijskom analizom ispituje se razlika rezultata dobivenih dvjema metodama. Dijagramom raspršenja, regresijskim pravcem i pripadajućom regresijskom jednadžbom se prikazuju rezultati. Iz jednadžbe se iščitavaju nagib i odsječak na y-osi te im se pridružuje interval pouzdanosti koji predstavlja raspon vrijednosti unutar kojih se s određenom sigurnošću nalazi mjereni parametar. Najčešće se koristi 95%-tni interval pouzdanosti. Pomoću intervala pouzdanosti moguće je odrediti konstantne ili proporcionalne pogreške između metoda. Konstantno odstupanje predstavlja otklon između metoda koji je jednak u svim koncentracijskim područjima i odgovara iznosu odsječka na osi y. Temeljem 95% intervala pouzdanosti pridruženog odsječku na y-osi možemo donijeti zaključak postoji li konstantno odstupanje. Ukoliko ne obuhvaća vrijednost 0 (obje granice intervala su ili manje ili veće od 0), postoji statistički značajno konstantno odstupanje između metoda. Proporcionalno odstupanje predstavlja otklon između metoda koji je ovisan o veličini koncentracijskog područja i odgovara koeficijentu smjera pravca, tj. tangensu kuta što ga pravac zatvara s osi x ( $b = \text{tg}(\alpha)$ ). Procjenom 95%-tnog intervala pouzdanosti pridruženog koeficijentu smjera pravca određuje se prisutnost proporcionalnog odstupanja. Ukoliko ne obuhvaća vrijednost 1 (obje granice intervala su ili manje ili veće od 1), postoji statistički značajno proporcionalno odstupanje između metoda (Bilic-Zulle, 2011.; Giavarina, 2015.; Topić i sur, 2018.).

Bland-Altman analiza se vrlo često koristi za procjenu slaganja između dviju kvantitativnih metoda mjerenja. Analiza dijagrama je jednostavan način za procjenu odstupanja srednjih razlika. Podaci se mogu analizirati i kao dijagram jediničnih razlika i kao dijagram postotne razlike. Dijagram raspršenja je graf u kojem na y-osi se prikazuje razlika

dvaju uparenih mjerenja (A-B), dok je na x-osi prikazan prosjek tih mjera  $((A+B)/2$ ; Giavarina, 2015.).

U idealnoj situaciji, kada bi metode bile potpuno podudarne, razlika između mjerenja ne bi postojala. Slično kao i kod ostalih analiza, ukoliko granice intervala pouzdanosti obuhvaćaju vrijednost 0, možemo zaključiti da nema konstantne razlike između dva mjerenja. Suprotno, ako su obje granice srednje razlike veće ili manje od nula, postoji statistički značajna razlika između mjerenja. Prilikom izračuna srednje vrijednosti razlike izračunavamo i vrijednost standardne devijacije razlikā (s). Većina dobivenih razlika mjerenja pomoću dvije metode trebala bi biti raspoređena između  $D \pm 2s$ . Ove granice predstavljaju granice prihvatljivosti (engl. *Limits of agreement*, LOA) - donja granica  $D - 2s$ , a gornja  $D + 2s$ . Procjena udjela vrijednosti unutar ovih granica govori nam o podudarnosti između metoda. Što je raspon između granica prihvatljivosti uži, podudarnost dviju metoda je bolja, i obratno, širok raspon ukazuje na lošije slaganje između metoda (Topić i sur, 2018.).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Rezultati

#### 4.1.1. Usporedba prisutnosti nakupina trombocita svjetlosnom mikroskopijom i digitalnom mikroskopijom na uređaju Sysmex DI-60

Rezultati usporedbe prisutnosti nakupina trombocita svjetlosnom mikroskopijom i digitalnom mikroskopijom na uređaju Sysmex DI-60 u leukocitnom, eritrocitnom i trombocitnom podizborniku prikazani su u Tablicama 5, 6 i 7. Slaganje rezultata dobivenih svjetlosnom mikroskopijom i pregledom leukocitnog i eritrocitnog podizbornika je 368/389 (94,6%), što odgovara vrlo visokom slaganju rezultata. U trombocitnom podizborniku slaganje rezultata je također vrlo visoko te iznosi 367/389 (94,3%). Na Sysmex DI-60 analizatoru u leukocitnom podizborniku uočeno je 17 lažno negativnih rezultata, dok je u eritrocitnom i trombocitnom uočeno njih 15. Lažno pozitivni rezultati pronađeni su u leukocitnom (4), eritrocitnom (6) i trombocitnom (7) podizborniku. Kappa ( $\kappa$ ) koeficijent leukocitnog podizbornika iznosi 0,60. Nadalje, K vrijednost eritrocitnog (0,62) i trombocitnog (0,63) podizbornika također ukazuje na umjeren stupanj slaganja rezultata.

Tablica 5. Slaganje utvrđivanja prisutnosti nakupina trombocita svjetlosnom mikroskopijom i digitalnom mikroskopijom u leukocitnom podizborniku

	Leukocitni podizbornik na uređaju Sysmex DI-60			
Svjetlosna mikroskopija		Nema nakupina trombocita	Prisutne nakupine trombocita	Ukupno
	Nema nakupina trombocita	350	4	354 (91,0%)
	Prisutne nakupine trombocita	17	18	35 (9,0%)
Ukupno		367 (94,3%)	22 (5,7%)	389
Kappa koeficijent (95% CI)	0,60 (0,45 – 0,76)			

Interval pouzdanosti (engl. *Confidence interval*; CI)



Tablica 6. Slaganje utvrđivanja prisutnosti nakupina trombocita svjetlosnom mikroskopijom i digitalnom mikroskopijom u eritrocitnom podizborniku

	Eritrocitni podizbornik na uređaju Sysmex DI-60			
Svjetlosna mikroskopija		Nema nakupina trombocita	Prisutne nakupine trombocita	Ukupno
	Nema nakupina trombocita	348	6	354 (91,0%)
	Prisutne nakupine trombocita	15	20	35 (9,0%)
Ukupno		363 (93,3%)	26 (6,7%)	389
Kappa koeficijent (95% CI)	0,63 (0,48 – 0,77)			

Interval pouzdanosti (engl. *Confidence interval*; CI)

Tablica 7. Slaganje utvrđivanja prisutnosti nakupina trombocita svjetlosnom mikroskopijom i digitalnom mikroskopijom u trombocitnom podizborniku

	Trombocitni podizbornik na uređaju Sysmex DI-60			
Svjetlosna mikroskopija		Nema nakupina trombocita	Prisutne nakupine trombocita	Ukupno
	Nema nakupina trombocita	347	7	354 (91,0%)
	Prisutne nakupine trombocita	15	20	35 (9,0%)
Ukupno		362 (93,1%)	27 (6,9%)	389
Kappa koeficijent (95% CI)	0,62 (0,47 – 0,76)			

Interval pouzdanosti (engl. *Confidence interval*; CI)

Hi-kvadrat testom (pogl. 3.4.) utvrđeno je da nema statistički značajne razlike u otkrivanju nakupina trombocita između svjetlosne mikroskopije i Sysmex DI-60 metode, kao ni između pojedinih podizbornika navedenog uređaja (P=0,323; Tablica 8).

Tablica 8. Rezultati Hi-kvadrat analize

	Leukociti	Eritrociti	Trombociti	Svjetlosna mikroskopija	P-vrijednost
N (nakupine)	22	26	27	35	0,32
N (bez nakupina)	367	363	362	354	

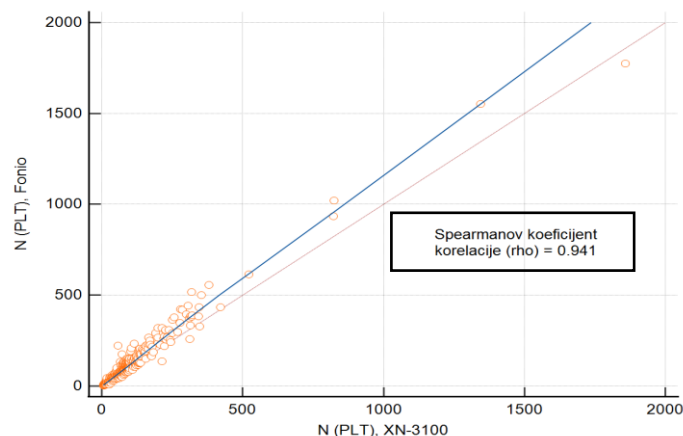
#### 4.1.2. Usporedba broja trombocita

Uspoređeno je 364 uzoraka Fonio i Sysmex XN-3100 metodom određivanja broja trombocita. Služeći se Spearmanovom rang korelacijom (pogl. 3.4.), dobivena je vrijednost u iznosu od 0,94 s 95%-tnim intervalom pouzdanosti od 0,93 do 0,95 (Tablica 9). Na osnovu dobivene korelacije, može se zaključiti da se radi o izvrsnom slaganju dviju uspoređivanih metoda. Raspon broja trombocita u uspoređenim uzorcima obuhvaćao je broj trombocita od 3 do 1859 x 10<sup>9</sup>/L. Iz grafičkog prikaza korelacije Fonio i Sysmex XN-3100 metode (Graf 1.) vidljivo je da analizirani uzorci nisu ravnomjerno distribuirani po cijelom mjernom području, već je učestaliji broj uzoraka s brojem trombocita u nižem mjernom području.

Tablica 9. Korelacija broja trombocita dobivena na uređaju Sysmex XN-3100 i metodom po Fonio-u na uređaju Sysmex DI-60

Broj trombocita (Sysmex XN-3100), x10 <sup>9</sup> /L	Broj trombocita (Fonio), x10 <sup>9</sup> /L	ρ 0,941 (95% CI: 0,93 - 0,95)
Medijan 87 ( IQR: 81 – 90 )	Medijan 100 ( IQR: 93 – 107 )	

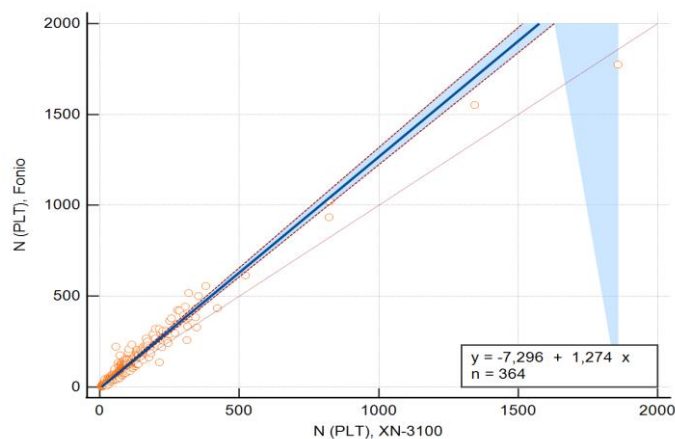
Interkvartilni raspon (engl. *Interquartile range*; IQR); Interval pouzdanosti (engl. *Confidence interval*; CI)



Graf 1. Grafički prikaz korelacije Fonio i Sysmex XN-3100 metode

Passing – Bablok regresijom (pogl. 3.4.) dobiven je pravac regresije  $y = -7,30$  (95% CI: od -10,50 do -4,40) +  $1,27$  (95% CI: od 1,23 do 1,32)  $x$  (Graf 2.). Odsječak na osi y pomoću kojeg se procjenjuje konstantno odstupanje iznosi -7,30 (95% CI: -10,50 do -4,40). S obzirom da 95% interval pouzdanosti ne obuhvaća nulu, možemo zaključiti da postoji statistički značajno konstantno odstupanje Fonio i Sysmex XN-3100 metoda. Rezultat dobiven regresijskom jednadžbom za nagib pravca iznosi 1,27 (95% CI: 1,23 do 1,32). 95% interval pouzdanosti za nagib pravca ne obuhvaća vrijednost jedan. Temeljem toga zaključujemo da postoji statistički značajno proporcionalno odstupanje Fonio i Sysmex XN-3100 metoda.

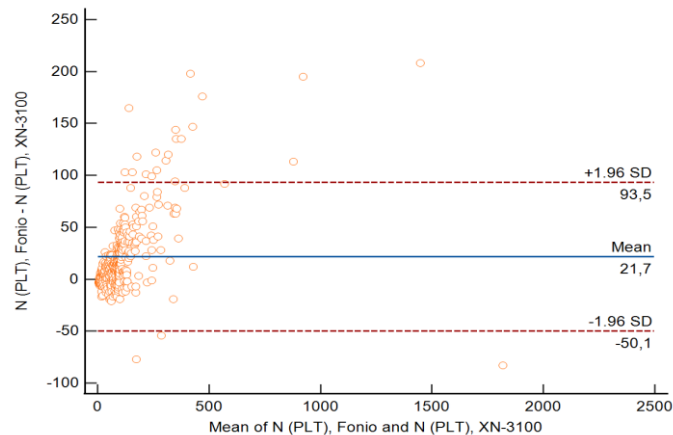
Cusumov test linearnosti, nakon upotrebe Passing-Bablok regresijske metode, koji se koristi za procjenu valjanosti linearnog modela, pokazao je da nema značajnog odstupanja u linearnom odnosu između mjerenja broja trombocita Fonio i Sysmex XN-3100 metodama, čime je zadovoljen uvjet korištenja Passing-Bablok regresijske metode ( $P = 0,11$ ;  $P > 0,05$ )



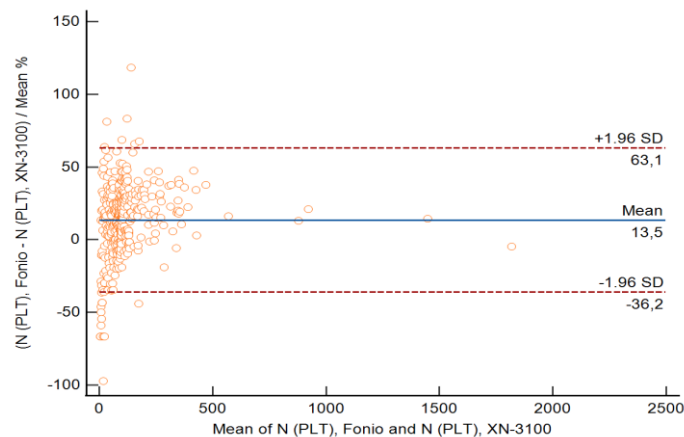
Graf 2. Prikaz Passing-Bablok regresijske analize usporedbe Fonio i Sysmex XN-3100 metode

Bland-Altmanova analiza (pogl. 3.4.) prikazana je kao apsolutna (Graf 3.) i relativna razlika (Graf 4.). Na y- osi se nalazi razlika dviju mjerenih metoda u ovom slučaju Fonio i Sysmex XN-3100 metode, a na x- osi se nalazi srednja vrijednost razlike mjerenja tim dvjema metodama. Srednja razlika uspoređenih metoda iznosi 21,7, odnosno 13,5%, uz pripadajuće 95%-tne intervale pouzdanosti koji iznose 17,94 – 25,49, odnosno 10,85% - 16,07%. S obzirom da 95% interval pouzdanosti apsolutne i relativne razlike ne obuhvaća nulu, možemo zaključiti da postoji statistički značajno konstantno i proporcionalno odstupanje (pogl. 3.4.) između uspoređenih Fonio i Sysmex XN-3100 metoda. Drugim riječima, Fonio metoda mjeri vrijednosti za 21,7 veće nego Sysmex XN-3100 metoda. U području manjeg broja izmjerenih

trombocita (ispod vrijednosti od  $200 \times 10^9/L$  trombocita) postoji bolje slaganje metoda jer su vrijednosti bliže jedna drugoj.



Graf 3. Prikaz rezultata Bland Altman analize usporedbe Fonio i Sysmex XN-3100 metode; x-os je srednja vrijednost mjerenja dviju metoda, a y-os je srednja vrijednost razlike mjerenja u apsolutnom obliku



Graf 4. Prikaz rezultata Bland Altman analize usporedbe Fonio i Sysmex XN-3100 metode u postotcima; x-os je srednja vrijednost mjerenja dviju metoda, a y-os je srednja vrijednost razlike mjerenja u postotnom obliku

#### 4.2. Rasprava

Laboratorijski nalazi su od velikog značaja liječniku prilikom diferencijalne dijagnostike, kako bi mogao što prije reagirati u kritičnim slučajevima, posljedično postaviti pravilnu dijagnozu ili uputiti bolesnika na daljnje pretrage. Stoga je odgovornost magistra ili specijalista medicinske biokemije izdati pouzdan i točan nalaz svih parametara. U ovom diplomskom radu se govori o važnosti prisutnosti nakupina trombocita u uzorku i važnosti izdavanja točnog broja trombocita.

Kako bi se ubrzao i unaprijedio način određivanja trombocita tijekom niza godina razvijane su brojne automatizirane metode određivanja broja trombocita (pogl. 1.3.), a one su: metoda impedancije (pogl. 1.3.1.), optička metoda (pogl. 1.3.2.) i imunološka metoda (pogl. 1.3.3.). Zlatni standard određivanja prisutnosti nakupina trombocita je svjetlosna mikroskopija (pogl. 3.3.). Prvi cilj ovog diplomskog rada je bio provedba provjere rada Sysmex DI-60 analizatora radi kompletnog verifikacijskog izvještaja. Drugi cilj ovog diplomskog rada je ostvariti stručni doprinos u području hematologije, točnije pouzdanosti provjere trombocita na Sysmex DI-60 analizatoru. Stoga je u ovom diplomskom radu ispitana pouzdanost provjere trombocita digitalnom morfologijom na Sysmex DI-60 analizatoru (pogl. 3.2.3.). Provjera trombocita je od izrazite važnosti kako bi se izdala točna i pouzdana vrijednost trombocita te pravovremeno uočila morfološka promjena ili/i promjena broja trombocita u analiziranom uzorku. Također, uvođenjem automatizirane provjere trombocita omogućila bi se standardizacija i harmonizacija ovog dijela rada u hematološkom laboratoriju.

Pouzdanost je ispitana usporedbom prisutnosti nakupina trombocita u podizbornicima (WBC, RBC, PLT; Slika 6.,11.,12.,13.) Sysmex DI-60 analizatora sa prisutnošću nakupina trombocita svjetlosnom mikroskopijom. Također, uspoređen je broj trombocita dobiven mjerenjem na Sysmex XN-3100 analizatoru i broj trombocita dobiven Fonio metodom (Tablica 9.; pogl. 4.2.). Statističkom obradom prikupljenih podataka usporedbe prisutnosti nakupina u podizbornicima (WBC, RBC, PLT) Sysmex DI-60 analizatora sa prisutnošću nakupina svjetlosnom mikroskopijom pokazano je vrlo visoko slaganje rezultata s određenim brojem neslaganja između dviju uspoređenih metoda (Tablica 5., 6., 7. i 8.). Razlika je prisutna u otprilike 5% ukupnih uzoraka. Približno 3-4% njih čine uzorci gdje Sysmex DI-60 detektira nakupine trombocita koja mikroskopski nije uočena, a otprilike 1-2% čine oni gdje Sysmex ne detektira nakupine trombocita potvrđene mikroskopskom analizom. Drugim riječima, ne postoji velika razlika rezultata tih dviju metoda.

Nadalje, nije uočena statistički značajna razlika u otkrivanju nakupina trombocita između pojedinih podizbornika navedenog uređaja. Rezultat Hi-kvadrat testa (Tablica 8.) ukazuje da je P-vrijednost 0,32. Znajući da P-vrijednost manja od 0,05 upućuje na postojanje statistički značajne razlike između metoda, možemo zaključiti da ne postoji statistički značajna razlika između određivanja nakupina trombocita automatiziranom Sysmex DI-60 metodom i same mikroskopske metode.

Temeljem koeficijenta korelacije zaključujemo da je korelacija Fonio i Sysmex XN-3100 metoda blizu vrijednosti 1, tj. da su rezultati dobiveni ovim dvjema metodama blizu

100%-nog poklapanja. Drugim riječima, to upućuje na snažnu linearnu korelaciju, tj. matematičku povezanost dviju metoda.

Passing-Bablok regresijskom analizom usporedbe Fonio i Sysmex XN-3100 metoda zaključujemo da postoji manje proporcionalno i konstantno odstupanje između rezultata dobivenih ovim dvjema metodama. Temeljem toga utvrđujemo da su metode podudarne s manjim odstupanjem.

Provedenim testom linearnosti (Cusumov test) uviđamo da nema značajnog odstupanja od iste jer P-vrijednost iznosi 0,11.

Tumačenjem 95%-nog intervala pouzdanosti obaju Bland Altman grafova koji ne obuhvaćaju vrijednost nula uviđamo da postoji statistički značajno odstupanje između uspoređenih Fonio i Sysmex XN-3100 metoda. Grafovi s apsolutnim i postotnim vrijednostima (Graf 3. i 4.) ukazuju da postoji konstantno i proporcionalno odstupanje koje iznosi 21,7, tj. 13,5%. Iako je procjena broja trombocita pomoću Fonio metode pokazala vrlo visoku korelaciju s rezultatima dobivenim sa Sysmex XN-3100, prema vrijednosti aritmetičke sredine uočavamo da metodom po Fonio-u mjerimo vrijednosti za 21,7, tj. za 13,5% (sa standardnom devijacijom 1,96) više nego automatskom metodom na uređaju Sysmex XN-3100. Nadalje, kod nižih vrijednosti izmjerenih trombocita uviđamo bolje slaganje dviju uspoređenih metoda, a kod viših vrijednosti uviđamo manje slaganje metoda.

Uočene razlike između određivanja broja trombocita Fonio i Sysmex XN-3100 metodom su očekivane jer je Fonio samo aproksimativna, a samim time i neprecizna metoda određivanja broja trombocita.

Također, uočena konstantna i proporcionalna odstupanja moraju biti i klinički značajna kako bi se metode proglasile neusporedivima. Stoga je prije provođenja postupka usporedbe metoda neophodno odabrati klinički relevantne kriterije prihvatljivosti prilagođene za svaki pojedini parametar. Tek ukoliko je ustanovljeno odstupanje veće od klinički relevantnog kriterija možemo reći da metode nisu usporedive (Topić i sur., 2018.). Stoga bi bilo poželjno u budućim istraživanjima usporediti dobivena odstupanja s kriterijima biološke varijancije kako bismo dobili uvid u klinički značaj samih odstupanja.

Svi dobiveni rezultati pokazuju da je podudarnost metoda provjere broja i postojanja nakupina trombocita zadovoljavajuća što ide u prilog dosadašnjim studijama provedenim na CellaVision™ DM96 (CellaVision AB, Švedska) i DI-60 analizatorima.

Provedena istraživanja pokazuju da, kada se razmaz periferne krvi analizira sa CellaVision™ DM96 sustavom, automatizirane procjene broja trombocita su pouzdano točne. Prva studija je analizirala 127 razmaza periferne krvi pomoću ručne mikroskopije,

automatiziranog hematološkog analizatora i CellaVision™ DM96 tehnologije. Pokazali su da je ukupna izvedba sustava CellaVision™ DM96 za broj trombocita bila slična kod automatskog hematološkog analizatora i ručne procjene trombocita. Bland-Altmanova analiza nije pokazala sustavnu pogrešku (Gao i sur., 2013.).

Istraživanje provedeno na pedijatrijskoj populaciji pokazalo je da je potrebno pažljivo pregledavati razmaze periferne krvi u slučaju trombocitopenije ili kod alarmantnog broja nakupina trombocita na rutinskom analizatoru, jer su nakupine trombocita koncentrirane zajedno s fibrinskim nitima. Budući da digitalna morfologija odabire ograničeno područje unutar razmaza koje korisnik ne može promijeniti, veliku većinu nakupina trombocita zajedno s fibrinom digitalna morfologija ne klasificira kao 'trombocitne nakupine', osim ako su prisutni u velikom broju u razmazu ili ako ih korisnik prepozna u eritrocitnom podizborniku. Stoga se digitalna morfologija ne može koristiti za ovu vrstu selektivnog probira prema Bitencourt i sur. iz 2013. godine.

Treća studija je pokazala da se osjetljivost CellaVision™ DM96 za otkrivanje nakupina trombocita može povećati na 82,8% pregledom cijelog WBC-podizbornika i cijelog PLT-podizbornika. Mikroskopski pregled razmaza periferne krvi, kada se pregleda rub i čitljivo područje razmaza, daje stopu detekcije nakupina trombocita od 99,0% prema Gulati i suradnici iz 2014. godine.

Također, prema istraživanju Yoon i sur. iz 2019. godine, potrebno je veće povećanje ili razlučivost CellaVisiona za ručno otkrivanje malarije jer je primjerice, zbog ograničene rezolucije, razlikovanje malarije od trombocita vrlo teško.

Iako je korištenje mikroskopa zlatni standard za ispitivanje stanica periferne krvi, ima niz ograničenja uključujući zamor osoblja zbog ručne provedbe metode; nedostatak sposobnosti uspoređivanja stanica; subjektivnost procjene i značajnu varijaciju među osobljem; kao i nemogućnost usporedbe s prethodnim nalazima istog bolesnika. Ograničenja svjetlosne mikroskopije također uključuju previđanje malignih poremećaja, osobito ako se maligne stanice pojavljuju u malom broju (VanVranken i sur., 2014.).

Brojne su prednosti korištenja CellaVision™ DM96 tehnologije u odnosu na korištenje svjetlosnog mikroskopa. Tehnologija digitalnih slika može olakšati proces rada u rutinskom hematološkom laboratoriju hematologiji uključujući: pregled rezultata i rada analizatora s udaljenih mjesta, istodobni prikaz svih stanica kako bi se ispravno identificirale specifične stanice, poboljšanje edukacije, smanjenje vjerojatnost slučajne pogreške, dosljednost rezultata pacijenata, upućivanje na promijenjene stanice i korištenje arhiviranih slika za kontrolu kvalitete i procjenu međulaboratorijske usporedivosti. Još jedna prednost

digitalnih morfoloških analizatora je lako čuvanje snimljenih stanica i naknadno pregledavanje istih ukoliko je potrebno savjetovanje s kolegama (Kratz, 2019.). CellaVision™ DM96 nudi kvalitetne slike koje se mogu povećavati, uspoređivati jedna pored druge, pretvarati u slikovni (.jpeg) format. Stvorena baza podataka može se koristiti u edukativne svrhe budućih laboratorijskih djelatnika kako bi se pokazala rijetka i specifična stanja (VanVranken i sur., 2014.; Kratz, 2019.; Kim, 2018.).

Prednosti korištenja CellaVision™ DM96 koje su ispitanici ocijenili najbitnijima uključuju: smanjeno naprezanje očiju, smanjen umor, i prednosti u edukaciji laboratorijskog osoblja (VanVranken i sur., 2014.).

S druge strane, ispitanici su ukazali i na poneka značajna ograničenja kao što je ograničenje točne procjene trombocita i morfologije crvenih krvnih zrnaca. Softver za digitalnu sliku trenutno se koristi u predkliničkoj i kliničkoj hematologiji te potencijalno nudi dodatne opcije (VanVranken i sur., 2014.). Nadalje, nedostatak provjere broja trombocita Sysmex DI-60 analizatorom je što njegova izvedba uvelike ovisi o kvaliteti razmaza periferne krvi i/ili boje koja se koristi za točnu identifikaciju stanica. Također, nedostatak je i vrijeme analize jer, iako je automatizirana metoda, Sysmex DI-60 poslijeanalitički zahtjeva ručnu korekciju rezultata zbog čega sama analiza (zasada) dulje traje.



## 5. ZAKLJUČAK

Usporedbom prisutnosti nakupina trombocita svjetlosnom mikroskopijom i digitalnom mikroskopijom na uređaju Sysmex DI-60 i usporedbom broja trombocita određenih Fonio metodom i na Sysmex XN-3100 analizatoru može se zaključiti sljedeće:

- Provjera prisutnosti nakupina pregledom svih podizbornika Sysmex DI-60 analizatora pokazala je zadovoljavajuće slaganje i jednaku procjenu u odnosu na rezultate dobivene svjetlosnom mikroskopijom za najveći broj (94,47%) uzoraka
- Razilaženja u otkrivanju nakupina trombocita dvjema uspoređenim metodama utvrđena su u do 5% uzoraka
- Nije utvrđena statistički značajna razlika provjere nakupina između pojedinih (WBC, RBC, PLT) podizbornika Sysmex DI-60 analizatora ( $P = 0,32$ )
- Fonio i Sysmex XN-3100 metode određivanja broja trombocita su pokazale gotovo 100%-no slaganje dobivenih vrijednosti
- Utvrđeno je manje konstantno i proporcionalno odstupanje u određivanju broja trombocita Fonio metodom i automatiziranim brojanjem na hematološkom analizatoru Sysmex XN-3100
- Metodom po Fonio-u utvrđeno je da su vrijednosti za 21,7 više nego vrijednosti broja trombocita dobivene na Sysmex XN-3100
- Pokazano je bolje slaganje broja trombocita izmjereno kod nižih vrijednosti nego kod viših vrijednosti
- Sysmex DI-60 je pouzdan analizator koji se može uvesti u rutinski rad hematološkog laboratorija za provjeru nakupina trombocita i određivanje broja trombocita
- Za dvojbene slučajeve preporuča se dodatna provjera nakupina trombocita svjetlosnim mikroskopom

## 6. LITERATURA

1. Bacus, J.W., Watt, S. and Trobaugh, F.E. Clinical Evaluation of a New Electrical Impedance Instrument for Counting Platelets in Whole Blood. *American Journal of Clinical Pathology*, 1980., 73(5), 655–663.
2. Barnes PW, McFadden SL, Machin SJ, Simson E. The International Consensus Group for Hematology Review: Suggested Criteria for Action Following Automated CBC and WBC Differential Analysis. *Lab Hematol*, 2005., 11, 83-90.
3. Bilic-Zulle, L. Comparison of methods: Passing and Bablok regression. *Biochemia Medica*, 2011., 49–52.
4. Bitencourt, E. D. D. S. D., Voegeli, C. F., Onzi, G. D. S., Boscato, S. C., Ghem, C., & Munhoz, T. Validation of the Sysmex sp-1000i automated slide preparer-stainer in a clinical laboratory. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 2013., 35, 404-408.
5. Brereton, M., McCafferty, R., Marsden, K., Kawai, Y., Ezzell, J., Ermens, A., ... & Nordin, G. Recommendation for standardization of haematology reporting units used in the extended blood count. *International Journal of Laboratory Hematology*, 2016. 38(5), 472-482.
6. Briggs, C., Harrison, P. and Machin, S.J. Continuing developments with the automated platelet count. *International Journal of Laboratory Hematology*, 2007., 29(2), 77–91.
7. Gao, Y., Mansoor, A., Wood, B., Nelson, H., Higa, D., & Naugler, C. Platelet count estimation using the CellaVision DM96 system. *Journal of pathology informatics*, 2013., 4, 16.
8. Casonato, A., Bertomoro, A., Pontara, E., Dannhauser, D., Lazzaro, A. R., & Girolami, A. EDTA dependent pseudothrombocytopenia caused by antibodies against the cytoadhesive receptor of platelet gpIIB-IIIa. *Journal of clinical pathology*, 1994., 47(7), 625–630.; <https://doi.org/10.1136/jcp.47.7.625>
9. Giavarina, D. Understanding Bland Altman analysis. *Biochemia Medica*, 2015., 25(2), 141–151.
10. Clinical Laboratory Diagnostics, 2020., <https://www.clinical-laboratory-diagnostics-2020.com/> , pristupljeno 24.02.2022.
11. Gulati, G., Uppal, G., Florea, A. D., & Gong, J. Detection of Platelet Clumps on Peripheral Blood Smears by CellaVision DM96 System and Microscopic Review. *Laboratory medicine*, 2014., 45(4), 368–371.

12. Čvorišćec D, Flegar-Meštrić Z, Harmonizacija općih pretraga iz područja opće medicinske-biokemije. Medicinska naklada, Zagreb, 2004., str. 9-11.
13. Giant platelets in hereditary macrothrombocytopenia, 2022., <https://www.uptodate.com/contents/image/print?imageKey=HEME%2F72433>, pristupljeno 19.02.2022
14. George-Gay, B. and Parker, K. Understanding the complete blood count with differential. *Journal of PeriAnesthesia Nursing*, 2003., 18(2), 96–117.
15. Graham, M. The Coulter principle: foundation of an industry. *Journal of the Association for Laboratory Automation*, 2003., 8(6), 72–81.
16. Gulati, G., Song, J., Dulau Florea, A. and Gong, J. Purpose and Criteria for Blood Smear Scan, Blood Smear Examination, and Blood Smear Review. *Annals of Laboratory Medicine*, 2013., 33(1).
17. Hematology: Clinical Principles and Applications, 2013., [https://books.google.hr/books?hl=hr&lr=&id=-tHsAwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=hematology+rodak&ots=ePNR-yRFJJ&sig=6qbIcE1HN0TZ7mC-ZSJt-V51C2M&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=true](https://books.google.hr/books?hl=hr&lr=&id=-tHsAwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=hematology+rodak&ots=ePNR-yRFJJ&sig=6qbIcE1HN0TZ7mC-ZSJt-V51C2M&redir_esc=y#v=onepage&q&f=true), pristupljeno 30. 12. 2021.
18. How Does a Flow Cytometer Work?, <https://www.bio-rad.com/featured/en/flow-cytometer.html>, pristupljeno 30.3.2022.
19. Hrvatsko društvo za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu: Nacionalne preporuke za uzorkovanje venske krvi, 2014., <https://www.hdmblm.hr/images/preporuke/Nacionalne-preporuke-za-uzorkovanje-venske-krvi.pdf>, pristupljeno 05.11.2022
20. Incir, S., Calti, H. K., & Palaoglu, K. E. The role of immature granulocytes and inflammatory hemogram indices in the inflammation. *Int J Med Biochem*, 2020., 3(3), 125-30.
21. Introducing Digital Cell Morphology by CellaVision, 2022., <https://www.cellavision.com/en/introducing-digital-cell-morphology-by-cellavision>, pristupljeno 01.03.2022.
22. Junqueira, C. L., Carneiro, J., Kelley, R. O., Bradamante, Ž., Knežević-Kostović, L., Švajger, A., & Banek, L. Osnove histologije. Zagreb, Školska knjiga, 1999., str. 233-247.

23. Kim, H., Hur, M., Kim, H., Kim, S., Moon, H. and Yun, Y. Performance of automated digital cell imaging analyzer Sysmex DI-60. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 2018., 56 (1), 94-102.
24. Kratz, A., Lee, S., Zini, G., Riedl, J.A., Hur, M. and Machin, S. Digital morphology analyzers in hematology: ICSH review and recommendations. *International Journal of Laboratory Hematology*, 2019., 41(4), 437–447.
25. Kurata Y, Hayashi S, Jouzaki K, et al. Four cases of pseudothrombocytopenia due to platelet cold agglutinins. *The Japanese Journal of Clinical Hematology*. 2006., 47(8), 781-786.
26. Labar, B. *Hematologija*. Zagreb, Školska knjiga, 2017., str. 6-8; 60-66; 301-307.
27. Margetić S. Trombocitni pokazatelji s hematoloških analizatora - laboratorijska interpretacija i kliničko značenje // *Analiza krvnih stanica - mogućnosti i ograničenja tehnologija* / Getaldić Biserka (ur.). Zagreb: Medicinska naklada, 2015., str. 57-74.
28. McHugh, M. L. Interrater reliability: the kappa statistic. *Biochemia medica*, 2012., 22(3), 276-282.
29. McKenzie, S. B., Williams, J. L., & Landis-Piwowar, K. *Clinical Laboratory Hematology* (2nd edition). Prentice Hall, 2014., str. 65.
30. Power Comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling Tests, 2011., [https://www.researchgate.net/publication/267205556\\_Power\\_Comparisons\\_of\\_Shapiro-Wilk\\_Kolmogorov-Smirnov\\_Lilliefors\\_and\\_Anderson-Darling\\_Tests](https://www.researchgate.net/publication/267205556_Power_Comparisons_of_Shapiro-Wilk_Kolmogorov-Smirnov_Lilliefors_and_Anderson-Darling_Tests), pristupljeno 30.12.2021.
31. Premužić-Lampič, M. *Hematologija: klinička i laboratorijska*. Medicinska naklada., 2000., str. 15-18; 217-263.
32. Schober, P., Boer, C., & Schwarte, L. A. Correlation coefficients: appropriate use and interpretation. *Anesthesia & Analgesia*, 2018., 126(5), 1763-1768.
33. Sheehan D. *Physical biochemistry: principles and applications* (2nd edition). John Wiley & Sons 2009., str. 286-290
34. Sučić, M. *Megakariopoeza*. predavanje, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2019., [https://moodle.srce.hr/2019-2020/pluginfile.php/3341272/mod\\_resource/content/1/Megakariopoeza.pdf](https://moodle.srce.hr/2019-2020/pluginfile.php/3341272/mod_resource/content/1/Megakariopoeza.pdf), pristupljeno 03.11.2021.
35. Sheehan D. *Physical biochemistry: principles and applications* (2nd edition). John Wiley & Sons 2009., str. 286-290

36. Sullivan, E. Hematology Analyzer: From Workhorse to Thoroughbred. *Laboratory Medicine*, 2006., 37(5), 273–278.
37. Topić E., Primorac D., Janković S., Štefanović M i suradnici. *Medicinska biokemija i laboratorijska medicina u kliničkoj praksi*. 2. izdanje, 2018; str. 81-102; 505-570.
38. Udovičić, M., Baždarić, K., Bilić-Zulle, L., & Petrovečki, M. Što treba znati kada izračunavamo koeficijent korelacije?. *Biochemia medica*, 2007., 17(1), 10-15.
39. Sysmex, Upute proizvođača Sysmex DI-60, Kobe, Japan, 2018.
40. Sysmex, Upute proizvođača za Sysmex SP-50, Kobe, Japan, 2019.
41. VanVranken, S. J., Patterson, E. S., Rudmann, S. V., & Waller, K. V. A Survey Study of Benefits and Limitations of using CellaVision™ DM96 for Peripheral Blood Differentials. *American Society for Clinical Laboratory Science*, 2014., 27(1), 32-39.
42. Vidranski, V., Laskaj, R., Sikiric, D. and Skerk, V. Platelet satellitism in infectious disease? *Biochemia Medica*, 2015., 25(2), 285–294.
43. Zadro, R. Primarna hemostaza, predavanje, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2021.,
44. What is Hydrodynamic Focusing?, 2021., <https://www.news-medical.net/life-sciences/What-is-Hydrodynamic-Focusing.aspx>, pristupljeno 30. 12. 2021.
45. Yoon, J., Kwon, J. A., Yoon, S. Y., Jang, W. S., Yang, D. J., Nam, J., & Lim, C. S. Diagnostic performance of CellaVision DM96 for Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum screening in peripheral blood smears. *Acta tropica*, 2019., 193, 7–11.
46. Yue, S., Pilon, P. and Cavadias, G. Power of the Mann–Kendall and Spearman’s rho tests for detecting monotonic trends in hydrological series. *Journal of Hydrology*, 2002., 259(1-4), 254–271.

## 7. SAŽETAK/SUMMARY

Trombociti ili krvne pločice nastaju u koštanoj srži te čine sastavni dio kompletne krvne slike uz eritrocite i leukocite. Kako bi se izbjeglo izdavanje nepouzdanih i netočnih rezultata zbog predanalitičkih pogrešaka (npr. pseudotrombocitopenije) provodi se mikroskopski pregled razmaza periferne krvi. Mikroskopski pregled daje uvid u stvarno stanje broja trombocita, tj. postoje li stvarno niske vrijednosti trombocita u organizmu ili se radi o *in vitro* nastalim nakupina trombocita. Zlatni standard određivanja prisutnosti nakupina trombocita je svjetlosna mikroskopija koja je vrlo zamorna i dugotrajna. No zahvaljujući razvoju tehnologije razvijena je digitalna mikroskopija kojom je omogućen brži pregled razmaza periferne krvi. Cilj ovog diplomskog rada je provjerena pouzdanost provjere trombocita uređajem za digitalnu morfologiju Sysmex DI-60 (Sysmex, Kobe, Japan). Uspoređena je prisutnosti nakupina u podizbornicima (WBC, RBC, PLT) Sysmex DI-60 analizatora sa prisutnošću nakupina trombocita svjetlosnom mikroskopijom. Dodatno, uspoređen je broj trombocita dobiven metodom po Fonio-u na uređaju Sysmex DI-60 s brojem trombocita s hematološkog analizatora Sysmex XN-3100. Provjera prisutnosti nakupina pregledom svih podizbornika Sysmex DI-60 analizatora pokazala je zadovoljavajuće slaganje i jednaku procjenu. Razlike između određivanja broja trombocita Fonio i Sysmex XN-3100 metodom su bila male i očekivane jer je Fonio samo aproksimativna metoda određivanja broja trombocita. Shodno tome zaključeno je da se analizator može uvesti u rutinski rad hematološkog laboratorija za provjeru broja trombocita i prisutnosti nakupina trombocita. U dvojbenim slučajevima uputna je dodatna provjera nakupina trombocita svjetlosnom mikroskopijom.

Platelets are produced in the bone marrow, and along with erythrocytes and leukocytes, are the essential part of the complete blood count. In order to avoid unreliable and inaccurate results due to preanalytical errors (eg. pseudothrombocytopenia), microscopic examination of peripheral blood smears is performed. Microscopic examination of blood smears provides information whether the patient has really low platelet counts or is it a consequence of platelet aggregation. The gold standard for determining the presence of platelet aggregates is light microscopy which is very tedious and time consuming. With technological advancements, digital microscopy has been developed, which enables faster examination of peripheral blood smears. The aim of this thesis was to verify the reliability of platelet count evaluation using digital morphology analyzer Sysmex DI-60 (Sysmex, Kobe, Japan). The presence of platelet clumps in the submenus (WBC, RBC, PLT) of the Sysmex DI-60 analyzer was compared with the presence of platelet aggregates by light microscopy.

Also, platelet count obtained by the Fonio method on Sysmex DI-60 was compared to the platelet count obtained on the hematology analyzer Sysmex XN-3100 analyzer. Assessment of the presence of platelet clumps by reviewing all submenus of the Sysmex DI-60 analyzer showed satisfactory agreement and comparable performance. The differences between the Fonio platelet count and the Sysmex XN-3100 method were irrelevant and expected because Fonio is only an approximate platelet count method. Accordingly, it was concluded that Sysmex DI- 60 can be introduced into the routine work of the hematology laboratory for assessment of the presence of platelet clumps and platelet count estimation. However, any doubtful case requires examination of the peripheral blood smear by light microscopy.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Medicinska biokemija  
Specijalna područja kliničke biokemije  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### Pouzdanost provjere trombocita digitalnom morfologijom na uređaju Sysmex DI-60

**Marija Dorotić**

#### SAŽETAK

Trombociti ili krvne pločice nastaju u koštanoj srži te čine sastavni dio kompletne krvne slike uz eritrocite i leukocite. Kako bi se izbjeglo izdavanje nepouzdanih i netočnih rezultata zbog predanalitičkih pogrešaka (npr. pseudotrombocitopenije) provodi se mikroskopski pregled razmaza periferne krvi. Mikroskopski pregled daje uvid u stvarno stanje broja trombocita, tj. postoje li stvarno niske vrijednosti trombocita u organizmu ili se radi o in vitro nastalim nakupina trombocita. Zlatni standard određivanja prisutnosti nakupina trombocita je svjetlosna mikroskopija koja je vrlo zamorna i dugotrajna. No zahvaljujući razvoju tehnologije razvijena je digitalna mikroskopija kojom je omogućen brži pregled razmaza periferne krvi. Cilj ovog diplomskog rada je provjerena pouzdanost provjere trombocita uređajem za digitalnu morfologiju Sysmex DI-60 (Sysmex, Kobe, Japan). Uspoređena je prisutnosti nakupina u podizbornicima (WBC, RBC, PLT) Sysmex DI-60 analizatora sa prisutnošću nakupina trombocita svjetlosnom mikroskopijom. Dodatno, uspoređen je broj trombocita dobiven metodom po Fonio-u na uređaju Sysmex DI-60 s brojem trombocita s hematološkog analizatora Sysmex XN-3100. Provjera prisutnosti nakupina pregledom svih podizbornika Sysmex DI-60 analizatora pokazala je zadovoljavajuće slaganje i jednaku procjenu. Razlike između određivanja broja trombocita Fonio i Sysmex XN-3100 metodom su bila male i očekivane jer je Fonio samo aproksimativna metoda određivanja broja trombocita. Shodno tome zaključeno je da se analizator može uvesti u rutinski rad hematološkog laboratorija za provjeru broja trombocita i prisutnosti nakupina trombocita. U dvojbenim slučajevima uputna je dodatna provjera nakupina trombocita svjetlosnom mikroskopijom.

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

Rad sadrži: 48 stranica, 4 grafičkih prikaza, 7 tablica i 46 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Trombociti, Sysmex DI-60, digitalna morfologija

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

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

**Dr. sc. Marija Grdić Rajković**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Desire Coen Herak**, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: svibanj 2022.



## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Medical Biochemistry  
Special areas of clinical biochemistry  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### Reliability of platelet verification by digital morphology on Sysmex DI-60 analyzer

**Marija Dorotić**

#### SUMMARY

Platelets are produced in the bone marrow, and along with erythrocytes and leukocytes, are the essential part of the complete blood count. In order to avoid unreliable and inaccurate results due to preanalytical errors (eg. pseudothrombocytopenia), microscopic examination of peripheral blood smears is performed. Microscopic examination of blood smears provides information whether the patient has really low platelet counts or is it a consequence of platelet aggregation. The gold standard for determining the presence of platelet aggregates is light microscopy which is very tedious and time consuming. With technological advancements, digital microscopy has been developed, which enables faster examination of peripheral blood smears. The aim of this thesis was to verify the reliability of platelet count evaluation using digital morphology analyzer Sysmex DI-60 (Sysmex, Kobe, Japan). The presence of platelet clumps in the submenus (WBC, RBC, PLT) of the Sysmex DI-60 analyzer was compared with the presence of platelet aggregates by light microscopy. Also, platelet count obtained by the Fonio method on Sysmex DI-60 was compared to the platelet count obtained on the hematology analyzer Sysmex XN-3100 analyzer. Assessment of the presence of platelet clumps by reviewing all submenus of the Sysmex DI-60 analyzer showed satisfactory agreement and comparable performance. The differences between the Fonio platelet count and the Sysmex XN-3100 method were irrelevant and expected because Fonio is only an approximate platelet count method. Accordingly, it was concluded that Sysmex DI-60 can be introduced into the routine work of the hematology laboratory for assessment of the presence of platelet clumps and platelet count estimation. However, any doubtful case requires examination of the peripheral blood smear by light microscopy.

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

Thesis includes: 48 pages, 4 figures, 9 tables and 46 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Platelets, Sysmex DI-60, digital morphology

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

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

**Marija Grdić Rajković, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Desire Coen Herak, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: May 2022.

