

# Pouzdanost određivanja broja retikulocita primjenom digitalne mikroskopije

---

**Petreković, Anamarija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2024**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:103626>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-28**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Anamarija Petreković**

**Pouzdanost određivanja broja retikulocita primjenom  
digitalne mikroskopije**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Specijalna područja kliničke biokemije Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod stručnim vodstvom prof.dr.sc. Dunje Rogić, spec.med.biokemije te suvoditeljstvom doc.dr.sc. Ivane Lapić, spec.med.biokem. i lab.medicine.

Srdačno se zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Dunji Rogić na stručnom vodstvu te pomoći pri izradi ovoga diplomskog rada, kao i dr.sc. spec.med.biochem Ivani Lapić na suvoditeljstvu, vremenu i velikom trudu, nesebičnoj pomoći, strpljenju i ugodnoj atmosferi pri izradi diplomskog rada.

Od srca zahvaljujem Dariu na velikoj podršci tijekom svih ovih godina i što je uvijek bio uz mene. Zahvaljujem svojoj obitelji, tati koji me već mjesecima zove magisticom, baki koja živi za ovaj trenutak, svim mojim prijateljima koji mi obogaćuju život, Bruni koji me tjerao da izađem na svaki ispit, mojoj budućoj doktorici i kolegici Ivani koja me uvijek motivirala da budem najbolja verzija sebe, mojim Martinama, kviz ekipi, Renati i svim divnim ljudima bez kojih sve ovo ne bi bilo isto.

# Sadržaj

1.UVOD.....	1
1.1.Eritrociti .....	1
1.2.Eritrocitopoeza.....	1
1.3.Crvna krvna slika .....	3
1.4. Retikulociti.....	5
1.4.1. Morfologija i razvoj retikulocita .....	5
1.4.2.Retikulocitni pokazatelji .....	6
1.4.3.Klinički značaj broja retikulocita.....	7
1.5. Anemija.....	7
1.5.1. Sideropenična anemija .....	8
1.5.2.Megaloblastična anemija.....	9
1.5.3.Hemolitička anemija .....	10
1.7.Hematološki brojač .....	12
1.8. Metode brojenja retikulocita .....	13
1.8.1. Metoda supravitalnog bojenja i brojenja na svjetlosnom mikroskopu.....	13
1.8.2. Metoda fluorescencije na hematološkom analizatoru .....	14
1.9. Digitalna mikroskopija.....	14
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	15
3.MATERIJALI I METODE .....	16
3.1.Uzorci.....	16
3.2. Priprema razmaza periferne krvi i brojenje retikulocita pomoću svjetlosnog mikroskopa.....	16
3.3. Brojenje retikulocita na uređaju za digitalnu morfologiju .....	17
3.3.1.Opis hematološkog sustava Sysmex XN-3100 .....	17
3.3.2.Postupak obrade uzoraka i brojanja retikulocita na digitalnom analizatoru za morfologiju Sysmex DI-60 .....	18
3.4.Statistička analiza podataka .....	21
4.REZULTATI I RASPRAVA .....	23
4.1.Rezultati .....	23
4.1.1.Usporedba broja retikulocita metodom ručnog brojanja svjetlosnom mikroskopijom i Sysmex XN-10 metodom.....	23
4.1.2. Usporedba ručnog brojanja i Sysmex DI-60 metode .....	26
4.1.3.Usporedba Sysmex XN-10 i Sysmex DI-60 metode.....	30
4.2. RASPRAVA .....	34
5. ZAKLJUČAK .....	38
6.POPIS KRATICA, OZNAKA, SIMBOLA .....	39
7.LITERATURA .....	41
8.SAŽETAK/SUMMARY.....	43
8.1.SAŽETAK .....	43
8.2. SUMMARY .....	43

## 1.UVOD

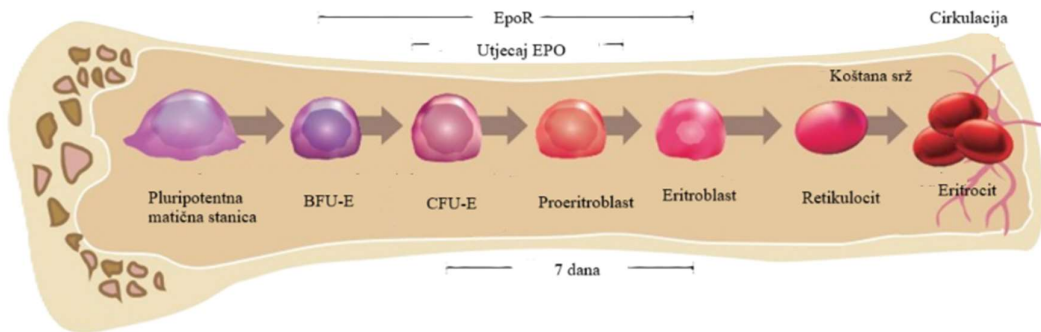
### 1.1.Eritrociti

Zreli eritrocit bikonkavnog je oblika, bez jezgre, promjera 7-8  $\mu\text{m}$  i prosječnog volumena 80-100 fL. Bojanjem razmaza periferne krvi metodom po Pappenheimu boji se rozo zbog unutarstaničnog sadržaja acidofilnog proteina hemoglobina. Stanica nije sposobna sintetizirati nove proteine ili lipide zbog gubitka ostatne ribonukleinske kiseline (engl. *Ribonucleic acid*, RNA), mitohondrija i važnih enzima (McKenzie, 2014).

### 1.2.Eritrocitopoeza

Eritropoeza je jedan od najvažnijih fizioloških procesa, neophodan za sve osnovne aktivnosti organa i za preživljavanje. Dnevno se stvara  $3 \times 10^9$  eritrocita po kilogramu tjelesne mase. Eritroidna homeostaza je strogo reguliran proces. Stanice u mikrookruženju koštane srži proizvode faktore rasta potrebne za daljnju diferencijaciju stanica. Ključni faktori rasta za eritropoezu su faktor rasta matičnih stanica (engl. *stem cell factor*, SCF) i eritropoetin (EPO). Pluripotentna matična stanica (PMS) je početna stanica iz koje započinje cijela hematopoeza. Diferencijacijom PMS nastaje multipotentna mijeloidna stanica (MMS) i limfoidna matična stanica (LMS). Iz MMS-a se diferencira miješani mijeloidni progenitor CFU-GEMM (engl. *colony forming unit-granulocyte, erythroid, megakaryocyte and monocyte*). Pod utjecajem SCF-a, interleukina 3 (IL-3) i granulocitno-makrofagnog faktora stimulacije rasta kolonija (engl. *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*, GM-CSF), iz CFU-GEMM nastaje usmjerena stanica, progenitor za eritropoezu, BFU-E (engl. *burst forming unit - erythroid*), najranija eritroidna stanica. BFU-E stvara subpopulaciju stanica koje formiraju eritroidni progenitor CFU-E (engl. *colony forming unit - erythroid*). Eritropoetin najintenzivnije djeluje na CFU-E, sprječavajući njihovu apoptozu i inducirajući njihovu klonalnu ekspanziju i nastanak proeritroblasta. Proeritroblast je najnezrelija, morfološki prepoznatljiva stanica eritrocitne loze, s jezgrom koja zauzima većinu stanice i ispunjena je sitnim mrežastim kromatinom. Zbog velike količine RNA, proeritroblast je bazofilan. U jezgri se vidi perinuklearni halo, područje mitohondrija. Iz jednog proeritroblasta nastane prosječno osam eritrocita. Sljedeći razvojni oblik eritrocita je bazofilni eritroblast koji je nešto manji. U citoplazmi se nazire crvenkasto obojenje zbog početka sinteze hemoglobina. Za normalnu sintezu deoksiribonukleinske kiseline (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNA), potrebni su

vitamini B12 i B9, dok je za stvaranje hemoglobina potrebno željezo. Sintezom hemoglobina, stanica prelazi u polikromatofilni eritroblast čija je citoplazma sivo-plava zbog acidofilnosti hemoglobina. Kromatin je grubo i nepravilno kondenziran, a to je posljednja stanica u razvoju eritrocita koja se dijeli. U sljedećem stadiju, acidofilnom eritroblastu, jezgra je reducirana i dolazi do ekstrudacije jezgre koju fagocitiraju makrofagi. Nakon toga slijedi stadij retikulocita, mlađeg eritrocita, stanice bez jezgre, ali s ostacima RNA u citoplazmi. Retikulocit sazrijeva u vremenu od dva do tri dana, prvu polovicu sazrijeva u koštanoj srži, a drugu u cirkulaciji, pretežno u slezeni pri čemu gubi RNA (Labar, 2017). Na slici 1 prikazan je proces eritrocitopoeze u koštanoj srži.



Slika 1. Prikaz procesa eritropoeze (preuzeto i prilagođeno iz Elliott i sur.,2014.)

### 1.3. Crvena krvna slika

Hematološke pretrage jedne su od najčešće korištenih laboratorijskih pretraga. Rutinski testovi kompletna krvna slika, diferencijalna krvna slika i broj retikulocita koriste se u otkrivanju primarnih bolesti hematopoetskog sustava ili hematoloških promjena uslijed drugih bolesti (McKenzie, 2014). Kompletna krvna slika (KKS) multiparametrijska je laboratorijska pretraga koja se sastoji od broja leukocita, eritrocita i trombocita, koncentracije hemoglobina, hematokrita, diferencijalne krvne slike te odabranih izmjerenih ili izračunatih parametara vezanih uz veličinu i sadržaj stanica dobivenih na automatiziranim hematološkim analizatorima (Lapić i sur., 2022.)

Crvenu krvnu sliku čini broj eritrocita, koncentracija hemoglobina, hematokrit koji se definira kao volumen stanica u jednoj litri krvi, eritrocitne konstante koje uključuju prosječni volumen eritrocita (engl. *mean corpuscular volume*, MCV), prosječni sadržaj hemoglobina u eritrocitu (engl. *mean corpuscular hemoglobin*, MCH), prosječnu koncentraciju hemoglobina u jednoj litri krvi (engl. *mean corpuscular hemoglobin concentration*, MCHC), razdiobu eritrocita po volumenu (engl. *red blood cell distribution width*, RDW), te retikulocite izražene kao apsolutni broj ili relativni u promilima. U tablici 1. prikazani su referentni intervali za parametre crvene krvne slike za odraslu populaciju. Eritrocitne konstante računaju se prema sljedećim izrazima (Tietz, 2018):

$$\text{MCV (fL)} = 10 \times \text{Hct (\%)} / \text{Erc (} 10^6/\mu\text{L)},$$

$$\text{MCH (pg)} = \text{Hb (g/L)} / \text{Erc (} \times 10^{12}/\text{L)},$$

$$\text{MCHC (g/L)} = \text{Hb (g/L)} / \text{Hct (L/L)}$$

Tablica 1. Referentni intervali parametara crvene krvne slike za odraslu populaciju

<b>Pretraga</b>	<b>Jedinica</b>	<b>Referentni interval (muškarci)</b>	<b>Referentni interval (žene)</b>
Eritrociti	$\times 10^{12}/L$	4,34-5,72	3,86-5,08
Hemoglobin	g/L	138-175	119-157
Hematokrit	L/L	0,415-0,530	0,356-0,470
MCV	fL	83,0-97,2	83,0-97,2
MCH	pg	27,4-33,9	27,4-33,9
MCHC	g/L	320-345	320-345
RDW	%	9,0-15,0	9,0-15,0
Retikulociti	/1000 eritrocita (‰)	5,0-21,6	5,0-21,6
Retikulociti	$\times 10^9/L$	22-97	22-97



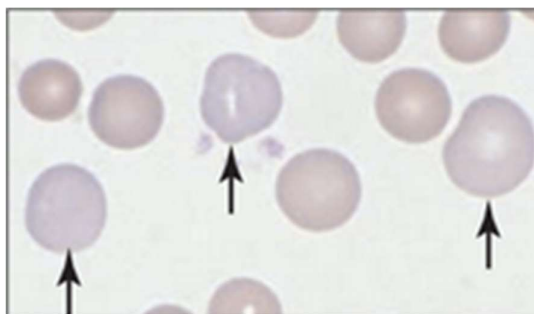
## 1.4. Retikulociti

### 1.4.1. Morfologija i razvoj retikulocita

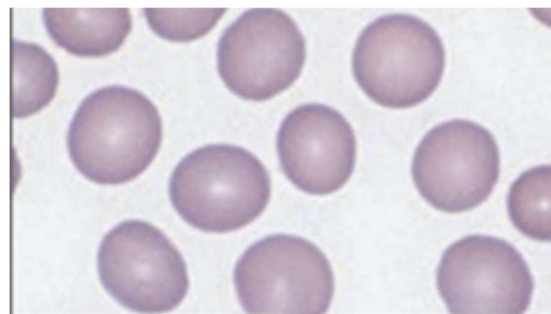
Retikulocit ili mladi eritrocit, stanica je bez jezgre i sadrži ostatke ribonukleinske kiseline u citoplazmi. Stvaraju se u koštanoj srži iz acidofilnog eritroblasta. Veličine je 8-10 $\mu$ m. Ovakva stanica još uvijek ima sposobnost sinteze hemoglobina. Retikulocit napušta koštanu srž nakon 1-2 dana, te za 1-2 dana sazrijeva, pretežito u slezeni pri čemu gubi RNA (Labar, 2017). U perifernoj krvi zadržava se 2-3 dana. Životni vijek retikulocita može se produžiti na 3 ili više dana kao rezultat preranog oslobađanja tijekom povećane eritropoeze. Povećanje razine EPO stimulira koštanu srž da poveća proizvodnju retikulocita. Razine EPO obično rastu 3 do 4 dana prije nego dođe do porasta broja retikulocita (Rai i sur.,2023).

Retikulocitni stadij počinje ekstruzijom jezgre normoblasta i završava gubitkom citoplazmatskih organela. U interakciji s makrofagima događa se enukleacija, a razgradnja i izbacivanje organela počinje u koštanoj srži i nastavlja se u krvotoku. Jednom u cirkulaciji, u razgradnji RNA sudjeluju ribonukleaze. Rastavljanjem mitohondrija i razgradnjom ribosoma, retikulociti poprimaju diskoidni oblik i cirkuliraju kao zrele crvene stanice. (Glassy 2018; Rai i sur., 2023)

Normalno predstavljaju oko 1% cirkulirajućih eritrocita (Glassy 2018). Mogu aktivno sintetizirati hemoglobin i druge proteine u koštanoj srži. U usporedbi sa zrelim eritrocitima, retikulociti imaju veći volumen, veći sadržaj hemoglobina i nižu koncentraciju hemoglobina (Rai i sur., 2023). Na slici 2 prikazan je retikulocit obojen po Wrightu u usporedbi sa zrelim eritrocitom na slici 3.



Slika 2. Retikulocit obojen po Wrightu (preuzeto iz McKenzie 2014.)



Slika 3. Zreli eritrocit (preuzeto iz McKenzie 2014.)

## 1.4.2. Retikulocitni pokazatelji

Broj retikulocita može se izraziti kao postotak svih eritrocita odnosno relativni broj retikulocita, apsolutni broj retikulocita, korigirani broj retikulocita, indeks proizvodnje retikulocita (engl. *Reticulocyte Production Index*, RPI) ili kao frakcija nezrelih retikulocita (engl. *Immature Reticulocyte Fraction*, IRF) (Kundrapu i sur., 2018).

Apsolutni broj retikulocita ( $\times 10^9/L$ ) računa se kao umnožak broja svih eritrocita i postotka retikulocita tj. njihovog relativnog broja. Kod pacijenata oboljelih od anemije, postotak retikulocita u perifernoj krvi može se činiti povišen u odnosu na ukupan broj eritrocita. Izračun koji se naziva korigirani broj retikulocita, također i retikulocitni indeks (engl. *Reticulocyte index*, RI) može se koristiti za točniju procjenu funkcije koštane srži. Računa se prema sljedećoj formuli:

$$RI = \frac{\text{broj retikulocita (\%)} \times \text{hematokrit bolesnika}}{0,45}$$

IRF se računa kao omjer nezrelih retikulocita prema ukupnim retikulocitima. Zrelost retikulocita može se procijeniti na temelju intenziteta fluorescentnog bojenja koji je proporcionalan njihovom sadržaju RNA. Intenzitet fluorescencije retikulocita dijeli se na niski, visoki i srednji. Retikulociti s visokim intenzitetom fluorescencije čine frakciju najnezrelijih retikulocita. IRF predstavlja zbroj retikulocita visoke i srednje fluorescencije i odražava populaciju nezrelih retikulocita, a izražava se kao postotak.

Iako broj retikulocita u perifernoj krvi odražava eritrocitopoetsku aktivnost koštane srži, RPI parametar daje točniji uvid u učinkovitost koštane srži u odgovoru na anemiju. Vrijednost  $RPI < 2$  povezuje se s hipoproliferacijskim poremećajima (aplastičnom anemijom) i neučinkovitom eritropoezom,  $RPI > 3$  povezuje se s hemolitičkim anemijama, nedavno krvarenje ili odgovor na terapiju te ukazuje kako je odgovor koštane srži odgovarajući za stupanj anemije (Tietz, 2018.). Vrijednost RPI računa se prema formuli:

$$RPI = \frac{\text{hematokrit bolesnika}}{0,45} \times \frac{\text{broj retikulocita (\%)}}{\text{vrijeme sazrijevanja retikulocita (dani)}}$$

Na današnjim hematološkim analizatorima analogno značenje RPI indeksu ima retikulocitni pokazatelj IRF pa njegova povećana vrijednost ukazuje na učinkovit odgovor koštane srži na anemiju, za razliku od normalne ili snižene vrijednosti (Topić i sur., 2018). Bolji je pokazatelj odgovora koštane srži od ukupnog broja retikulocita u stanjima dokazivanja uspješnosti transplantacije koštane srži ili u praćenju odgovora na terapiju eritropoetinom u bolesnika s anemijom povezanom s kroničnim zatajenjem bubrega (Kundrapu i sur., 2018).

Retikulocitni sadržaj hemoglobina (engl. *Reticulocyte hemoglobin content*, Chr) koristan je indirektni pokazatelj sideropenične anemije. Mjeri količinu željeza dostupnog u koštanoj srži koju retikulocit može iskoristiti za proizvodnju hemoglobina (Rai i sur.,2023).

#### 1.4.3. Klinički značaj broja retikulocita

Određivanje broja retikulocita koristi se u dijagnostici raznih bolesti, kao i kod preventivnih i sistematskih pregleda zdravih osoba (Sosnin i sur.,2017).

Broj retikulocita koristi se za procjenu funkcije učinkovite eritropoeze i može pomoći u dijagnozi različitih tipova anemije. Relativni broj retikulocita u zdravih osoba iznosi od 0,5 do 2%. Visoki broj retikulocita javlja se zbog povećanog odgovora na eritropoetin (EPO) koji se vidi kod hemolitičkih anemija, gubitka krvi ili odgovora na liječenje. Nizak broj retikulocita može se pojaviti zbog smanjene proizvodnje crvenih krvnih stanica zbog smanjenog odgovora koštane srži, nutritivnog nedostatka (npr. željeza, vitamina B12, folata) ili smanjene razine EPO kod kroničnog zatajenja bubrega, može se javiti u sideropeničnoj anemiji i anemiji kronične bolesti zbog smanjene sinteze hemoglobina, aplastičnoj anemiji zbog zatajenja koštane srži, aplastičnim krizama usred hemolitičnih anemija, mijelodisplastičnom sindromu (Kundrapu i sur.,2018;Rai i sur.2023).

#### 1.5. Anemija

Anemija se prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (engl. *World Health Organization*, WHO) definira kao stanje u kojem je koncentracija hemoglobina u eritrocitima <130 g/L za odrasle muškarce, a <120g/L za žene (Cappellini, 2015).

Razlikuju se morfološka (morfološka obilježja eritrocita), funkcionalna (procjena eritropoetske aktivnosti koštane srži) i patofiziološka (mehanizam nastanka) podjela anemija (Topić i sur.,2018).

Kod bolesnika s blažim oblikom anemije obično nema nikakvih simptoma. Tek kada je koncentracija hemoglobina <90 g/L zapažaju se simptomi kao što su nedostatak zraka, umor, slabost, lupanje srca, glavobolja, gubitak koncentracije (Labar, 2017).

Laboratorijska dijagnostika anemija uključuje rutinske hematološke pretrage koje uključujuu kompletnu krvnu sliku, retikulocitne pokazatelje, pregled razmaza periferne krvi koji ukazuju na prisutnost morfološki promijenjenih eritrocita, a za utvrđivanje etiopatogeneze koriste se i specifične hematološke i biokemijske pretrage (Topić i sur., 2018). Idiopatska anemija može

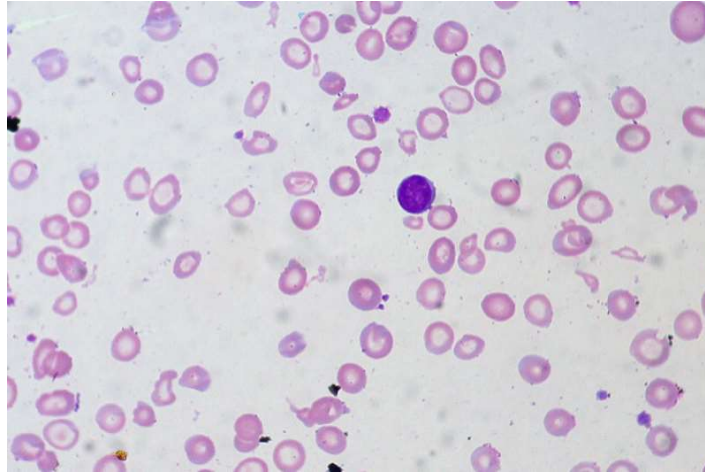
biti posljedica progresivne rezistencije eritroidnih preteča koštane srži na eritropoetin ili kroničnog proupalnog stanja (Cappellini, 2015).

### 1.5.1. Sideropenična anemija

Sideropenična anemija jedna je od najčešćih kroničnih poremećaja i čini 50% anemija, a nastaje zbog smanjene ugradnje željeza u hemoglobin (Topić i sur., 2018). Uzroci sideropenične anemije razlikuju se ovisno o dobi, spolu i socioekonomskom statusu. Nedostatak željeza najčešće je posljedica nedovoljnog unosa željeza, smanjene apsorpcije ili gubitka krvi osobito u starijih bolesnika (Rai i sur., 2023).

Najraniji stadij bolesti obilježen je smanjenim rezervama željeza u organizmu, ali i dalje normalnim vrijednostima hematoloških i biokemijskih pokazatelja statusa željeza. Bolest u ovom stadiju može biti klinički neprepoznatljiva i bez simptoma. U drugom stadiju smanjeni su pohrana i transport željeza u organizmu u odnosu na potrebe organizma, smanjuje se raspoloživost željeza za eritrocitopoezu, koncentracija feritina u serumu i zasićenje transferina željezom su smanjeni. U posljednjem stadiju bolest je klinički razvijena.

Sideropenična anemija karakterizirana je smanjenim brojem eritrocita u krvnoj slici, koncentracija hemoglobina ovisna je o stupnju anemije, snižene su eritrocitne konstantne MCV, MCH i MCHC uz povišen RDW. Relativni i apsolutni broj retikulocita te IRF mogu biti sniženi ili unutar referentnog intervala, ali je  $RPI < 2,5$ . Određivanje retikulocitnih pokazatelja klinički je značajno u praćenju učinkovitosti liječenja nadomjesnim preparatima željeza, a sam porast broja retikulocita i frakcije nezrelih retikulocita dva tjedna nakon početka liječenja upućuje na uspješnost samog liječenja. Na hematološkim analizatorima nove generacije dostupan je i podatak o sadržaju hemoglobina u retikulocitima (CHr, engl. *Reticulocyte Hemoglobin Content*) i postotku hipokromnih eritrocita (%Hypo). %Hypo se definira kao postotak eritrocita s koncentracijom Hb-a manjom od 280 g/L. Normalna vrijednost %Hypo je  $< 2,5\%$ , dok je vrijednost  $> 10\%$  pouzdan pokazatelj nedostatka željeza (Topić i sur., 2018). Na slici 4 prikazani su hipokromni, mikrocitni eritrociti i retikulocitoza prisutni kod sideropenične anemije.

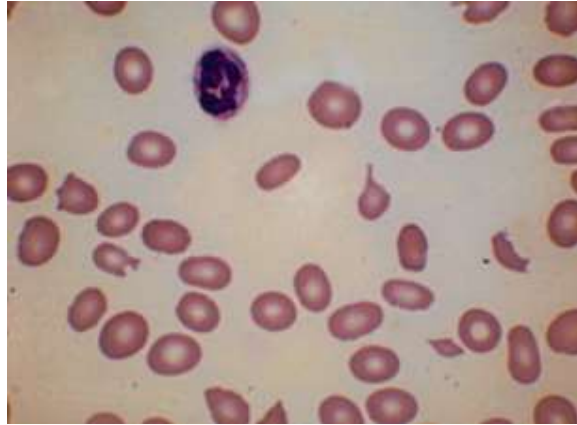


Slika 4. Sideropenična anemija, mikrocitni, hipokromni eritrociti i retikulocitoza (preuzeto iz Warner i Kamran 2023.)

### 1.5.2. Megaloblastična anemija

Megaloblastična anemija nastaje kao posljedica manjka vitamina B<sub>12</sub> ili folne kiseline što dovodi do poremećene sinteze DNA. Dolazi do vidljivih morfoloških promjena u krvi i koštanoj srži (Damjanov i sur., 2011). Obilježja megaloblastične anemije su makrocitoza uz povišene vrijednosti MCV i MCH, megalocitoza, hipersegmentacija neutrofilnih granulocita u diferencijalnoj krvnoj slici (DKS) i karakteristične promjene stanica hematopoeze u koštanoj srži.

Relativni i apsolutni broj retikulocita najčešće je u granicama referentnog intervala, ali uz RPI <2,5, a uspješno liječenje praćeno je njihovim porastom u perifernoj krvi već 5-8 dana od početka liječenja. Najčešće pretrage za dijagnosticiranje megaloblastične anemije su određivanje koncentracije vitamina B<sub>12</sub> i B<sub>9</sub> u serumu. Najčešći oblik megaloblastične anemije zbog nedostatka vitamina B<sub>12</sub> je tzv. perniciozna anemija koja se javlja zbog nedostatka ili smanjenog izlučivanja unutrašnjeg čimbenika (engl. *Intrinsic Factor*, IF) u parijetalnim stanicama želuca zbog prisutnosti autoprotutijela protiv parijetalnih stanica želuca i IF-a (Topić i sur., 2018).



Slika 5. Megaloblastična anemija, shistociti, hipersegmentirani granulocit (preuzeto i prilagođeno iz Bain 2010.)

### 1.5.3. Hemolitička anemija

Hemolitičke anemije heterogena su skupina normocitnih, normokromnih anemija kod kojih dolazi do preranog uništavanja eritrocita. Može se klasificirati prema izvoru poremećaja, načinu nastanka i mjestu nastanka (McKenzie, 2014). Uzrok poremećaja može se javiti u eritrocitu (intrinzični poremećaj) ili zbog vanjskih čimbenika (ekstrinzični poremećaj). Razaranje eritrocita događa se u mononuklearno-fagocitnom sustavu slezene. Ukoliko dođe do preranog razaranja eritrocita u slezeni, radi se o ekstravaskularnoj hemolizi, za razliku od one koja se zbiva unutar krvožilnog sustava i naziva se intravaskularna hemoliza (Damjanov i sur., 2011). Razlikuju se nasljedne i stečene hemolitičke anemije. Nasljedne hemolitičke anemije posljedica su poremećaja eritrocitne membrane, poremećaja metabolizma u eritrocitu uzrokovane nedostatkom glukoza-6-fosfat-dehidrogenaze (G6PDH) i piruvat-kinaze (PK), poremećaja sastava i sinteze hemoglobina. Obilježje stečenih hemolitičkih anemija je normalno stvaranje eritrocita u koštanoj srži, ali njihovo prijevremeno uništavanje intravaskularno ili ekstravaskularno zbog vanjskih čimbenika. Važno obilježje hemolitičkih anemija je retikulocitoza tj. povećan relativni i apsolutni broj retikulocita i IRF-a uz  $RPI > 2,5$  (Topić i sur., 2018). U tablici 2. prikazana je klasifikacija hemolitičkih anemija, a u tablici 3. laboratorijski pokazatelji hemolize u organizmu.

Tablica 2. Klasifikacija hemolitičkih anemija (Damjanov i sur.,2011)

<b>Intrinzični uzroci hemolize</b>	
Urođene hemolitičke anemije	defekti stanične membrane: hereditarna sferocitoza enzimopatije: manjak glukoza-6-fosfat dehidrogenaze hemoglobinopatije: anemija srpastih stanica, talasemija
Stecene hemolitičke anemije	paroksizmalna noćna hemoglobinurija
<b>Ekstrinzični uzroci hemolize</b>	
Imunosni uzorci	Autoimunosna hemolitička anemija: anemija uzrokovana toplim protutijelima, hladnim protutijelima Aloimunosna hemolitička anemija: transfuzijska reakcija, fetalna eritroblastoza, imunoreakcija na lijekove, sistemske autoimune bolesti
Infekcije i toksini	malarija, ugriz zmije
Fizički uzorci hemolize	umjetne srčane valvule, izvantjelesna cirkulacija za vrijeme operacije srca mikroangiopatija hipersplenizam

Tablica 3. Laboratorijski pokazatelji hemolize (Topić i sur., 2018)

<b>Hematološki</b>	
Rtc	povišeni
Krvni razmaz	polikromatofilija, specifične promjene eritrocita ovisno o tipu HA: sferociti, srpaste stanice, target-stanice, eliptociti, pojava eritroblasta u perifernoj krvi, inkluzije u eritrocitima: Heinzova tjelešca
Koštana srž	hiperplazija eritrocitopeze
<b>Biokemijski (serum, plazma)</b>	

Ukupni i indirektni bilirubin	povišeni
Haptoglobin, hemopeksin	smanjeni ili odsutni
LDH	povišen
Željezo, UIBC	povišeno, snižen
Methemalbumin	pozitivan kod intravaskularne hemolize
<b>Urin</b>	
Hemoglobin	pozitivan kod intravaskularne hemolize
Bilirubin	negativan
Urobilinogen	povišen
Hemosiderin	negativan ili pozitivan u kroničnoj hemolizi

Laktat dehidrogenaza (engl. *Lactate dehydrogenase*, LDH); Nezasićeni kapacitet vezanja željeza (engl. *unsaturated iron binding capacity*, UIBC); Hemolitička anemija (engl. *Hemolytic anemia*, HA); Retikulociti (engl. *Reticulocyte*, Rtc)

## 1.7. Hematološki brojač

Hematološki analizatori koriste dva principa brojanja krvnih stanica, metodu impedance ili promjene otpora i optičkog raspršenja svjetlosti. Metoda impedance temelji se na promjeni otpora koja se javlja prolaskom stanica suspendiranih u elektrolitskoj otopini između dviju elektroda. Broj zabilježenih impulsa označava broj stanica, a amplituda odnosno veličina promjene svakog impulsa proporcionalna je volumenu svake stanice. Kako bi se izbjegla recirkulacija stanica i prolazak više stanica kroz aperturu odjednom, uzorak se oblaže strujom tekućine tj. hidrodinamički fokusira.

Optička metoda koristi karakteristike monokromatskog svjetla u svrhu brojenja i diferenciranja stanica. Hidrodinamički fokusirana struja stanica usmjerava se kroz kvarcnu kivetu na izvor svjetlosti. Kako stanice prolaze područjem detekcije, prekidaju zraku svjetlosti i ona se rasipa u svim smjerovima. Raspršene zrake svjetlosti detektiraju se fotodetektorima i pretvaraju u električne signale. Stupanj prednjeg raspršenja svjetlosti, pod malim kutem, mjera je veličine stanice, a stupanj bočnog raspršenja mjera unutarnje složenosti stanice (McKenzie 2014).



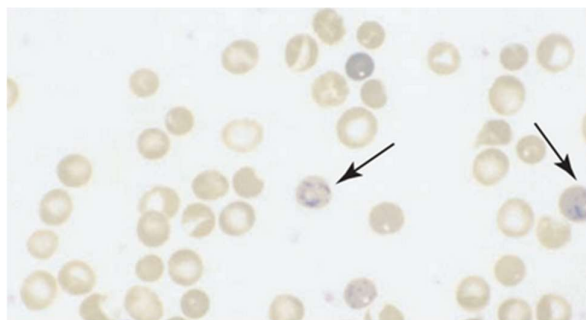
## 1.8. Metode brojenja retikulocita

### 1.8.1. Metoda supravitalnog bojenja i brojenja na svjetlosnom mikroskopu

Bojanjem po Pappenheimu retikulociti su nešto veći od zrelih crvenih krvnih stanica i imaju plavkastu nijansu (polikromazija). Točnije se prepoznaju korištenjem supravitalne boje (za žive nefiksirane stanice) obično novim metilenskim modrilom ili briljant krezil modrilom, koje boje preostalu RNA, Golgijev kompleks i mitohondrije u citoplazmi. Nakon bojenja, ribosomi i organele aglutiniraju u mrežu koja korelira sa zrelošću retikulocita, mlađe stanice imaju izraženije zrnate naslage povezane precipitiranom ribosomskom mrežom promjenjive duljine (Glassy 2018).

Kod ručnog brojenja retikulocita, puna krv uzeta u epruvetu s ljubičastim čepom na antikoagulans kalij etilendiamin-tetraoctenu kiselinu ( $K_3EDTA$ ), miješa se sa supravitalnom bojom kao što je novo metilensko modriilo (tetrametilitionin-klorid) ili briljant krezil modriilo. Boja uzrokuje nakupljanje i bojenje ostataka nukleinske kiseline RNA prisutne u nezrelim retikulocitima. Uzorak se inkubira i priprema se razmaz periferne krvi. Pripremljeni nativni preparat gleda se pod imerzijom na povećanju 1000x na svjetlosnom mikroskopu. Retikulociti se broje tako da se u smanjenomu vidnom polju izbroji 1000 eritrocita (200 eritrocita u 5 vidnih polja) i zabilježi broj nađenih retikulocita. Svaka stanica koja sadrži dva ili više plavo-ljubičastih inkluzija smatra se retikulocitom. Obojene stanice (retikulociti) broje se kao postotak od ukupnih crvenih krvnih stanica (promili) ili kao apsolutan broj (McKenzie, 2014). Slika 6 prikazuje vidno polje s retikulocitima obojenim novim metilenskim modrilom pod svjetlosnim mikroskopom na povećanju 1000x.

Točnost brojanja retikulocita ručnim metodama prilično je promjenjiva i ovisi o mnogim čimbenicima, od bojenja, dogovora što zapravo čini sam retikulocit do metode brojanja (Glassy 2018).



Slika 6. Prikaz retikulocita obojenih novim metilenskim modrilom pod svjetlosnim mikroskopom na povećanju 1000x (preuzeto iz McKenzie 2014.)

## 1.8.2. Metoda fluorescencije na hematološkom analizatoru

Broj retikulocita i retikulocitni parametri danas se rutinski određuju automatiziranom metodom na hematološkim analizatorima. Koristi se protočna citometrija s fluorescentnim bojama.

Specifična fluorescentna boja koja sadrži oksazin ili polimetin prodire kroz staničnu membranu stanica i veže se za RNA u retikulocitima, koji za razliku od eritrocita još sadrže ostatnu RNA. Fokusirana laserska zraka okomito pada na protočnicu kroz koju prolazi otopina sa stanicama i pobuđuje fluorescentnu boju vezanu za RNA u retikulocitima. Fluorescentna boja emitira svjetlost određene valne duljine koja se detektira fotodetektorom. Stanice se procjenjuju prema prednjem raspršenju svjetlosti i fluorescenciji. Retikulociti se dalje klasificiraju i prema intenzitetu fluorescencije. Intenzitet fluorescencije korelira s količinom RNA u stanicama što omogućuje diferencijaciju retikulocita od zrelih eritrocita.

Ove automatizirane metode određuju i dodatne retikulocitne parametre, uključujući koncentraciju hemoglobina u retikulocitima, srednji volumen retikulocita, frakciju nezrelih retikulocita. Koncentracija hemoglobina u retikulocitima određuje se izravnim mjerenjem hemoglobina u retikulocitima prema karakteristikama raspršenja svjetlosti. Srednji volumen retikulocita izveden je iz citograma retikulocita i odražava prosječnu veličinu populacije retikulocita (McKenzie 2014).

## 1.9. Digitalna mikroskopija

Počeci razvoja digitalne mikroskopije datiraju iz 1960-tih kada su uvedeni prvi automatizirani sustavi za morfološku analizu. U novije vrijeme razvijeni su i predstavljeni na tržištu laboratorijske hematologije napredniji automatski digitalni mikroskopski sustavi CellaVision®DM96, CellaVision®DM1200, CellaVision®DM9600 (CellaVision AB), Sysmex DI-60 (Sysmex Corp. Kobe, Japan, temeljen na platformi CellaVision DM1200), Vision Hema (West Medica), EasyCell (Medica Corporation), Nextslide (Nextslide Imaging LLC), Cobas m511 (Roche Diagnostics) te HemaCAM (Fraunhofer Institute for Integrated Circuits IIS) (Kratz, 2019).

CellaVision sustav temelji se na automatskom lociranju i snimanju digitalne slike stanica iz obojenog razmaza periferne krvi. Stanice se preklasificiraju koristeći softver za analizu slika i njihove slike prikazuju se na ekranu računala. Analizator skenira dio mikroskopskog stakalca i identificira odgovarajući monosloj stanica. Prepoznavanje stanica temelji se na tehnologiji umjetne neuronske mreže (Kratz, 2019).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Broj retikulocita važan je laboratorijski parametar u procjeni eritropoetske aktivnosti koštane srži u odgovoru na anemiju, krvarenja, kemoterapiju i različite toksine.

Iako se pregled razmaza periferne krvi na svjetlosnom mikroskopu i ručno brojanje retikulocita i dalje smatra zlatnim standardom, takav proces je dugotrajan, zamoran, sklon greškama zbog varijabilnosti i subjektivnosti među promatračima, zahtjeva dobro educirano laboratorijsko osoblje.

Digitalni analizatori za morfologiju stanica sve su više rašireni i uklopljeni u rutinskim hematološkim laboratorijima. U želji za automatizacijom, poboljšanjem performanse, standardizacijom rezultata, smanjenjem vremena obrade uzorka i praktičnog rada u laboratoriju te bržim morfološkim pregledom razmaza periferne krvi analizatori za digitalnu morfologiju stanica sve se više usavršavaju, a njihova izvedba procjenjuje.

Trenutna konfiguracija uređaja za digitalnu morfologiju Sysmex DI-60 ne predviđa ciljani preglednik za brojenje retikulocita. Cilj ovog istraživanja je usporediti rezultate brojenja retikulocita ručnom metodom na svjetlosnom mikroskopu, na Sysmex XN-10 hematološkom analizatoru automatiziranom metodom i brojenjem unutar eritrocitnog podizbornika na Sysmex DI-60 analizatoru za digitalnu morfologiju stanica i provjeriti je li on pogodan za određivanje broja retikulocita.

### 3.MATERIJALI I METODE

#### 3.1.Uzorci

Istraživanje je provedeno u Odjelu za laboratorijsku hematologiju i koagulaciju Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Zagreb u studenom i prosincu 2023. i obuhvatilo je 59 uzoraka. Uzorci pune krvi korišteni u istraživanju birani su nasumično nakon obrade na hematološkom sustavu Sysmex XN-3100 (Sysmex, Kobe, Japan). U obzir su dolazili bolesnici kojima je rutinski odrađena kompletna krvna slika te apsolutni i relativni broj retikulocita, neovisno o dobi i spolu. 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>). Uzorci su uzorkovani u standardiziranu epruvetu s ljubičastim čepom (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria) koja sadrži K<sub>3</sub>EDTA kao antikoagulans.

#### 3.2. Priprema razmaza periferne krvi i brojenje retikulocita pomoću svjetlosnog mikroskopa

Nasumično su odabrani rutinski uzorci pune krvi s hematološkog analizatora Sysmex XN-10 i pravilno homogenizirani. Svaki uzorak pune krvi alikvotirao se u zasebne mikroeprovete od 1,5 mL i promiješao sa supravitalnom bojom briljant kretil modrilom u omjeru 2:1. Boja uzrokuje nakupljanje i bojenje ostataka ribonukleinske kiseline (RNA) prisutne u retikulocitima. Sadržaj mikroeproveta ponovno se homogenizirao kako bi se krv i boja što bolje pomiješale. Uzorci su inkubirani na sobnoj temperaturi 20-30 minuta. Osposobljeni laboratorijski tehničar izradio je razmaze periferne krvi. Tako pripremljeni razmazi pregledani su pomoću svjetlosnog mikroskopa Olympus BX41 (Olympus Corp., Tokio, Japan). Nakon pronalaska slike korištenjem makrovijka i izoštravanja mikrovijkom, na stakalce razmaza je dodana kap imerzijskog ulja, a mikroskop je podešen na najveće povećanje (1000x). Razmazi su pregledani u tanjem dijelu gdje su eritrociti raspoređeni jedan do drugog u jednom sloju. Retikulociti su brojeni ručno na 1000 eritrocita (200 eritrocita u 5 vidnih polja) te je zabilježen broj nađenih retikulocita.

### 3.3. Brojenje retikulocita na uređaju za digitalnu morfologiju

#### 3.3.1. Opis hematološkog sustava Sysmex XN-3100

Za određivanje kompletne krvne slike i broja retikulocita automatiziranom metodom na hematološkom analizatoru korišten je hematološki sustav Sysmex XN-3100 koji se sastoji od dva hematološka analizatora Sysmex (XN-10L i XN-10R), uređaja za izradu i bojenje razmaza periferne krvi (SP-50), uređaja za uzorkovanje (SA-31, CF-70) i uređaja za digitalnu morfološku analizu Sysmex DI-60.

##### 3.3.1.1. Sysmex XN-10

Sysmex XN-10 (Sysmex, Kobe, Japan) automatizirani je hematološki analizator, koji radi na principu fluorescentne protočne citometrije pomoću lasera i hidrodinamičkog fokusiranja. Kao uzorke koristi punu vensku ili kapilarnu krv, a ima mogućnost rada u načinu za tjelesne tekućine.

Za određivanje broja eritrocita i trombocita koristi načelo hidrodinamički fokusirane impedance, ali ima mogućnost odrediti ih i optički. Za subpopulacije leukocita, retikulocita i trombocita koristi optičku metodu s fluorescentnim bojama.

Određivanje koncentracije hemoglobina temelji se na metodi s natrijevim lauril sulfatom, koji se nakon hemolize eritrocita veže za hemoglobin i denaturira ga, pri čemu željezo iz fero-oblika prelazi u feri-oblik. Apsorpcija se mjeri na 546 nm. Eritrocitne konstante MCV, MCH i MCHC izračunavaju se iz broja eritrocita, hemoglobina i hematokrita.

##### 3.3.1.2. Sysmex DI-60

Sysmex DI-60 uređaj je za digitalnu morfološku analizu razmaza periferne krvi. Sastoji se od automatiziranog mikroskopa, visokokvalitetne digitalne kamere i računalnog sustava koji sadrži programsku podršku CellaVision DM koja prikuplja i preklasificira stanice iz obojenih razmaza periferne krvi. Analizator pregledava krvni razmaz, pronalazi stanice, snima slike stanica, preklasificira ih i prekarakterizira njihovu morfologiju tehnologijom umjetne neuronske mreže.

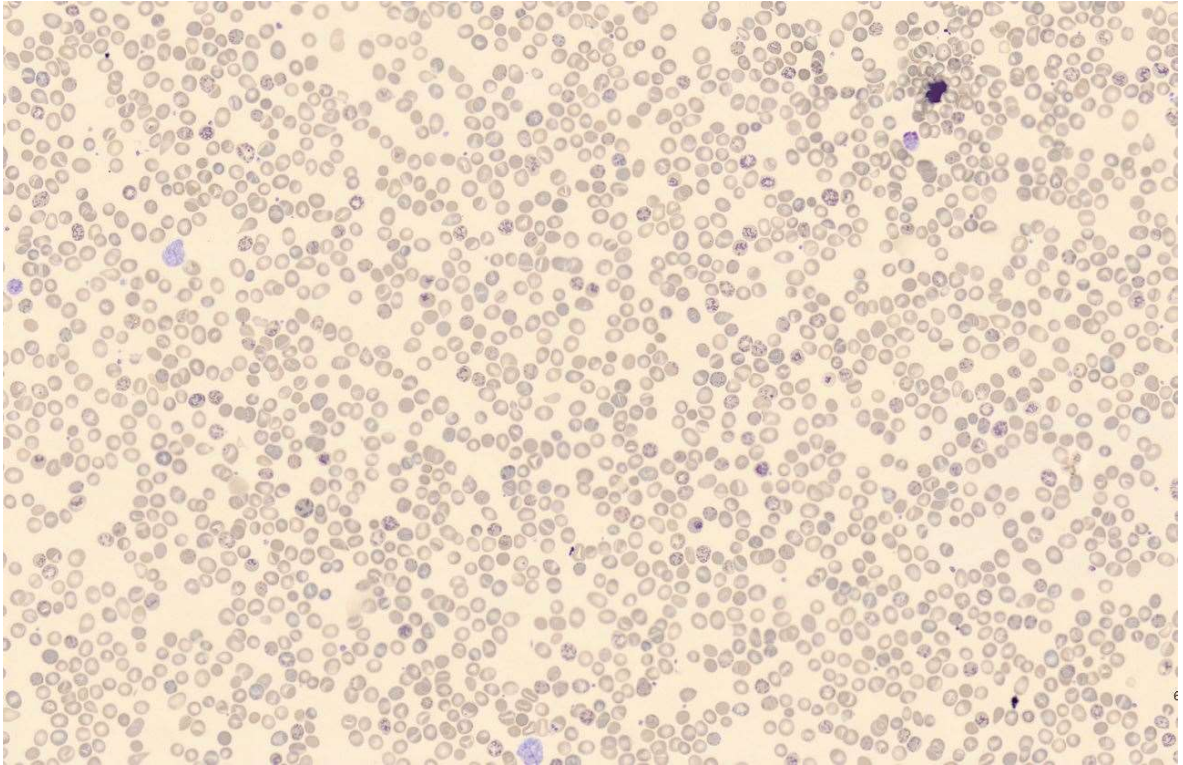
Analizator za digitalnu morfologiju stanica Sysmex DI-60 sadrži optičku jedinicu koja se sastoji od mikroskopa, kamere i računalnog sustava s ugrađenim softverom za klasifikaciju CellaVision DM. Mikroskop sadrži dva objektiva s povećanjima 10x i 100x i međuobjektiva koji se prebacuje između povećanja 1,0x i 0,5x, a u konačnici se stvara slika s povećanjima od 5x, 10x, 50x ili 100x (Kim, 2018).

Laboratorijski stručnjak provjerava i može po potrebi promijeniti predloženu klasifikaciju pojedinih stanica, kao i dodavati bilješke i komentare. Sve slike i rezultati pohranjuju se u bazu

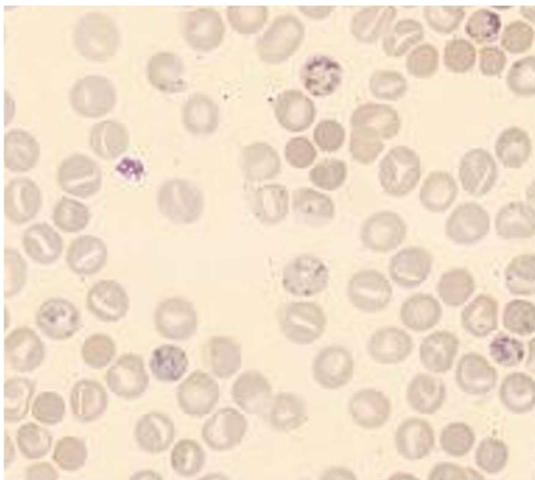
podataka. Odabirom željenog razmaza otvara se prozor s podizbornicima za pojedine krvne stanice, WBC, RBC i PLT. Otvaranjem WBC podizbornika vidljiva je predklasifikacija subpopulacija leukocita. Leukociti se preklasificiraju u 12 kategorija: nesegmentirani granulociti, segmentirani granulociti, eozinofili, bazofili, monociti, limfociti, promijelociti, mijelociti, metamijelociti, blasti, atipični limfociti, plazma stanice. Ostale stanice i elementi koji nisu leukociti preklasificiraju se kao eritroblasti, makrotrombociti, nakupine trombocita, artefakti. Pojedine elemente koje ne može identificirati svrstava u kategoriju neidentificirano. U eritrocitnom podizborniku RBC moguć je pregled morfologije eritrocita, ali i provjera trombocita i prisutnosti nakupina trombocita. Morfologija eritrocita prekarakterizira se na temelju šest morfoloških karakteristika: polikromazija, hipokromija, anizocitoza, mikrocitoza, makrocitoza i poikilocitoza. Karakteristike su svrstane u tri stupnja 1+, 2+ ili 3+. U PLT podizborniku trombociti se broje Fonio metodom. Trenutna konfiguracija uređaja Sysmex DI-60 ne predviđa ciljani preglednik za brojenje retikulocita. (Upute za rad na Sysmex XN-3100 hematološkoj liniji)

### 3.3.2. Postupak obrade uzoraka i brojanja retikulocita na digitalnom analizatoru za morfologiju Sysmex DI-60

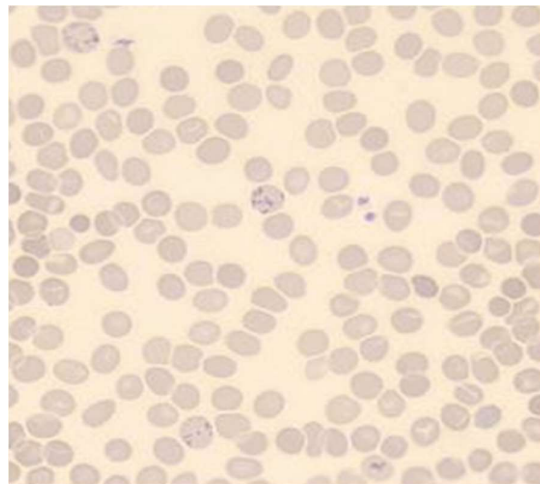
Nakon pregleda svakog razmaza pod svjetlosnim mikroskopom, isti razmazi periferne krvi propušteni su na analizator za digitalnu morfologiju Sysmex DI-60. Umetanjem stakalca robotska jedinica za hvatanje pomiče stakalce pod objektiv digitalnog mikroskopa. Digitalni mikroskop pretražuje razmaz, a digitalna kamera snima pregledne slike monosloja eritrocita koje se prikazuju na zaslonu računala. U podizborniku za crvene krvne stanice vizualno su pregledane snimljene slike monosloja crvenih krvnih stanica, koji su sadržavali retikulocite, izbrojani su i zabilježeni retikulociti nađeni na 1000 eritrocita (u 5 vidnih polja na 200 eritrocita), analogno metodi brojenja retikulocita pomoću svjetlosnog mikroskopa. Slika 7 prikazuje vidno polje u eritrocitnom podizborniku uređaja Sysmex DI-60 koje sadrži retikulocite, Slike 8,9,10 pobliži prikaz vidnog polja s retikulocitima u podizborniku za eritrocite na uređaju Sysmex DI-60, a slika 11 vidno polje s prisutnošću retikulocitoze.



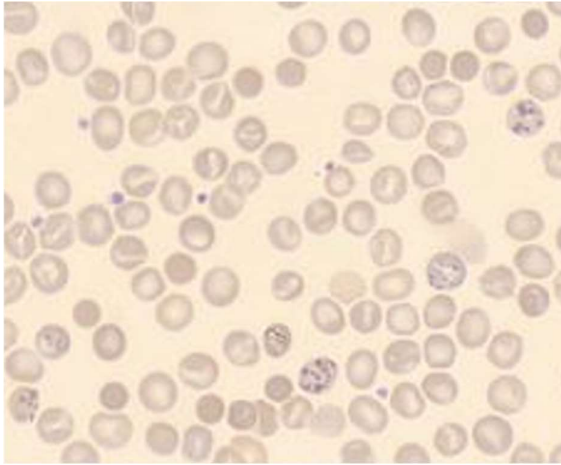
Slika 7. Prikaz monosloja eritrocita uz prisustvo retikulocita u eritrocitnom podizborniku analize digitalnom morfologijom na uređaju Sysmex DI-60



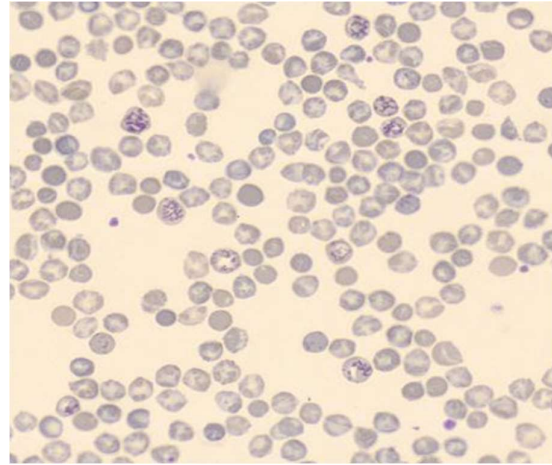
Slika 8. Prikaz vidnog polja s retikulocitima u podizborniku za eritrocite na uređaju Sysmex DI-60



Slika 9. Prikaz vidnog polja s retikulocitima u podizborniku za eritrocite na uređaju Sysmex DI-60



Slika 10. Prikaz vidnog polja s retikulocitima u podizborniku za eritrocite na uređaju Sysmex DI-60



Slika 11. Prikaz vidnog polja sa prisutnošću retikulocitoze u podizborniku za eritrocite na uređaju Sysmex DI-60



### 3.4. Statistička analiza podataka

Normalnost raspodjele podataka ispitana je Shapiro-Wilk testom i rezultati su prikazani kao aritmetičke sredine i standardne devijacije u slučaju normalne distribucije, odnosno kao medijani i interkvartilni rasponi, ako je utvrđeno odstupanje od normalne raspodjele (Razali i Yap, 2011).

Za procjenu usporedivosti metoda korišteni su Spearmanov koeficijent korelacije ranga ( $\rho$ ), Passing-Bablok regresija i Bland-Altman analiza. Za sve statističke analize, P-vrijednost ispod 0,05 smatrala se statistički značajnom. Statistička analiza provedena je statističkim programom MedCalc, v.22.021 (Ostend, Belgija).

Korelacija je statistički postupak za izračunavanje povezanosti dviju varijabli. Vrijednost korelacije brojčano se iskazuje koeficijentom korelacije, najčešće Pearsonovim ili Spearmanovim, dok se značajnost koeficijenta iskazuje vrijednošću P. Koeficijent korelacije pokazuje u kojoj su mjeri promjene vrijednosti jedne varijable povezane s promjenama vrijednosti druge varijable, ali predznak koeficijenta korelacije (+ ili -) govori o smjeru povezanosti. Prilikom tumačenja vrijednosti koeficijenta korelacije uobičajeno se smatra kako vrijednosti r od 0 do 0,25 ili od 0 do -0,25 upućuju kako nema povezanosti, dok vrijednosti r od 0,25 do 0,50 ili od -0,25 do -0,50 upućuju na slabu povezanost među varijablama. Vrijednosti r od 0,50 do 0,75 ili od -0,50 do -0,75 upućuju na umjerenu do dobru povezanost, te vrijednosti r od 0,75 do 1 ili od -0,75 do -1 upućuju na vrlo dobru do izvrsnu povezanost među varijablama. (Udovičić i sur., 2007).

Passing-Bablok regresijska analiza je statistički postupak kojim je moguće ispitati podudarnost između dviju metoda. Usporedba rezultata mjerenja na dvama analitičkim sustavima temelji se na izradi regresijskog pravca te pripadajućoj jednadžbi pravca. Vrijednost odsječka mjera je sustavne, a vrijednost nagiba proporcionalne razlike između dviju metoda. Izračunavanjem 95%-tnih intervala pouzdanosti za vrijednosti odsječka i nagiba ispituje se postoji li statistički značajno odstupanje vrijednosti odsječka od 0 te vrijednosti nagiba od 1. Ukoliko 95%-tni intervali pouzdanosti za odsječak i nagib sadrže 0, odnosno 1, zaključujemo kako ne postoji značajno sustavno ni proporcionalno odstupanje. Jedini uvjeti za njenu primjenu jesu kontinuirana raspodjela podataka te linearna povezanost između rezultata mjerenja. Linearnost se ispituje Cusum (engl. *cumulative sum*) testom. Mala P vrijednost ( $P < 0,05$ ) ukazivat će na to da ne postoji linearna povezanost između dva mjerenja, odnosno Passing-Bablok analiza tada nije primjenjiva (Bilić - Zulle, 2011).

Bland Altman statistička analiza metoda je procjene slaganja kvantitativnih mjerenja temeljena na intervalima slaganja (engl. *limits of agreement*, LOA). Ovi statistički intervali izračunavaju

se iz srednje vrijednosti razlika dvaju mjerenja (engl. *mean*) te standardne devijacije ( $s$ ) razlika dvaju mjerenja. Rezultati analize prikazuju se Bland Altman dijagramom, koji prikazuje ovisnost razlike dvaju mjerenja ( $A-B$ ) i njihove srednje vrijednosti ( $(A+B)/2$ ). Bland Altman analiza jednostavna je metoda procjene odstupanja, kao i definicije intervala slaganja koji obuhvaća 95% razlika dvaju mjerenja, no ne govori jesu li navedeni intervali prihvatljivi ili ne. (Giavarina, 2015).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Rezultati

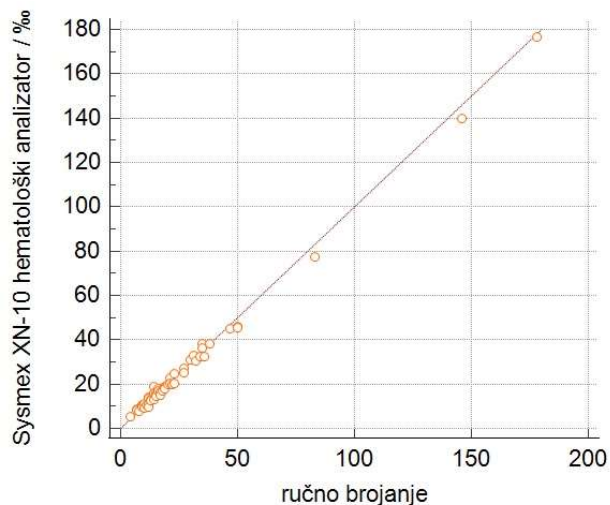
#### 4.1.1. Usporedba broja retikulocita metodom ručnog brojanja svjetlosnom mikroskopijom i Sysmex XN-10 metodom

Uspoređeno je 59 uzoraka koji su analizirani ručnom metodom svjetlosnom mikroskopijom i automatiziranim metodom određivanja broja retikulocita na hematološkom analizatoru Sysmex XN-10. Koristeći Spearmanovu rang korelaciju dobivena je vrijednost u iznosu od 0,980 s 95%-tnim intervalom pouzdanosti od 0,967 do 0,988 (Tablica 4). Na osnovu dobivene korelacije, može se zaključiti da se radi o izvrsnom slaganju dviju uspoređivanih metoda. Iz grafičkog prikaza korelacije ručnog brojanja i Sysmex XN-10 metode vidljivo je da analizirani uzorci nisu ravnomjerno distribuirani po cijelom mjernom području nego je učestaliji broj uzoraka s brojem retikulocita u nižem mjernom području.

Tablica 4. Korelacija broja retikulocita dobivena na uređaju Sysmex XN-10 i ručnom metodom svjetlosnom mikroskopijom

Broj retikulocita ručna metoda, ‰	Broj retikulocita Sysmex XN-10, ‰	Koeficijent korelacije ( $\rho$ )
Medijan 17 (IQR: 12-27)	Medijan 17 (IQR:11-26)	0,980 (95% CI: 0,967-0,988)

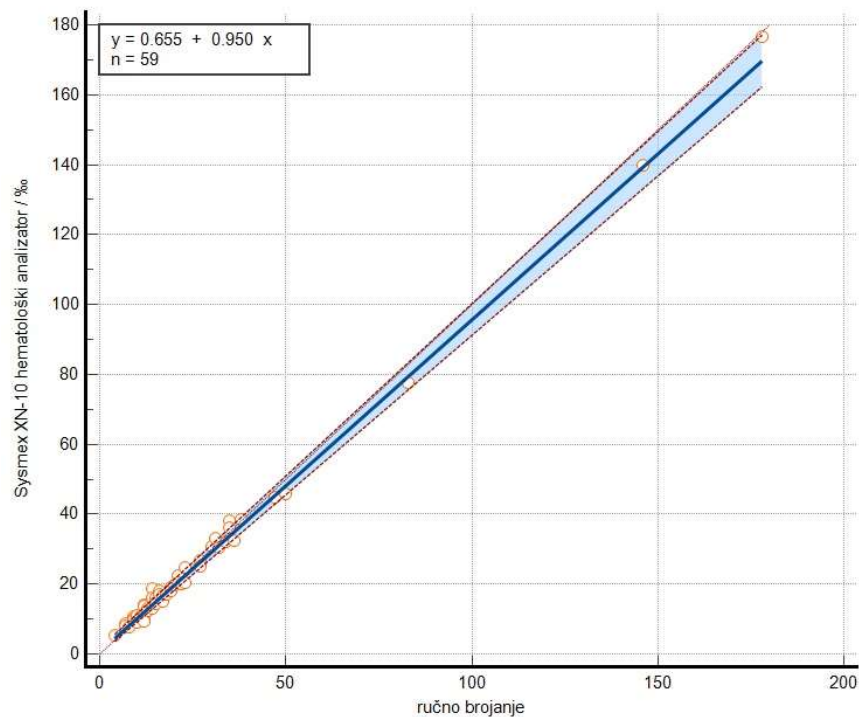
Interkvartilni raspon (engl. *Interquartile range*, IQR); Interval pouzdanosti (engl. *Confidence interval*, CI)



Slika 12. Graf raspšenja vrijednosti broja retikulocita dobivenih ručnom metodom svjetlosnom mikroskopijom i Sysmex XN-10 metodom

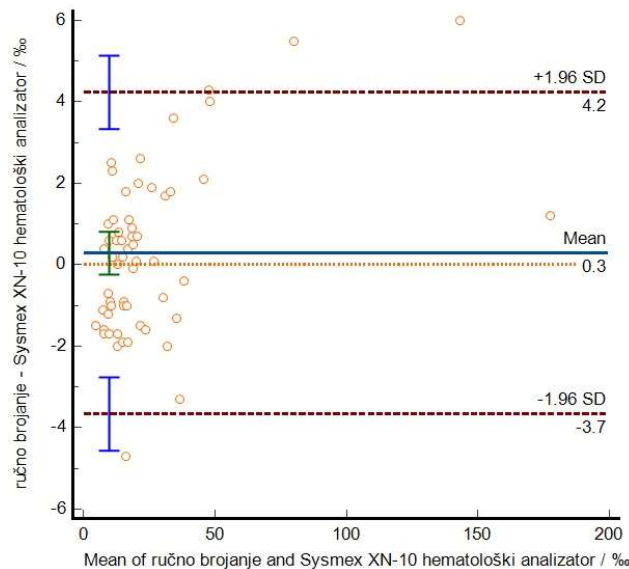
Passing-Bablok regresijom dobiven je pravac regresije  $y = 0,65$  (95% CI: od 0,01 do 1,66) +  $0,95$  (95% CI: od 0,91 do 0,99)  $x$ . Odsječak na osi  $y$  pomoću kojeg se procjenjuje konstantno odstupanje iznosi 0,65 (95% CI: od 0,01 do 1,66). S obzirom da 95% interval pouzdanosti ne obuhvaća nulu, može se zaključiti da postoji statistički značajno konstantno odstupanje ručnog brojanja retikulocita i Sysmex XN-10 metode. Rezultat dobiven regresijskom jednadžbom za nagib pravca iznosi 0,95 (95% CI: od 0,91 do 0,99). 95 % interval pouzdanosti za nagib pravca ne obuhvaća jedan, dakle postoji statistički značajno proporcionalno odstupanje ručnog brojanja i Sysmex XN-10 metode.

Cusumov test linearnosti koji se koristi za procjenu valjanosti linearnog modela pokazao je da nema značajnog odstupanja u linearnom odnosu između mjerenja broja retikulocita ručnom metodom i Sysmex XN-10 metodom čime je zadovoljne uvjet korištenja Passing-Bablok regresijske metode ( $P=0,54$ ;  $P > 0,05$ )

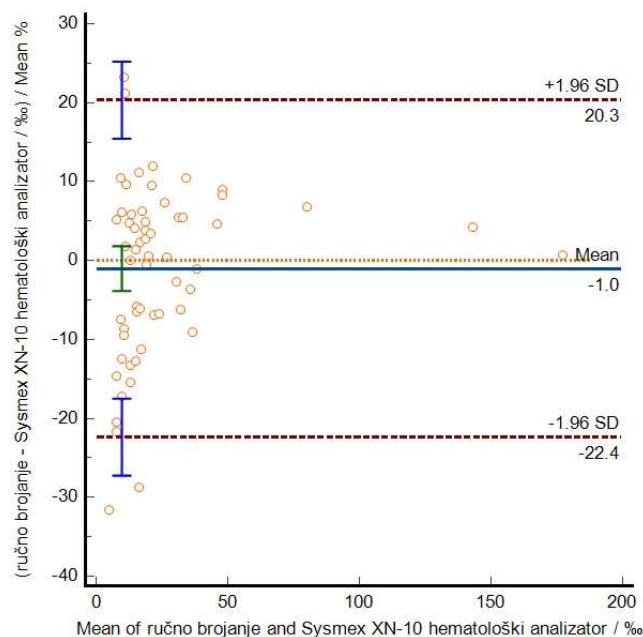


Slika 13. Prikaz Passing-Bablok regresijske analize usporedbe ručne metode svjetlosnom mikroskopijom i Sysmex XN-10

Bland-Altman analiza prikazana je kao apsolutna (Slika 14.) i relativna razlika (Slika 15.). Na y- osi nalazi se razlika dviju mjerenih metoda u ovom slučaju ručna metoda i Sysmex XN-10 metoda, a na x- osi nalazi se srednja vrijednost razlike mjerenja tim metodama. Srednja razlika uspoređenih metoda iznosi  $0,3 \times 10^9/L$  odnosno  $-1,0 \%$ , uz pripadajuće 95%-tne intervale pouzdanosti koji iznose  $(-0,24 - 0,81) \times 10^9/L$ , odnosno  $-3,87\%$  do  $1,81 \%$ . S obzirom da 95% interval pouzdanosti apsolutne i relativne razlike obuhvaćaju nulu ( $P=0,47$ ), možemo zaključiti da ne postoje statistički značajno konstantno i proporcionalno odstupanje između uspoređivanih metoda ručnog brojanja i Sysmex XN-10. Sysmex XN-10 metoda brojenja mjeri vrijednosti za  $0,3 \times 10^9/L$  manje, odnosno  $1,0\%$  veće nego ručna metoda. U području manjeg broja izmjerenih retikulocita postoji bolje slaganje metoda jer su vrijednosti bliže jedna drugoj.



Slika 14. Prikaz rezultata Bland Altman analize usporedbe ručnog brojanja svjetlosnom mikroskopijom i Sysmex XN-10 metode; x-os je srednja vrijednost mjerenja dviju metoda, a y-os srednja vrijednost razlike mjerenja u apsolutnom obliku



Slika 15. Prikaz rezultata Bland Altman analize usporedbe ručnog brojanja svjetlosnom mikroskopijom i Sysmex XN-10 metode; x-os je srednja vrijednost mjerenja dviju metoda, a y-os srednja vrijednost razlike mjerenja u postotnom obliku

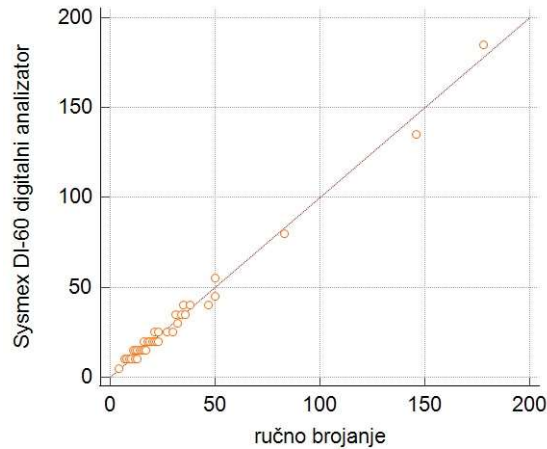
#### 4.1.2. Usporedba ručnog brojanja i Sysmex DI-60 metode

Uspoređeno je 59 razmaza periferne krvi ručnim brojenjem svjetlosnom mikroskopijom i brojenjem unutar eritrocitnog podizbornika na uređaju za digitalnu morfologiju DI-60. Koristeći Spearmanovu rang korelaciju dobivena je vrijednost u iznosu od 0,970 s 95%-tnim intervalom pouzdanosti od 0,950 do 0,982 (Tablica 5). Na osnovu dobivene korelacije, može se zaključiti da se radi o izvrsnom slaganju dviju uspoređivanih metoda. Iz grafičkog prikaza korelacije ručnog brojanja i Sysmex DI-60 metode vidljivo je da analizirani uzorci nisu ravnomjerno distribuirani po cijelom mjernom području nego je učestaliji broj uzoraka s brojem retikulocita u nižem mjernom području.

Tablica 5. Korelacija broja retikulocita dobivena na uređaju Sysmex DI-60 i ručnom metodom svjetlosnom mikroskopijom

Broj retikulocita ručna metoda, ‰	Broj retikulocita Sysmex DI-60, ‰	Koeficijent korelacije ( $\rho$ )
Medijan 17 (12-27)	Medijan 15 (11-25)	0,970 (95% CI: 0,950 do 0,982)

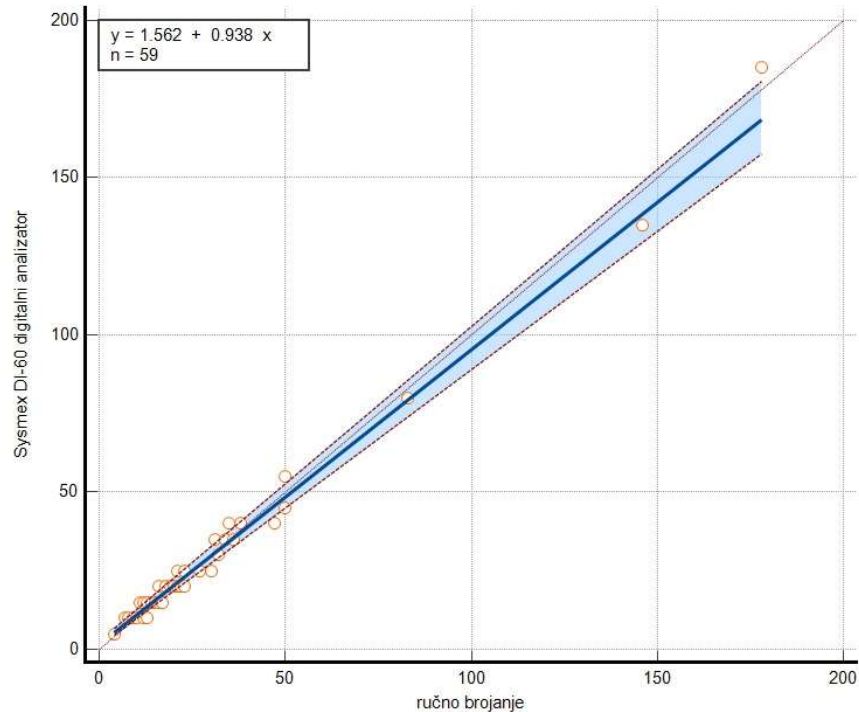
Interkvartilni raspon (engl. *Interquartile range*; IQR); Interval pouzdanosti (engl. *Confidence interval*; CI)



Slika 16 Graf raspršenja vrijednosti broja retikulocita dobivenih ručnom metodom svjetlosnom mikroskopijom i Sysmex DI-60 metodom

Passing-Bablok regresijom dobiven je pravac regresije  $y = 1,56$  (95% CI: od 1,00 do 2,69) +  $0,94$  (95% CI: od 0,88 do 1,00)  $x$ . Odsječak na osi  $y$  pomoću kojeg se procjenjuje konstantno odstupanje iznosi 1,56 (95% CI: od 1,00 do 2,69). S obzirom da 95% interval pouzdanosti ne obuhvaća nulu, može se zaključiti da postoji statistički značajno konstantno odstupanje ručnog brojanja retikulocita i Sysmex DI-60 metode. Rezultat dobiven regresijskom jednadžbom za nagib pravca iznosi 0,94 (95% CI: od 0,88 do 1,00). 95 % interval pouzdanosti za nagib pravca obuhvaća jedan, dakle ne postoji statistički značajno proporcionalno odstupanje ručnog brojanja i Sysmex DI-60 metode.

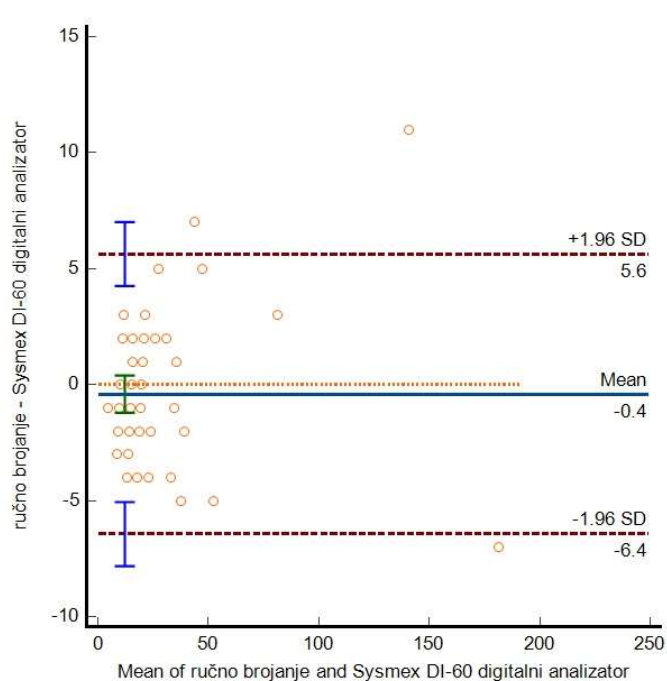
Cusumov test linearnosti koji se koristi za procjenu valjanosti linearnog modela pokazao je da nema značajnog odstupanja u linearnom odnosu između mjerenja broja retikulocita ručnom metodom i Sysmex DI-60 metodom čime je zadovoljen uvjet korištenja Passing-Bablok regresijske metode ( $P=0,86$ ;  $P > 0,05$ )



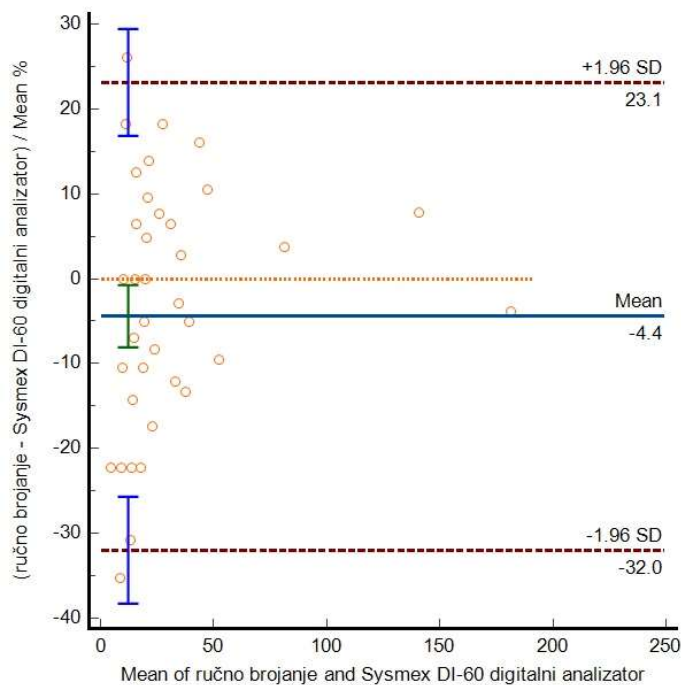
Slika 17. Prikaz Passing-Bablok regresijske analize usporedbe ručne metode svjetlosnom mikroskopijom i Sysmex DI-60

Bland-Altman analiza prikazana je kao apsolutna (Slika 18.) i relativna razlika (Slika 19.). Na y- osi nalazi se razlika dviju mjerenih metoda u ovom slučaju ručna metoda i Sysmex DI-60 metoda, a na x- osi nalazi se srednja vrijednost razlike mjerenja tim metodama. Srednja razlika uspoređenih metoda iznosi  $-0,4 \times 10^9/L$ , odnosno  $-4,4 \%$ , uz pripadajuće 95%-tne intervale pouzdanosti koji iznose  $(-1,21 - 0,40) \times 10^9/L$  odnosno  $-8,08\%$  do  $-0,76\%$ . S obzirom da 95% interval pouzdanosti apsolutne razlike obuhvaća nulu ( $P= 0,31$ ), a 95% interval pouzdanosti relativne razlike ne obuhvaća nulu uz ( $P=0,02$ ) može se zaključiti da postoji statistički značajno konstantno i proporcionalno odstupanje. Sysmex DI-60 metoda brojenja mjeri vrijednosti za  $0,4 \times 10^9/L$  veće (4,4%) nego ručna metoda.





Slika 18. Prikaz rezultata Bland Altman analize usporedbe ručnog brojanja svjetlosnom mikroskopijom i Sysmex DI-60 metode; x-os je srednja vrijednost mjerenja dviju metoda, a y-os srednja vrijednost razlike mjerenja u apsolutnom obliku



Slika 19. Prikaz rezultata Bland Altman analize usporedbe ručnog brojanja svjetlosnom mikroskopijom i Sysmex DI-60 metode; x-os je srednja vrijednost mjerenja dviju metoda, a y-os srednja vrijednost razlike mjerenja u postotnom obliku

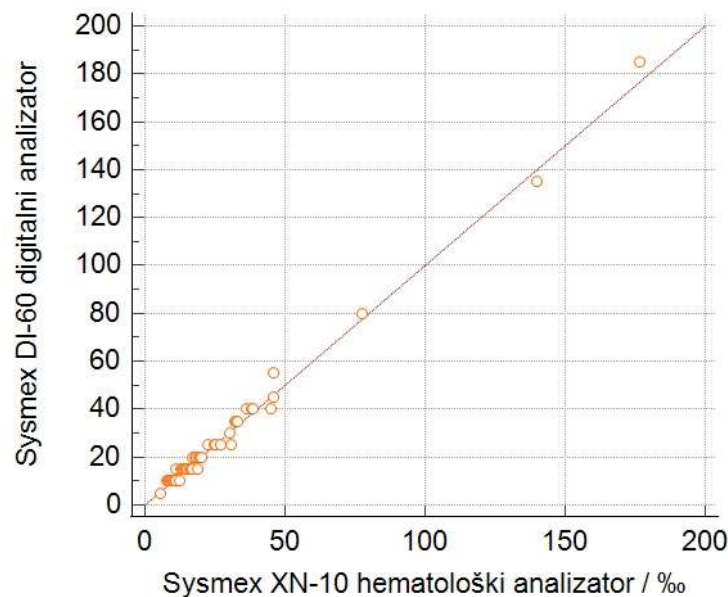
#### 4.1.3. Usporedba Sysmex XN-10 i Sysmex DI-60 metode

Uspoređeno je 59 uzoraka koji su analizirani na hematološkom analizatoru Sysmex XN-10 i Sysmex DI-60 metodom određivanja broja retikulocita. Koristeći Spearmanovu rang korelaciju dobivena je vrijednost u iznosu od 0,970 s 95%-tnim intervalom pouzdanosti od 0,950 do 0,982 (Tablica 6). Na osnovu dobivene korelacije, može se zaključiti da se radi o izvrsnom slaganju dviju uspoređivanih metoda. Iz grafičkog prikaza korelacije Sysmex XN-10 i Sysmex DI-60 metode vidljivo je da analizirani uzorci nisu ravnomjerno distribuirani po cijelom mjernom području nego je učestaliji broj uzoraka s brojem retikulocita u nižem mjernom području.

Tablica 6. Korelacija broja retikulocita dobivena na uređaju Sysmex XN-10 i Sysmex DI-60

Broj retikulocita Sysmex XN-10, ‰	Broj retikulocita Sysmex DI-60, ‰	Koeficijent korelacije ( $\rho$ )
Medijan 17 (IQR:11-26)	Medijan 15 (IQR: 11-25)	0,970 (95% CI: 0,950 do 0,982)

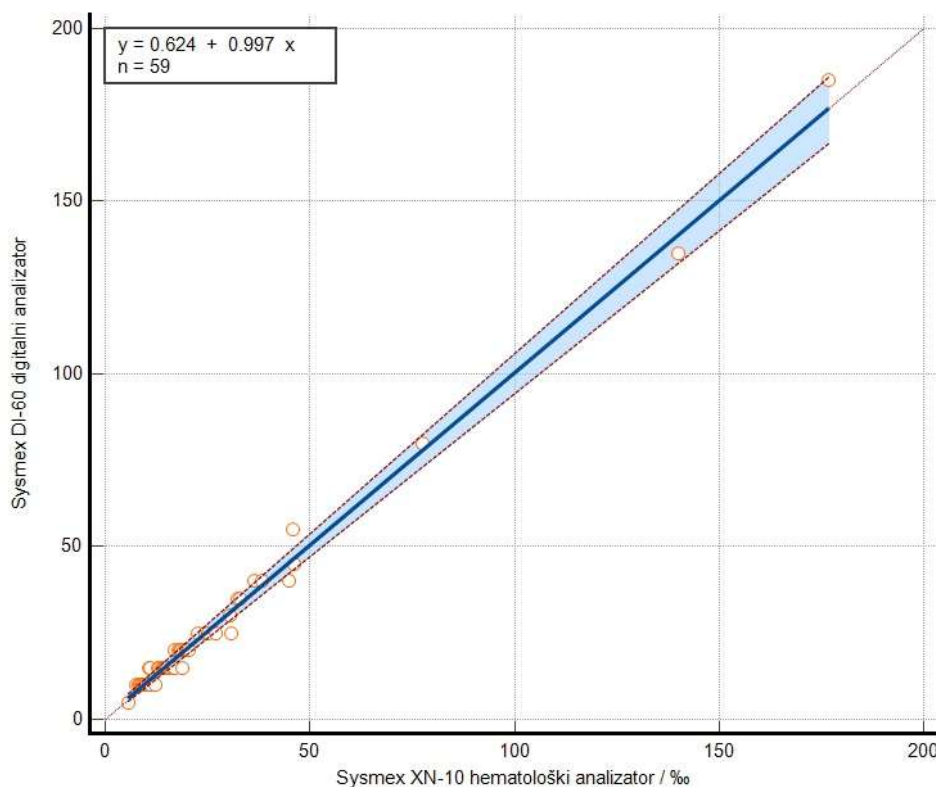
Interkvartilni raspon (engl. *Interquartile range*; IQR); Interval pouzdanosti (engl. *Confidence interval*; CI)



Slika 20. Graf raspšenja vrijednosti broja retikulocita dobivenih na uređaju Sysmex XN-10 i Sysmex DI-60

Passing-Bablok regresijom dobiven je pravac regresije  $y = 0,62$  (95% CI: od -0,05 do 1,60) +  $1,00$  (95% CI: od 0,94 do 1,04)  $x$ . Odsječak na osi  $y$  pomoću kojeg se procjenjuje konstantno odstupanje iznosi 0,62 (95% CI: od -0,05 do 1,60). S obzirom da 95% interval pouzdanosti obuhvaća nulu, može se zaključiti da ne postoji statistički značajno konstantno odstupanje Sysmex XN-10 i Sysmex DI-60 metode. Rezultat dobiven regresijskom jednadžbom za nagib pravca iznosi 1,00 (95% CI: od 0,94 do 1,04). 95 % interval pouzdanosti za nagib pravca obuhvaća jedan, dakle ne postoji statistički značajno proporcionalno odstupanje Sysmex DI-60 i Sysmex XN-10 metode.

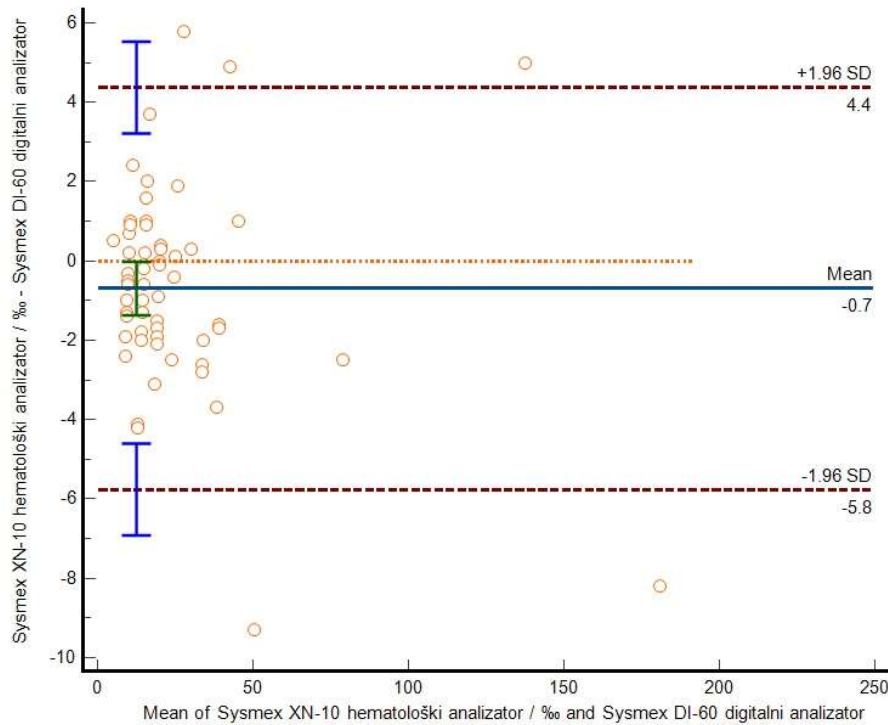
Cusumov test linearnosti koji se koristi za procjenu valjanosti linearnog modela pokazao je da nema značajnog odstupanja u linearnom odnosu između mjerenja broja retikulocita Sysmex DI-60 i Sysmex XN-10 metodom čime je zadovoljene uvjet korištenja Passing-Bablok regresijske metode ( $P=0,54$ ;  $P > 0,05$ ).



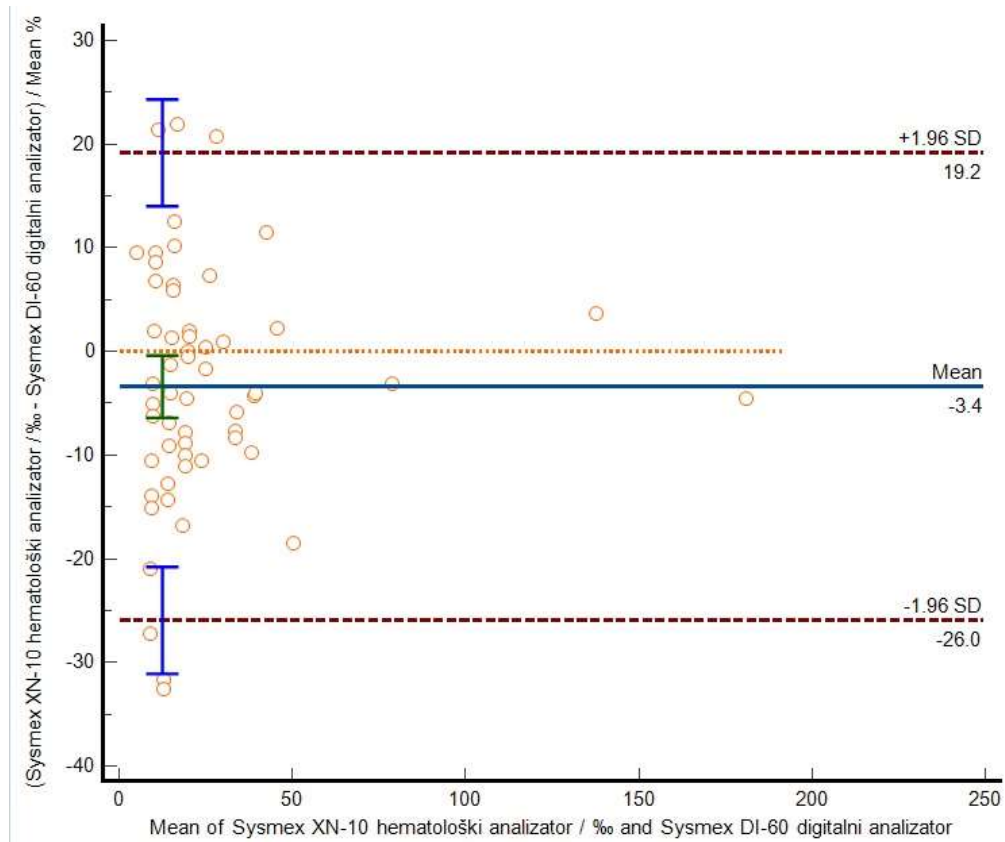
Slika 21. Prikaz Passing-Bablok regresijske analize usporedbe Sysmex XN-10 i Sysmex DI-60

Bland-Altman analiza prikazana je kao apsolutno (Slika 22.) i relativno (Slika 23.) odstupanje. Na  $y$ - osi nalazi se razlika dviju mjerenih metoda u ovom slučaju Sysmex XN-10 i Sysmex DI-

60 metoda, a na x- osi nalazi se srednja vrijednost razlike mjerenja tim metodama. Srednja razlika uspoređenih metoda iznosi  $-0,7 \times 10^9/L$  odnosno  $-3,4 \%$ , uz pripadajuće 95%-tne intervale pouzdanosti koji iznose  $(-1,37 - -0,02) \times 10^9/L$  ( $P=0,04$ ), odnosno  $-6,40\%$  do  $-0,40 \%$  ( $P=0,03$ ). S obzirom da 95% interval pouzdanosti apsolutne ( $P=0,04$ ) i relativne razlike ( $P=0,03$ ) ne obuhvaćaju nulu, možemo zaključiti da postoje statistički značajno konstantno i proporcionalno odstupanje između uspoređivanih metoda Sysmex XN-10 i Sysmex DI-60. Sysmex DI-60 metoda mjeri vrijednosti za  $0,7 \times 10^9/L$  veće (3,4%) nego Sysmex XN-10.



Slika 22. Prikaz rezultata Bland Altman analize usporedbe Sysmex XN-10 i Sysmex DI-60 metode; x-os je srednja vrijednost mjerenja dviju metoda, a y-os srednja vrijednost razlike mjerenja u apsolutnom obliku



Slika 23. Prikaz rezultata Bland Altman analize usporedbe Sysmex XN-10 i Sysmex DI-60 metode; x-os je srednja vrijednost mjerenja dviju metoda, a y-os srednja vrijednost razlike mjerenja u postotnom obliku

## 4.2. RASPRAVA

Sysmex DI-60 je automatizirani digitalni analizator morfologije stanica koji omogućava brz pregled razmaza periferne krvi. U Odjelu za laboratorijsku hematologiju i koagulaciju KBC-a Zagreb uveden je u rutinski rad za mikroskopsko određivanje diferencijalne krvne slike te provjeru broja i nakupina trombocita. Pri tome je u usporedbi sa svjetlosnom mikroskopijom i automatiziranom metodom na hematološkom brojaču pokazao zadovoljavajuće rezultate.

Zlatni standard određivanja broja retikulocita u razmazima periferne krvi je svjetlosna mikroskopija. Morfološka analiza i pregled razmaza periferne krvi neophodan je u dijagnozi hematoloških bolesti. Procjena morfologije leukocita, eritrocita i trombocita ključna je u otkrivanju određenih hematoloških stanja (Kratz, 2019). Morfološka procjena krvnih stanica svjetlosnom mikroskopijom zahtjeva pomnu pripremu razmaza periferne krvi i uvelike ovisi o njihovoj kvaliteti (McKenzie, 2014). Cilj ovog diplomskog rada je provjeriti pouzdanost određivanja broja retikulocita na Sysmex DI-60 analizatoru.

Pouzdanost određivanja broja retikulocita ispitana je usporedbom broja retikulocita dobivenog mjerenjem na Sysmex XN-10 analizatoru, ručnom metodom svjetlosnom mikroskopijom i analogno njoj broj retikulocita dobiven brojenjem unutar eritrocitnog podizbornika na Sysmex DI-60 analizatoru za digitalnu morfologiju stanica. Ispitana je korelacija metoda, Passing-Bablok linearna regresija i Bland-Altman analiza.

Temeljem koeficijenta korelacije zaključujemo da je korelacija ručnog brojanja svjetlosnom mikroskopijom i Sysmex XN-10 metode blizu vrijednosti 1, odnosno da su rezultati dobiveni ovim dvjema metodama blizu 100%-tnog poklapanja. Postoji snažna linearna korelacija tj. matematička povezanost metoda.

Passing-Bablok regresijskom analizom usporedbe ručnog brojanja svjetlosnom mikroskopijom i Sysmex XN-10 metode zaključujemo da postoji manje statistički značajno konstantno i proporcionalno odstupanje između rezultata dobivenih ovim dvjema metodama. Može se zaključiti da su metode podudarne s manjim odstupanjem. Testom linearnosti (Cusumov test) utvrđujemo da nema značajnog odstupanja od linearnosti jer P-vrijednost iznosi 0,54.

Bland-Altman analizom i tumačenjem 95%-nog intervala pouzdanosti grafova s apsolutnim i postotnim vrijednostima uočavamo da ne postoji statistički značajno konstantno ni proporcionalno odstupanje. Prema vrijednosti aritmetičke sredine uočavamo da automatskom metodom na Sysmex XN-10 mjerimo vrijednosti za  $0,3 \times 10^9/L$  manje nego ručnom metodom. Temeljem koeficijenta korelacije zaključujemo da je korelacija ručnog brojanja svjetlosnom mikroskopijom i brojanja unutar eritrocitnog podizbornika Sysmex DI-60 analizatora blizu

vrijednosti 1, odnosno da su rezultati dobiveni ovim dvjema metodama blizu 100%-tnog poklapanja. Postoji snažna linearna korelacija tj. matematička povezanost metoda.

Passing-Bablok regresijskom analizom usporedbe ručnog brojanja svjetlosnom mikroskopijom i Sysmex DI-60 metode zaključujemo da postoji manje konstantno odstupanje između rezultata dobivenih ovim dvjema metodama, ali ne i proporcionalno odstupanje. Može se zaključiti da su metode podudarne s manjim odstupanjem. Testom linearnosti (Cusumov test) utvrđujemo da nema značajnog odstupanja od linearnosti jer P-vrijednost iznosi 0,86.

Bland-Altman analizom i tumačenjem 95%-nog intervala pouzdanosti grafova s apsolutnim i postotnim vrijednostima uočavamo da postoji manje statistički značajno konstantno i proporcionalno odstupanje u metodama gledajući relativne razlike. Prema vrijednosti aritmetičke sredine uočavamo da Sysmex DI-60 metodom mjerimo vrijednosti za  $0,4 \times 10^9/L$  veće nego ručnom metodom svjetlosnom mikroskopijom.

Temeljem koeficijenta korelacije zaključujemo da je korelacija automatizirane metode na Sysmex XN-10 hematološkom analizatoru i Sysmex DI-60 metode blizu vrijednosti 1, odnosno da su rezultati dobiveni ovim dvjema metodama blizu 100%-tnog poklapanja. Postoji snažna linearna korelacija tj. matematička povezanost metoda.

Passing-Bablok regresijskom analizom usporedbe Sysmex XN-10 i Sysmex DI-60 metode zaključujemo da ne postoji konstantno i proporcionalno odstupanje između rezultata dobivenih ovim dvjema metodama. Može se zaključiti da metode pokazuju dobru podudarnost. Testom linearnosti (Cusumov test) utvrđujemo da nema značajnog odstupanja od linearnosti jer P-vrijednost iznosi 0,54.

Bland-Altman analizom i tumačenjem 95%-nog intervala pouzdanosti grafova s apsolutnim i postotnim vrijednostima uočavamo da postoji manje statistički značajno konstantno i proporcionalno odstupanje. Prema vrijednosti aritmetičke sredine uočavamo da Sysmex DI-60 metodom mjerimo vrijednosti za  $0,7 \times 10^9/L$  veće (3,4%) nego Sysmex XN-10.

Dobiveni rezultati pokazuju da je podudarnost provjere broja retikulocita zadovoljavajuća što potvrđuju i dosadašnje studije provedene na CellaVision DM96 i DI-60 analizatorima. Ipak, najveći broj istraživanja obuhvatio je provjeru pouzdanosti određivanja diferencijalne krvne slike i provjere morfologije eritrocita u usporedbi sa svjetlosnom mikroskopijom. Objavljene studije izvijestile su o točnosti diferencijalnog brojenja leukocita od 90,3% u usporedbi s ručnim diferencijalnim brojenjem. Drugi radovi izvijestili su o rasponu točnosti prekarakterizacije morfoloških abnormalnosti eritrocita od 65% do 98%, ovisno o prirodi abnormalnosti. Procijenila se i podudarnost određivanja broja trombocita u odnosu na standard bilježeci raspon korelacijskih koeficijenata od 0,92 do 0,94. Svi podaci govore u prilog

CellaVision platformi kao privlačnoj opciji za potrebe poluautomatizacije pregleda morfologije razmaza periferne krvi (Mahe i sur.,2014).

Postoji samo ograničena količina literature posvećene usporedbi ručne metode za brojenje retikulocita u obojenim krvnim razmazima s automatiziranim analizatorima za digitalnu morfologiju (Sosin i sur.,2017).

U istraživanju Mahe i sur. iz 2014. analizirano je 100 razmaza periferne krvi i uspoređen je broj retikulocita pomoću svjetlosne mikroskopije, automatiziranog hematološkog analizatora Beckman Coulter LH750 i CellaVision tehnologije. Rezultati su uspoređeni pomoću Spearmanovog koeficijenta korelacije i Friedmanove dvosmjerne analize varijance (ANOVA). Rezultati su pokazali visoku korelaciju između svih metoda, posebno između CellaVision metode i analizatora LH750 koji se često smatra referentnom metodom. Distribucije broja retikulocita nisu se značajno razlikovale među metodama. Srednja vrijednost i standardna devijacija pristranosti bili su najniži u usporedbi CellaVision i LH750 brojeva, što sugerira da su ove dvije metode najdosljednije i najpouzdanije. Zaključno, automatizirane metode (LH750 i CellaVision) pokazale su se vrlo preciznima za određivanje relativnog broja retikulocita, uz manju varijabilnost nego kod ručnog brojanja (Mahe i sur.,2014).

U istraživanju Sosin i sur. iz 2017. analizirano je 15 razmaza periferne krvi s retikulocitozom (glavna skupina) i 15 s normalnim brojem retikulocita (kontrolna grupa). Rezultati brojenja retikulocita Vision Hema® Reticulocyte (Vision Hema® RET) softverom uspoređeni su s rezultatima dobivenim ručnim brojenjem retikulocita. Pokazano je da je korištenjem automatiziranog brojenja retikulocita vrijeme analize u glavnoj skupini smanjeno za 90,5%, a u kontrolnoj skupini za 56%. Rezultati brojanja retikulocita programom Vision Hema® RET ne razlikuju se od podataka svjetlosnog mikroskopa u glavnoj skupini ( $P=0,211$ ) i u kontrolnoj skupini ( $P=0,530$ ). Spearmanov koeficijent korelacije  $\rho$  je 0,977 što ukazuje na vrlo visoku razinu slaganja između dviju metoda. Rezultati procjene preciznosti unutar serije pokazuju visoku ponovljivost broja retikulocita u usporedbi s ručnom metodom u slučajevima normalnog i visokog broja retikulocita. Na temelju ovih rezultata softver Vision Hema® RET preporučuje se za korištenje u kliničkim dijagnostičkim laboratorijima zbog svoje točnosti i pouzdanosti (Sosin i sur., 2017).

U ovom istraživanju utvrđeni koeficijent korelacije između ručne metode i Sysmex DI-60 metode ( $\rho=0,970$ ) odnosno automatizirane metode na Sysmex XN-10 i Sysmex DI-60 metode ( $\rho=0,970$ ) u skladu je s koeficijentima korelacije dobivenim u istraživanjima Mahe i sur. iz



2014. i Sosin i sur. iz 2017. U navedenim istraživanjima rezultati brojenja retikulocita digitalnom mikroskopijom i referentnim metodama nisu pokazali statistički značajnu razliku tj. odstupanje, dok je u ovom istraživanju utvrđeno manje statistički značajno odstupanje u određivanju broja retikulocita Sysmex DI-60 metodom i ručnom metodom, odnosno Sysmex DI-60 metodom i Sysmex XN-10 metodom što je očekivano uzevši u obzir da su ručna metoda i brojenje retikulocita unutar eritrocitnog podizbornika na Sysmex DI-60 analizatoru samo aproksimativne, sklone subjektivnosti pri brojenju i neprecizne u odnosu na automatiziranu metodu na hematološkom analizatoru.

## 5. ZAKLJUČAK

Usporedbom broja retikulocita određenih ručnom metodom na svjetlosnom mikroskopu, na Sysmex XN-10 hematološkom analizatoru i brojenjem unutar eritrocitnog podizbornika na Sysmex DI-60 analizatoru za digitalnu morfologiju stanica može se zaključiti:

- Utvrđena je vrlo visoka korelacija između Sysmex DI-60 metode i ručne metode, kao i Sysmex DI-60 i Sysmex XN-10 metoda što ukazuje na vrlo dobru podudarnost metoda
- Utvrđeno je manje statistički značajno konstantno i proporcionalno odstupanje u određivanju broja retikulocita Sysmex DI-60 metodom i ručnom metodom, odnosno Sysmex DI-60 metodom i Sysmex XN-10 metodom
- Brojenjem retikulocita unutar eritrocitnog podizbornika Sysmex DI-60 utvrđeno je da su vrijednosti za  $0,4 \times 10^9/L$  veće nego vrijednosti ručnom metodom svjetlosnom mikroskopijom, odnosno  $0,7 \times 10^9/L$  veće nego automatiziranom metodom na hematološkom analizatoru Sysmex XN-10
- Postoji bolje slaganje broja retikulocita izmjereno kod nižih vrijednosti nego kod viših vrijednosti
- Sysmex DI-60 može se uvesti u rutinski rad hematološkog laboratorija za određivanje broja retikulocita
- Uvijek je moguća dodatna provjera broja retikulocita i morfologije eritrocita svjetlosnom mikroskopijom
- Koristeći analizator za digitalnu morfologiju stanica Sysmex DI-60 unutar integrirane hematološke linije očekuje se doprinos poboljšanju rutinske hematološke analize

## 6.POPIS KRATICA, OZNAKA, SIMBOLA

BFU-E- engl. *burst forming unit – erythroid*

CFU-E- engl. *Colony forming unit – erythroid*

CFU-GEMM-engl. *colony forming unit – granulocyte, erythroid, megakaryocyte and monocyte*, miješani mijeloidni progenitor

Chr- engl. *Reticulocyte hemoglobin content*, retikulocitni sadržaj hemoglobina

CI- engl. *Confidence interval*, Interval pouzdanosti

DKS- diferencijalna krvna slika

DNA-engl. *deoxyribonucleic acid* , deoksiribonukleinska kiselina

EPO- eritropoetin

G6PDH- glukoza-6-fosfat dehidrogenaza

GM-CSF- engl. *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*, granulocitno-makrofagni faktor stimulacije rasta kolonija

HA-hemolitička anemija

Hb-hemoglobin

ICSH-engl. *The International Council for Standardization in Haematology*, Međunarodno vijeće za standardizaciju u hematologiji

IF-engl.*Intrinsic factor*, unutrašnji čimbenik

IL-3- interleukin 3

IL-6- interleukin 6

IRF-engl.*Immature reticulocyte fraction* , nezrela frakcija retikulocita

IQR-engl. *Interquartile range*, Interkvartilni raspon

K<sub>3</sub>-EDTA-engl. *Tripotassium thylenediaminetetraacetic*, kalij etilendiamin-tetraoctena kiselina

KKS- kompletna krvna slika

LDH- laktat dehidrogenaza

LMS- limfoidna matična stanica

MCH- engl. *mean corpuscular hemoglobin*, prosječni sadržaj hemoglobina u eritrocitu

MCV- engl. *mean corpuscular volume*, prosječni volumen eritrocita

MMS- multipotentna mijeloidna stanica

PK- protein kinaza

PMS- pluripotentna matična stanica

RDW-engl. *red blood cell Distribution Width*, razdioba eritrocita po volumenu

RI-engl. *Reticulocyte indeks*, retikulocitni indeks

RNA- engl. *ribonucleic acid*, ribonukleinska kiselina

RPI- engl. *Reticulocyte Production Indeks*, indeks proizvodnje retikulocita

Rtc-retikulociti

SCF- engl. *stem cell factor*, faktor rasta matičnih stanica

UIBC- engl. *unsaturated iron binding capacity*, nezasićeni kapacitet vezanja željeza

WHO- Svjetska zdravstvena organizacija

## 7.LITERATURA

- Bain BJ. Schistocytes in megaloblastic anemia. *American Journal of Hematol* 2010;85(8):599.
- Bilić-Zulle, L. Comparison of methods: Passing and Bablok regression. *Biochemia Medica*, 2011., 21(1):49–52
- Cappellini MD, Motta I. Anemia in Clinical Practice-Definition and Classification: Does Hemoglobin Change With Aging? *Seminars in Hematology*, 2015., 52(4), 261-9.
- Damjanov I., Jukić S., Nola M. Patologija (treće izdanje), Medicinska naklada, 2011. str 395-396, 407-409
- Elliott S, Sinclair A, Collins H, Rice L, Jelkmann W. Progress in detecting cell-surface protein receptors: the erythropoietin receptor example. *Ann Hematol.* 2014;93(2):181-92
- Giavarina, D. Understanding Bland Altman analysis. *Biochemia Medica*, 2015., 25(2), 141–151
- Glassy E.F., Color Atlas of Hematology, College of American Pathologist, 2018., str. 134-135
- 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
- Kim HN, Hur M, Kim H, Kim SW, Moon HW, Yun YM. Performance of automated digital cell imaging analyzer Sysmex DI-60. *Clinical chemistry and laboratory medicine.* 2017;56(1):94–102
- Kratz A., Lee S., Zini G. et al. Digital morphology analyzers in hematology: ICSH review and recommendations, *International Journal of Laboratory Hematology*, 2019. 41(4), 437–447.
- Kundrapu S., Noguez J. Laboratory Assessment of Anemia U: Advances in Clinical Chemistry, Makowski G.S., urednici, Elsevier, 2018. vol 83, str. 197-225
- Labar B., Hematologija. Zagreb, Školska knjiga, 2017., str. 15-19, 103
- Lapić I., Miloš M., Dorotić M. et al. Analytical validation of white blood cell differential and platelet assessment on the Sysmex DI-60 digital morphology analyzer, *International Journal of Laboratory Hematology*, 2022.
- Mahe E.R., Higa D., Naugler C., Mansoor A., Shabani-Rad M. Accuracy of the CellaVision DM96 platform for reticulocyte counting. *J Pathol Inform* 2014.;5:17
- McKenzie, S. B., Williams, J. L., Landis-Piwowar, K. Clinical Laboratory Hematology (2nd edition). Prentice Hall, 2014., str. 99-103, 361-368, 878, 884-887, 893-894, 931-940

Rai D., Wilson A.M., Moosavi L. Histology, Reticulocytes. *StatPearls* 2023.

Razali N., Wah Y. Power Comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling tests. *Journal of Statistical Modeling and Analytics*, 2011 ,2, 21-33.

Rifai, N. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. Elsevier -Health Sciences Division, 2018. str. 1734e1-1734e5

Sosin D.Y., Onjanova L.S., et al. Automated Reticulocyte Counting in Peripheral Blood Smears *Biomedical Engineering*, 2017.,249-253.

Tabe Y., Yamamoto T., Maenou I. et al, Performance evaluation of the digital cell imaging analyzer DI-60 integrated into the fully automated Sysmex XN hematology analyzer system *Clin Chem Lab Med* 2015; 53(2): 281–289

Topić E., Primorac D., Janković S., Štefanović M. i suradnici. Medicinska biokemija i laboratorijska medicina u kliničkoj praksi. 2. izdanje, 2018; str. 390-402, 412-430

Udovičić, M., Baždarić, K., Bilić-Zulle, L., Petrovečki, M. Što treba znati kada izračunavamo koeficijent korelacije? *Biochemia medica*, 2007., 17(1), 10-15.

Warner MJ, Kamran MT. Iron Deficiency Anemia. *StatPearls* ,2023.

## 8.SAŽETAK/SUMMARY

### 8.1.SAŽETAK

Retikulociti su mladi eritrociti, stanice bez jezgre i sa ostacima ribonukleinske kiseline u citoplazmi. Razvijaju se u koštanoj srži iz acidofilnog eritroblasta. Broj retikulocita važan je laboratorijski parametar u procjeni eritropoetske aktivnosti koštane srži u odgovoru na anemiju, krvarenja, kemoterapiju i različite toksine. Zlatni standard brojenja retikulocita je svjetlosna mikroskopija koja je dugotrajna i zamorna, sklona greškama zbog varijabilnosti i subjektivnosti među promatračima. Razvojem tehnologije razvijaju se i digitalni analizatori za morfologiju stanica koji omogućuju brži pregled razmaza periferne krvi. Cilj ovog diplomskog rada je usporediti rezultate brojenja retikulocita ručnom metodom na svjetlosnom mikroskopu, na Sysmex XN-10 hematološkom analizatoru automatiziranom metodom i brojenjem unutar eritrocitnog podizbornika na Sysmex DI-60 analizatoru za digitalnu morfologiju stanica i provjeriti je li on pogodan za određivanje broja retikulocita. Za procjenu usporedivosti metoda korišteni su Spearmanov koeficijent korelacije ranga ( $\rho$ ), Passing-Bablok regresija i Bland-Altman analiza. Utvrđena je vrlo visoka korelacija između Sysmex DI-60 i automatizirane Sysmex XN-10 ( $\rho = 0,970$ ) metode i ručne metode ( $\rho = 0,970$ ) što ukazuje na vrlo dobru podudarnost metoda. Utvrđeno je manje, očekivano odstupanje između Sysmex DI-60 metode i ručne metode, odnosno Sysmex XN-10 metode. Zaključeno je da se analizator može uvesti u rutinski rad hematološkog laboratorija za određivanje broja retikulocita unutar eritrocitnog podizbornika.

### 8.2. SUMMARY

Reticulocytes are immature erythrocytes, cells without a nucleus and with remnants of ribonucleic acid in their cytoplasm. They are produced in the bone marrow from acidophilic erythroblasts. Reticulocyte count is an important laboratory parameter in assessing the erythropoietic activity of the bone marrow in response to anemia, bleeding, chemotherapy, and various toxins. The gold standard for counting reticulocytes is light microscopy, which is time-consuming and tedious, prone to errors due to variability and subjectivity among observers. With the advancement of technology, digital analyzers for cell morphology have been developed, enabling faster examination of peripheral blood smears. The aim of this thesis was to compare the results of reticulocyte count using the manual method by light microscopy, the automated method on the Sysmex XN-10 hematology analyzer, and the counting within the erythrocyte submenu on the Sysmex DI-60 cell morphology analyzer, and to determine if it is

suitable for reticulocyte counting. To assess the comparability of the methods, Spearman's rank correlation coefficient ( $\rho$ ), Passing-Bablok regression, and Bland-Altman analysis were used. A very high correlation was found between the Sysmex DI-60 and the automated Sysmex XN-10 ( $\rho = 0,970$ ) method and the manual method ( $\rho = 0,970$ ), indicating a very good concordance of the methods. A small, expected deviation was found between the Sysmex DI-60 method and the manual method, as well as the Sysmex XN-10 method. In conclusion, Sysmex DI-60 analyzer can be introduced into the routine work of the hematology laboratory for reticulocyte count within the erythrocyte submenu.



## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### POUZDANOST ODREĐIVANJA BROJA RETIKULOCITA PRIMJENOM DIGITALNE MIKROSKOPIJE

Anamarija Petreković

#### SAŽETAK

Retikulociti su mladi eritrociti, stanice bez jezgre i sa ostacima ribonukleinske kiseline u citoplazmi. Razvijaju se u koštanoj srži iz acidofilnog eritroblasta. Broj retikulocita važan je laboratorijski parametar u procjeni eritropoetske aktivnosti koštane srži u odgovoru na anemiju, krvarenja, kemoterapiju i različite toksine. Zlatni standard brojenja retikulocita je svjetlosna mikroskopija koja je dugotrajna i zamorna, sklona greškama zbog varijabilnosti i subjektivnosti među promatračima. Razvojem tehnologije razvijaju se i digitalni analizatori za morfologiju stanica koji omogućuju brži pregled razmaza periferne krvi. Cilj ovog diplomskog rada je usporediti rezultate brojenja retikulocita ručnom metodom na svjetlosnom mikroskopu, na Sysmex XN-10 hematološkom analizatoru automatiziranom metodom i brojenjem unutar eritrocitnog podizbornika na Sysmex DI-60 analizatoru za digitalnu morfologiju stanica i provjeriti je li on pogodan za određivanje broja retikulocita. Za procjenu usporedivosti metoda korišteni su Spearmanov koeficijent korelacije ranga ( $\rho$ ), Passing-Bablok regresija i Bland-Altman analiza. Utvrđena je vrlo visoka korelacija između Sysmex DI-60 i automatizirane Sysmex XN-10 ( $\rho = 0,970$ ) metode i ručne metode ( $\rho = 0,970$ ) što ukazuje na vrlo dobru podudarnost metoda. Utvrđeno je manje, očekivano odstupanje između Sysmex DI-60 metode i ručne metode, odnosno Sysmex XN-10 metode. Zaključeno je da se analizator može uvesti u rutinski rad hematološkog laboratorija za određivanje broja retikulocita unutar eritrocitnog podizbornika.

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

Rad sadrži: 46 stranica, 23 grafičkih prikaza, 6 tablica i 28 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Retikulociti, svjetlosna mikroskopija, digitalna mikroskopija, hematološki analizator, usporedba metoda

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Dunja Rogić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Ivana Lapić**, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Marija Grdić Rajković**, izvanredni profesor u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: srpanj 2024.

## 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 DIGITAL MICROSCOPY IN DETERMINATION OF THE RETICULOCYTE COUNT

Anamarija Petreković

#### SUMMARY

Reticulocytes are young erythrocytes, cells without a nucleus and with remnants of ribonucleic acid in their cytoplasm. They develop in the bone marrow from acidophilic erythroblasts. The number of reticulocytes is an important laboratory parameter in assessing the erythropoietic activity of the bone marrow in response to anemia, bleeding, chemotherapy, and various toxins. The gold standard for counting reticulocytes is light microscopy, which is time-consuming and tedious, prone to errors due to variability and subjectivity among observers. With the advancement of technology, digital analyzers for cell morphology have been developed, enabling faster examination of peripheral blood smears. The aim of this thesis is to compare the results of reticulocyte counting using the manual method with light microscopy, the automated method on the Sysmex XN-10 hematology analyzer, and the counting within the erythrocyte submenu on the Sysmex DI-60 cell morphology analyzer, and to determine if it is suitable for reticulocyte counting. To assess the comparability of the methods, Spearman's rank correlation coefficient ( $\rho$ ), Passing-Bablok regression, and Bland-Altman analysis were used. A very high correlation was found between the Sysmex DI-60 and the automated Sysmex XN-10 ( $\rho = 0,970$ ) method and the manual method ( $\rho = 0,970$ ), indicating a very good concordance of the methods. A small, expected deviation was found between the Sysmex DI-60 method and the manual method, as well as the Sysmex XN-10 method. It was concluded that the analyzer can be introduced into the routine work of the hematology laboratory for reticulocyte counting within the erythrocyte submenu.

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

Thesis includes: 46 pages, 23 figures, 6 tables and 28 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Reticulocytes, light microscopy, digital microscopy, hematology analyzer, method comparison

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

Reviewers: **Dunja Rogić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Ivana Lapić, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Marija Grdić Rajković, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: Srpanj 2024.