

ВЪВЕДЕНИЕ

Автоматичните хематологични броячи претърпяха през последните няколко години значителна технологична еволюция поради въвеждането на нови физични и химични принципи на клетъчен анализ и прогресивното развитие на софтуера. Значително се увеличи аналитичната ефективност на резултатите и качеството на предоставяната от анализаторите информация [4, 5, 12, 13]. Този бърз прогрес изисква повече специализирани познания за интерпретация на резултатите и за разширяване на клиничните им приложения.

В допълнение към традиционните показатели на пълната кръвна картина и диференциалното броене на левкоцити съвременните хематологични анализатори от висок клас предоставят информация за допълнителни количествени и качествени параметри на изследваните клетки, като наличие на незрели гранулоцити, бласти, атипични лимфоцити, еритробласти, хемоглобинова концентрация в ретикулоцитите, млада ретикулоцитна фракция и др. [4, 5]. Новите показатели имат важно значение при проследяване на пациенти със злокачествени хемопатии, диференциална диагноза на анемии [12, 15], както и за ранна диагностика на функционален железен дефицит [14].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Хематологични анализатори

ADVIA® 2120 е напълно автоматизиран хематологичен анализатор с възможност за анализ на 120 проби/час (CBC/Diff). Анализаторът работи с пълна кръв с K_2EDTA и извършва следните анализи: Complete blood counts (CBC); CBC + диференциално броене на левкоцити (CBC/diff); Ретикулоцити (retic) – процент, абсолютна стойност и индекси; CBC/diff + retic (CBC/diff/retic); CBC/retic; WBC: олевяване, атипични лимфобласти, незрели гранулоцити, миелопероксидазна недостатъчност; RBC: ANISO, MICRO, MACRO, HC VAR, HYPO, HYPER, RBC фрагменти, RBC сенки, NRBC, тромбоцитни слепвания, големи тромбоцити.

Аналитичните обхвати (линейност) на основните хематологични параметри са следните: WBC $0.02-400 \times 10^9/L$; RBC $0.0-7.0 \times 10^{12}/L$; Plt $5.0-3500 \times 10^9/L$; Hb $0-225 \text{ g/L}$; Retic 0.2-24.5%. Анализаторът използва нецианиден хемоглобинов метод – с borate solution и surfactant (N, N,-dimethylaurylamine N-oxide), и последващо фотометриране на 565 nm. Еритроци-

тите се изброяват (след изоволемична трансформация в сферични клетки) чрез разсейване на лазерен лъч и измерване на светлинните сигнали от отклоненията под малък ($2-3^\circ$) и голям ъгъл ($5-15^\circ$). В допълнение към двуизмерното определяне на обем и хемоглобинова концентрация в еритроцитите за изброяване на ретикулоцитите се въвежда допълнително измерване на лазерна светлинна абсорбция след суправиталното им оцветяване с Oxazine 750. За диференциалното броене на левкоцити се използва комбинирано приложение на пероксидазен и базофилен метод. При пероксидазния метод неутрофилите, еозинофилите и моноцитите се оцветяват според степента на пероксидазната им активност, докато лимфоцитите, базофилите и големите неоформени клетки (LUC) не съдържат пероксид и остават неоцветени. При базофилния метод всички левкоцити с изключение на базофилите се оголват от цитоплазмата и могат да бъдат категоризирани като моно- или полинуклеарни клетки въз основа на формата и сложността на техните ядра. Непроменените базофили могат лесно да бъдат различени от малките клетъчни ядра.

COULTER LH 750 е съвременен напълно автоматичен хематологичен анализатор от висок клас, в който е заложена нова аналитична техника на комбинация на класическия импедансен метод на Coulter със софистични математически алгоритми и възможност за лазернооптично броене на кръвни клетки, 5-типно диференциално броене на левкоцити, броене на еритробласти [2, 7, 11]. Определянето на концентрацията на хемоглобина става след фотометрично определяне на концентрацията на хемиглобинцианид при 540 nm.

Дизайн на проучването

Място на провеждане: Клиничното изпитание е проведено в Хематологична лаборатория на ЦКЛ, УМБАЛ „Александровска“, София.

Протокол на проучването: Анализирани са 100 проби на пациенти за период от 10 дни на ADVIA®2120. Същите пациентски проби са анализирани и на COULTER LH 750.

Сравнени са данните от автоматичното диференциално броене на левкоцитите на ADVIA®2120 и мануалното диференциално броене (референтен метод). При мануалното диференциално броене са анализирани по 200 клетки от всяка кръвна натривка от двама независими изследователи. Хематологичните ана-

лизатори ADVIA®2120 и COULTER LH 750 са калибрирани според инструкциите на производителя. За оценка на точността и за определяне на възпроизводимост във време е използвана контролна кръв "ADVIA 3in1 TESTpoint Hematology Controls" (Siemens Healthcare Diagnostics Inc.) в срок на годност, в три нива – Normal (lotN: 01964364), Abnormal I (lotN: 09459683) и Abnormal II (lotN: 03410380). Контролната кръв съдържа червени и бели кръвни клетки с човешки произход, както и частици, симулиращи тромбоцити и ретикулоцити.

Статистически анализ

Извършен е корелационен и регресионен анализ с компютърна програма MethodValidator за сравнение на резултатите, получени с ADVIA®2120, COULTER LH 750 и мануалния метод. Валидирането на резултатите (изпитване на аналитична надежност) е осъществено чрез вариационна оценка на възпроизводимост (повторяемост на резултатите) в серия, възпроизводимост от ден в ден, оценка на точността и недостоверността.

РЕЗУЛТАТИ

Невъзпроизводимост в серия

Резултатите от оценката на възпроизводимостта в серия са представени в табл. 1. Изследвани са в серия случайно подбрани рутинни проби на пациенти – общо 22 анализа.

Таблица 1. Невъзпроизводимост в серия на показателите от пълната кръвна картина, диференциалното броене на левкоцитите и ретикулоцитния брой, определени с ADVIA®2120

Параметър	\bar{x}	SD	CV%
WBC (White blood cells)	7,2	0,24	3,3
RBC (Red blood cells)	4,79	0,04	0,8
Hb (Hemoglobin)	133	0,72	0,5
Hct (Hematocrit)	0,40	0,01	1,5
MCV (Mean corpuscular volume)	84	0,76	0,9
MCH (Mean corpuscular hemoglobin)	27	0,45	1,6
PLT (Platelets)	302	9,6	3,1
%Neutrophils	55,25	0,91	1,6
%Lymphocytes	31,95	0,94	2,9
%Eosinophils	1,9	0,27	14,2
%Basophils	1,3	0,3	23
%Monocytes	6,3	0,65	10,3
%LUC	3,1	0,35	11,2
%RETIC	2,2	0,15	6,8

Невъзпроизводимост във време (от ден в ден)

За оценка на невъзпроизводимостта във време са изследвани контролни материали при едни и същи условия в продължение на 31 дни. Резултатите са представени в табл. 2, 3, 4 и 5.

Таблица 2. Невъзпроизводимост във време с контролен материал "ADVIA 3in1 TESTpoint Hematology Controls" – Abnormal I (lotN: 09459683)

	WBC	RBC	Hb	Hct	PLT
n	33	33	33	33	33
\bar{x}	3,50	2,30	55,3	0,17	79,4
SD	0,16	0,03	0,70	0	3,70
CV%	4,3	1,4	1,2	1,8	4,6

Таблица 3. Невъзпроизводимост във време с контролен материал "ADVIA 3in1 TESTpoint Hematology Controls" – Normal (lotN: 01964364)

	WBC	RBC	Hb	Hct	PLT
n	31	31	31	31	31
\bar{x}	7,10	4,25	115,4	0,35	221,4
SD	0,12	0,06	1,14	0	6,3
CV%	1,8	1,5	1	1,3	2,8

Таблица 4. Невъзпроизводимост във време с контролен материал "ADVIA 3in1 TESTpoint Hematology Controls" – Abnormal II (lotN: 03410380)

	WBC	RBC	Hb	Hct	PLT
n	31	31	31	31	31
\bar{x}	16,4	5,12	162,1	0,47	471,6
SD	0,3	0,1	2	0	11,5
CV%	1,8	1,3	1,2	1,4	2,4

Таблица 5. Невъзпроизводимост във време на показателите от диференциалното броене на левкоцитите с контролен материал "ADVIA 3in1 TESTpoint Hematology Controls" – Normal (lotN: 01964364)

	%Neut	%Lymph	%Mono	%Eos	%Baso
n	31	31	31	31	31
\bar{x}	68,2	18	8,2	2	0,3
SD	0,6	0,4	0,5	0,2	0,1
CV%	0,9	2,3	5,8	8	19

Недостоверност и неточност на резултатите

Достоверността бе оценена чрез изследване на контролен материал в три нива в продължение на 31 дни и с изчисляване на процентното отклонение (d%) на средната стойност (X) от обявената стойност на производителя (X₀). Резултатите са представени последователно за трите нива в табл. 6, 7 и 8.

Таблица 6. Оценка на недостоверност с контролен материал “ADVIA 3i1 TESTpoint Hematology Controls” – Abnormal I (lotN: 09459683)

	WBC	RBC	Hb	Hct	PLT	MCV	MCH	MCHC	%Retic	%Neut	%Lymph	%Mono	%Eos	%Baso	%LUC
n	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33
X ₀	3,3	2,4	56	0,17	78	72	23,7	329	7,9	51,1	32,9	8	1,7	2,5	7
\bar{x}	3,5	2,3	55,3	0,17	79,4	74,1	23,9	322,7	7,7	50,3	33	8,4	1,5	1	5,8
d%	6,1	-1,8	-1,25	0	1,3	2,8	0,8	-2,1	-2,5	-1,6	0,3	5	-11,7	-60	-17,4

X₀ – обявената стойност на производителя; X – средната стойност от получените резултати; d% – процентното отклонение

Таблица 7. Оценка на недостоверност с контролен материал “ADVIA 3i1 TESTpoint Hematology Controls” – Normal (lotN: 01964364)

	WBC	RBC	Hb	Hct	PLT	MCV	MCH	MCHC	%Retic	%Neut	%Lymph	%Mono	%Eos	%Baso	%LUC
N	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31
X ₀	6,66	4,37	116	0,35	229	79,2	26,5	335	3,40	60,5	25,5	6,8	1,8	2,5	5
\bar{x}	7,09	4,25	115,4	0,35	221,4	81,73	27,15	332,1	3,49	60,14	24,59	6,93	1,7	0,56	6,09
d%	6	-2,3	-0,8	0	-3,5	2,5	3,8	-0,8	2,5	-0,7	-3,9	1,5	-5,5	-80	21,8

X₀ – обявената стойност на производителя; X – средната стойност от получените резултати; d% – процентното отклонение

Таблица 8. Оценка на недостоверност с контролен материал “ADVIA 3i1 TESTpoint Hematology Controls” – Abnormal II (lotN:03410380)

	WBC	RBC	Hb	Hct	PLT	MCV	MCH	MCHC	%Retic	%Neut	%Lymph	%Mono	%Eos	%Baso	%LUC
n	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31
X ₀	15,4	5,25	165	0,47	475	91,1	31,4	345	0,9	69,8	17,2	7	2,5	2,5	4
\bar{x}	16,4	5,12	162,1	0,47	471,6	93,4	31,6	338,4	0,4	68,2	18	8,2	2	0,3	3,3
d%	6,5	-1,9	-1,8	0	-0,8	2,2	0,6	-2	-55,5	-2,3	0,5	16,8	-20	-88	-17,5

X₀ – обявената стойност на производителя; X – средната стойност от получените резултати; d% – процентното отклонение

Корелационен и регресионен анализ

За целите на корелационния и регресионния анализ са изследвани по 100 проби на пациенти със стойности в цялата клинично измервана област, подбрани на случаен принцип, които са анализирани едновременно на двата хематоло-

гични анализатора – ADVIA®2120 и COULTER LH 750. Получените резултати от регресионния анализ са представени в табл. 9.

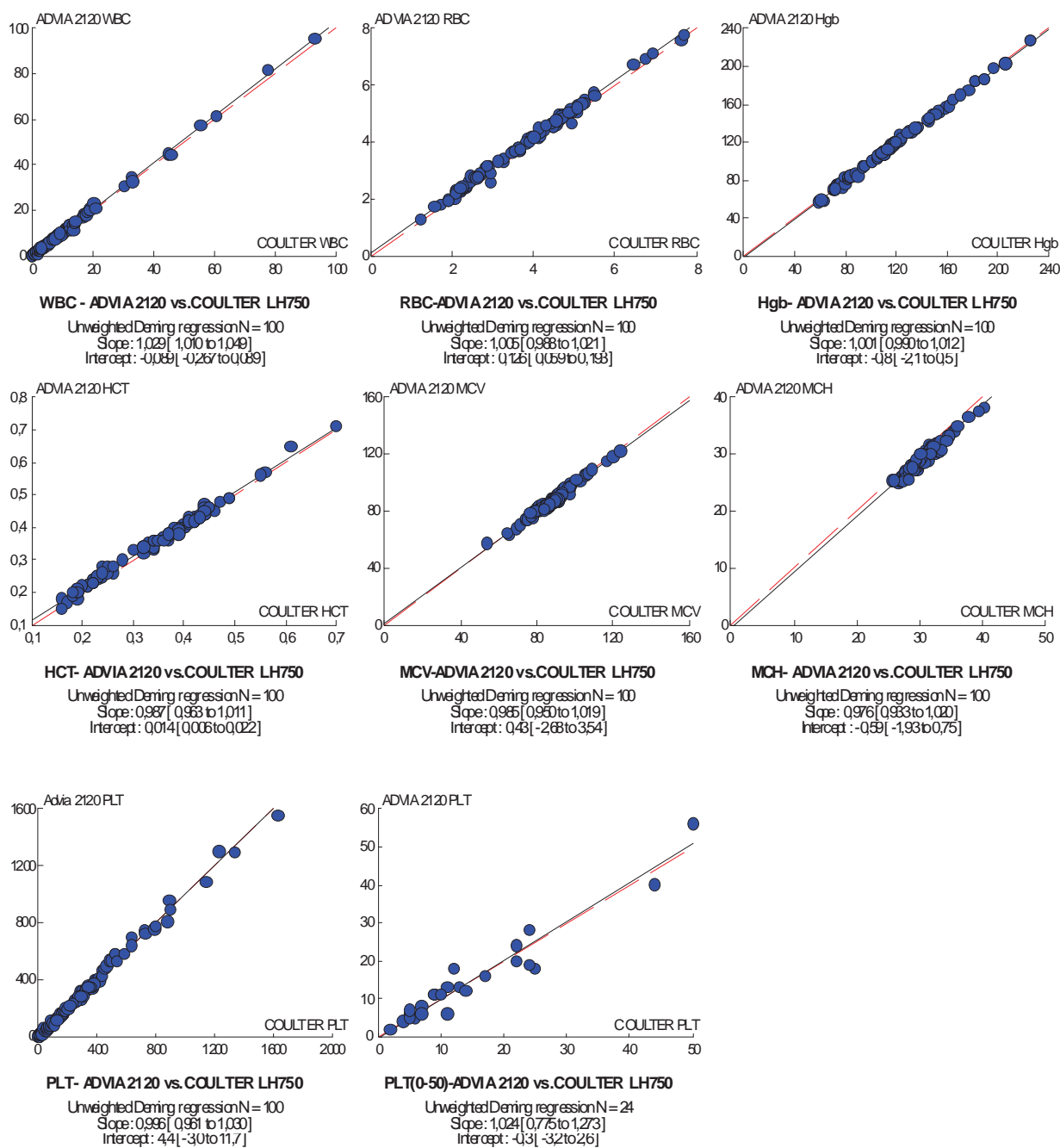
Мануално диференциално броене на левкоцитите бе извършено при 60 от пробите, като получените резултатите са сравнени в табл. 10.

Таблица 9. Корелационен и регресионен анализ на резултатите, получени с ADVIA®2120 и COULTER LH 750

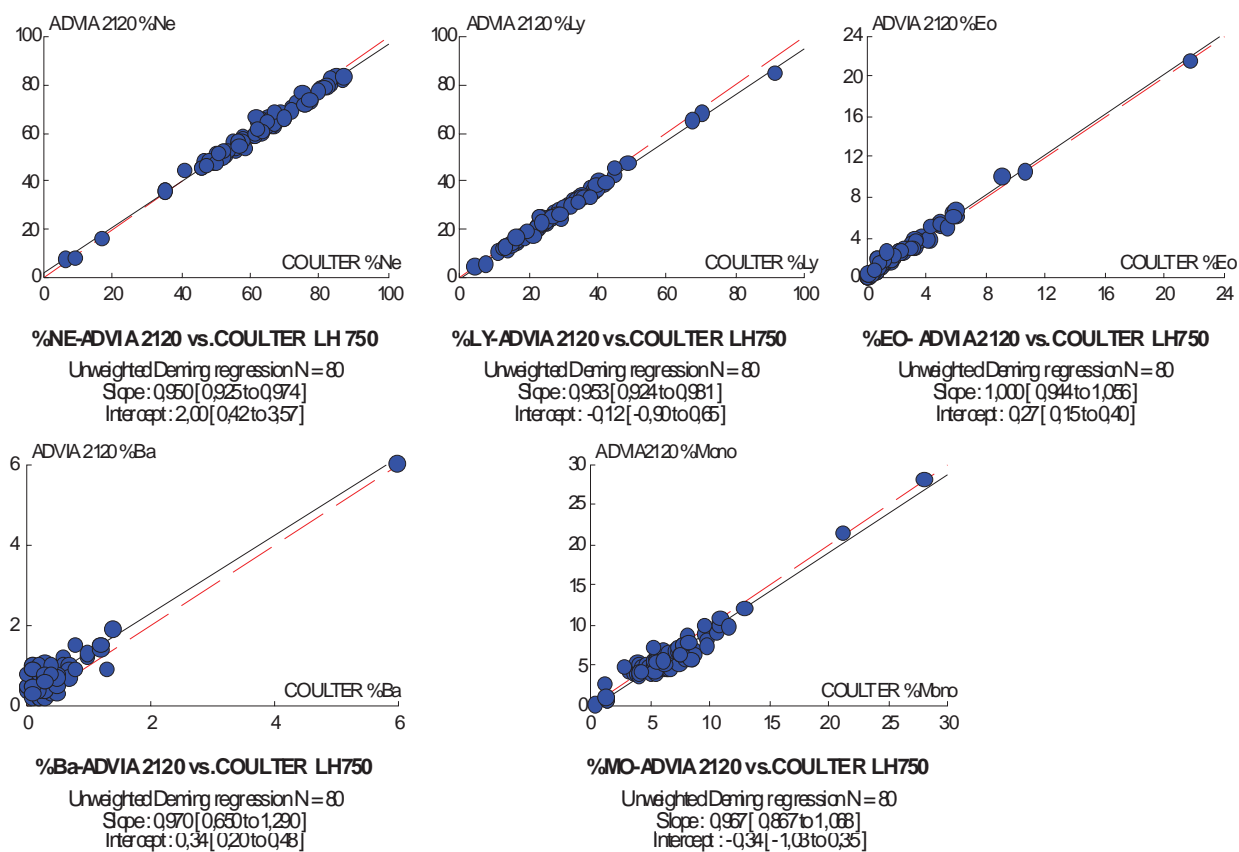
Параметър	r	Slope	Y-intersept	ADVIA 2120 Mean	COULTER LH 750 Mean	Bias
WBC	0,999	1,03	-0,09	12,1	11,8	-0,3
RBC	0,997	1,01	0,13	3,98	3,83	-0,15
Hb	0,999	1,00	-0,8	115	115	0
Hct	0,996	0,99	0,01	0,35	0,34	-0,01
MCV	0,988	0,99	1,4	87,2	88,1	0,9
MCH	0,972	0,98	-0,6	29,3	30,5	1,2
PLT	0,997	0,99	4,4	302	299	-3
%Neutrophils	0,993	0,95	2,0	60,3	61,4	1,1
%Lymphocytes	0,996	0,95	-0,1	27,1	28,6	1,5
% Eosinophils	0,994	1,00	0,3	2,6	2,3	-0,3
% Basophils	0,929	0,97	0,3	0,8	0,5	-0,3
% Monocytes	0,962	0,97	-0,3	6,3	6,8	0,5

Таблица 10. Корелационен и регресионен анализ на резултатите от диференциалното броене на левкоцитите и от определяне на ретикулоцитите, получени с ADVIA® 2120 и мануалния метод

Параметър	<i>r</i>	<i>Slope</i>	<i>Y-intercept</i>	ADVIA 2120 Mean	Manual mean	<i>Bias</i>
%Neutrophils	0,984	0,94	3,5	61,0	61,0	0
%Lymphocytes	0,975	0,96	-0,7	27,8	29,7	1,9
% Eosinophils	0,977	0,98	0,2	2,6	2,4	-0,2
% Basophils	0,906	0,91	0,5	0,8	0,4	-0,4
% Monocytes	0,951	0,88	1,1	6,2	5,7	-0,5
%Reticulocytes	0,996	0,91	0,2	3,16	3,21	0,5



Фиг. 1. Корелационен и регресионен (Deming) анализ при сравнение на резултатите от пълната кръвна картина, получени с ADVIA® 2120 и COULTER LH 750



Фиг. 2. Корелационен и регресионен (Deming) анализ при сравнение на резултатите от диференциалното броење на левкоцити, получени с ADVIA®2120 и COULTER LH 750

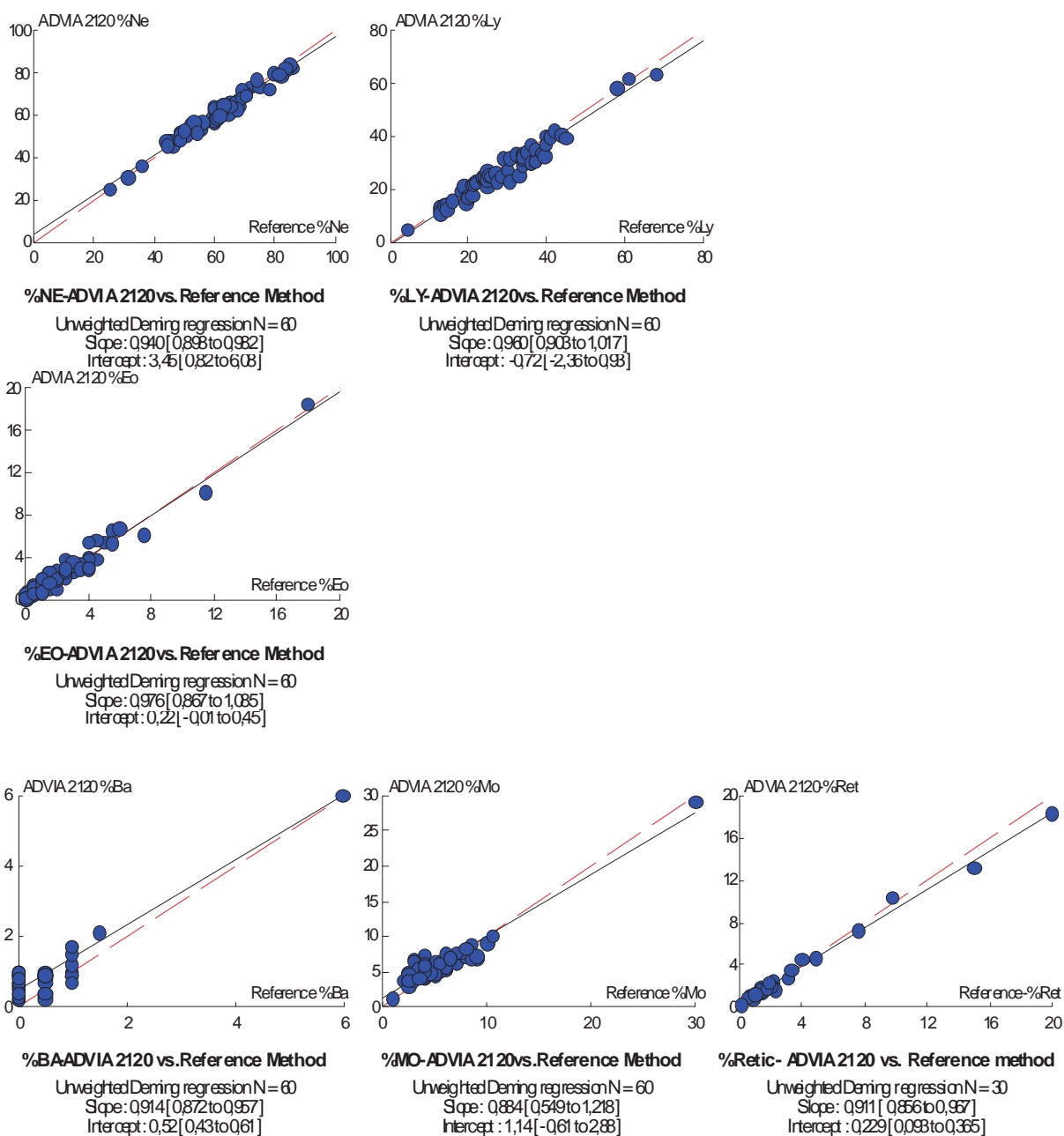
ОБСЪЖДАНЕ

В настоящото проучване бяха оценени точността и достоверността на хематологичния анализатор ADVIA®2120. Данните от статистическата обработка на резултатите показаха много добра възпроизводимост в серия: коефициент на вариация (CV%), по-малък от 2% за Hb, Hct, RBC, MCV, по-малък от 6% за WBC и по-малък от 7% за PLT. Възпроизводимостта от ден в ден, оценена с изследване на контролна кръв в трите клинично значими области, също бе много добра – CV% от 1% за Hb до 4,6% за PLT. Тези резултати удовлетворяват публикуваните в Медицинския стандарт по клинична лаборатория [1] допустими коефициенти на вариация на отделните параметри, както и международните критерии [3, 5, 8, 10].

Получените резултати от определяне на пълна кръвна картина и диференциалното броење на левкоцитите, получени с ADVIA®2120 и COULTER LH 750, показват висока положителна корелация. Повечето корелационни коефициен-

ти при изследваните параметри бяха над 0,96. По-ниски са корелационните коефициенти на клетките с нисък брой в кръвта (базофили, $r = 0,929$) и на клетките с вариабилна морфология като моноцитите ($r = 0,962$). По-ниски корелационни коефициенти за моноцити и базофили са цитирани и от други изследователи [6, 9]. Корелацията на тромбоцитите бе отлична ($r = 0,997$) дори и по отношение на критично ниските стойности (PLT под $50 \times 10^9/L$, $r = 0,966$).

Корелационните коефициенти при сравняване на резултатите от диференциалното броење на левкоцитите, получени с ADVIA®2120 и мануалния (референтен) метод, също са много добри – над 0,95, като съответно при базофилите се получава очаквано по-нисък корелационен коефициент (0,906). Наклонът (slope) на регресионните криви при отделните параметри е близък до 1, което означава, че размерът на пропорционалната системна грешка е приемлив. Много добри са и данните за Y-intercept, които показват клинично и статистически незначима постоянна системна грешка.



Фиг. 3. Корелационен и регресионен (Deming) анализ при сравнение на резултатите от диференциалното броене на левкоцити и от ретикулоцитите, получени с ADVIA® 2120 и мануалния (референтен) метод

Изводи

1. Резултатите от това проучване с контролни материали показаха много добра аналитична надеждност на хематологичния анализатор ADVIA® 2120.

2. Установена бе висока положителна корелация при сравняване на резултатите от изследване на проби на пациенти на ADVIA® 2120 с COULTER LH 750 и мануалния метод.

3. Изполваният софтуер с нагледно визуализиране на клетъчните популации и флагиране

на патологичните резултати е удобен и лесен за използване.

4. Способността му да определя наличие на големи нецветени клетки (LUC) и % бласти, полуколичествената оценка на морфологията на еритроцитите и възможността за изчисление на ретикулоцитни индекси го правят подходящ за по-специализирани хематологични лаборатории при изследване на пациенти с различни хематологични заболявания.

Библиография

1. Медицински стандарт по клинична лаборатория. Обн. ДВ. бр. 66 от 24 август 2010 г., изм. ДВ. бр. 92 от 23 ноември 2010 г.
2. Aulesa, C. et al. Validation of the Coulter LH 750 in a hospital reference laboratory. – *Lab. Hematol.*, 9, 2003; 15-28.
3. Barnes, P. W. et al. The international consensus group for hematology review: suggested criteria for action following automated CBC and WBC differential analysis. – *Lab. Hematol.*, 11, 2005, № 2, 83-90.
4. Buttarello, M. et M. Plebani. Automated blood cell counts: State of the art. – *Am. J. Clin. Pathol.*, 130, 2008, № 1, 104-116.
5. Buttarello, M. Quality specification in haematology: the automated blood cell count. – *Clin. Chim. Acta*, 346, 2004, № 1, 45-54.
6. Ducrest, S. et al. Flow-cytometric analysis of basophil counts in human blood and inaccuracy of hematology analyzers. – *Allergy*, 60, 2005, № 11, 1446-1450.
7. Fernandez, T. et al. Performance evaluation of the Coulter LH 750 hematology analyzer. – *Lab. Hematol.*, 7, 2001, № 3, 217-228.
8. Guidelines for the evaluation of blood cell analysers including those used for differential leucocyte and reticulocyte counting and cell marker applications. International Council for Standardization in Haematology: prepared by the ICSH Expert Panel on Cytometry. – *Clin. Lab. Haematol.*, 16, 1994, № 2, 157-174.
9. Harris, N. et al. Performance evaluation of the ADVIA 2120 hematology analyzer: an international multicenter clinical trial. – *Lab. Hematol.*, 11, 2005, № 1, 62-70.
10. International Council for Standardization in Haematology Expert Panel on Cytometry. Recommendation of the International Council for Standardization in Haematology for ethylenediaminetetraacetic acid anticoagulation of blood for blood cell counting and sizing. – *Am. J. Clin. Pathol.*, 100, 1993, № 4, 371-372.
11. Kaplan, S. S. et al. Performance characteristics of the Coulter LH 500 hematology analyzer. – *Lab. Hematol.*, 10, 2004, № 2, 76-87.
12. Piva, E. et al. Automated reticulocyte counting: state of the art and clinical applications in the evaluation of erythropoiesis. – *Clin. Chem. Lab. Med.*, 48, 2010, № 10, 1369-1380.
13. Segal, H. C. et al. Accuracy of platelet counting haematology analysers in severe thrombocytopenia and potential impact on platelet transfusion. – *Br. J. Haematol.*, 128, 2005, № 4, 520-525.
14. Thomas, C. et L. Thomas. Biochemical markers and hematologic indices in the diagnosis of functional iron deficiency. – *Clin. Chem.*, 48, 2002, № 7, 1066-1076.
15. Torres Gomez, A. et al. Utility of reticulocyte maturation parameters in the differential diagnosis of macrocytic anemias. – *Clin. Lab. Haematol.*, 25, 2003, № 5, 283-288.

Постъпила за печат на 15 февруари 2012 г.



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
ЦЕНТРАЛНА МЕДИЦИНСКА БИБЛИОТЕКА

ул. "Св. Г. Софийски" № 1, 1431 София

(02) 952-23-93, (02) 952-16-45, (02) 952-05-09, (02) 952-59-20, <http://www.mu-sofia.bg>

АБОНАМЕНТЕН СПИСЪК – 2012

Заглавие	Периодичност	Годишен абонамент в лв.
Acta Medica Bulgarica (на англ. език)	2	20
Акупунктура	2	14
Български медицински журнал	3	30
Детски и инфекциозни болести	2	16
Ендокринни заболявания	2	14
Медицински мениджмънт и здравна политика	3	21
Медицински преглед	4	48
Неврология и психиатрия	2	14
Обща медицина	4	32
Сестринско дело	3	24
Съвременна стоматология	3	30
Сърдечно-съдови заболявания	3	30
Хирургични заболявания	2	14