

POUZDANOST NALAZA UDJELA REAKTIVNIH LIMFOCITA NA HEMATOLOŠKOM ANALIZATORU ADVIA

Bošnjak, Josipa

Undergraduate thesis / Završni rad

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split / Sveučilište u Splitu**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:176:678682>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-15**



Sveučilišni odjel zdravstvenih studija
SVEUČILIŠTE U SPLITU

Repository / Repozitorij:

[Repository of the University Department for Health Studies, University of Split](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO – LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Josipa Bošnjak

**POUZDANOST NALAZA UDJELA REAKTIVNIH
LIMFOCITA NA HEMATOLOŠKOM ANALIZATORU ADVIA**

Završni rad

Split, 2014.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
MEDICINSKO – LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Josipa Bošnjak

**POUZDANOST NALAZA UDJELA REAKTIVNIH
LIMFOCITA NA HEMATOLOŠKOM ANALIZATORU ADVIA**

Završni rad

Mentor:

Doc. dr. sc. Biserka Getaldić – Švarc

Su- mentori:

mag. med. biok., spec. Daniela Šupe Domić

mag. med . biok., spec. Leida Tandara

Split, 2014.

Rad je izrađen na lokalitetu Kliničkog bolničkog centra Križine, pod nadzorom mag. med. biok. Leide Tandare i stručnim vodstvom mentorice doc. dr. sc. Biserka Getaldić – Švarc.

*Od srca se zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Biserka Getaldić – Švarc koja je svojim znanstvenim i stručnim savjetima oblikovala ideju i pomogli mi u izradi ovoga završnog rada
Hvala na strpljenju, pomoći i vodstvu pri izradi rada.*

Srdačno se zahvaljujem mag. med. biok. Leidi Tandari na nesebičnoj pomoći i susretljivosti pri izradi praktičnog dijela rada.

Također se srdačno zahvaljujem mag. med. biok. Danieli Šupe- Domić na neizmjernej podršci, savjetima te pomoći pri izradi završnoga rada.

Hvala svim kolegama i prijateljima na fakultetu koji su svojim prisustvom uljepšali studiranje jer to vrijeme smatram najljepšim dijelom svoga života. Posebno hvala nekolicu prijatelja s kojima sam naučila kako predavanja učiniti zabavnijim. Hvala starijim kolegicama na mudrim savjetima kako stručnim tako i životnim te društvu koje ste mi pružile. Bila mi je čast i zadovoljstvo upoznati vas sve!

Najveće hvala mojim divnim roditeljima koji su mi omogućili studij i obitelji na razumijevanju i podršci tokom studiranja! Dida moj, nisam baš doktorica ali sam nešto još lipše!

Josipa Bošnjak

SADRŽAJ

POPIS OZNAKA I KRATICA

1. UVOD

1.1. Automatizacija - doprinos zdravstvenom sustavu.....	7
1.1.1. Hematološki analizatori.....	7
1.2. Hematologija.....	9
1.2.1. Imunost.....	9
1.2.2. Organizacija imunostnog sustava.....	10
1.3. Limfociti.....	10
1.3.1. Razvojni put limfocita.....	11
1.3.2. Limfociti B i limfociti T.....	12
1.3.3. Stanice NK.....	13
1.4. Poremećaji limfocitnog (imunološkog) sustava.....	14
1.4. 1. Atipične imune proliferacije.....	14
1.4.1.1. Reaktivni limfociti.....	14
1.4.1.2. Infektivna mononukleoza.....	16
1.4.1.3. Sindrom infektivne mononukleoze.....	17
2. HIPOTEZA.....	18
3. CILJ I SVRHA RADA.....	18
4. MATERIJALI I METODE.....	19
4.1. Uzorci.....	19
4.2. Metode.....	19
4.2.1. Uzimanje uzorka periferne krvi za analizu.....	19
4.2.2. Analiza uzorka periferne krvi.....	19
4.2.3. ADVIA 2120.....	20
4.2.3.1. O ADVIA-i 2120.....	20
4.2.4. Analiza krvnog razmaza.....	22
4.4. Statistička obrada.....	23
5. REZULTATI.....	24

5.1. Usporedivost metoda.....	28
6. RASPRAVA.....	30
7.ZAKLJUČCI.....	31
8.SAŽETAK.....	32
9.SUMMARY.....	34
10.LITERATURA.....	36
11. PRILOZI.....	37
12.ŽIVOTOPIS.....	38

POPIS OZNAKA I KRATICA

T	limfocitno obilježje
B	limfocitno obilježje
CD	razlikovni biljeg (engl. cluster of differentiation)
GM-CSF	stimulirajući faktor rasta granulocita i makrofaga
TNF	faktora tumorske nekroze
Ig	imunoglobulin
IgM	imunoglobulin klase M
IgA	imunoglobulin klase A
IgD	imunoglobulin klase D
IgE	imunoglobulin klase E
NK	natural killer stanica
IM	infektivna mononukleoza
EBV	Epstein-Barr-ov virus
CMV	citomegalovirus
DNA	deoksi- ribonukleinska kiselina
MGG	May-Gröwald Giemsa
GVHD	reakcija transplantata protiv primatelja
AIDS	sindrom stečene imunodeficijencije

1.UVOD

1.1. Automatizacija- doprinos zdravstvenom sustavu

Naziv automatizacija se rabi za opisivanje procesa u kojem jedan ili više laboratorijskih analizatora izrađuje veliki broj analiza uz minimalno sudjelovanje laboratorijskoga osoblja.

Primjena informacijske i robotske tehnologije u laboratoriju, pojavila se još sedamdesetih godina prošloga stoljeća kao logičan slijed događaja uz sve prisutniju automatizaciju. Automatizacijom i robotizacijom dobrim se dijelom rješavaju različiti problemi jer u velikoj mjeri proširuju mogućnost i kapacitet laboratorija, smanjuju zamor laboratorijskog osoblja pa se povećavaju točnost i preciznost, povećavaju reproducibilnost rezultata i dovode do poboljšanja kvalitete laboratorijskoga rada primjenom kvalitetnih analitičkih metoda i učinkovitih programa osiguranja kvalitete. (1)

1.1.1. Hematološki analizatori – principi klasifikacije subpopulacija leukocita

Primjena automatizacije u hematologiji počela je potkraj pedesetih godina prošlog stoljeća. Područje rada hematologije dugo se temeljilo isključivo na ručnim metodama koje su bile prilično spore i iscrpljujuće. (2)

Veliko olakšanje rada su omogućili mikroprocesori kao sastavni dijelovi hematološkoga brojača. Omogućili su automatsko upravljanje, kontrolu radnog procesa, ispravak potencijalnih analitičkih pogrešaka te statističku obradu dobivenih rezultata. Tako su se hematološki brojači stanica razvili u hematološke analizatore koji uz osnovne hematološke parametre određuju i diferencijalnu krvnu sliku te pružaju dodatne podatke, ovisno o tipu analizatora.

Klasificiranje -diferenciranje leukocitnih subpopulacija s pomoću lasera može se provoditi uz prethodnu obradbu leukocita s peroksidazom. Sustav se temelji na protočnoj citometriji. Stanice su razrijeđene reagensom ali bez znatne promjene svojstava. Istodobno se na svakoj stanici provode tri mjerenja: volumen (*mjerenje el. otpora*), provodljivost (*mjerenje elektromagnetskim valovima visoke frekvencije*) te veličina i gustoća jezgre (*pomoću monokromatskog svjetla laserske zrake*). Analizator također ispisuje na nalaz napomene koje upozoravaju na moguće prisutne nezrele granulocite, atipične limfocite, blaste, eritroblaste, agregate trombocita, abnormalnu raspodjelu trombocita, eritrocita i leukocita.

Protočni citometar također može brojati i diferencirati stanice, koje se prethodno odvajaju i obrađuju specifičnim monoklonskim antitijelima, a fluorescentna se boja veže s pomoću sekundarnih protutijela kao indikator reakcije. Tijekom mjerenja stanice se rasprše u tekućem

mediju te hidromehaničkim fokusiranjem u protočnoj komorici razdvoje i jednolikom brzinom struje kroz područje detekcije. Svaku pojedinu stanicu osvjetljava svaka UV-laserska zraka. Raspršeno lasersko svjetlo skuplja se u detektoru pod malim kutom (1-19 °) što je razmjerno volumenu stanice i pod velikim kutom(90°) što daje podatke o strukturi stanice. Podatci se prevode u numerički prikaz ili za prikaz u obliku histograma. Ova tehnologija pruža mogućnost analize i tipizacije leukemičnih stanica, tumorskih stanica te analize i dokazivanja specifičnih proteina i staničnih enzima s visokom točnošću i reproducibilnošću u radu. (2)



Slika 1. Hematološki analizator ADVIA 2120

1.2. Hematologija

Hematologija je znanost koja se bavi proučavanjem krvi i to staničnog dijela, od nastanka u krvotvornim organima, preko funkcija i života u cirkulaciji i tkivima do propadanja ili utroška stanica tijekom obavljanja funkcija u organizmu. (3)

Krv je tekućina koja ispunjava intravaskularni volumen uz brojne funkcionalne aktivnosti koje su vezane za stanice krvi. Pa tako: prenosi kisik tkivu, CO₂ u pluća, prenosi potrebne tvari za proizvodnju stanica u koštanoj srži. Također sadrži obrambene mehanizme, prenosi metabolite otpadnih produkata te omogućuje procese zgrušavanja.

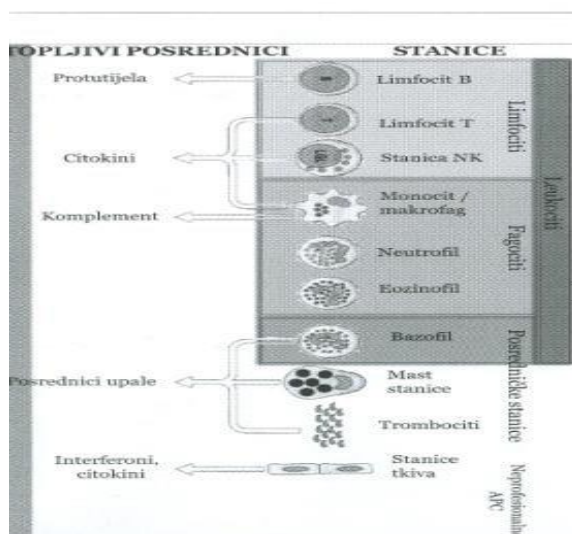
1.2.1. Imunost

Tijekom razvoja života na Zemlji, čovjek je stekao uspješne mehanizme obrane od infekcija. Ti mehanizmi postoje u organizmu i prije dodira s patogenim mikroorganizmima, a svakome od njih organizam se odupire na sličan način. (5)

Imunost je sposobnost organizma da se odupre djelovanju stranih tvari (antigena). Pojam imunosti u širem smislu riječi danas je proširen na specifične i nespecifične reakcije protiv najrazličitijih antigena, a ne samo mikroorganizama i toksina, u smislu očuvanja antigenskog i genskoga integriteta organizma.

Razlikujemo nespecifičnu ili urođenu otpornost koja postoji bez prethodnog dodira organizma s antigenom i njezino djelovanje je usmjereno protiv svih antigena s kojima organizam dođe u kontakt. Nespecifična imunost se temelji na anatomskim, fiziološkim, staničnim (fagocitnim) i upalnim zaprjekama.

Specifična ili stečena otpornost se aktivira prilikom kontakta organizma s nekim antigenom i usmjerena je samo protiv tog antigena. Prema izvršnim mehanizmima postoje dva oblika obrambenih reakcija; humoralna obrana koja je posredovana topljivim tvarima u tjelesnim tekućinama i stanična obrana, posredovana stanicama. Humoralni efektori imunosti su protutijela, a stanični efektori su limfociti. (6)



Slika 2. Podjela imuniteta

1.2.2. Organizacija imunosnog sustava

Imunosni sustav kod čovjeka nije lokaliziran nego se sastoji od limforetikularnih organa i tkiva koji su difuzno raspoređeni u organizmu.

Krv se sastoji od krvnih stanica i krvne plazme. Stanični dijelovi krvi su leukociti koji su važni u obrani organizma, eritrociti i trombociti.

Krvne stanice nastaju u koštanoj srži iz hematopoetskih matičnih stanica. Iz pluripotentnih matičnih stanica u koštanoj srži, nastaju multipotentne matične stanice i to dvije vrste: mijeloidne i limfoidne. Diferencijacijom i proliferacijom multipotentnih matičnih stanica nastaju usmjerene matične stanice za eritrocitnu, granulocitnu, limfocitnu i trombocitnu lozu.

Eritrocitopoezom nastaju crvene krvne stanice ili eritrociti. Granulocitopoezom nastaju stanice bijele krvne loze ili granulociti. Trombocitopoezom nastaju trombociti.

Limfocitopoezom nastaju limfociti. (4)

Leukociti su sve stanice krvi koje u fiziološkim uvjetima imaju jezgru. Prema morfološkim karakteristikama dijele se na : granulocite (na neutrofilne, eozinofilne i bazofilne), limfocite i monocite.

Limfatički organi su posebne strukture u kojima nastaju imunološke stanice, gdje one sazrijevaju i obavljaju svoju osnovnu funkciju.

Primarni ili centralni limfoidni organi su timus i koštana srž. Oni osiguravaju mikrookolišne uvjete u kojima pluripotentne matične stanice sazrijevaju u limfocite. U timusu sazrijevaju limfociti T, a u koštanoj srži limfociti B.

Sekundarni ili periferni organi su slezena, limfni čvorovi, limforetikularno tkivo u probavnom, dišnom i spolno- mokraćnom sustavu. U perifernim limfoidnim organima limfociti obitavaju, surađuju i djeluju. (6)

1.3. Limfociti

Limfociti ili limfatičke stanice najvažnije su stanice imunološkoga sustava jer su nositelji svih vrsta specifične imunosti.

Limfocit je mala stanica prosječne veličine oko 9 μm . Posjeduje ekscentrično položenu jezgu i oskudnu, bazofilnu citoplazmu. Populacija limfocita u fiziološkim stanjima sastoji se pretežno od malih i velikih limfocita. Manji broj limfocita krvi su veliki limfociti koji su kako im i ime kaže veći, obilnije bazofilne citoplazme u kojoj se može naći mali broj većih azurofilnih granula. U citoplazmi malih limfocita nema granula. (7)

U krvi postoje tri vrste limfocita: limfociti T koji čine glavninu stanica (65 - 85% svih limfocita), limfociti B (5- 15-5%), tzv. nula (0) stanice među kojima je većina NK- stanica, odnosno prirodnih stanica ubojica i mali broj hematopoenih matičnih stanica. Sve su te

stanice morfološki slične pa njihovo razlikovanje nije moguće bez upotrebe antitijela specifičnih za antigene koje svaka od tih limfocitnih subpopulacija ima .

Limfociti T i B su sastavni dio imunološkoga sustava. Imaju funkciju razlikovanja stranih molekula ili antigena od vlastitih. Posjeduju imunološki odgovor na strane antigene, sjećanje na susrete sa stranim antigenom (imunološko pamćenje) i time jači imunološki odgovor pri ponovnom ulasku tog istog antigena u organizam. NK stanice sudjeluju u obrani organizma od tumorskih stanica, virusnih stanica te vlastitih promjenjenih stanica.

Svaka stanica T i B ima na membrani receptore specifične za pojedine antigene. Vezanje antigena za receptore aktivira limfocite. Aktivirani limfociti napuštaju krv, ulaze u periferno limfoidne organe i u njima proliferiraju i diferenciraju se u zrele stanice, nakon čega počinje imunološki odgovor. (4)

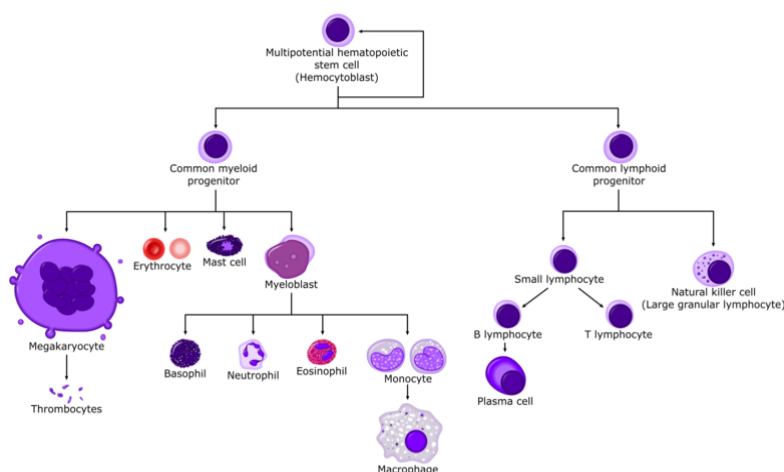
1.3.1. Razvoj limfocita

Iz multipotentne limfoidne stanica nastaju stanice pre-T i pre-B i prirodne stanice ubojice (NK- stanice prema engl. *natural killer*). Putovi razvoja stanica pre-T i pre-B su različiti.

Stanice pre-T iz koštane srži imigriraju u timus, gdje se diferenciraju i proliferiraju. Iz protimocita preko ranih timocita nastaju zreli timociti. Taj proces se zbiva pod djelovanjem timopoetina (stvara se u timusu), interleukina 1, interleukina 4, interleukina 6, GM-CSF(stimulirajući faktor rasta granulocita i makrofaga) i faktora tumorske nekroze (TNF).

Timociti u tijeku diferencijacije podliježu strogoj selekciji prema sposobnosti prepoznavanja vlastitih antigena. Iz timusa, limfociti T (timociti) odlaze u periferno limfoidne organe: limfne čvorove, slezenu i druge u kojima dalje sazrijevaju.

Stanice pre-B u koštanoj srži sazrijevaju u rane stanice B, koje odlaze u periferno limfoidne organe u kojima se nastavlja proliferacija i sazrijevanje. Nastaju srednje zreli i zreli limfociti B. Sazrijevanje limfocita B sastoji se u sintezi teških lanaca imunoglobulina M (IgM) u citoplazmi, kasnije IgM i IgD imunoglobulina u njihovoj membrani. Molekule imunoglobulina služe kao receptori za antigene. Javlja se i niz drugih receptora. Nakon susreta s antigenom, limfociti B proliferiraju i sazrijevaju u plazma- stanice preko faze plazmacitoidnih limfocita. Stanice u kojima nije uspjela sinteza IgM imunoglobulina, programirane su za umiranje (apoptozom).(4)



Slika 3. Razvoj limfocita

1.3.2. Limfociti B i limfociti T

LIMFOCITI B

Limfociti B služe za prepoznavanje antigena i nakon susreta s njima za diferencijaciju u plazma- stanice. Uz receptore za antigene na membrani limfocita B nalaze se i molekule za međusobno prepoznavanje vlastitih stanica. Većina se limfocita B nakon nekoliko ciklusa proliferacije diferencira u plazma- stanice, koje počnu proizvoditi imunoglobuline, protutijela na antigene koji su ih izazvali. Nakon dijeljenja stanica ostanu stanice sa pamćenjem (memory cells) na antigen koji ih je aktivirao. Najveći broj plazma- stanica luči IgG (>80%), manji broj IgA (15%) ili IgM (<5%) dok su IgD i IgE samo u tragovima.

Protutijela mogu uništavati mikroorganizme na dva načina: aktivacijom komplemента ili oblaganjem mikroorganizma (opsonizacijom). Djelovanja protutijela naziva se humoralnom imunošću.

LIMFOCITI T

Limfociti T imaju središnju ulogu u imunološkom sustavu. Postoje dvije vrste limfocita T: T4 i T8. Obje vrste imaju dvije podvrste. Među stanicama T4 nalaze se Th (helperi, odnosno pomagačke stanice) i Ti (induceri). Među stanicama T8 su Ts (supresori) i Tc (citotoksične) stanice. Te su stanice dio stanične imunosti.

Limfociti T4

Limfociti T4 čine $\frac{2}{3}$ krvnih limfocita. One mogu prepoznati samo odlomke antigena koje su djelomice razgradile B- stanice. Nakon susreta s antigenom dolazi do aktivacije stanica T4, njihove proliferacije i proizvodnje limfokina koji potiču proliferaciju i diferencijaciju aktiviranih limfocita B, čime počinje odgovor limfocita B na djelovanje antigena.

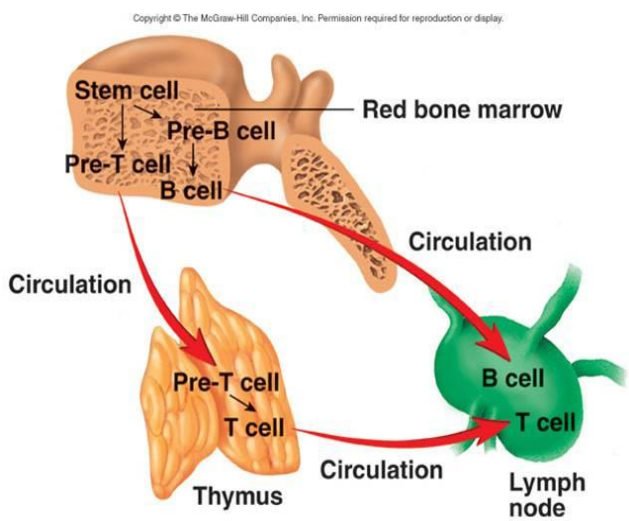
Limfociti T8

Limfociti T8 čine $\frac{1}{3}$ krvnih limfocita. One dodirrom otkrivaju strane antigene na stanicama koje su inficirane virusom i na stanicama zloćudnih tumora. Supresorski limfociti T8 smanjuju odgovor stanica B na antigene. Citotoksični i citolitički limfociti T8 izravno oštećuju ciljne stanice. Do tada mirne stanice, nakon aktivacije postaju stanice ubojice. One se preko receptora vežu za ciljne stanice, ubace u njih citolitične tvari iz svojih granula i razore ih. Nakon toga se odvoje spremne za nove napade.

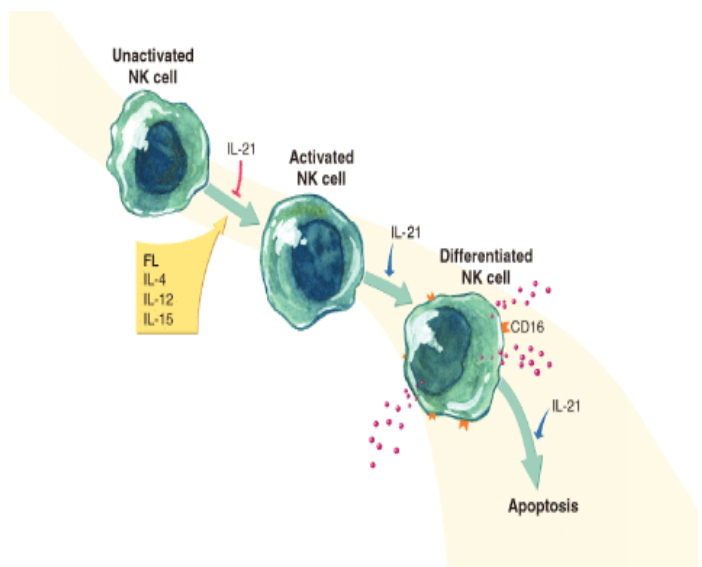
1.3.3. Stanice NK (natural killer - prirodne stanice ubojice)

NK stanice su podvrsta limfocita T koja ima sposobnost uništavanja stanica bez predhodnog susreta sa antigenom. Programirane su za uništavanje: virusima inficiranih stanica, tumorskih stanica, vlastitih nezrelih ili nepotpuno zrelih stanica. Kad se NK stanice susretnu s ciljnim stanicama, one ubace u njih citolitičke tvari iz svojih granula i unište ih. Interferoni pojačavaju djelovanje samih NK stanica.

NK stanice su odgovorne za prirodnu otpornost na virusne i druge infekcije i tumore. Normalno ih u krvi ima 10%. Njihov broj se povećava u vrijeme virusnih infekcija i nekih imunoloških odgovora. One mogu sudjelovati i u potiskivanju prejakih imunoloških odgovora u autoimunim bolestima i reakcijama transplantata protiv domaćina (GVHD prema eng. *Graft Versus Host Disease*). (4)



Slika 4. Razvoj limfocita T i B



Slika 5. Aktivacija i djelovanje NK stanica

1.4. Poremećaji limfocitnog (imunološkog) sustava

Ispitivanje koje smo proveli uključuje pojavnost reaktivnih ili atipičnih limfocita u krvi koji se javljaju u određenim stanjima. Ukratko ćemo objasniti određene uzročnike atipične imune proliferacije humanih limfocita, stanja u kojima nalazimo reaktivne limfocite u krvi.

Promjene u limfocitnom sustavu mogu uzrokovati mikroorganizmi, posebice virusi, neki lijekovi i za sada nepoznati čimbenici. Posljedice tih promjena mogu biti povećana proliferacija limfocita praćena limfadenopatijom i splenomegalijom, promijenjen broj limfocita u perifernoj krvi (limfocitoza i limfocitopenija), promijenjena morfologija limfocita te lučenje reaktivnih (atipičnih) limfocita.

1.4.1. Atipične imune proliferacije

Kao što je prethodno spomenuto, virusi, neki lijekovi te nepoznati čimbenici mogu izazvati različite odgovore imunološkoga sustava pa tako i one s neuobičajenom kliničkom i “atipičnom” histološkom slikom.

Najčešći virusni uzročnik atipične proliferacije je Epstein - Barrov virus (EBV) ili sindrom infektivne mononukleoza (IM). Smatra se da je njime zaraženo 90% svjetske populacije. Osim EBV u kojima nalazimo reaktivne limfocite, postoje ostali sindromi nalik na IM kao infekcija citomegalovirusom (CMV) te toksoplazmoza.

1.4.1.1. Reaktivni limfociti

Reaktivni limfocit je ne-maligni leukocit nađen u perifernoj krvi. Pojavljuje se kao nespecifični odgovor na stres. Mali limfocit postaje veći i sposoban se dijeliti. Izvorno ga je opisao Turk 1907 u perifernoj krvi pacijenata s IM, a i kasnije detaljnije klasificiran po Downey-u i McKinlay-u 1923. Danas je to atipični limfocit, Downey-ova stanica, ili reaktivni limfocit te je on marker bolesti kada se pronađe u perifernoj krvi. Još nije u cjelosti postignuta suglasnost o nazivu ovih stanica pa se u literaturi iste stanice nazivaju svim gore navedenim sinonimima. Mišljenja smo da je naziv reaktivni limfocit najbliže stvarnom opisu stanice jer atipični limfocit može obuhvatiti sve morfološki izmjenjive stanice što uključuje i imunoproliferirajuće bolesti (8)

Morfologija

Reaktivni limfociti se morfološki razlikuju kao i svojstvima površinskih markera koji obuhvaćaju heterogenu smjesu tipova stanica. Ovo je rezultat poliklonskog imunološkog odgovora na antigenu stimulaciju. Morfologija se razlikuje od slučaja do slučaja. Identificiraju se na temelju njihove povećane površine i prisutnosti aktivne sinteze DNA.

Reaktivne limfocite su vrlo detaljno opisali Downey i McKinley i klasificirali su ih u tip 1, 2 i 3.

Tip 1, najčešće viđen oblik, sastoji se od lobulirane jezgre koja sadrži mase kromatina i poroznu, često vakuoliziranu i bazofilnu citoplazmu.

Tip 2, najrjeđe viđen oblik, nalik je plazma stanicama i sadrži ekscentrično položenu jezgru s gustim, okruglim ili uglatim kromatinom. Lagana bazofilija citoplazme se proteže od jezgre do vanjskog staničnog zida.

Tip 3, nalik je blastima koje nalazimo u leukemijama. U jezgri sadrži nukleole i „razliveni“ kromatin. Citoplazma je veća nego kod leukemijskih blasta, često vakuolizirana i u nekim stanicama jako bazofilna. Ova vrsta stanice je često uzrok pogrešne dijagnoze leukemije u stanjima infektivne mononukleoze. Ova stanica predstavlja reaktivnog limfocita koji sadrži nezrelu ili mladu jezgru, nukleole i obilnu citoplazmu. Ova stanica se naziva imunoblast.(9)

Uloga

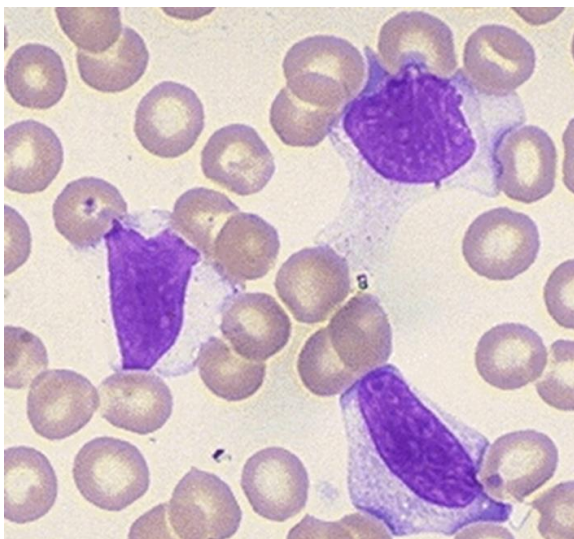
Sveprisutnost reaktivnih limfocita ukazuje da imaju važnu ulogu u imunološkom odgovoru I u najbolje su istraženi u krvi bolesnika sa sindromom infektivne mononukleozoe.

Razna istraživanja su pokazala da reaktivni limfociti posjeduju oba T i B tipa limfocita. Njihova heterogenost upućuje na prirodnu reaktivnost stanica. Ove studije su također potvrdili da se aktivno dijele. Antigeni poticaj dovodi do poliklonske proliferacije limfocita.

Novija istraživanja ukazuju da su reaktivnih limfociti zapravo aktivirani T-limfociti koji se luče kao odgovor na inficirane B-limfocite.

Reaktivnih limfocita su pronađeni u nakupinama u područjima upale kao što su jetra i ždrijelo osoba s infektivnom mononukleozom. Oni djeluju kao normalni limfociti na mjestima lokalne upale, s ulogom u imunološkom odgovoru.

Imunost posredovana stanicama je važna u obrani domaćina protiv virusnih infekcije i zloćudnih novotvorina. Kod infektivne mononukleoze, reaktivni limfociti su dio normalnog imunog sustava koji pomaže u kontroli potencijalno fatalne mononukleoze izazvane B-stanicama kod čovjeka. (8)



Slika 6. Reaktivni limfociti

1.4.1.2. Infektivna mononukleoza

Sindrom infektivne mononukleoze (IM) je bolest koju u 80-90% slučajeva uzrokuje Epstein-Barrov virus. On se prenosi primarno slinom i seksualnim putem.

Virus zarazi epitelne stanice orofarinksa i limfocite B, kojima su bogati usta i ždrijelo. Preko limfocita B infekcija se širi u limforetikularni sustav. Virus se u limfocitima B replicira, izaziva proliferaciju limfocita B i lučenje dvaju vrsta protutijela: protutijela protiv specifičnih virusnih antigena i nespecifična protutijela, tzv. heterofilna protutijela. Na prisutnost inficiranih i transformiranih limfocita B, reagiraju limfociti T proliferacijom supresorskih i citotoksičnih limfocita (T8). Taj je odgovor usmjeren na kontrolu rasta inficiranih limfocita B i preventivu nastanka limfoproliferacijskih bolesti. Inkubacija bolesti traje od 30 do 50 dana.

Klinička slika

Klinička slika je posljedica primarne proliferacije inficiranih limfocita B i prekomjerno istaknutog T- staničnog odgovora.

Glavni simptomi su: umor, malaksalost, boli u mišićima, povišena tjelesna temperatura, bol u ždijelu, ponekad mučnina.

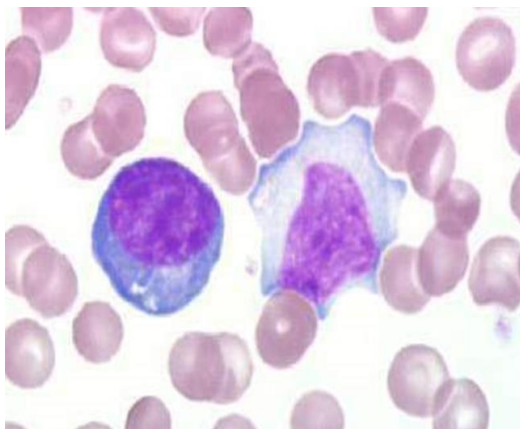
Kliničkim pregledom se mogu naći povećani limfni čvorovi, najčešće vratni, obično umjerena hepatosplenomegalija i periorbitalni edemi.

Laboratorijski nalazi

U laboratorijskom nalazu imamo prisutnost *reaktivih limfocita* (stanice infektivne mononukleoze), heterofilnih i specifičnih protutijela.

U krvnoj slici je blago snižen broj eritrocita, broj leukocita je povišen ($12-25 \times 10^9/L$) dok je broj trombocita normalan ili blago snižen.

U razmazu krvi je smanjen broj neutofila uz pomak diferencijalne krvne slike ulijevo. Limfociti su brojčano povećani i morfološki promjenjeni. Oni su veliki, bazofilne citoplazme s azurofilnim granulama (limfociti T8). (4.1)



Slika 7. Reaktivni limfocit

1.4.1.3. Sindrom infektivne mononukleoze

Sindrom infektivne mononukleoze u 10 % slučajeva oboljelih izazivaju citomegalovirus (CMV) ili toksoplazma (*Toxoplasma Gondii*).

Citomegalovirus

Infekcija citomegalovirusom u odraslih osoba su uočene kao posljedica transfuzije i transplantacije. Može se javiti kao kongenitalna i perinatalna infekcija te kod pacijenata s AIDS-om. U krvnoj slici eritrociti su blago sniženi kao i trombociti, dok je broj leukocita normalan ili blago povećan. U razmazu periferne krvi prevladava limfocitoza s manjim postotkom reaktivnih limfocita. Serološkim testovima se dokazuje postojanje infekcije CMV.

Toksoplazmoza

Uzročnik toksoplazmoze je *Toxoplasma gondii*, intracelularni parazit. Može se pojaviti kao kongenitalna infekcija, s inficirane majke na fetus.

U perifernoj krvi nalazimo cirkulirajuće reaktivne imfocite, iako ne tako tipične ili istaknute kao kod IM i CMV infekcije. Serološkim testovima se dokazuje postojanje infekcije *Toxoplasma gondii*. (9)

2. HIPOTEZA

Pregled kompletne krvne slike, uključujući eksplicitnu pet parametarsku diferencijalnu krvnu sliku na hematološkim analizatorima omogućuje postavljanje dijagnoze različitih hematoloških bolesti i stanja. Pregledom rezultata diferencijalne krvne slike na hematološkim analizatorima moguće je uočiti pojedine tipove leukocitnih subpopulacija i na temelju oznaka prisustva izmjenjenih stanica moguća je brža diferencijalna dijagnostika hematoloških poremećaja. Pri tome je važno dobro poznavanje oznaka koji analizatori izdaju pri klasificiranju leukocitnih subpopulacije jer su one vodilja u provjeri morfoloških promjena optičkom mikroskopijom.

3. CILJ i SVRHA RADA

Ispitivanja u ovom radu biti će istovremeno usmjerena na određivanje :

1. pouzdanost nalaza prisustva reaktivnih limfocita na hematološkom analizatoru ADVIA 120 provjerom reproducibilnosti (preciznost)
2. utvrđivanjem razine usporedivosti udjela (postotka) LUC stanica određenih na hematološkom analizatoru i pregledom razmaza obojenog metodom MGG
3. utvrđivanjem razine osjetljivosti (najniži broj reaktivnih limfocita) koji analizator klasificira.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Uzorci

U svrhu istraživanja koristili smo rezultate 60 uzoraka periferne krvi rutinski analiziranih u KBC Split – Hematološki laboratorij. Prema podacima dostupnim iz uputnica 30 uzoraka je svrstano u skupinu zdravih ispitanika, dok je skupina od 30 ispitanika imalo patofiziološke promjene.

Svi uzorci koji su korišteni u izradi krvnih razmaza bili su ostatna krv, uz nepoznavanje demografskih podataka ispitanika u skladu sa etičkim pravilima ispitivanja za koje nije potreban pismeni pristanak ispitanika.

4.2. METODE

4.2.1. Uzimanje uzoraka periferne krvi za analizu

Uzorak venske krvi se dobije venepunkcijom kubitalne vene. Nakon početne provjere i identifikacije pacijenta, počeli smo s uobičajnim postupkom uzimanja venske krvi.

Zamolimo pacijenta da stisne šaku, podvežemo podvezu i pronalazimo mjesto uboda (venu). Mjesto uboda dezinficiramo 70% alkoholom i pričekamo da se mjesto uboda osuši. Fiksiramo venu, postavimo iglu paralelno sa venom, pod kutem od 45° te iglom uđemo u venu. Koristili smo zatvoreni sistem s podtlakom. Nakon što smo pustili da krv slobodno teče u epruvete, skinemo podvezu, pacijent opusti šaku. S obzirom da smo koristili epruvete za kompletnu krvnu sliku (ljubičasti čep) koja sadrži antikoagulans EDTA, neposredno nakon vađenja krvi epruvetu smo lagano okrenuli 5-10 puta da se pomješa puna krv s antikoagulansom. Pri završetku postupka na ubodno mjesto smo stavili jastučić od vate te fiksirali ljepljivom trakom.

Napomena: određeni uzorci krvi su doneseni u laboratorij na analizu iz drugih bolničkih odjela.

4.2.2. Analiza uzorka periferne krvi

Nakon postupka uzimanja uzorka periferne krvi, uzorci su analizirani na hematološkom analizatoru ADVIA 2120.

Prije samog analiziranja uzoraka, provdena je analitička kontrola kvalitete aparata analizom komercijalnih kontrolnih uzoraka. Prije unošenja u aparat, uzorci su provjereni (ime i prezime, pretraga, prisutnost ugruška), čep epruvete je obrisan u slučaju prisutnosti kapljica krvi koje bi eventualno mogle ometati uobičajni rad analizatora, točnije začepiti igle

analizatora. Uzorci su poslagani na točno određene stalke i stavljeni u aparat. U roku od desetak minuta imali smo rezultate pretraga.

4.2.3. ADVIA 2120

4.2.3.1. O ADVIA-i

ADVIA 2120 je hematološki analizator tvrtke Bayer, potpuno automatiziran s mogućnošću analize 120 uzoraka na sat (KS/DKS). Za analizu koristi punu krv s mogućnošću izrade pet kombinacija analiza, a to su:

- Brojčane vrijednosti krvne slike (CBC)
- CBC s diferencijalnom krvnom slikom (CBS/diff)
- Apsolutni broj retikulocita i postotak retikulocita (retic)
- CBS/diff sa retikulocitima (CBS/diff/retic)
- CBS sa retikulocitima (CBS/retic)

Analizator uz elektronske, hidraulične, zračne i analitičke mehanizme za uzorak sadrži i prostor za pohranu svih reagensa za rad, Defoamera i otopine za ispiranje osim Sheat/Rinse. Sustav za otpad je sustavni dio analizatora. Postoje tri mogućnosti za aspiraciju uzorka i to putem autosampler-a, ručnim načinom iz otvorene vakuete i ručnim načinom iz zatvorene vakuete. Identifikacija uzoraka može se vršiti putem barcoda, putem ručnog unošenja identifikacijskoga broja ili putem uređenog radnog niza vakueta sa uzorcima po stalcima i pozicijama.

UFC blok je najvažniji dio ADVIA 2120 sustava. Sastavljen je od osam ploča izrađenih od poliakrila. Spojevi ovih ploča čine puteve kojima se kreću uzorci, reagensi i zrak tijekom rada analizatora.

U sklopu bloka nalaze se dijafragmalne pumpe koje ubrizgavaju reagense u sistem. Osnovni dijelovi UFC bloka su hemoglobinska komora, bazo-reakcijska komora, eritrocitna, retikulocitna i perox reakcijska komora, razdjelni ventil (shear valve) i reagens pumpe.

Razdjelni ventil dijeli uzorak u točne volumene potrebne za pojedinu vrstu analiza koje analizator obavlja. Pet reakcijskih komora su prošireni prostori unutar UFC bloka u kojem se mješaju uzorak i reagens i u kojima se odvija citokemijska reakcija. Perox i bazo-reakcijske komore su ugrijane komore kako bi se citokemijska reakcija odvijala što brže. U perox komori uzorak se miješa s reagensima Perox 1, Perox 2 i Perox 3. U bazo komori uzorak se miješa s basodil reagensom da bi se bazofilni granulociti odvojili od mono i polinukleara.

Reakcijska komora za hemoglobin služi kao optička kiveta u kojoj se očitava koncentracija hemoglobina klasičnom cijanmethemoglobinskom metodom.

RBC/PLT reakcijska komora i retikulocitna komora služe kao spremišta u kojima se mješaju uzorak i reagens za željenu citokemijsku reakciju.

Kalibracija i kontrola

Kalibracija analizatora radi se sa komercijalnim kalibratorom svježe pune krvi i direktno se kalibriraju. Analizator ima svoj program kontrole kvalitete i uključuje analizu rezultata kontrolnih krvi na tri nivoa: niskom, normalnom i visokom.

Rezultati kontrola prikazuju se za određeni lot brojačano i grafički, mogu se printati ili biti memorirani (10).

Princip rada i metode

Pri određivanju hematoloških parametara analizator ADVIA 2120 rabi tehnologiju mjerenja rasapa svjetlosti laserske zrake. Prema Mievoj teoriji rasapa svjetlosti na homogenim sferama, rasap laserske svjetlosti mjeren pri malom (2-3) i pri velikom kutu (5-15) za svaku pojedinačnu stanicu pretvara se u mjeru volumena i mjeru unutarnje strukture (za eritrocite – hemoglobin, za leukocite – lobularnost jezgre, za trombocite – granule).

U analitičkim sustavima koji rabe jednodimenzijisku analizu trombocita prisutan je metodološki problem – razlikovanje trombocita od netrombocitnih čestica usporedive veličine, a to su najčešće fragmentirani eritrociti, mikrociti i stanični debris, a nadalje, dolazi do preklapanja mikrocita i makrotrombocita.

Dvodimenzijaska analiza trombocita donijela je nove parametre, trombocitne indekse. Uz mjeru veličine trombocita, MPV, postoje MPM (prosječna masa trombocita), MPC (prosječna koncentracija sadržaja trombocita), te mjere njihovih raspodjela PMDW i PCDW. Primjena trombocitnih indeksa našla je svoje mjesto pri određivanju aktivacije trombocita pošto se u tom procesu mijenja oblik trombocita, oni bubre i degranuliraju.

Analiza leukocita odvija se na dva različita mjerna kanala, na jednom se mjeri aktivnost mijeloperoksidaze i veličina stanica, a na drugom leukocitnom kanalu određuje se granularnost jezgri i veličina stanica. Činjenica da se blasti mogu detektirati na oba mjerna kanala ukazuje na povećanu osjetljivost i specifičnost ovog parametra, koji se još uvijek na hematološkim analizatorima izražava kao oznaka upozorenja.

Velike peroksidaza-negativne stanice (LUC – large unstained cells) rabe se za dijagnosticiranje i praćenje akutnih leukemija i mijelodisplastičnog sindroma, a smatraju se prognostičkim čimbenikom u B-KLL i u virusnim infektivnim bolestima.

LUC populacija raste tijekom neutropenične faze nakon primjene kemoterapije i tijekom faze oporavka. Apsolutni broj LUC stanica pozitivno korelira s apsolutnim brojem blasta, CD 34+ i CD3+/CD4+ stanicama prije nadir faze tijekom kemoterapijskog ciklusa. Nakon te faze LUC stanice pokazuju pozitivnu korelaciju s CD2+/CD56+ stanicama (NK-stanice).

LUC stanice pokazuju negativnu korelaciju s brojem neutrofila i s parametrom MPXI. MPXI se pokazao kao potencijalni biljeg za praćenje aktivnosti G-CSF, on raste u neutropeničnih

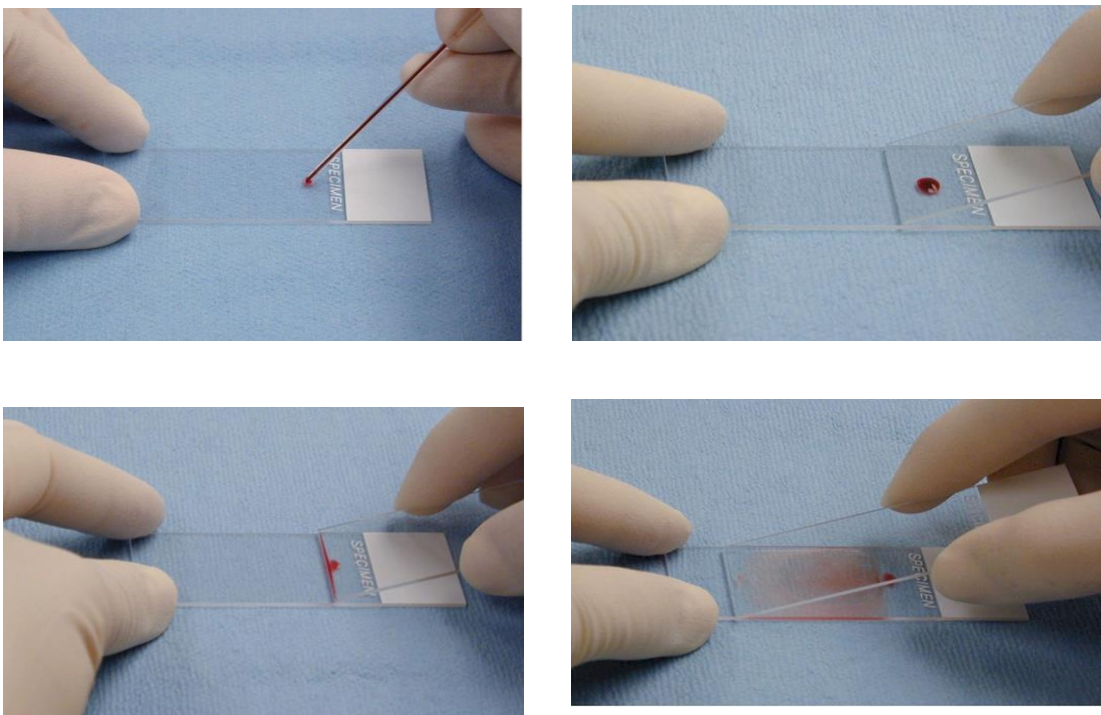
pacijenata liječenih s G-CSF, a pokazuje naglo smanjenje u prenadir fazi. Postotak LUC stanica i MPXI su biljezi nadir faze i mogu pomoći u predviđanju trajanja neutropenije.

Prognostički značaj LUC stanica i MPXI je pokazan kod pacijenata koji se oporavljaju od znatne neutropenije uzimanjem G-CSF. Brže se oporavljaju pacijenti koji u prenadir fazi imaju niski MPXI, povećan broj blasta i CD34+/CD45+ stanica, te veliki porast LUC stanica. (11)

4.2.4. Analiza krvnog razmaza

Kao što je već spomenuto, kontrola analize DKS-a hematološkog analizatora ADVIA-e je mikroskopski pregled razmaza krvi. Nakon zaprimanja uzorka krvi te analize u analizatoru napravili smo krvni razmaz klasičnim postupkom.

Uzorak krvi smo lagano promješali, umetnuli dispensor na čep epruvete te pritisnuli dispensor na rub predmetnog stakalca. Pomoću pokrvnog stakalca, razvukli smo kap krvi pod kutem od 30-45° i dobili krvni razmaz.



Slika 8 Postupak izrade krvnog razmaza

Bojanje uzoraka

Nakon sušenja razmaza na sobnoj temperaturi pola sata, slijedi bojanje. Korišteno je May-Grunwald Giemsa bojanje.

May-Grunwald otopinu pažljivo nanijeti na prethodno na zraku osušen i horizontalno postavljen preparat razmaza krvi, tako da boja prekrije čitavu površinu koja se boji tijekom 5 minuta. Uklonili smo boju ispiranjem razmaza sa destiliranom vodom. Potom smo svježe priređenu Giemsa otopinu (razr. 1:10) nanijeli na razmaz i bojili 30 minuta, a nakon toga ispirati destiliranom vodom. Razmaz smo sušiti na sobnoj temperaturi u kosom položaju na stalku za sušenje. Nakon sušenja preparat je bio spreman za mikroskopski pregled.

4.4. Statistička obrada

Značajnost razlike ispitivanih metoda za obje grupe ispitanika ispitana je regresijskom raščlambom Passing- Bablok koja se koristi za ispitivanje usporedivost metoda u laboratoriskoj dijagnostici.

Sve su statističke obrade obavljene u programskom paketu MedCalc11.5.0.0.® za Windows (MedCalc Software, Broekstraat 52, Belgium)

5. REZULTATI

1. Preciznost nalaza prisustva reaktivnih limfocita smo određivali na jednom uzorku koji smo ponovili 10 puta te smo dobili rezultat koeficijenta varijacije od 4,5% (KV= 4,5%)

U tablici br. 5.1. prikazani su rezultati zastupljenosti reaktivnih limfocita u skupini zdravih ispitanika određenih na hematološkom analizatoru ADVIA .

BROJ ISPITANIKA	VRIJEDNOST LUC stanica (%)	BROJ ISPITANIKA	VRIJEDNOST LUC stanica (%)
1.	3.1	16.	2.1
2.	1.3	17.	2.3
3.	1.8	18.	1.7
4.	1.2	19.	2.9
5.	1.4	20.	0.9
6.	0.8	21.	1.2
7.	1.2	22.	1.7
8.	2.0	23.	1.1
9.	1.9	24.	2.1
10.	1.9	25.	1.8
11.	0.9	26.	1.4
12.	2.4	27.	2.1
13.	2.4	28.	2.6
14.	1.4	29.	0.9
15.	1.0	30.	2.0

U tablici br. 5.2. prikazani su rezultati zastupljenosti reaktivnih limfocita u skupini ispitanika sa patofiziološkim promjenama određenih na hematološkom analizatoru ADVIA

BROJ ISPITANIKA	VRIJEDNOST LUC stanica (%)	BROJ ISPITANIKA	VRIJEDNOST LUC stanica (%)
1.	4.5	16.	6.5
2.	10.1	17.	5.1
3.	4.3	18.	6.2
4.	5.4	19.	13.8
5.	5.6	20.	6.7
6.	4.6	21.	6
7.	6.8	22.	15.1
8.	27	23.	4.7
9.	25	24.	7.1
10.	5	25.	5.1
11.	13.3	26.	8.6
12.	6.7	27.	13
13.	7.6	28.	9.1
14.	5.8	29.	11
15.	6.3	30.	14.2

U tablici br. 5.3. prikazani su rezultati zastupljenosti reaktivnih limfocita u skupini zdravih ispitanika određenih na mikroskopu.

BROJ ISPITANIKA	VRIJEDNOST REAKTIVNIH LIMFOCITA (%) MIKROSKOP	BROJ ISPITANIKA	VRIJEDNOST REAKTIVNIH LIMFOCITA (%) MIKROSKOP
1.	5	16.	2
2.	0	17.	3
3.	0	18.	0
4.	3	19.	4
5.	0	20.	2
6.	0	21.	0
7.	4	22.	0
8.	1	23.	1
9.	0	24.	2
10.	5	25.	1
11.	0	26.	0
12.	3	27.	3
13.	4	28.	3
14.	0	29.	0
15.	0	30.	1

U tablici br. 5.4. prikazani su rezultati zastupljenosti reaktivnih limfocita u skupini ispitanika sa patofiziološkim promjenama određenih na mikroskopu.

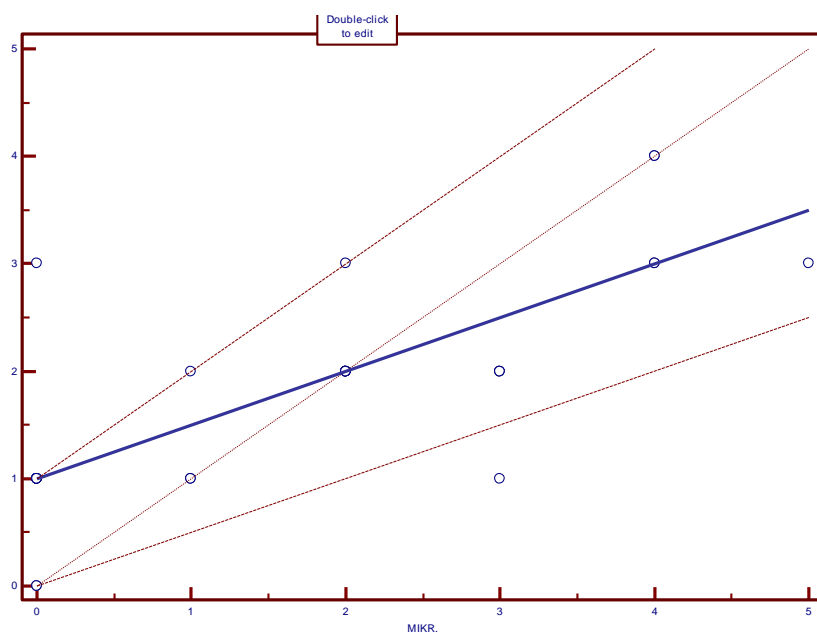
BROJ ISPITANIKA	VRIJEDNOST REAKTIVNIH LIMFOCITA (%) MIKROSKOP	BROJ ISPITANIKA	VRIJEDNOST REAKTIVNIH LIMFOCITA (%) MIKROSKOP
1.	6	16.	4
2.	8	17.	5
3.	4	18.	14
4.	4	19.	11
5.	4	20.	9
6.	5	21.	6
7.	6	22.	16
8.	26	23.	4
9.	55	24.	8
10.	7	25.	6
11.	17	26.	22
12.	4	27.	11
13.	6	28.	5
14.	7	29.	9
15.	6	30.	17

5.1. Usporedivost metoda

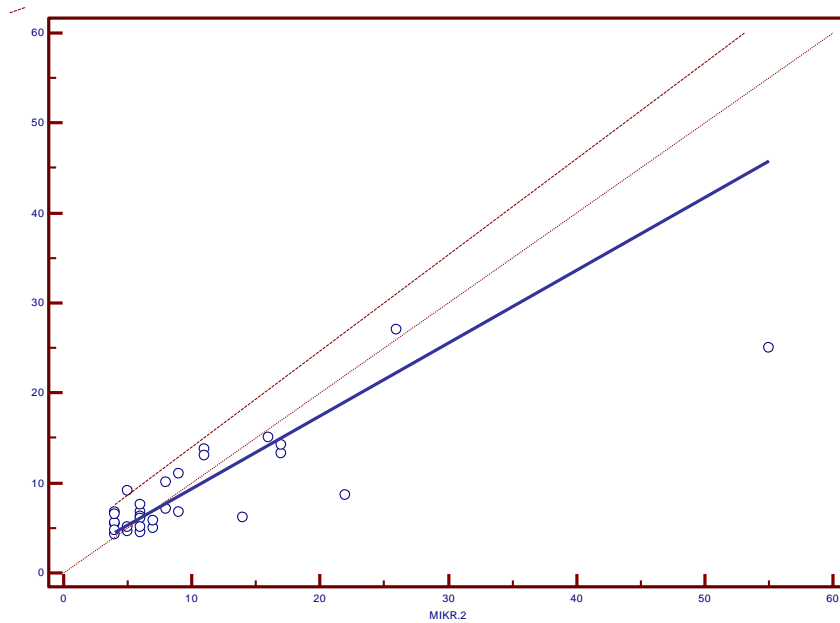
Usporedivost metode klasificiranja limfocita na hematološkom analizatoru ADVIA u našem ispitivanju za obje grupe ispitanika učinjena je s određivanjem broja limfocita optičkom mikroskopskom metodom . Postoji li korelacija između rezultata dviju metoda i kolika je statistička značajnost korelacije (povezanosti metoda) ispitali smo statističkim postupkom Passing- Bablok regresije .

U statističkom modelu ispitivanja iste varijable – reaktivni limfociti dobene na hematološkom analizatoru i mikroskopski postavili smo vrijednosti mikroskopskim pregledom razmaza kao poznatu varijablu x .

Grafički prikaz Passing- Bablok regresije učinjen je pomoću statističke programske potpore MedCalc pri čemu je prikazan regresijski pravac (puna linija) granice pouzdanosti (isprekidana linija) te idealni pravac (sitno isprekidana linija). Grafički prikazi za obje skupine ispitanika prikazani su na slikama 5.1.1. i 5.1.2.



Slika 5.1.1. Grafički prikaz Passing – Bablok regresije za rezultate određivanja reaktivnih limfocita metodama ADVIA- hem.analizator i mikroskopski za grupu zdravih ispitanika. Rezultati regresije za rezultate određivanja reaktivnih limfocita na analizatoru ADVIA i mikroskopski s 95% -tnom pouzdanosti nemaju značajno odstupanje među izmjerenim vrijednostima
($y=1,000+0,500 x$) uz $P> 0,10$.



Slika 5.1.2. Grafički prikaz Passing – Bablok regresije za rezultate određivanja reaktivnih limfocita metodama ADVIA- hem.analizator i mikroskopski za grupu ispitanika s patofiziološkim promjenama. Rezultati regresije za rezultate određivanja reaktivnih limfocita na analizatoru ADVIA i mikroskopski s 95% -tnom pouzdanosti nemaju značajno odstupanje među izmjerenim vrijednostima ($y=1,300+0,8083 x$) uz $P> 0,10$.

6. RASPRAVA

Usporedba nalaza DKS hematološkog analizatora ADVIA-e s drugim analizatorima

Prema dostupnim podacima izvedena je usporedba rada četiri suvremena hematološka analizatora, među kojima i ADVIA 2120 u analizi kompletne krvne slike, diferencijalne krvne slike i morfoloških atipičnosti iz normalnih i patoloških uzoraka. Kao kontrola, služio je mikroskopski pregled udjela pojedinih vrsta leukocita. Rezultati su pokazali da analizator ADVIA 2120 je pokazala znatno niže rezultate za oba parametra što se može pripisati klasifikaciji određenih stanica kao nebojene ili atipične stanice.

Broj neutrofila je bio nešto veći od referentnog, broj monocita i leukocita je bio nešto niži. Broj bazofila je bio netočan u prisutnosti atipičnih limfocita ili blasta.

S obzirom na označavanje s blasta (uključujući povećan broj LUCs za ADVIA-u 2120), osjetljivost je u rasponu od 65% do 94%, a specifičnost između 67% i 86% te je time ADVIA 2120 bila najmanje specifičan analizator za flag parametre. (12)

7. ZAKLJUČCI

1. Potvrđena je pouzdanost nalaza prisustva reaktivnih limfocita na hematološkom analizatoru ADVIA 120 provjerom reproducibilnosti- preciznost na jednom uzorku ponavljanom 10 puta uz KV =4,5%.

2. Utvrđivana je prihvatljiva razine usporedivosti udjela (postotka) reaktivnih limfocita određenih na hematološkom analizatoru i pregledom razmaza obojenog metodom MGG jer uz 95% pouzdanost nema bitnih odstupanja u rezultatima u grupi zdravih ispitanika.

3. Utvrđivana je prihvatljiva razine usporedivosti udjela (postotka) reaktivnih limfocita određenih na hematološkom analizatoru i pregledom razmaza obojenog metodom MGG jer uz 95% pouzdanost nema bitnih odstupanja u rezultatima u grupi ispitanika s patofiziološkim promjenama.

4. Utvrđivana je razine osjetljivosti (najniži broj reaktivnih limfocita) koji analizator klasificira na vrijednost 1% .Ova vrijednost je zaokružena jer u kalsifikaciji analizator izražava vrijednosti u postotku s jednom decimalom što treba uzeti u obzir pri interpretaciji rezultata.

8. SAŽETAK

UVOD: Imunost posredovana stanicama je važna u obrani domaćina protiv virusnih infekcije i zloćudnih novotvorina. Reaktivni limfocit je ne-maligni leukocit nađen u perifernoj krvi. Pojavljuje se kao nespecifični odgovor na stres. Danas je to atipični limfocit, Downey-ova stanica, ili reaktivni limfocit te je on marker bolesti kada se pronađe u perifernoj krvi. Laboratorijska automatizacije sve se više razvija po pitanju hematoloških analizatora i algoritama kako bi na odgovarajući način otkrili abnormalne uzorke među kojima i reaktivne limfocite čiji nalaz nam jako pomaže u samoj dijagnostici stanja pacijenta.

CILJ ISTRAŽIVANJA: Odrediti pouzdanost nalaza reaktivnih limfocita u 60 uzoraka pacijenata. Od ukupnog broj uzoraka, 30 uzoraka se odnosilo na zdrave uzorke u usporedbi sa 30 pozitivnih nalaza reaktivnih limfocita.

MATERIJALI I METODE: Uzorci krvi (n=60) korišteni za analizu bili su podjeljeni u dvije skupine: 30 uzoraka je pripadalo zdravim ispitanicima sa negativnim nalazom reaktivnih limfocita. Preostalih 30 uzoraka je pripadalo ispitanicima s pozitivnim nalazom reaktivnih limfocita. Mjerni instrument korišten u svrhe analize je hematološki analizator ADVIA 2120. Kao kontrola korišten je mikroskopski pregled krvnog razmaza.

REZULTATI: Grafičkim prikazom Passing – Bablok regresije određivali smo reaktivne limfocite metodama ADVIA- hem.analizator i mikroskopski za grupu zdravih ispitanika. Rezultati regresije za rezultate određivanja reaktivnih limfocita na analizatoru ADVIA i mikroskopski s 95% -tnom pouzdanosti nemaju značajno odstupanje među izmjerenim vrijednostima ($y=1,000+0,500 x$) uz $P> 0,10$.

Grafičkim prikazom Passing – Bablok regresije određivali smo reaktivne limfocite metodama ADVIA- hem.analizator i mikroskopski za grupu ispitanika s patofiziološkim promjenama. Rezultati regresije za rezultate određivanja reaktivnih limfocita na analizatoru ADVIA i mikroskopski s 95% -tnom pouzdanosti nemaju značajno odstupanje među izmjerenim vrijednostima ($y=1,300+0,8083 x$) uz $P> 0,10$.

ZAKLJUČAK: 1. Potvrđena je pouzdanost nalaza prisustva reaktivnih limfocita na hematološkom analizatoru ADVIA 120 provjerom reproducibilnosti- preciznost na jednom uzorku ponavljanom 10 puta uz $KV =4,5\%$.

2. Utvrđivana je prihvatljiva razine usporedivosti udjela (postotka) reaktivnih limfocita određenih na hematološkom analizatoru i pregledom razmaza obojenog metodom MGG jer uz 95% pouzdanost nema bitnih odstupanja u rezultatima u grupi zdravih ispitanika.

3. Utvrđivana je prihvatljiva razine usporedivosti udjela (postotka) reaktivnih limfocita određenih na hematološkom analizatoru i pregledom razmaza obojenog metodom MGG jer uz 95% pouzdanost nema bitnih odstupanja u rezultatima u grupi ispitanika s patofiziološkim promjenama.

4. Utvrđena je razina osjetljivosti (najniži broj reaktivnih limfocita) koji analizator klasificira na vrijednost 1% .Ova vrijednost je zaokružena jer u klasifikaciji analizator izražava vrijednosti u postotku s jednom decimalom što treba uzeti u obzir pri interpretaciji rezultata.

9. SUMMARY

INTRODUCTION: Cell mediated immunity is important in host defense against viral infections and malignancies. Reactive lymphocyte is a non-malignant leukocytes that was found in the peripheral blood. It appears as a nonspecific response to stress. Today it is an atypical lymphocyte, Downey's cells, or reactive lymphocytes and is a marker of disease when it is found in the peripheral blood. Laboratory automation is increasingly developing in terms of hematology analyzers and algorithms in order to adequately detect abnormal patterns including reactive lymphocytes whose findings we really helpful in the diagnosis of the patient's condition.

AIM OF RESEARCH: To determine the reliability of the findings of reactive lymphocytes in 60 patient samples. Of the total number of samples, 30 samples were related to healthy samples compared with 30 positive findings reactive lymphocytes.

MATERIALS AND METHODS: Blood samples (n = 60) were used for the analysis were divided into two groups of 30 samples belonging to the healthy subjects with negative findings reactive lymphocytes. The remaining 30 samples belonged to subjects with positive findings reactive lymphocytes. The measuring instrument used for the purposes of analyzing is the hematology analyzer ADVIA 2120. As control was used microscopic examination of blood smears.

RESULTS: Graphic display of Passing - Bablok regression was used to determine the reactive lymphocytes methods ADVIA-hem. analyzer and microscopically for a group of healthy subjects. Results of regression results for the determination of reactive lymphocytes analyzer ADVIA and microscopic with 95% confidence with no significant deviation between the measured values. ($Y = 1.000 + 0.500 x$) with $P > 0.10$.

Graphic display of Passing - Bablok regression was used to determine the reactive lymphocytes methods ADVIA-hem. analyzer and microscopically for a group of patients with pathophysiological changes. Results of regression results for the determination of reactive lymphocytes analyzer ADVIA and microscopic with 95% confidence with no significant deviation between the measured values. ($Y = 1.300 + 0.8083 x$) with $P > 0.10$.

CONCLUSION: 1. The reliability of the findings of the presence of reactive lymphocytes in hematology analyzer ADVIA 120 is confirmed reproducibility-checking the accuracy of a single sample repeated 10 times with $CV = 4.5\%$.

2. Acceptable level of comparability share (percentage) of reactive lymphocytes specific to the hematology analyzer and examination of smears stained using MGG is determined because with 95% confidence there are no significant differences in the results in a group of healthy subjects.

3. Acceptable level of comparability share (percentage) of reactive lymphocytes specific to the hematology analyzer and examination of smears stained using MGG is determined because with 95% confidence there are no significant differences in the results in the group of patients with pathophysiological changes.

4. The level of sensitivity (the lowest number of reactive cells) is determined by analyzer which classifies the value of 1%. This value is rounded because the classification of the analyzer expressed as a percentage of the value to one decimal place which should be taken into account when interpreting the results.

10. LITERATURA

1. Štraus Božidar; Petrik, József. Štrausova medicinska biokemija/Čvorišćec, Dubravka Čepelak, Ivana. Zagreb, Medicinska naklada, 2009.
Poglavlje 2. Automatizacija i informatizacija u laboratoriju; str. 18; 18-40
2. Štraus Božidar; Petrik, József. Štrausova medicinska biokemija/Čvorišćec, Dubravka ; Čepelak, Ivana. Zagreb, Medicinska naklada, 2009.
Poglavlje 2. Automatizacija i informatizacija u laboratoriju; str. 29-30; 18-40
3. Mužina Marija Ljerka; Laboratorijska hematologija - interna skripta za zdravstvene škole medicinsko- laboratorijskoga usmjerenja
Uvod; str. 2
4. Mira Premužić- Lampič / Hematologija, klinička i laboratorijska; Medicinska naklada, Zagreb 2000.
Prvi dio - Hematopoeza str. 3-4; 5-6; 13-15; 3-26
4.1 Bolesti krvi i krvotvornih organa – 137-139; 137-245
5. Zdenko Volner/ Opća medicinska mikrobiologija s epidemiologijom i imunologijom; Školska knjiga, Zagreb 2007.
6. Igor Andreis, Drago Batinić, Filip Čulo i sur. / Imunologija; Medicinska naklada, Zagreb, 2010.
7. Biserka Getaldić. Kolegij: Laboratorijska hematologija i koagulacija; Predavanje 8 - Limfociti; Split 2014
8. Michael W. Simon, MD, PhD; The Atypical Lymphocyte - International Pediatrics/Vol. 18/No. 1/2003; 20-22
9. Harold R. Schumacher; David F. Garvin; Douglas A. Triplett - Introduction to laboratory hematology and hematopathology; 1984 Alan R. Liss, Inc.
10. Opći podatci o hematološkom analizatoru ADVIA 2120; KBC Split – Bolnica Križine; Odjel za medicinsko-laboratorijsku dijagnostiku
11. Perović E. S04-2: Prikaz nekih klinički značajnih parametara hematološkog analizatora ADVIA 2120. Biochemia Medica 2009;19(Suppl1):S40-S41
12. Meintker L, Ringwald J, Rauh M, Krause SW; Comparison of automated differential blood cell counts from Abbott Sapphire, Siemens Advia 120, Beckman Coulter DxH 800, and Sysmex XE-2100 in normal and pathologic samples; Am J Clin Pathol. 2013 May;139(5):641-50 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23596116>)

11. PRILOZI

Slike preuzete:

Slika 1. - <http://www.medilab.hr/laboratorijska-dijagnostika/siemens-hc/hematologija/advia-2120/>

Slika 2. Ilza Salamunić. P2; specifična i nespecifična imunost,2014

Slika 3. Biserka Getaldić. Kolegij: Laboratorijska hematologija i koagulacija; Predavanje 8 - Limfociti; Split 2014

Slika 4. Biserka Getaldić. Kolegij: Laboratorijska hematologija i koagulacija; Predavanje 8 - Limfociti; Split 2014

Slika 5. http://www.rndsystems.com/cb_detail_objectname_WI03_IL21.aspx

Slika 6. Biserka Getaldić. Kolegij: Laboratorijska hematologija i koagulacija; Predavanje 9 – Reaktivne promjene limfocita; Split 2014

Slika 7. Biserka Getaldić. Kolegij: Laboratorijska hematologija i koagulacija; Predavanje 9 – Reaktivne promjene limfocita; Split 2014

Slika 8. Biserka Getaldić. Kolegij: Laboratorijska hematologija i koagulacija; Predavanje 6 – EQALM smjernice za izradu kontrolnih uzoraka preparata razmaza periferne krvi; Split 2014

12. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 31. siječnja 1993. godine u Splitu. Osnovnu školu sam pohađala u OŠ „Ravne Njive“ u Splitu.

Godine 2007. upisala sam Zdravstvenu školu, medicinsko-laboratorijsko usmjerenje. Školske godine 2010/2011. uspješno sam završila srednju školu i postala medicinsko-laboratorijski tehničar.

Akadske godine 2011/2012. upisala sam se na Sveučilište u Splitu - Sveučilišni odjel zdravstvenih studija, smjer medicinsko- laboratorijska dijagnostika.

Aktivno se koristim engleskim jezikom te informatički sam pismena.

U slobodno vrijeme bavim se rekreativnim sportskim aktivnostima i čitanjem.