

NOVI POKAZATELJI KRVNIH STANICA - KLINIČKA PRIMJENA U PEDIJATRIJSKOJ HEMATOLOGIJI

BISERKA GETALDIĆ*

Razvoj tehnologije rezultirao je sve većim brojem novih pokazatelja stanica periferne krvi koji izrazito sporo nalaze svoju kliničku primjenu. Razlozi za to su heterogenost naziva za pojedini pokazatelj te nedostatak referentnih intervala, što je posebno izraženo u pedijatrijskoj dijagnostici te u nedostatnim planiranim studijama kojima bi se ispitala dijagnostička točnost pojedinog pokazatelja. Dijagnostička točnost pokazatelja (pretrage) najbolje je ispitana za eritrocitne i retikulocitne pokazatelje, pa su širina distribucije eritrocita (RDW - red cell distribution width), udio hipo kromnih eritrocita (% Hypo) i udio nezrelih retikulocita (IRF - immature reticulocyte fraction) uključeni u subspecijalističke pretrage i klasifikacije anemija. Leukocitni pokazatelji ukazuju na izmijenjene stanične subpopulacije na temelju razlike u njihovoj zrelosti, funkcionalnoj aktivnosti i morfološkim karakteristikama. Testiranje pouzdanosti podataka koje analitički sustavi mjere tijekom klasificiranja više od 8000 stanica leukocitne loze definiralo je ICSH (International Council for Standardisation in Haematology). Svaki laboratorij treba provesti ispitivanje kliničke osjetljivosti za analitički sustav na kojem će se analizirati pedijatrijski uzorci. Rezultate testiranja potrebno je predstaviti pedijatrija. Ovakav je pristup ključan u hitnoj pedijatrijskoj dijagnostici jer ubrzava i racionalizira diferencijalnu dijagnostiku. Istim pristupom ispitivani su i trombocitni pokazatelji među kojima udjel retikuliranih trombocita (IPF - immature platelet fraction) iskazuje visoku diskriminacijsku učinkovitost u diferencijalnoj dijagnostici trombocitopenija.

Deskriptori: ŠIRINA DISTRIBUCIJE ERITROCITA, POSTOTAK HIPOKROMNIH ERITROCITA, UDIO NEZERLIH RETIKULOCITA, KLASIFIKACIJA ANEMIJA, KLINIČKA OSJETLJIVOST ANALITIČKOG SUSTAVA, RETIKULIRANI TROMBOCITI

Klinička laboratorijska hematologija je zbog razvoja tehnologija hematoloških analizatora kontinuirano izložena izazovu analitičke i kliničke provjere pouzdanosti novih pokazatelja krvnih stanica. Istovremeno, usmjerivši se prema minimaliziranju uzorka krvi potrebnog za određivanje više od 25 pokazatelja krvnih stanica, tehnološki je razvoj omogućio da kapilarni uzorci krvi budu dostatni za sveukupnu analizu. S gledišta medicinske biokemije time je zadovoljen jedan od zahtjeva koju imperativno na-

meće pedijatrijska dijagnostika. Međutim, novi stanični pokazatelji nalaze svoju kliničku primjenu izrazito sporo. Razlog je u izrazitoj heterogenosti naziva za iste pokazatelje krvnih stanica koje rabe različite tehnologije te neispitanim referentnim intervalima za nove pretrage. Neispitani referentni intervali dodatna su prepreka ispitivanju dijagnostičke točnosti novih pretraga upravo u pedijatriji gdje za većinu već konvencionalnih hematoloških pretraga ima prosječno šest različitih intervala. Podjela staničnih pokazatelja slijedi populacije krvnih stanica u periferiji.

Eritrocitni pokazatelji

Anemija kao jedna od najčešćih bolesti ili stanja dijagnosticira se na dva temeljna principa. Kinetičkim pristupom kliničar nastoji utvrditi mehanizam koji je doveo da anemije dok morfološki pristup dijeli anemije s obzirom na veliči-

nu eritrocita i retikulocitni odgovor (1). Klasifikacija temeljena na morfološkim pokazateljima neizostavno uključuje podatke laboratorijske dijagnostike koji se nadopunjuju kliničkim podacima. Preciznost i točnost određivanja srednjeg volumena eritrocita (MCV-a) postignuta je na automatskim hematološkim analizatorima. Odstupanja od te vrijednosti izražena kao koeficijent varijacije eritrocitnog volumena među prvim je eritrocitnim pokazateljima kojima je ispitana dijagnostička točnost. RDW (*red cell distribution width*) - je širina distribucije eritrocita po volumenu čiji prihvaćeni referentni interval je 9,0-13,8%, a stupanj pouzdanosti za mjerenje anizocitoze iznosi 98%, dok je za morfološki pregled mikroskopom taj stupanj 58%.

Iako je spomenuti parametar prije 20 godina primijenjen na hematološkim analizatorima, tek je prije deset godina prihvaćen kao klinički prihvatljivo mjerilo anizocitoze (2). U studiji NHANES

Tablica 1.
Dijagnostička značajnost RDW, transferina i feritina u sideropeničnoj anemiji

Table 1
Diagnostic value of RDW, transferrin and ferritin in iron deficiency anemia

Pretraga/Test	Dijagnostička osjetljivost % / Sensitivity of the test %	Dijagnostička specifičnost % / Specificity of the test %
RDW >15	71,2-80	40-66
Feritin <12 g/L	65-97	99
Transferin (Fe/TIBC) <16%	95	77-95

III (*National Health and Nutrition Examination Survey*) ispitani su referentni intervali koji vrijede za pedijatrijsku populaciju u rasponu dobi do 14 godina i drugom intervalu od 14 do 18 god. (3). Razlog radi kojeg je naveden kao još uvijek "novi" parametar u kliničkoj dijagnostičkoj praksi su ispitivanja dijagnostičke točnosti u različitim klasifikacijama mikrocitnih anemija, što potvrđuju i literaturni podaci (4, 5). Dijagnostička osjetljivost i specifičnost RDW u odnosu na standardne biokemijske biljege transporta i rezerve željeza u sideropeničnoj anemiji prikazane su u Tablici 1 (6).

Temeljem ovih podataka RDW može se smatrati lako dostupnom laboratorijskom pretragom (sastavni je dio kompletne krvne slike), s dobrom diskriminacijskom sposobnosti probira djece s latentnom anemijom (*latent iron deficiency*). Pokazatelj je koji ima dovoljnu dijagnostičku specifičnost za razlikovanje sideropenije od anemije koja prati kroničnu bolest, ali i pretraga pozitivne prediktivne vrijednosti učinkovitosti terapije (7). Istraživanja usmjerena prema lako dostupnoj laboratorijskoj pretrazi koja će imati visoku dijagnostičku osjetljivost za potvrdu predanemijskih stadija manjka željeza značajna su upravo u pedijatriji. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije sideropenična anemija ima približno prevalenciju veću od 40% u djece do pet godina starosti u 69 zemalja. Među njima polovina ima razvijene kliničke simptome anemije (8). Mala djeca predstavljaju posebno "ranjivu" skupinu jer je u razdoblju intenzivnog rasta potreba za željezom 10 puta veća po kilogramu tjelesne težine nego u odraslih muškaraca (9, 10). Ovaj javnozdravstveni problem u našoj zemlji znatno je manji i prema podacima ispitivanja predškolske

populaciju je % Hypo <2% (12). Ukoliko je % Hypo >10% tada u potpunosti korelira s manjkom željeza tako da je upravo ta vrijednost prihvaćena kao dijagnostički kriterij za manjak željeza (13). Od svih eritrocitnih parametara, % Hypo za sada je jedina pretraga koju je odobrila FDA (Američka uprava za hranu i lijekove, *Food and Drug Administration*) i nalazi se na popisu subspecijalističkih pretraga Hrvatske komore medicinskih biokemičara.

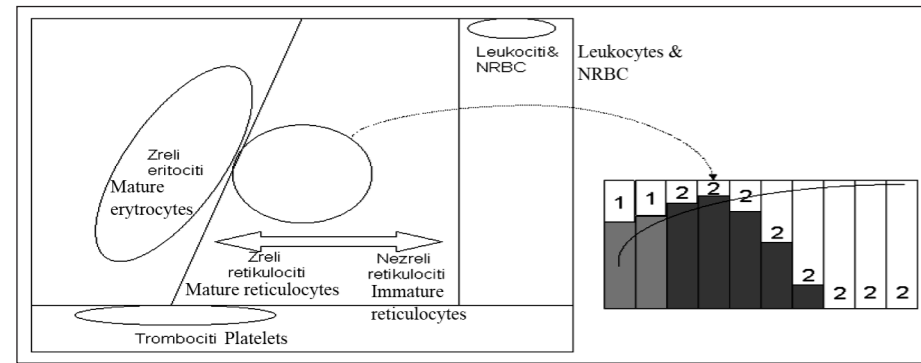
Kako utrka raznih tehnologija hematološki analizatora neprekidno traje, bilo je za očekivati da će se pojaviti parametri koji će biti dijagnostički analogni pretrazi % Hypo ali pod različitim nazivima. Prema novijim podacima na hematološkom analizatoru Sysmex XE-2100 srednja vrijednost prednjeg loma laserske zrake unutar histograma populacija zrelih eritrocita izražava se kao RBC-Y i korelira s % Hypo (14). Klinička evaluacija potvrdila je izuzetno dobru korelaciju ($r=0,84$) između RBC-Y i % Hypo u skupinama zdravih te ispitanika s manjkom željeza, kao i dobru korelaciju RBC-Y i % Hypo s topljivim transferrinski receptorima TfR (15). Najnovija istraživanja na analizatoru Abbott CD Sapphire koji automatski određuje udjel hipokromnih eritrocita pokazuju izuzetnu usporedivost s % Hypo ($r=0,87$). Za sada nije učinjena harmonizacija ove pretragu pa ova heterogenost naziva pretrage ovisno o tehnologiji onemogućava kliničku interpretaciju. U skoroj budućnosti ovaj eritrocitni pokazatelj biti će harmoniziran i sastavni dio nalaza kompletne krvne slike. Kako ne postoje razlike u postotku hipokromnih eritrocita uvjetovane životnom dobi, tako je ispitana velika diskriminacijska učinkovitost ove pretrage u dijagnostici sideropenične anemije doba temelj za kliničku primjenu u pedijatrijskoj hematologiji (16).

Retikulocitni pokazatelji

Konvencionalni mikroskopski pregled retikulocita u obojenom razmazu ima nisku preciznost jer se rutinski pregleda 1000 eritrocita. ICSH (*International Council for Standardization in Haematology*) izdao je dokument H44-A2 koji definira broj eritrocita na 19.500

*Klinička jedinica za laboratorijsku hematologiju i koagulaciju
Klinički zavod za kemiju
KBC "Sestre milosrdnice"

Adresa za dopisivanje:
Dr. sc. Biserka Getaldić
Klinička jedinica za laboratorijsku hematologiju i koagulaciju
Klinički zavod za kemiju
KBC "Sestre milosrdnice"
10000 Zagreb, Vinogradska 29
E-mail: bigetaldi@hotmail.com



Slika 1.
Histogram raspodjele krvnih stanica prema volumenu iz kojeg se odvaja skupina nezrelih retikulocita unutar populacije retikulocita

Figure 1
The histogram profiles of blood cells and separation of immature reticulocytes in histogram reticulocyte regions

stanica koje treba pregledati za postizanje prihvatljive preciznosti u odnosu na zastupljenost retikulocita (CV 5% - Rtc 0,2%). Analitička preciznost i točnost postignute su automatskim metodama na hematološkim analizatorima koje osim broja određuju i retikulocitne indekse.

Retikulocitni indeksi posebno su klinički zanimljivi radi kratkog života retikulocita od 24 do 48 sati u perifernoj krvi koja zapravo zrcali trenutačnu kasnu fazu hemoglobinogeneze -eritropoeze. Retikulociti se u normalnoj eritropoezi otpuštaju iz koštane srži 18 do 36 sati prije konačnog sazrijevanja u eritrocite i unutar njihove populacije samo 5% su mladi - nezreli retikulociti (*shift, stress cells*). Njih karakterizira veći volumen i maksimalna količina RNA. Ukoliko se eritropoeza intenzivira, udjel nezrelih retikulocita je veći. Na Slici 1 prikazan je histogram klasifikacije retikulocita temeljem njihovog volumena koji se može se rabiti za evaluaciju skupine mladih retikulocita u ukupnoj populaciji (6).

Davis i sur. predložili su da se nezavisni parametar praćenja eritropoeze koji je proporcionalan količini RNA u retikulocitima zove IRF (*immature reticulocyte fraction*) ili, najbliže hrvatskom prijevodu, moglo bi se govoriti o udjelu nezrelih retikulocita. Pretpostavka je da bi praćenje sazrijevanja retikulocita moglo biti klinički korisno u kinetičkoj klasifikaciji i praćenju učinkovitosti terapije deficitarnih anemija kao i u potvrđivanju remisije nakon transplantacije autolo-

gnih matičnih hematopoznih stanica, potvrdila su klinička ispitivanja (17, 18). Povećanje udjela mladih retikulocita dobar je prediktivni biljeg oporavka nakon supresivne terapije antineoplastičkim lijekovima (20). Posebno treba izdvojiti IRF kao brzo i dostupnu pretragu probira u nasljednoj sferocitozi i inkompatibilnosti ABO u novorođenčadi (21). Pod ovim je nazivom udio nezrelih retikulocita uz dodatne retikulocitne pokazatelje postavljen na različite hematološke analizatore čiji se mjerni principi razlikuju. U Tablici 2 prikazani su hematološki analizatori koji svojom tehnologijom podržavaju određivanja IRF (6).

Iako u sferi interesa liječnika - pedijataru nije poznavanje laboratorijskih tehnologija medicinski biokemičari u kliničkim hematološkim laboratorijima

Tablica 2.
Hematološki analizatori koji podržavaju određivanje retikulocitnih indeksa

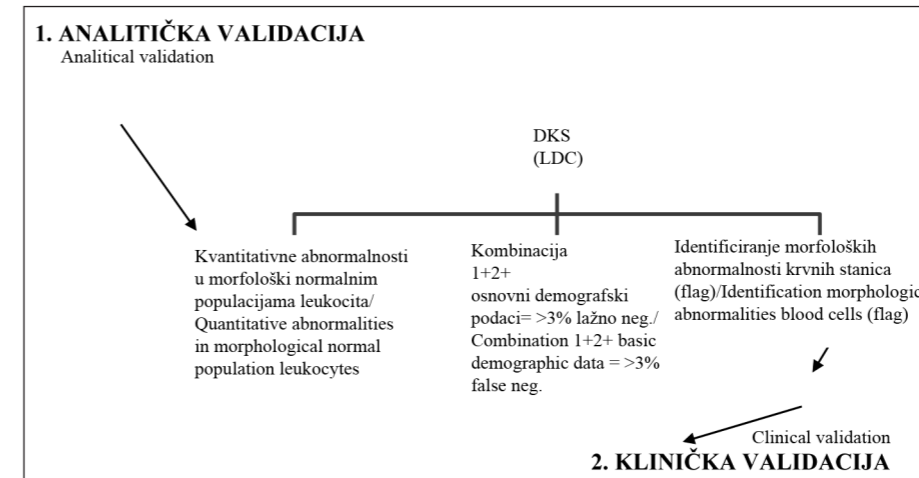
Table 2
Automated hematology analyzers that measures reticulocyte parameters

Analizator/Analyzers	Udio nezrelih retikulocita / Immature reticulocyte fraction	Retikulocitni indeksi / Reticulocyte indices
Abbot Cell Dyn 4000, Sapphire	IRF	-
ABX Pentra 120 Retic	3-populacije/IRF	MCVr
Bayer ADVIA 120	3-populacije/IRF	MCVr, CHr, CHCr, indeksi raspršenja
Beckman Coulter LH 750, DxH	IRF	MSRV, MRV, HLR%, HLR#
Sysmex XE 2100	3-populacije/IRF	RET-Y

koji su uključeni u pedijatrijsku hematologiju trebaju prezentirati hematološke analitičke sustave jer tek zajedničkim planiranim studijama moguće je odrediti dijagnostičku točnost za *sve nove stanične pretrage* i usporediti rezultate vlastite analitičke validacije s definiranim granicama. Rezultati analitičke validacije pet različitih analitičkih sustava definiraju poželjnu analitičku preciznost za IRF; CV - 5,6-11,9% (22). Nastavak ispitivanja referentnog intervala na različitim analitičkim sustavima rezultirao je harmoniziranim intervalom od 0,14-0,35% kao i ispitanim razlikama ovisno o dobi (23).

Leukocitni pokazatelji

Cilj laboratorijske hematologije u dijagnostici kvantitativnih i kvalitativnih promjena leukocita usmjeren je na smanjenje zahtjeva za mikroskopskim pregledom krvnog razmaza (DKS) nakon analize na hematološkim analizatorima. Postotak provjera nalaza poznat je kao "review rate" (24). Optimalna vrijednost je do 15%, ali ako laboratorij obuhvaća pedijatrijsku hematologiju vrijednost je do 30%. Diferencijalna krvna slika optičkom mikroskopijom konvencionalna je metoda dijagnostike broja i morfološki definiranih subpopulacija leukocitne loze i do unatrag nekoliko godina bila je sastavni dio pretrage *svih* pedijatrijskih uzoraka. Činjenica da se diferenciranje temelji na obliku stanica, citoplazmatском sadržaju i karakterističnom bojenju kao i da periferna krv predstavlja samo transportni dio za neutrofilne gra-



Slika 2.
Ispitivanje analitičke i kliničke validacije određivanja leukocitnih populacija na hematološkim analitičkim sustavima

Figure 2
Protocols for validation of laboratory-developed analytical and clinical validation of LDC on automated hematology analyzers

nulocite i monocite te sustav redistribuiranja i recirkulacija za limfocite, uz izrazitu dinamiku kvantiteta svih populacija u djece, jedno je od ograničenja u kliničkoj i analitičkoj osjetljivosti ove pretrage (25). Drugo ograničenje je mali broj (100) rutinski pregledanih stanica kojem se treba dodati i sve manji broj educiranih osoba s znanjem morfologije krvnih stanica. Razvijena tehnologija hematoloških staničnih analizatora opravdano se smatra prekretnicom u diferenciranju leukocitnih populacija jer se klasificira 8000-10.000 leukocita.

Za razliku od ostalih krvnih populacija, leukociti nemaju doslovno neke nove pokazatelje, a izrazita heterogenost označavanja prisutnosti morfološki izmijenjenih stanica (opće prihvaćen pojam - FLAG), koje rabe različite tehnologije temeljene na raznim mjernim principima (VCS; MOA; MAPSS; FCS), dodatno otežava prihvaćanje nalaza klasifikacije leukocita LDC (*leucocyte differential count*) od kliničara bez provjere DKS, što je posebno prisutno u pedijatrijskoj hematologiji. Jedini pravilan pristup kojim svaki pedijatrijski hematološki laboratorij može izmijeniti stav pedijatra sastoji se od tri faze. Prve dvije faze imaju definirane postupke koje je potrebno učiniti s pedijatrijskim (kapilarnim) uzorcima: 1. ispitivanje analitičke osjetljivosti, preciznosti i usporedivosti hematološkog

analizatora na kojem će se analizirati pedijatrijski uzorci; 2. ispitivanja kliničke osjetljivosti ili učinkovitosti čije kriterije je definirao ICSH (26, 27). Na Slici 2 prikazan je pristup ispitivanju analitičke i kliničke osjetljivosti (učinkovitosti). Pod 1. je označena analitička validacija; pod 2. klinička validacija; one obje, ujedinijene s demografskim podacima, rezultiraju s manje od 3% lažno normalnih klasifikacija leukocita. Rezultate validacija medicinski biokemičar treba predstaviti pedijatriju te se zajednički postiže cilj smanjenja mikroskopskih DKS (28).

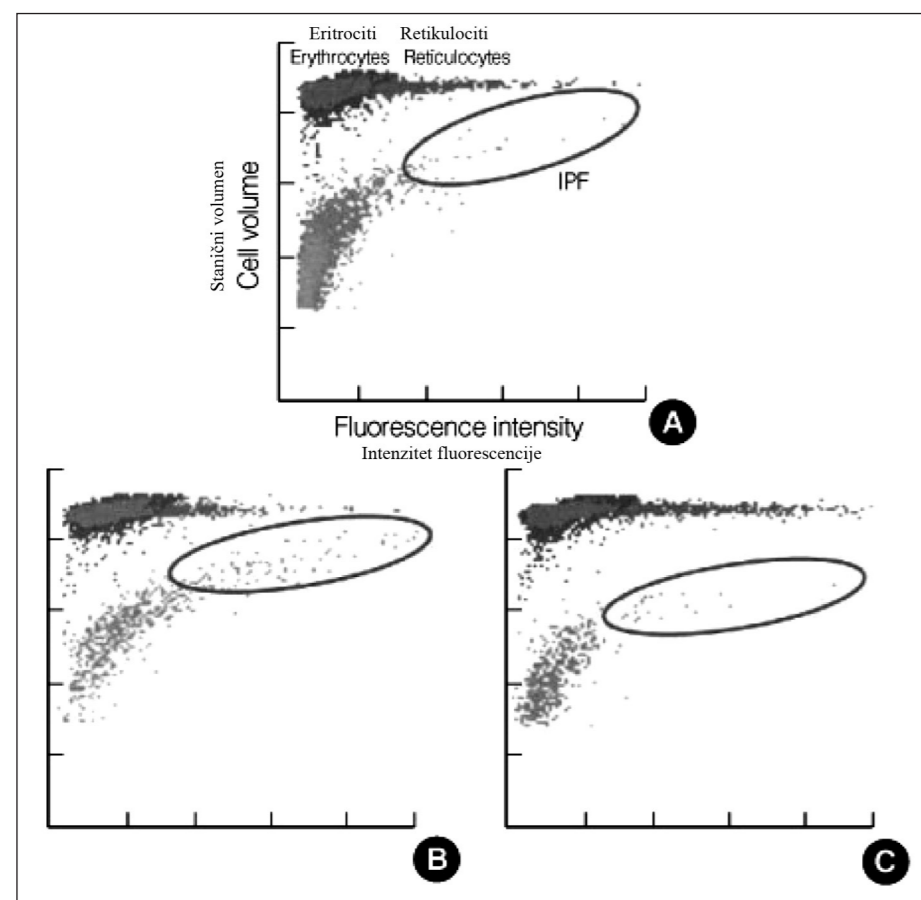
U hitnoj pedijatrijskoj dijagnostici ovakvim se pristupom ubrzava diferencijalna dijagnostika, posebno u stanjima virusnih infekata često prisutnih u djece. Provjera morfologije limfocita, za koje analizatori izdaju oznaku - flag, - radi prisutnosti reaktivnih limfocita (virociti) uz mogućnost određivanja omjera CD4/CD8 na hematološkim analizatorima, omogućava hitnu dijagnostiku virusnih bolesti (EBV i CMV) (29). Klinička značajnost određivanja udjela neselementiranih neutrofilnih granulocita već se dugo razmatra (30). Referentni intervali u djece su 18 do 11%, što je bitno pri interpretaciji nalaza jer je sve niži indeks pouzdanosti što je veći broj neselementiranih granulocita. Budući da se rutinski gotovo nikada ne pregleda 400 leukocita, pouzdanost analizatora koji temeljem

količine DNA kvantificiraju broj tih stanica (*band*) je daleko veća - CI 95% (31).

Trombocitni pokazatelji

Brzina aktiviranja trombocita koji u nekoliko stotinki milisekunde mijenjaju oblik, a koja im omogućava da ispunjavaju svoju biološku funkciju kroz adheziju na druge stanice, istovremeno je ogromna, trajno prisutna prepreka u kvantitativnim i kvalitativnim ispitivanjima trombocita *in vitro*. Doda li se ovome i vrlo često teško uzimanje uzorka krvi u djece, ove su stanice najčešći uzrok ponavljanja vadenja krvi u pedijatrijskoj populaciji. Brojne se metode danas koriste u ispitivanju trombocita, a uključuju određivanje njihova broja u cirkulirajućoj krvi, veličine, mjerenje heterogenosti veličine, zastupljenost mladih trombocita, te metode ispitivanja funkcionalne aktivnosti, ponajprije agregacije te aktivacije. Srednji volumen trombocita - MPV (*mean platelet volume*) i raspodjela po volumenu - PDW (*platelet distribution width*) već su dobro ispitani pokazatelji, dok udio mladih, retikuliranih trombocita tek nalazi svoju kliničku primjenu (32, 33).

Retikulirane trombocite prvi je opisao Ingram 1969. godine promatrajući ih svjetlosnim mikroskopom u pripravcima obojenim novim metilenskim plavilom, pri čemu je kao i u retikulocitima zapazio karakteristične ostatke nukleinskih kiselina - pretežito citoplazmatske RNK, te ih je nazvao retikulirani trombociti radi sličnosti s dugo poznatim retikulocitima eritrocitne loze. Ispitivanja na modelu životinja pokazala su da retikulirani trombociti ostaju u krvotoku 24 do 36 sati te da se nakon toga progresivno smanjuje količina DNK i njihov volumen (34). Uporaba fluorescentne boje tiazolnarančaste - TO (*thiazoleorange*) koja boji DNK i RNK te metodom protočne citometrije omogućila je analiziranje stanica bez jezgre. Smatra se da je njihova diferencijalna dijagnostička vrijednost u razjašnjenju uzroka trombocitopenija (35). Trombocitopenija ima tri osnovna razloga nastanka: 1. nedovoljno stvaranje u koštanoj srži; 2. pojačana razgradnja; 3. abnormalno skladištenje u slezeni.



Slika 3. Primjeri razdiobe udjela mladih trombocita (IPF) prema volumenu (Cell volume) i intenzitetu fluorescencije (Fluorescence intensity). A - zdrava osoba; B - autoimuna trombocitopenija; C - aplazija. <http://dx.doi.org/10.3343/kjlm.2010.30.5.451>

Figure 3. Immature platelet fraction (IPF) quantified by using fluorescent dyes and cell volume. A - healthy individuals; B - patients with ITP; C - patients with aplastic anemia. <http://dx.doi.org/10.3343/kjlm.2010.30.5.451>

Aspiracijska punkcija i biopsija koštane srži bila je metoda koja se smatrala zlatnim standardom u diferencijalnoj dijagnostici. Pojava svake neinvazivne metode posebno je značajna u pedijatriji pa je primjena protočne citometrije koja omogućava jednostavniju i točniju dijagnostiku etiologije trombocitopenija potaknula brojna ispitivanja. Rezultati radova pokazali su da je broj retikuliranih trombocita značajno povišen (>40%) kod trombocitopenija uzrokovanih perifernim razaranjem ITP (36). Iskorak u dostupnosti ovoga staničnog pokazatelja učinjen je razvojem tehnologije hemato-loških analizatora koji unazad nekoliko godina imaju mogućnost da iz uzorka krvi, uporabom boje koja se rabi u protočnoj citometriji, odrede trombocite s ostatkom citoplazmatske rPI. Razvijena

je tehnologija (Abbott, Sysmex) koja vrlo brzo daje podatak o udjelu retikuliranih trombocita ili IPF (*immature platelet fraction*). Na Slici 3 prikazana je razdioba mladih trombocita prema volumenu i intenzitetu fluorescencije u različitim stanjima trombocitopenije.

Postoje i dalje problemi oko standardiziranja ove metode jer nema kontrolnog materijala i referentne metode, a raspon vrijednosti koji se smatra normalnim varira ovisno o tehnologiji tako da su literaturni podaci u rasponu od <1% do 6,1% za odrasle osobe. Ispitivanja Yasunari Abe i suradnika potvrdila su rezultate ispitivanja drugim tehnologijama, te time istodobno potvrdila da nema razlike u različitim etničkim skupinama i da bi se kao granična vrijednost akti-

viriranja trombopoeze mogla uzeti 7,7%, pri kojoj je najveća osjetljivost i specifičnost uz indeks pouzdanosti od 95% (37). Ispitivanja u Laboratoriju za hematologiju Kliničkog zavoda za kemiju "KBC Sestre milosrdnice" rezultirala su definiranjem referentnog intervala za udjel mladih trombocita - rPI = 0,45-4,56% (CI 95%).

LITERATURA

1. Labar i sur. Hematologija 1. izd. Zagreb, Školska knjiga 2007; 103-5.
2. Bessman JD, Gilmer PR, Gardner FH. Improved classification of anemias by MCV and RDW. *Am J Clin Pathol* 1983; 80: 332-6.
3. Cheng CK, Chan J, Cembrowski GS, van Assendelft OW. Complete blood count reference interval diagrams derived from NHANES III: stratification by age, sex, and race. *Lab Hematol* 2004; 10: 42-53.
4. Buch AC, Karve PP, Panicker NK, Singru SA, Gupta SC. Role of red distribution width in classifying microcytic hypochromic anaemia. *J Indian Med Assoc* 2011; 109-12.
5. Mc Kenzie SB. Clinical laboratory hematology. 1. izd. Pearson Prentice Hall 2004; 200-8.
6. Getaldić B. Anemija - trajni izazov dijagnostici i terapiji. Zagreb, Medicinska naklada 2007; 33-8.
7. Brikman T, Simon Lopez R. Latent iron deficiency - Need for new parameters to aid diagnosis. *The Biochemical Scientist*, Sept 2006.
8. Shaw J, Friedman JF. Iron Deficiency Anemia: Focus on Infectious Diseases in Lesser Developed Countries. *Anemia*. 2011; 260-80.
9. Beard JL. Iron biology in immune function, muscle metabolism and neuronal functioning. *Journal of Nutrition* 2001; 131: 568-80.
10. Georgieff MK, Wewerka SW, Nelson CA. Iron status at 9 months of infants with low iron stores at birth. *Journal of Pediatrics* 2002; 141: 405-9.
11. Karin Ž, Đurašković N. Vrijednosti hemoglobina kod polaznika prvih razreda osnovnih škola Splitsko-dalmatinske županije u šk. god 2008./2009. *Hrvatski časopis za javno zdravstvo* 2010; 21.
12. Locatelli F. Revised European Best Practice Guidelines for Management of Anaemia in Patients With Chronic Renal Failure. *Nephrology and Dialysis Transplantation*. 2004; 2: 39-41.
13. David O, Grillo A, Ceoloni B, Cavallo F, Podda G, Biancotti PP, Bergamo D, Canavese C. Analysis of red cell parameters on the Sysmex XE 2100 and ADVIA 120 in iron deficiency and in uraemic chronic disease. *Scand J Clin Lab Invest* 2006; 66: 113-5.

14. Urrechaga E, Borque L, Escanero JF. Potential utility of the new Sysmex XE 5000 red blood cell extended parameters in the study of disorders of iron metabolism. *Clin Chem Lab Med* 2009; 4: 1411-614.
15. Machin SJ i sur. Functional iron deficiency and new red cell parameters on the Sysmex XE-2100, ISLH 2001 Industry - Sponsored Workshops, ISLH XIVth International Symposium, 2001.
16. Thomas C. Anemia of chronic disease: Pathophysiology and laboratory diagnosis *Laboratory Hematology* 2006; 11: 14-23.
17. Torres Gomez A, Casaño J, Sánchez J, Madrigal E, Alvarez MA. Utility of reticulocyte maturation parameters in the differential diagnosis of macrocytic anemias. *Clin Lab Haematol*. 2005; 25: 283-8.
18. Gonçalo AP, Barbosa IL, Campilho F, Campos A, Mendes C. Predictive value of immature reticulocyte and platelet fractions in hematopoietic recovery of allograft patients. *Transpl Proc* 2011; 43: 241-3.
19. Geldard AR, Tobin DJ, Cuthbert A. Immature reticulocyte fraction as a useful parameter for blood transfusion assessment in anaemia. *Br J Biomed Sci* 2009; 66: 98-101.
20. Dunlop LC, Cohen J, Harvey M, Gallo J, Motum P, Rosenfeld D. The immature reticulocyte fraction: a negative predictor of the harvesting of CD34 cells for autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Clin Lab Haematol*. 2006; 28: 245-7.
21. Mullier F, Lainey E, Fenneteau O, Da Costa. Additional erythrocytic parameters helpful for diagnosis of hereditary spherocytosis: results of a multicentre study. *Ann Hematol*. 2011; 90: 759-68.
22. Buttarello M, Bulian P, Farina G, Petris MG, Temporin V, Toffolo L. Five fully automated methods for performing immature reticulocyte fraction: comparison in diagnosis of bone

- marrow aplasia. *Am J Clin Pathol* 2002; 117: 871-9.
23. Turowski D, Wysocka J, Butkiewicz AM. Peripheral blood reticulocytes and their reference range values for percentage, absolute count, and immature fraction in children, measured with flow cytometry. *Folia Histochem Cytobio* 2000; 38: 31-6.
24. Sireci A, Schlager R, Kratz A. A Method for Optimizing and Validating Institution Specific Flagging Criteria for Automated Cell Counters. *Arch Path Lab Med* 2010; 134-40.
25. Pierre RV. Peripheral blood film review. The demise of eyecount leukocyte differential *Clin Lab Med*. 2002; 22: 279-97.
26. Buttarello M, Plebani M. Automated blood cell counts. State of the art. *Am J Clin Pathol* 2008; 130: 104-16.
27. Barends PW, Mc Fadden SL, Machin SJ, Simson E. International consensus group for hematology. The international consensus group for hematology review. Suggest criteria for action following automated CBC and WBC differential analysis. *Lab Hematol* 2005; 11: 83-90.
28. Tan BT, Nava AJ, George TI. Evaluation of Beckman Coulter UniCel DxH and Abbott Diagnostic Cell-Dyn Sphire hematology analyzers on pediatric and neonatal specimen in a tertiary care hospital. *Am J Clin Pathol* 2011; 135: 929-38.
29. Reimann KA, O'Gorman MR, Spritzler J, Wilkening CL, Sabath DE, Helm K, Campbell DE. Multisite comparison of CD4 and CD8 T-lymphocyte counting by single-versus multiple-platform methodologies: evaluation of Beckman Coulter flow-count fluorospheres and the tetraONE system. *The NIAID DAIDS New Technologies Evaluation Group. Clin Diagn Lab Immunol*. May 2000; 7: 344-51.
30. Corneblet PJ. Clinical utility of the band count. Interpretation of the peripheral blood film; *Clinics in Laboratory medicine* 2002; 22.

31. Briggs CJ, Linssen J, Longair I, Machin SJ. Improved flagging rates on the Sysmex XE-5000 compared with the XE-2100 reduce the number of manual film reviews and increase laboratory productivity *Am J Clin Pathol*. Aug 2011; 136: 309-16.
32. Leniček Krleža J, Zadro R, Nakić M, Sučić M, Huzjak N, Juričević M, Stavljenić-Rukavina A. Značenje i uporabna vrijednost trombocitnih pokazatelja. *Paediatr Croat* 1999; 43: 79-85.
33. Bessman JD. Platelet volume/count relationship aids thrombocytopenia prognosis. *JAMA*. 1983; 249: 2863-4.
34. Cho YG, Lee JH, Kim DS, Lee HS, Choi SI. Clinical usefulness of the simple technique to diagnose thrombocytopenia using immature platelet fraction. *Korean J Lab Med* 2007; 27: 1-6.
35. Briggs C, Kunka S, Hart D, Oguni S, Machin SJ. Assessment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia. *Br J Haematol* 2004; 126: 93-9.
36. Diquattro M, Gagliano F, Calabrò GM, Tommasi M, Scott CS, Mancuso G, Palma B, Menozzi. Relationship between platelet counts, platelet volumes and reticulated platelets in patients with ITP: evidence for significant platelet count inaccuracies with conventional instrument methods. *Int Jnl Lab Hem* 2009; 31: 199-206.
37. Yasunari AbeY, Wada H, Tomatsu H, Sakaguchi A, Nishioka J, YabuY, Onishi K, Nakatani K, Morishita Y, Oguni S, Nobori T. A simple technique to determine thrombopoiesis level using immature platelet fraction (IPF). *Thromb Res*. 2006; 118: 463-9.

Summary

NEW BLOOD CELL PARAMETERS - CLINICAL APPLICATION IN PEDIATRIC HEMATOLOGY

B. Getaldić

Advancements in technology have resulted in an increasing number of new peripheral blood cell parameters whose clinical application is remarkably slow. This may be due to heterogeneous names of individual parameters and lack of reference intervals which is particularly pronounced in pediatric diagnostics, and also to insufficient number of studies designed to test diagnostic accuracy of individual parameters. The diagnostic accuracy of a parameter (test) has best been investigated for erythrocyte and reticulocyte parameters so that RDW (red cell distribution width), % Hypo (hypochromic erythrocytes) and IRF (immature reticulocyte fraction) have been included in subspecialist tests and classifications of anemia. Leukocyte parameters indicate altered cell subpopulations on the basis of difference in maturity, functional activity and morphological characteristics. ICSH (International Council for Standardisation in Haematology) has defined how to test the reliability of data measured by analytical systems during classification of more than 8000 leukocyte lineage cells. Each laboratory should test the clinical sensitivity of an analytical system that is to be used for analysis of pediatric samples. Results of this test should be presented to pediatricians. Such an approach is essential in emergency pediatric diagnostics as it makes differential diagnostics faster and more rational. The same approach has been applied also to test platelet parameters, among which IPF (immature platelet fraction) shows high discriminatory efficiency in differential diagnostics of thrombocytopenias.

Descriptors: RDW, PERCENTAGE HYPOCHROMIC ERYTHROCYTES, IRF, CLASSIFICATIONS OF ANEMIA, CLINICAL SENSITIVITY OF ANALYTICAL SYSTEM, IPF

Primljeno/Received: 29. 2. 2012.

Prihvaćeno/Accepted: 5. 4. 2012.