**Сравнение количества лейкоцитов в крови по каналам WNR, WDF и WPC на гематологическом анализаторе Sysmex XN**

**Введение:**

Модульная система Sysmex XN (Sysmex, Kobe, Япония) использует новую технологию для подсчета лейкоцитов (WBC) и дифференциального анализа с использованием отдельных каналов: ядросодержащие лейкоциты (WNR), дифференциальный канал (WDF) и канал белых прогениторных клеток (WPC). Мы задались вопросом, насколько конкордантными будут результаты подсчета лейкоцитов между ними.

**Методы:**

В 6327 последовательных образцах количество лейкоцитов сравнивалось между каналами WNR и WDF. Они также сравнивались по группам, 3 группы по количеству лейкоцитов и 2 группы по статусу химиотерапии. В 508 образцах из 4361 образца выполненных на модуле XN-20, для проверки рефлексов использовался канал WPC для рефлекторного теста. Сравнение данных проводилось с помощью корреляции Пирсона, абсолютной разницы и процентной разницы (%D).

**Результаты:**

Количество лейкоцитов между каналами WNR и WDF показало очень высокую корреляцию в общем количестве образцов (r = 0,9976) и в группах по количеству WBC и химиотерапии. С увеличением количества WBC абсолютная разница увеличивалась, а %D уменьшался (P < 0,0001 для обоих случаев). Процентная разница составила 1,55% в общем количестве образцов и показала наибольшее значение в группе тяжелой лейкопении (<1.0 9 109 /L, 6.18%).

**Выводы:**

Это первое крупномасштабное исследование новой канальной технологии подсчета количества лейкоцитов на аппарате Sysmex XN. Подсчеты лейкоцитов по каналам WNR, WDF и WPC высоко коррелируют между собой и в целом являются взаимозаменяемыми и надежными.

**Введение**

Полный анализ крови (CBC) дает информацию о пациентах и является одним из наиболее часто запрашиваемых анализов в клинических лабораториях. С момента появления первого автоматизированного гематологического анализатора в 1950-х годов, основанного на принципе Coulter, произошел значительный технический прогресс в области автоматизированных гематологических анализаторов; современные гематологические анализаторы характеризуются собственными технологиями и характеристиками, позволяющими получать исчерпывающие отчеты, технологии и характеристики, позволяющие получать исчерпывающие данные о состоянии клеток крови с хорошими показателями точности и достоверности .

Для определения количества лейкоцитов (WBC) и дифференциального числа клеток применялись различные технологии, такие как светорассеяние, абсорбционная спектрометрия, электрический импеданс, радиочастотная проводимость и/или проточная цитометрия . Несмотря на достоверность данных о количестве лейкоцитов и дифференцировке клеток в большинстве случаев, ручное исследование мазков, хотя его клиническая ценность все еще обсуждается , проводят, когда автоматические гематологические анализаторы показывают флаг. Модульная система Sysmex XN (Sysmex, Kobe, Япония) - это анализатор нового поколения, использующий принципы, каналы и реагенты, отличные от тех, которые использовались в предыдущей версии анализатора - Sysmex XE-2100, и его эффективность оценивалась в последних исследованиях Прибор Sysmex XN был разработан для измерения ядросодержащих эритроцитов (NRBC) в автоматическом режиме наряду с основным анализом крови. Для этой функции количество лейкоцитов и дифференцировки анализируются по двум отдельным каналам - каналу ядросодержащих лейкоцитов (WNR) и каналу дифференцировки лейкоцитов (WDF) соответственно. Недавно, был опубликован интересный отчет о ложных показателях WBC в Sysmex XN; количество лейкоцитов в каналах WNR и WDF каналах значительно отличались, например 0.11 9 109 /л (WNR) против 6,93 9 109 /Л (WDF) .В этом случае расчетное количество лейкоцитов в мазке крови были совместимы с количеством лейкоцитов по каналу WDF и было выдано сообщение с флагом 'Difference между WNR и WDF- Проверьте результаты" на экране анализатора. Однако она не была передана в лабораторную информационную систему, поэтому сотрудники лаборатории не распознали эту проблему. Кроме того, четыре случайных случая с несоответствием количества лейкоцитов между каналами WNR и WDF были отмечены четыре случайных случая у пациентов с аденокарциномами . Расхождение между каналами WNR и WDF считалось, что это связано с различием реагентов в разных каналах каналами. Реагент в канале WNR был более кислым, и это могло привести к тому в WBC в канале WNR были более хрупкими.

Точный подсчет количества лейкоцитов является основополагающим для точной диагностики и оперативного лечения. В данном исследовании мы стремились оценить производительность Sysmex XN в отношении по количеству лейкоцитов. Нас интересовало, можно ли достоверно получить количество лейкоцитов как из каналов WNR и WDF и будут ли расхождения между этими двумя каналами в последовательных клинических образцах.

**Материалы и методы**

Образцы

В течение 5 дней в апреле 2014 г. в общей сложности 6327 образцов были последовательно получены от 4088 пациентов (включая стационарных и амбулаторных). Они были направлены в лабораторию для рутинного анализа КС из всех отделений больницы Университета Конкук (KUH), Сеул, Корея. Забор образцов производился непосредственно из вены с помощью иглы для забора крови, пробиркодержателя и ваккутайна с К3-ЭДТА. K3-EDTA-содержащего вакутейнера (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Германия) и выполняли в течение 4 ч после взятия. Гемолитические или свернувшиеся образцы исключались во избежание получения некачественных данных и ложных результатов. Протокол исследования был разработан в соответствии с критериям Хельсинкской декларации и был одобрен Советом по надзору за институтами KUH. Письменное информированное согласие от включенных в исследование пациентов не требовалось, поскольку данные были получены в ходе планового КС без дополнительного забора крови.

**Исследования**

Все 6327 образцов были проанализированы на приборе Sysmex XN. Sysmex XN имеет две базовые модели: XN-10 и XN20. Каждая модель имеет различные опциональные параметры с различные потребности. И XN-10, и XN-20 сообщают о количестве лейкоцитов, дифференциальное количество лейкоцитов и количество NRBC с помощью каналов WNR и WDF. Кроме того, в XN-20 имеется канал белых прогениторных клеток (WPC), который позволяет различать бласты и аномальные лимфоциты при наличии флагов "аномальная лимфа? или 'бласты?', когда в канале WNR или WDF появляются флаги. Канал WNR используется для определения WBC, NRBC,

 и базофилов, в то время как канал WDF используется для подсчета нейтрофилов, лимфоцитов, моноцитов, эозинофилов и незрелых гранулоцитов. Оба канала используют проточная цитометрия с полупроводниковым лазером. В обоих Sysmex XN-10 и XN-20, значение из канала WNR сообщается как общее количество лейкоцитов, независимо от рефлекторного теста . Общее количество лейкоцитов из каналов WDF и WPC используются как параметры, пригодные только для исследований. На рис. 1 схематично показано порядок представления данных о количестве лейкоцитов в Sysmex XN .

Среди используемых реагентов (LYSERCELL и FLUOROCELL), YSERCELL отличается в каждом канале; LYSERCELL в канале WNR более кислый (pH 2,95-3,05, 26-32 мОсм/кг H2O), чем в канале канале WDF (pH 5,95-6,05, 98-108 мОсм/кг H2O). Если в этом канале обнаруживаются бласты или аномальные лимфоциты, то проводится рефлекторный тест в канале WPC, где LYSERCELL более нейтрален (pH 7,25-7,35, 32-42 мОсм/кг H2O).



Калибровка системы подсчета лейкоцитов проводится не реже одного раза в 6 месяцев с использованием внутреннего стандартного материала (XN CAL, Sysmex); калибровка производится только в канале WNR. Эта калибровка не распространяется на другие каналы WBC, где количество лейкоцитов генерируется как RU. Внутренний контроль качества проверяется не реже чем каждые 8 ч с использованием трехуровневых материалов контроля качества (XN CHECK, Sysmex). Все 6327 образцов были подвергнуты случайному анализу между модулями XN-10 и XN 20; 1966 образцов были проанализированы с помощью модуля XN-10 и 4361 образец - с помощью модуля XN-20. В модуле XN-20 испытание на рефлекс по каналу ДПК было проведено в 508 из 4361 образца образцов (11,6%).

Для получения клинических и лабораторных данных были изучены медицинские карты пациентов. Средний возраст включенных в исследование пациентов 57 лет (диапазон 0-96 лет), женщины составили 50,6% (3202/6327). Медиана количества лейкоцитов во всех образцах составила 6,74 9 109 /л (диапазон, 0.03-294.58 9 109 /L). Все образцы были разделены на три группы в зависимости от количества лейкоцитов: лейкопения (<4.0 9 109 /л, n = 716); нормальное количество лейкоцитов (4,0- 10.0 9 109 /л, n = 4419); и лейкоцитоз (>10.0 9 109 /л, n = 1192). Группа лейкопении была разделена на на тяжелую (<1,0 9 109 /L, n = 82) и лейкопению легкой и средней степени тяжести (от 1,0 до <4.0 9 109 /л, n = 634). Они также сравнивались в двух группах пациентов в зависимости от статуса химиотерапии на момент забора крови: химиотерапия (n = 1304) и умеренная лейкопения (n = 634) и без химиотерапии (n = 5023).

Мы сравнили корреляцию, абсолютную разницу и процентную разницу (%D) количества лейкоцитов между каналами WNR и WDF и WDF. Процентная разница количества лейкоцитов рассчитывали путем деления разницы в количестве лейкоцитов между каналами WNR и WDF на количество WBC в канале WNR; количество WBC в канале WNR рассматривалось как исходное значение. Для подсчета количества WBC максимальный коэффициент дисперсии (CV), установленный производителем, составил 3% в нормальных образцах (WBC ≥4,0 9 109 /л); это значение использовалось для определения количества лейкоцитов в канале WNR. /л) и для сравнения методов.

**Статистический анализ**

Данные выражались в виде медианы и диапазона. Коэффициент корреляции Пирсона (с 95% доверительным интервалом [CI]) использовался для сравнения количества лейкоцитов. Коэффициенты r ≤0,35 рассматривались как низкие корреляции, от 0,36 до 0,67 - как умеренные, от 0,68 до 1,0 - как высокие, а коэффициенты r ≥0,90 - очень высокая корреляция . График Бланда-Альтмана использовался для определения средних различий и 95% границ согласия количества лейкоцитов между каналами WNR и WDF . Для сравнения абсолютных различий и %D в каналах WNR и WDF использовался тест Kruskal-Wallis с post hoc. U-тест Манна-Уитни использовался для сравнения абсолютной разницы и %D в группах по количеству WBC. Парный тест Вилкоксона парный тест использовался для сравнения абсолютной разницы и %D каналов WDF vs. WPC и WDF vs. WNR. Для статистического анализа использовались программы Analyse-it Software (версия 3.76.4 Analyse-it Software, Ltd., Лидс, Великобритания) и MedCalc Software (версия 13.1.2, MedCalc Software, Mariakerke, Бельгия). Статистическими считались значения P, равные или менее 0,05, считались статистически значимыми.

**Результаты**

Коэффициент корреляции Пирсона (r), абсолютная разность, и %D между каналами WNR и WDF представлены в табл. 1. Во всех 6327 образцах количество лейкоцитов показали очень высокую корреляцию между двумя каналами (r = 0,9976) без существенных отклонений от линейности. Такая высокая корреляция наблюдалась во всех подгруппах по количеству лейкоцитов и статусу химиотерапии статуса. %D составил 1,55% в общем количестве образцов и менее 3% в каждой подгруппе, за исключением группы с тяжелой лейкопенией группы. %D в группе с тяжелой лейкопенией (n = 82) был значительно выше, чем в группе легкой и средней степени тяжести лейкопении (6,18 против 2,36%, P < 0,0001). По мере увеличения количества лейкоцитов абсолютная разница между ними увеличивалась, а %D уменьшался (P < 0,0001). в то время как %D уменьшался (P < 0,0001, и то, и другое). У 1304 пациентов, получавших химиотерапию, абсолютная разница в показателях WBC была значительно ниже, чем у пациентов, не получавших лечение (0,0 пациентов, не получавших химиотерапию (0,08 9 109 /л против 0,11 9 109 /L, P < 0.0001). Однако %D был значительно выше у пациентов, получавших химиотерапию, по сравнению с пациентами, не получавшими лечения (1,56 против 1,55%, P = 0,0008).

В 508 образцах, для которых был проведен рефлекторный тест, количество WBC показало очень высокую корреляцию в каждой паре каналов: WNR против WDF; WNR против WPC; и WDF против WPC (табл. 2). Такая очень высокая корреляция наблюдалась во всех подгруппах по количеству лейкоцитов и статусу химиотерапии. Аналогично как и в случае с суммарными образцами, по мере увеличения количества WBC, абсолютная разница в количестве лейкоцитов увеличивалась, а % D по количеству лейкоцитов уменьшался. Следует отметить, что в группе тяжелой лейкопении, %D между каналами WNR и WPC составил 0,1%, что является значительным отличием по сравнению с %D других каналов (6,66%), между каналами WNR и WDF; 7,69% между каналами WDF и WPС.

**Обсуждение**

Несмотря на новые передовые технологии в автоматических гематологических анализаторах, могут встречаться ложные или ошибочные результаты подсчета клеток. Количество лейкоцитов с их дифференцировкой является одним из наиболее важных параметров КТГ. Настоящее исследование было задумано на основе предыдущего случая, в котором были обнаружены значительные различия в количестве лейкоцитов между каналами WNR и WDF (0,11 9 109/л vs. 7,4 9 109/л) и показало, что количество лейкоцитов по каналу WDF как точное значение . В этом случае флаг сообщение, появившееся на экране анализатора, 'Разница между WNR и WDF. Проверьте результаты", не было передано в лабораторную информационную систему, и сотрудники лаборатории не смогли его распознать. Этот случай подчеркивает важность проверки каждого флаговое сообщение прибора. В нашем исследовании 6327 последовательных образцов, отражающих различные клинические условия и типичные популяции пациентов в клинических лабораториях, одно и то же сообщение не было обнаружено. Если бы мы включили исследования тех немногих случаев, когда этот флаг был обнаружен, это исследование было бы существенно усилено. Хотя мы не смогли получить дополнительную информацию о том, в каких случаях появляется такое сообщение, ни из нашего исследования, ни от производителя, этот флаг, по-видимому, появляется очень редко. Поэтому пользователям следует обращать внимание на ложные, сильно лейкопенические образцы и должны подтверждать результаты с помощью дополнительных инструментов, таких как мазки крови.

В данном исследовании количество лейкоцитов в каналах WNR, WDF и WPC показало очень высокую корреляцию независимо от количества лейкоцитов и статуса химиотерапии (табл. 1 и 2). Хотя мы использовали %D для сравнения каналов, у нас не было информации о смещении ни одного из трех каналов, поскольку в данном исследовании не использовался референсный метод подсчета лейкоцитов. Учитывая, что не существует предложенного отсечения, которое можно было бы применить для сравнения этих видов новых каналов для подсчета лейкоцитов, мы использовали заявленный производителем максимальный внутрипроцессный CV, равный 3%. Хотя этот 3% было предложено для нормальных образцов (WBC ≥4,0 9 109/л), %D между каналами был менее 3% даже в лейкопении , за исключением лейкопенических образцов тяжелой степени. Однако сомнительно, что статистическая значимость %D может быть расценена как клинически значимое различие.



Примечательно, что %D был очень низким (0,10%) между каналами WNR и WPC даже для образцов с выраженной лейкопенией, в отличие от высокого % D между каналами WDF и WPC и между каналами WNR и WDF (6,66) между каналами WNR и WDF; 7,69% (табл. 2). В приборе XN-20, в котором для рефлекторного теста используется канал WPC рефлекторного теста, данные по WBC, полученные из каналов WNR и WPC, оказались более связанными друг с другом, чем данные, полученные по каналу WDF. Осмолярность LYSERCELL в канале WDF (98-108 мОсм/кг H2O) была выше, чем в каналах WNR и WPC (26-32 и 32-42 мОсм/кг Н2О соответственно. Это может быть одним из объяснений таких различий между каналами. Аналитическая погрешность при подсчете нейтрофилов быстро возрастает в образцах с выраженной лейкопенией , этот вывод подтверждается и настоящим исследованием. В образцах с тяжелой лейкопенией следует учитывать такие аспекты, и для подтверждения количества лейкоцитов необходимо провести анализ мазка крови.

В Sysmex XN реагент для канала WNR является более кислым и имеет более низкую осмолярность, чем реагент для канала WNR. Мы предположили, что химиотерапия может повлиять на хрупкость мембран лейкоцитов и привести к различиям в количестве лейкоцитов в разных каналах, но в настоящем исследовании было показано, что в текущем статусе химиотерапии нет клинически значимой разницы в количестве лейкоцитов в разных каналах между каналами. Этот вывод согласуется с предыдущими результатами сообщением об отсутствии существенной разницы в количестве лейкоцитов между каналами WNR и WDF при различных pH, времени инкубации и температуры.

В соответствии с правилами Clinical Laboratory Improvement, каждая лаборатория должна продемонстрировать, что она может получить технические характеристики сопоставимые с характеристиками, установленными производителем при внедрении нового гематологического анализатора. Однако решение о приемлемости зависит от того, какая величина аналитической погрешности является допустимой , не влияя и не ограничивая использование и интерпретацию результатов отдельных тестов при валидации метода сравнении двух приборов. Следовательно, каждая лаборатория должна разработать свои собственные критерии оценки для приемлемых результатов. Новые критерии оценки или руководства для этой новой канальной технологии. Критерии должны зависеть не от технологии, а скорее от потенциальных медицинских последствия неправильных результатов лабораторных исследований.



Ограниченность данного исследования заключается в том, что подробная информация о химиотерапии не было. Мы можем предположить что различные виды химиотерапии (например, алкилирующие агенты, ингибиторы топоизомеразы II) могут влиять на уровень лейкоцитов по-разному влиять на мембрану лейкоцитов. Кроме того, любые изменения в % D в процессе проведения химиотерапии не удалось оценить. Последовательное исследование %D может дать больше информации о том, какой канал будет полезным для подсчета количества лейкоцитов в связи с химиотерапией. Для подтверждения этих предположений необходимы дальнейшие исследования предположения. И наконец, поскольку все образцы были исследованы в течение 4 ч после взятия, влияние транспортировки образца в течение 4 ч после взятия, задержки в обработке образцов в данном исследовании не оценивалось.

В заключение следует отметить, что это первое исследование, в котором изучался новый метод подсчета лейкоцитов с использованием различных каналов в модульной системе Sysmex XN. В нашем крупномасштабном исследовании, включавшем 6327 клинических образцов, подсчет лейкоцитов с использованием каналов WNR, WDF и WPC были высококоррелированы., а результаты в целом были взаимозаменяемы и надежны. В нашем единичном институциональном исследовании не удалось выявить случаев значительного расхождения результатов количества лейкоцитов между каналами, что оставляет возможность для дальнейшего исследования дальнейших исследований Sysmex XN и его каналов для определения количества лейкоцитов в различных клинических ситуациях .