

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Kateřinská 32, 121 08 Praha 2, Česká republika, tel.: 224 961 111, e-mail: office@lf1.cuni.cz



**Porovnání kontroly měření na různých typech
analyzátorů používaných na ÚKBLD CHLTC ve
VFN v Praze**

(Magisterská diplomová práce)

Autor: Bc. Vladimír Koblasa

Vedoucí magisterské práce: prof. MUDr. Jan Kvasnička, DrSc.

Školitel – konzultant: Mgr. Ivana Malíková

Praha, 2012

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval svým vedoucím diplomové práce prof. MUDr. Janu Kvasničkoví, DrSc. a ing. Miloslavu Špundovi, CSc. Velice děkuji paní Mgr. Ivaně Malíkové z Centrální hematologické laboratoře ÚLBLD Všeobecné fakultní nemocnice v Praze za neobyčejně obětavou pomoc, poskytnutí studijních materiálů a věcné připomínky k mé práci.

Taktéž děkuji celé mé rodině za pomoc a pochopení.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje. Současně dávám svolení k tomu, aby tato závěrečná práce byla archivována v Ústavu vědeckých informací 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a zde užívána ke studijním účelům. Za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou přednáškovou nebo publikační aktivitu, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v Digitálním repozitáři Univerzity Karlovy v Praze (<http://repozitar.cuni.cz>). Práce je zpřístupněna pouze v rámci Univerzity Karlovy v Praze.

Souhlasím – Nesouhlasím *

V Praze, 23. 5. 2012

Bc. Vladimír Koblasa

Podpis.....

* Nehodící se škrtněte

Abstrakt

Koblasa, Vladimír - Porovnání kontroly měření na různých typech analyzátorů používaných na ÚKBLD CHLTC ve VFN v Praze

1. lékařská fakulta UK Praha 2, Kateřinská 32

Vedoucí práce: prof. MUDr. Jan Kvasnička, DrSc.

Školitel – konzultant: Mgr. Ivana Malíková

Vyšetření krevního obrazu je základní hematologické vyšetření, u kterého je potřeba zajistit správnou kontrolu kvality.

Cílem práce bylo porovnání výsledků měření kontrolních materiálů s definovanými parametry a dále stejných vzorků na jednotlivých hematologických analyzátozech, abychom získali podklady pro vyjádření nejistot měření.

ÚKBLD CHLTC ve VFN v Praze využívají analyzátory krve, které pracují na různých principech. Pro porovnání kvality měření byly vybrány analyzátory pracující pomocí impedančního principu, kdy jednotlivé krevní buňky prochází mezi dvěma elektrodami, mezi nimiž je určité elektrické napětí. Změna tohoto napětí je zaznamenána a přesně definována pro každý druh krevních buněk. Dále byl vybrán analyzátor, který pracuje pomocí optické detekce. Analyzátor ozařuje jednotlivé krevní buňky světelným paprskem. Buňka, která vstoupí do cesty světelnému záření, snižuje jeho optickou hustotu dopadající na fotobuňku, to vyvolá změnu napětí a opět tato změna je přesně definována pro každý druh krevních buněk.

Jako software pro záznam výsledků jsem použil tabulkový editor Excel, který svými výpočetními funkcemi pro mé měření zcela postačuje. Naměřené výsledky byly porovnány s rozmezím, které doporučuje výrobce. Hodnoty u všech hladin kontrolních materiálů splňovaly doporučené rozmezí.

Závěrem porovnání kontroly kvality měření na různých typech analyzátorů bylo zjištění, že při současné činnosti na oddělení ÚLBLD CHLTC dochází k mnohem nižším rozdílům, než které jsou stanoveny pro jednotlivé přístroje normami. Vzhledem k těmto výsledkům lze konstatovat, že tyto normy by mohly být u některých laboratoří přísnější.

Klíčová slova: analyzátor, kontrola kvality měření, krevní buňky, erytrocyty, leukocyty, trombocyty, morfologie

Abstract

Koblasa, Vladimír - Comparison of control measurements on various types of haematology analyzers used by ÚKBLD CHLTC at University Hospital in Prague

First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Praha 2, Kateřinská 32

Head of the work: prof. MUDr. Jan Kvasnička, DrSc.

Supervisor -consultant: Mgr. Ivana Malíková

Blood cell count is essential testing method in hematology, where it is necessary to ensure proper quality control.

Aim of this study was to compare the results of measurement control materials with defined parameters and the same samples at different haematological analyzers to obtain evidence for the expression of measurement uncertainties.

There are used more types of blood analyzers in ÚKBLD CHLTC at University Hospital in Prague, which operate on different principles. For comparison were selected analyzers using the impedance working principle, where individual blood cell passes between two electrodes controlled by low voltage. Variation of this voltage is recorded and accurately defined for each type of blood cells. It was also chosen analyzer that works with optical detection. Analyzer illuminates the individual blood cell by light beam. A cell that enters into the path of light rays, reduce its optical density incident on the photocell. The change of the light density causes variation of low voltage and this variation is precisely defined for each type of blood cells.

As software for recording the results, I used Excel spreadsheet that its calculating functions for my measurements quite sufficient. The measured results were compared with the range recommended by the manufacturer. Values for all levels of control materials meet the recommended range.

Finally report from this study is, that comparison of quality control measurements on various types of analyzers used by department

of ÚLBLD CHLTC is much less difference than those specified for each unit standards. Due to these results we can say, that these standards could be more stringent in some laboratories.

Keywords: analyzer, quality control measurements, blood cells, erythrocytes, leukocytes, platelets, morphology

Identifikační záznam:

KOBLASA, Vladimír. Porovnání kontroly měření na různých typech analyzátorů používaných na ÚKBLD CHLTC ve VFN v Praze [Comparison of control measurements on various types of haematology analyzers used by ÚKBLD CHLTC at University Hospital in Prague]. Praha, 2012. s. Univerzita Karlova v Praze, 1.lékařská fakulta, Ústav biofyziky a informatiky 1. LF UK. Vedoucí magisterské práce Jan Kvasnička

Obsah

1.	Úvod	11
2.	Teoretická část	12
2.1	Krev – složení, obecné vlastnosti	12
2.1.1	Fyziologie krevní buňky	12
2.1.1.1	Fyziologie červené krvinky	12
2.1.1.2	Fyziologie bílé krvinky	13
2.1.1.3	Fyziologie krevní destičky	14
2.1.2	Morfologie krve - krevní elementy	14
2.1.2.1	Morfologie erytrocytů - červené krvinky	15
2.1.2.2	Bílé krvinky – Leukocyty	16
2.1.2.3	Krevní destičky – Trombocyty	20
2.1.3	Krevní plazma	20
2.1.3.1	Bílkoviny krevní plazmy	20
2.1.4	Patofyziologie krve	21
2.1.4.1	Poruchy červené krevní řady	22
2.1.4.2	Poruchy bílé krevní řady	24
2.2	Odběr a zpracování krevního vzorku	25
2.2.1	Odběr venózní krve	26
2.2.2	Odběr krve z arteriálního katetru	26
2.2.3	Odběr kapilární krve	27
2.2.4	Chyby při odběrech a manipulaci s krevním vzorkem	28
2.2.5	Transport a uchování krevního vzorku	28
2.3	Morfologické vyšetření krve	29
2.3.1	Krevní obraz	29
2.3.2	Diferenciální počet leukocytů	30
2.4	Možnosti počítání krevních buněk	30
2.4.1	Mikroskopická metoda počítání krevních buněk	30
2.4.1.1	Bürkerova komůrka	31
2.4.2	Elektronické počítání krevních buněk	32

2.5	Kontrola kvality	32
2.5.1	Zajištění kontroly kvality	33
2.5.2	Typy zajištění kontroly kvality	34
2.5.2.1	Vnitřní řízení kvality - Internal Quality Control (IQC)	34
2.5.2.2	Externí kontrola kvality - External Quality Assurance (EQA)	34
2.5.3	Kontrolní materiál	35
2.5.4	Provádění kontrol kvality	35
2.5.4.1	Rutinní činnosti související s kontrolou kvality	35
2.5.4.2	Vlastní provádění kontrolních měření	36
2.5.4.3	Správnost / pravdivost	37
2.5.4.4	Přesnost měření analyzátoru v sérii – opakovatelnost	38
2.5.4.5	Přesnost měření analyzátoru v čase – reprodukovatelnost	38
2.5.4.6	Porovnatelnost různých metod měření a různých analyzátorů	39
2.5.4.7	X-B analýza jednotlivých analyzátorů (klouzavý průměr)	40
2.5.4.8	Porovnatelnost mezi klinickými laboratořemi – EHK	40
2.5.5	Kontrolní měření po změnách na analyzátoru	41
2.5.6	Hodnocení kontrolních měření	41
2.5.6.1	Možné typy chyb	42
2.5.6.2	Možné příčiny chyb	43
3.	Praktická část	44
3.1.	Definice kontrolních souborů	44
3.1.1.	Kontrolní materiály s přesně definovanou hodnotou	44
3.1.2.	Kontrolní materiály bez definované hodnoty	44
3.2.	Odběr a zpracování vzorků	45
3.3.	Analyzátor	45
3.3.1.	Parametry KO stanovované na všech analyzátořech	45
3.3.2.	Analyzátor LH 755, LH 750, DxH 800 I, DxH 800 II	46
3.3.3.	Sysmex XE-5000	47
3.3.4.	Celltac E , Celltac F	48
3.4.	Reagencie	49
3.5.	Zpracování naměřených dat	50

3.5.1. Vyhodnocení měření kontrol s definovanou hodnotou	50
3.5.2. Vyhodnocení měření kontrol nativní krve bez udané hodnoty	54
3.5.3. Relativní nejistoty měření při normální hladině	58
3.5.4. Absolutní nejistoty měření při normální hladině	58
4. Diskuze	59
5. Závěr	61
6. Seznam použité literatury	62
7. Seznam zkratk použitých v textu	64
8. Seznam tabulek a obrazové dokumentace	65
9. Přílohy	66

1. Úvod

Vyšetření krevního obrazu na hematologických analyzátoch patří k základním hematologickým vyšetřením. V současné době je na trhu mnoho výrobců automatických analyzátorů krevního obrazu (například firmy Beckman Coulter, Sysmex, Abbott, Siemens, a další), kteří využívají pro měření různé principy detekce. Nejpoužívanějšími jsou metody impedanční nebo optické detekce krevních elementů. U obou těchto technologií je primárním výsledkem určitá změna předem známého elektrického potenciálu. Tento výstup je dále pomocí speciálních elektrických obvodů zesílen a upraven a teprve pak je přístrojem analyzován. Vlastní analýza je provedena pomocí speciálního a velmi složitého algoritmu, jejichž výzkum a vývoj patří mezi hlavní know how výrobce. Výsledky měření z přístrojů těchto výrobců jsou neobjektivnější a poskytují velmi přesné výsledky, včetně informací o případných abnormalitách v měřeném vzorku. Ve světě je dále několik desítek výrobců analyzátorů, kteří pouze vyrábějí své přístroje na základě koupené licence již použité technologie. Tyto analyzátoři jsou většinou levné, ale dostačující pro malé laboratoře.

Pokud tedy laboratoře používají k měření větší počet analyzátorů pracujících na různém principu odlišení krevních elementů, je potřeba mít všechny výstupy zajištěné dobrou kontrolou kvality měření a zajištěnou porovnatelnost výsledků mezi jednotlivými analyzátoři.

2. Teoretická část

2.1 Krev – složení, obecné vlastnosti

Krev je jednou z hlavních součástí vnitřního prostředí organismu. Svým složením a funkcemi představuje životně důležitou tekutinu, která jako pohyblivé médium spojuje všechny orgány a tkáně v těle a má rozhodující homeostatický význam. Je to suspenze formovaných buněčných elementů v krevní plazmě. Formované buněčné elementy tvoří buněčnou část krve a plazma tvoří nebuněčnou, tekutou část krve, která umožňuje pohyb buněčných elementů [1]. Uzavřený krevní oběh je velice efektivní systém, který umožňuje vyšší specializaci jednotlivých tělních orgánů, protože každý orgánový systém se podílí pouze částečně na udržování stálosti vnitřního prostředí a usnadňuje regulaci krevního zásobování těmito orgány. Uzavřený krevní oběh spolu s vysoce specializovanou krevní tkání umožňuje dokonalé systémové řízení stálosti vnitřního prostředí.

Objem krve v lidském těle činí 7 – 10% tělesné hmotnosti, to je u dospělého člověka přibližně 4,5 – 6 litrů, ženy mají ve vztahu k tělesné hmotnosti objemově méně krve než muži.

Hematokrit

Podíl červených krevních buněk v celkovém množství krve se nazývá hematokrit [2]. Při odstředování nesrážlivé krve dojde k oddělení krevních elementů od plazmy. Normální hodnota u mužů je 39 – 49%, u žen 36 – 46%.

2.1.1 Fyziologie krevní buňky

2.1.1.1 Fyziologie červené krvinky

Červená krvinka je bezjaderná buňka, která zaujímá 40 – 45% objemu krve. Postrádá většinu organel a je to tedy převážně buněčná membrána, která uzavírá přesycený roztok hemoglobinu [2]. Bikonkávní tvar představuje optimální poměr povrchu

k objemu a sama buňka se dá snadno deformovat při průchodu krevní kapilárou. Tato vlastnost umožňuje průchod červené krvinky i kapilárami, které mají menší vnitřní průměr, než je průměr krvinky. Naopak častým deformováním dochází ke snížení životnosti krvinky [3].

Hlavní funkcí erytrocytů v organismu je přenos O_2 z plic do tkání a CO_2 opačným směrem ve vazbě na molekulu hemoglobinu. Tato vazba je reverzibilní a je závislá na parciálním tlaku plynu. Tyto tlakové poměry jsou v plicní tkáni ve prospěch O_2 tak, aby došlo k navázání molekuly O_2 na hemoglobin a k transportu pomocí erytrocytu až na místo spotřeby.

Zralý erytrocyt přežívá v krvi přibližně 110 – 120 dní. Po této době je erytrocyt již velmi mechanicky opotřebovaný a také je vyčerpán jeho enzymatický systém, který je důležitý pro jeho správný metabolismus [4], [6]. Dochází k postupnému snižování aktivity enzymů sacharidového metabolismu, který je pro erytrocyt nejdůležitější a v buňce klesá obsah redukčních látek, které se již nestačí syntetizovat v dostatečném množství. V důsledku toho nastává peroxidace lipidů, akumuluje se methemoglobin a denaturují se enzymy a membránové bílkoviny [17]. Erytrocyt se zmenšuje, buněčná membrána se ztenčuje a buňka se zakulacuje. Takto změněný erytrocyt se těžko pohybuje v kapilárách, a proto se zachycuje především ve slezině, kde je fagocytován.

2.1.1.2 Fyziologie bílé krvinky

Bílé krvinky (leukocyty) jsou bezbarvé kulaté buňky, které obsahují jádro. Zralé leukocyty se v organismu podílí na obranných reakcích organismu [3]. Dělí se na:

- neutrofilní tyče a segmenty
- eozinofilní segmenty
- bazofilní segmenty
- monocyty
- lymfocyty

Dají se rozdělit dle morfologie na granulocyty (polymorfonukleáry – neutrofilny, bazofilny a eozinofilny) a agranulocyty (monocyty, lymfocyty, plazmocyt) nebo dle imunologické funkce na fagocyty – buňky s fagocytární schopností (mikrofágy):

neutrofilů, eozinofilů a makrofágů: monocytů, histiocytů) a imunitních – buňky produkující protilátky (lymfocyty: B- a T-lymfocyty, NK buňky a plazmatické buňky: plazmocyty) [5], [13].

Jednotlivé druhy leukocytů mají různou délku života od několika hodin, až po celý život jedince:

- zralé neutrofilů přežívají v krevním oběhu jen několik hodin a pak přestupují do tkání, kde pravděpodobně zanikají
- zralé eozinofilů přežívají v krevním oběhu 12 – 24 hodin a pak přechází do oblastí mimo krevní oběh
- zralé bazofilů přežívají v krevním oběhu 4 – 7 dnů
- monocytů přežívají v krevním oběhu několik dní, pak přechází do tkání, některé monocytů se mohou opakovaně vracet do krevního oběhu, jiné se natrvalo usazují ve tkáních a diferencují se na specifické tkáňové makrofágů (histiocytů). Tyto buňky patří do skupiny monocytomakrofágů.
- lymfocyty B a T přežívají několik dní až týdnů, ale paměťové buňky přežívají několik let až desetiletí

2.1.1.3 Fyziologie krevní destičky

Krevní destičky (trombocyty) jsou malé bezjaderné útvary, které vznikají odštěpením části cytoplazmy megakaryocytů [7]. Jsou to velmi labilní a povrchově aktivní částice. Po vyplavení z kostní dřevě je až 30% z nich zadržováno 1 – 2 dny ve slezině. Po odštěpení z megakaryocytu podléhají destičky stárnutí a přežívají v cirkulující krvi 8 – 14 dní. Zestárlé a nefunkční trombocyty jsou odbourávány mononukleárním fagocytárním systémem ve slezině, játrech a kostní dřevě.

2.1.2 Morfologie krve - krevní elementy

V krvi se rozlišují tři druhy krevních buněk (elementů):

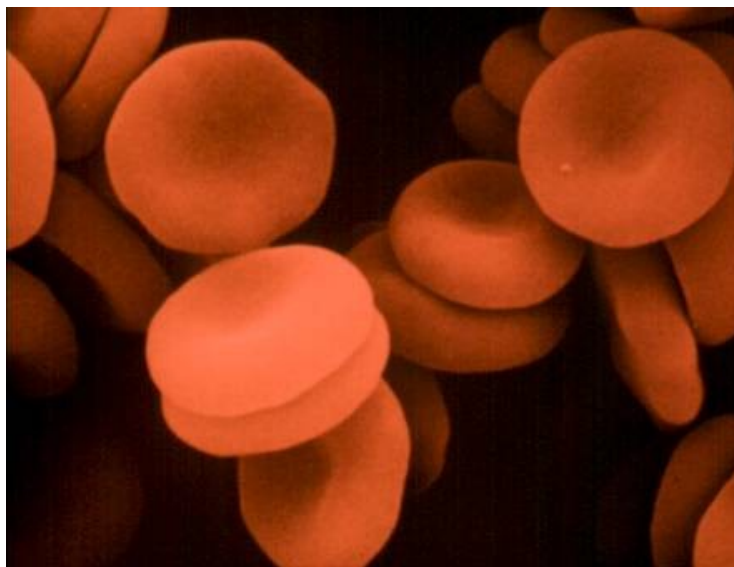
erythrocyty (červené krvinky) – bezjaderné, jejich hlavní funkcí je transport krevních plynů

leukocyty (bílé krvinky) – jaderné, jejich hlavní funkcí je zajištění imunitních reakcí
trombocyty (krevní destičky) – bezjaderné, jejich hlavní funkcí je zajištění hemostázy

2.1.2.1 Morfologie erytrocytů - červené krvinky

Červené krvinky jsou bezjaderné, bikonkávní buňky, které obsahují červené krevní barvivo hemoglobin. Tento protein je významný pro jeho schopnost vázat a uvolňovat kyslík. Erytrocyty mají průměr 7,5 μm , na obvodu jsou 2,6 μm a uprostřed pouze 0,8 μm silné. Bikonkávní tvar zajišťuje eryrocytu velmi výhodný poměr mezi povrchem a objemem a usnadňuje tak výměnu plynů [8], [9]. Zároveň jsou i velmi elastické, když se protlačují i těmi nejužšími kapilárami.

Normální počet erytrocytů v krvi činí přibližně 3,9 – 5,5 milionů/ μl u žen a 4,1 – 6 milionů/ μl u mužů. Snížené hodnoty jsou obvykle spojené s anémií, zvýšený počet se nazývá polycytémií.



Obr. č. 1: Erytrocyty

2.1.2.2 Bílé krvinky – Leukocyty

Leukocyty (bílé krvinky) jsou buňky krve, které obsahují jádro, nemají stálý tvar, mohou se množit, žijí několik hodin až dní. Paměťové buňky zůstávají v lidském organismu po celý život. Obecnou vlastností leukocytů je schopnost vystupovat z krevního řečiště přes cévní stěnu do tkání, kde se uplatňují [1]. Tato schopnost se označuje jako diapedéza. Kromě toho mají bílé krvinky schopnost fagocytózy (pohlcování cizorodých částic a bakterií) a měňavkovitého pohybu. Počet leukocytů kolísá. Ráno na lačno je nižší než po najezení, při některých virových onemocněních klesá, při zánětlivých bakteriálních onemocněních naopak stoupá.

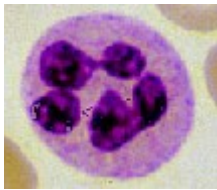
Bílé krvinky zajišťují obranyschopnost organismu. Podílí se jak na nespecifické (neutrofilní, eozinofilní a bazofilní granulocyty, monocyty, speciální lymfocyty-NK buňky) tak na specifické (T- a B-lymfocyty) imunitě. Nespecifická imunita je vrozená a její mechanismy mohou být v případě infekce použity okamžitě. Zajištěna je především fagocytózou některých bílých krvinek [14]. Specifická imunita nastupuje později než imunita nespecifická. Buňky specifické imunity specificky rozeznávají antigeny, které nejsou tělu vlastní. Rychlost a efektivnost specifické imunity je závislá na tom, pokolikáté se imunitní systém s konkrétním antigenem setkává.

Leukocyty se dělí podle typu granul obsažených v cytoplazmě a podle tvaru jádra do dvou skupin: granulocyty (polymorfonukleární leukocyty) a agranulocyty (mononukleární leukocyty). Toto dělení vychází z historického vývoje histologie, kdy se zjistilo, že v leukocytech se vyskytují barvitelná granula. Specifická granula specificky vážou neutrální, kyselé nebo bazické komponenty barvicích směsí Romanovského typu a granula azurofilní, která se barví purpurově a jsou považovány za lyzozomy. Skupina granulocytů ve zralé formě obsahuje jádro dvou- a vícelaločné a zahrnuje neutrofile, eosinofily a bazofily. Agranulocyty specifická granula neobsahují, avšak obsahují granula, která se barví azurofilními barvivy a mají jádro velké kulaté, nebo má vytvořené zářezy.

Za normálních okolností je fyziologicky v 1 mikrolitru (μL) krve člověka 4000 – 10000 leukocytů.

Granulocyty neutrofilní (50–70%) :

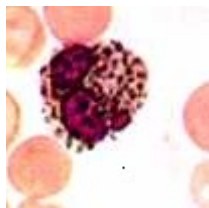
- barví se neutrálními komponenty barvicích směsí Romanovského typu
- mohou měnit tvar a prostupovat stěnou cév do místa infekce
- mají schopnost fagocytózy
- uplatňují se především v boji proti virům, bakteriím a prvokům



Obr.č. 2: Granulocyt neutrofilní

Granulocyty eosinofilní (2-4%) :

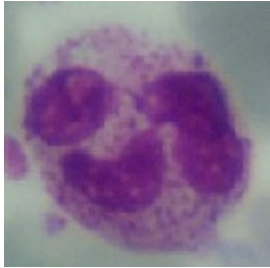
- barví se červeně kyselými komponenty barvicích směsí Romanovského typu
- mají schopnost fagocytózy
- jejich počet stoupá při alergických a parazitárních onemocněních



Obr. č. 3: Granulocyt eosinofilní

Granulocyty bazofilní (0-1%) :

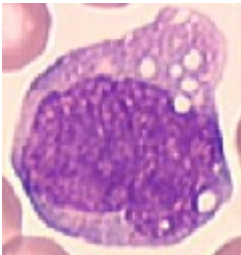
- barví se modře až modrofialově bazickými komponenty barvicích směsí Romanovského typu
- produkují látky s vazodilatačními a antikoagulačními účinky (heparin a histamin)



Obr. č. 4: Granulocyt bazofilní

Monocyty (3-8%):

- největší leukocyty s ledvinovitým jádrem
- v krvi cirkulují jako nezralé buňky, po průniku do tkání dozrávají v makrofágy a fagocytují patogeny
- jsou součástí retikuloendotelového systému



Obr. č. 5: Monocyt

Lymfocyty (20-30%) :

T-lymfocyty :

- vznikají v kostní dřeni a dozrávají v thymu (brzlíku)

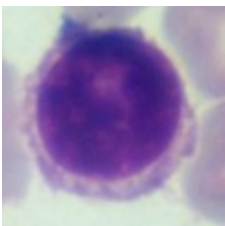
- mají velmi dlouhou životnost
- pomáhají B-lymfocytům při tvorbě protilátek (pomocné Th-buňky)
- mají regulační funkci a tlumí obranné reakce
- jsou schopny zabít nádorové buňky a buňky infikované virem navozením apoptózy – buněčné smrti - (cytotoxické Tc-buňky)



Obr. č. 6: T-lymfocyt

B-lymfocyty :

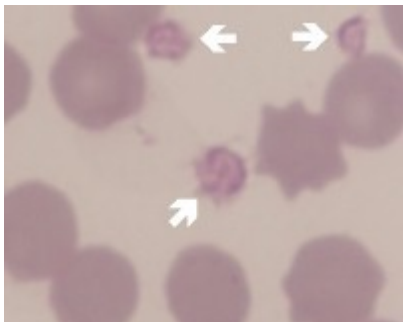
- dozrávají v kostní dřeni
- po aktivaci cizorodou látkou (např. bakterií, virem) se množí a mění se na plazmatické buňky, které tvoří a uvolňují protilátky – imunoglobuliny
- z některých plazmatických buněk se vytvoří paměťové buňky, které urychlují protilátkovou imunitní odpověď při příštím setkání se stejným antigenem



Obr. č. 7: B-lymfocyt

2.1.2.3 Krevní destičky – Trombocyty

Trombocyty jsou drobné bezjaderné částice o průměru 2 – 4 μm , vznikají jako úlomky plazmalemy megakaryocyty [1]. Podněcují srážení krve a pomáhají zacelovat defekty ve stěnách krevních cév, čímž zabraňují ztrátám krve. Normální počet trombocytů se pohybuje v rozmezí 150 000 – 400 000 na 1 μl krve.



Obr. č. 8.: Trombocyty

2.1.3 Krevní plazma

Plazma je tekutá část krve a představuje přibližně 5% hmotnosti těla. Tvoří přibližně 55- 65% objemu krve a 25% objemu extracelulární tekutiny. Plazma je vodný roztok celé řady organických a anorganických látek [6], [13]. Plazmu tvoří z 93% voda, 6% jsou organické látky (bílkoviny, glukóza, močovina, a.t.d.) a 1% jsou látky anorganické (především různé ionty, které se označují jako krevní elektrolyty). Přestože stále probíhá výměna látek mezi krví a tkáněmi, je složení plazmy za fyziologických podmínek relativně stálé. Osmolalita plazmy dosahuje hodnoty 300 mosm/l a pH plazmy kolísá pouze mezi 7,36 – 7,44.

2.1.3.1 Bílkoviny krevní plazmy

Plazmatických proteinů je 60 – 80 g/l, tedy přibližně 7 – 8 % plazmy. Bílkoviny krevní plazmy se dají dělit elektroforeticky nebo ultraelektroforeticky za účelem zjištění jejich zastoupení v plazmě. Využívá se při tom schopnosti bílkovin, jakožto nabitých

částic, pohybovat se ve stejnosměrném elektrickém poli. Tímto způsobem získáme tři skupiny bílkovin: albuminy 40 – 48 g/l, globuliny 18 – 30 g/l a fibrinogen 3 g/l.

Albuminy mají nejmenší molekulovou hmotnost a jejich molekul je nejvíce. Vytvářejí onkotický tlak, to je osmotický tlak bílkovin, kterým molekuly bílkovin vážou vodu a udržují tak stálou hladinu plazmatické vody [13]. Albuminy se syntetizují především v játrech a za normálních podmínek se jich vytvoří přibližně 17g za den. V důsledku snížené hladiny plazmatických bílkovin klesá onkotický tlak a voda uniká z cév do intersticiálního prostoru, čímž vznikají otoky. Kromě tvorby a udržení onkotického tlaku fungují albuminy také jako přenašeči některých látek, především steroidních hormonů a hormonů štítné žlázy.

Globuliny mají dvojnásobnou molekulovou hmotnost než albuminy. Dělí se na podskupiny α , β a γ -globuliny, přičemž α -globuliny se dělí ještě na frakci α_1 a α_2 a β -globuliny se dělí na frakci β_1 a β_2 . Jsou významné pro obranu organismu, zvláště γ -globuliny, které se tvoří v B-buňkách lymfatických uzlin.

2.1.4 Patofyziologie krve

Objem a složení krve v těle je za normálních okolností velmi stabilní. Za různých nefyziologických okolností a během onemocnění se však mohou různé parametry měnit a mohou výrazně ovlivňovat výsledky morfologického vyšetření krve. Také je nutno pamatovat na případnou probíhající léčbu, která může také mít vliv na měřené parametry krve.

Základní hodnotou je objem krve, kdy u zdravého jedince se označuje jako normovolémie, zvětšené množství jako hypervolémie, snížené množství jako hypovolémie [10]. Při tomto hodnocení je důležité znát procentuelní vyjádření množství formovaných elementů v celkovém objemu krve, tedy hematokrit. Při normálním poměru buněk a plazmy se jedná o jednoduchou normo-, hyper- nebo hypovolémii. Jestliže jsou hodnoty hematokritu zvýšené, pak se jedná o polycytémickou normo-, hyper- nebo hypovolémii, jestliže jsou hodnoty hematokritu snížené, pak jde o oligocytémickou normo-, hyper- nebo hypovolémii.

Krvetvorná tkáň je tkání, ve které dochází k velmi intenzivnímu buněčnému dělení a za normálních okolností jsou ztráty krevních buněk vyrovnávány jejich novou tvorbou. Všechny krevní elementy jsou odvozeny od pluripotentních krvetvorných kmenových buněk. Z těchto buněk po částečné diferenciaci vznikají unipotentní krvetvorné kmenové buňky, ze kterých vzniká vždy jen určitá krevní řada. Kmenové buňky vždy vyžadují pro svou proliferaci a diferenciaci účinek specifických humorálních faktorů (např.: erytropoetinu, trombopoetinu, a.t.d.).

Některé poruchy krvetvorby vznikají defektem na úrovni pluri- nebo unipotentních kmenových buněk (např. leukémie, aplastická anémie), jiné vznikají na úrovni vyžívajících buněk jednotlivých krevních řad.

2.1.4.1 Poruchy červené krevní řady

Odchytky velikosti

Za normálních okolností se přibližně 1 % erytrocytů liší tvarem a velikostí. Buňky o průměru pod 6,7 μm jsou mikrocyty, o průměru nad 7,7 μm jsou makrocyty.

Mikrocyty

Jedná se o krvinky s bikonkávním tvarem, ale s průměrem menším než 6,7 μm a MCV menším než 80 fl. Vzhledem ke své velikosti jsou v panopticky barveném nátěru světlejší než normocyty [10]. Vyšší výskyt mikrocytů je spojen s různými druhy anémií, např: anémie z nedostatku železa (sideropenická anémie), anémie z neschopnosti vázat železo na hem (sideroblastická anémie), nebo u vrozených poruch tvorby hemoglobinu (hemoglobinopatie, talasemie).

Makrocyty

Jedná se o krvinky s bikonkávním tvarem, ale s průměrem větším než 7,7 μm a MCV větším než 97 fl. Vyskytují se ve zvýšené míře u stavů spojených s nedostatkem vitamínu B₁₂ a kyseliny listové nebo u nemocných s primární poruchou metabolismu nukleových kyselin (MDS, aplastická anémie) [15].

Anizocytoza

Za fyziologických podmínek se v periferní krvi mohou nacházet erytrocyty o různé velikosti [13]. Anizocytoza erytrocytů se považuje stav, kdy se v periferní krvi nachází více než 10% erytrocytů o nestejně velikosti. Nemusí se také vždy objevit mikrocyty a makrocyty ve stejném nebo podobném poměru, ale daleko častější je že se vyskytne například zvýšené množství makrocytů mezi normocyty. Běžná je anizocytoza mikrocytů a normocytů u vegetariánů, vzhledem k minimálnímu příjmu živočišných bílkovin.

Odchylky tvaru

Kulatý tvar buňky:

Planocyty – velmi tenké erytrocyty

Anulocyty – erytrocyty s velmi malým obsahem hemoglobinu, ten je uložen převážně na obvodu buňky, takže se jeví jako kroužek

Leptocyty - erytrocyty s velmi malým obsahem hemoglobinu, ten je uložen převážně na obvodu a ve středu buňky, takže vypadá jako mexický klobouk

Sférocyty - erytrocyty jsou kulaté a v důsledku toho mají i menší průměr, barví se výrazně tmavší barvou, při výskytu nad 10% se jedná o onemocnění sférocytoza

Achromocyty – erytrocyty jsou velmi světlé až růžové, jedná se převážně již jen o membrány buněk, ze kterých se vyplavil hemoglobin v důsledku těžké anémie

Nepravidelný tvar buňky:

Drepanocyty – erytrocyty mají měsíčkovitý až srpkovitý tvar v důsledku změny molekuly hemoglobinu, jsou odolnější k hypotonickým roztokům NaCl

Poikilocyty – erytrocyty různého, nejčastěji hruškovitého nebo kapkovitého tvaru, opět se vyskytují často v důsledku anémie, při výskytu nad 10% jde o onemocnění poikilocytozu

Ovalocyty, eliptocyty – erytrocyty oválného tvaru, nejčastěji se jedná o dědičné onemocnění označované jako ovalocytoza

Echinocyty – erytrocyty s velmi nepravidelným tvarem připomínajícím ježka, vyskytují se u pacientů po transfúzi krve nebo po operacích vyžadujících zavedení mimotělního krevního oběhu

Akantocyty – erytrocyty s ostnatými výběžky, vyskytují se při nedostatku β -lipoproteinů v membráně buňky

Stomatocyty – erytrocyty ve tvaru pootevřených úst, může jít o dědičné onemocnění, nebo se vyskytuje při alkoholické cirhóze jater

Darkocyty – erytrocyty ve tvaru slzy nebo kapky, vyskytuje se při myeloproliferativním onemocnění a při anémiích

Keratocyty – rohovité erytrocyty, mají jeden nebo dva výběžky

Schistocyty – vznikají roztržením erytrocytů na fibrinových vláknech při mikroangiopatické hemolytické anémii

2.1.4.2 Poruchy bílé krevní řady

Poruchy granulocytů

V porovnání s erytrocyty neukazuje množství granulocytů v krvi míru jejich produkce. V kostní dřeni je stálá zásoba hotových zralých granulocytů, které se mohou rychle vyplavit do tělní cirkulace. Dále je pro granulocyty typické, že jejich velká část, tedy až 55%, je adherováno na cévní stěnu a tvoří takzvanou marginální hotovost. Také délka života je poměrně krátká, činí přibližně 24 – 36 hodin.

Z hlediska poruch jsou nejzávažnější poruchy spojené s nekontrolovaným množением (mezi tento typ poruchy patří všechny druhy leukémií). Reaktivní změny bílých krvinek jsou založeny na změně počtu bílých krvinek, jako odpověď na působení fyziologických situací (zvýšená námaha zvyšuje počty granulocytů) i na patogenní podněty (infekce) [10]. Jako granulocytóza se označuje zvýšení počtu granulocytů (dle typu buněk na nekrofilii, eozinofilii a bazofilii). Monocytóza je zvýšení monocytů v krvi. Obdobně snížení počtu granulocytů se označuje jako granulocytopenie, neutropenie, eozinopenie, bazopenie a monocytopenie.

Kvalitativní změny granulocytů se týkají poruch přesunu k místu infekce, poruch fagocytózy a poruch schopnosti ničit fagocytované bakterie.

Poruchy lymfocytů

Hlavní funkcí všech typů lymfocytů je uskutečnění specifických imunitních pochodů, tedy tvorby protilátek a tkáňové imunity. Jejich činnost úzce souvisí s funkcí

monocyto-makrofágového systému, kdy lymfocyty rozpoznají nepřátelské buňky a makrofágy společně s některými lymfocyty tyto buňky zničí [10], [13].

Zvýšené množství lymfocytů (lymfocytóza) je příznakem bakteriálních a zvláště virových infekcí, ale také důsledkem lymfoproliferativních onemocnění, mezi které se řadí akutní lymfatická leukémie, chronická lymfatická leukémie a maligní lymfomy.

Naopak snížené množství (lymfopenie) je způsobeno sníženou produkcí a zvýšenými ztrátami. Sníženou produkci vyvolává například vystavení organismu ionizujícímu záření, nebo při vysoké hladině hormonů kůry nadledvin, ať už v důsledku vysoké produkce nebo kvůli jejich použití při léčbě, která jejich zvýšený přísun vyžaduje.

2.2 Odběr a zpracování krevního vzorku

Výsledky měření mohou být ovlivněny mnoha fyziologickými i nefyziologickými faktory, které se mohou vyskytnout při odběru a manipulaci s biologickým materiálem. Je vždy důležité pamatovat, že odběr krve by se měl provádět vsedě nebo vleže u relaxovaného pacienta. Při změně polohy vleže do vzpřímené polohy dochází ke změnám tlaku v kapilárním systému a v koloidním osmotickém tlaku v plazmě. Při tomto pohybu dochází k přesunu vody z intravasálního prostoru do mezibuněčného prostoru a tím se může i u zcela zdravého jedince snížit objem plazmy až o 12%. Částice o průměru větším než 4nm jsou zadrženy buněčnými membránami a nemohou následovat tuto objemovou změnu. Změna v objemu plazmy vede k výrazné koncentrační změně v buňkách, zejména se v buňkách zvyšuje podíl makromolekul oproti extracelulárnímu prostředí. Pro objem nízkomolekulárních látek tento princip neplatí, protože mohou snadněji prostupovat buněčnou membránou. Při sníženém objemu plazmy dochází k ovlivnění některých přímo měřených hematologických parametrů, především jde o počet erytrocytů, hematokrit, hemoglobin, počet leukocytů a v důsledku toho i k ovlivnění parametrů vypočítaných.

2.2.1 Odběr venózní krve

Odběr se provádí v poloze vsedě nebo vleže ze žíly v paži. Paže se volně položí na opěradlo odběrového křesla. Odběrový pracovník zaškrtní paži škrtidlem 10 – 15 cm nad loketní jamkou, pomocí dezinfekčního prostředku na bázi benzalkoniumchloridu vydezinfikuje předpokládané místo vpichu a následně otře místo vpichu čtverečkem z buničiny. Je nutné nechat kůži oschnout, aby se zabránilo případné kontaminaci při odběru nebo hemolýze. K odběru se nejčastěji používá uzavřený vakuový systém Vacuteiner firmy Becton Dickinson. Palcem pod místem vpichu se stabilizuje poloha žíly, provede se vpich jehlou s nasazeným nástavcem. Poté se do nástavce nasadí zkumavka, při tom je nutné dbát na to, aby nedošlo k pohybu jehly v žíle. Jakmile krev začne proudit do zkumavky, musí se odstranit škrtidlo. Při odběru více zkumavek je potřeba zachovat pořadí odběru – zkumavky bez přísad, pak s přísadami. Bezprostředně po naplnění je nutné krev promíchat opakovaným otáčením zkumavky (alespoň 5x). Místo vpichu i s jehlou se zakryje čtvercem z buničiny, na ten je potřeba opatrně zatlačit a pomalu vytáhnout jehlu. Poté se přilepí náplast, pacientovi se doporučí tisknout přesně místo vpichu 2 minuty a ponechat náplast alespoň 15 minut po odběru. Zároveň se pacientovi doporučí, aby po odběru z důvodu případné nevolnosti, vyčkal cca 5 minut v klidu v čekárně.

2.2.2 Odběr krve z arteriálního katetru

Odběr krve z arteriálního katetru je speciální odběr, ke kterému je zapotřebí kromě běžného vybavení ještě následující: ústní rouška, sterilní rukavice, nůžky, sterilní tampony a krytí, Huberové jehly, spojovací set, injekční stříkačka 10 ml k proplachu, fyziologický roztok, heparin. Před odběrem je potřeba provést dezinfekci kůže (2 x) v místě implantovaného katetru. Odběr krve se provádí až po proplachu speciální spojovací hadičky a Huberové jehly asi 5 ml fyziologického roztoku, který má pokojovou teplotu.

Vlastní odběr se provádí tak, že se palpuje a fixuje „port“ mezi palcem a ukazováčkem. Při nádechu pacienta se provede vpich Huberovou jehlou přes kůži, následně membránu komůrky. Odtáhne se obsah až do průtoku čisté krve (5-10 ml). Odebere se potřebné množství krve na laboratorní vyšetření a po ukončení odběru se propláchne 20 ml fyziologického roztoku. Poté se ještě musí aplikovat heparinová zátka a přiloží se sterilní krytí.

2.2.3 Odběr kapilární krve

Je určen pro odběry na vyšetření krevního obrazu, glukózy, glykovaného hemoglobinu a acidobazické rovnováhy. Odběr se provádí z prstu v poloze vsedě. Důležité je dobře vydezinfikovat místo vpichu vhodným dezinfekčním prostředkem. Místem je vpichu obvykle střední palmární část distální falangy prstu ruky, kterou pacient nepíše. Dezinfekci necháme oschnout. Je to důležité, aby nedošlo k hemolýze. Vpich se provádí lancetou Haemolance s určenou hloubkou vpichu a silou lancety, nebo jinou lancetou na jedno použití. Hloubka vpichu nemá být větší než 2 mm, aby nedošlo k poškození hlubších podkožních struktur. Aby se předešlo infekci, je nutno při opakujících se punkcích vybírat různá místa vpichu. Odběr se musí uskutečňovat z dokonale prokrvených míst. Odběry z cyanotických, podchlazených prstů se stázou krve, jsou zbytečným trápením pacientů-výsledky nemohou být použitelné. Dokonalé prokrvení použitých míst je předpokladem správných výsledků a je třeba ho zajistit nejčastěji teplem (několikaminutový teplý zábal, teplá vodní lázeň maximálně 40 °C po dobu 10 minut). Před vpichem je nutno kůži dokonale osušit. Po vpichu se první kapka krve setře čtverečkem z buničiny, pak se konec kapiláry ponoří do další tvořící se kapky a krev se nasává kapilární silou. Musíme se při odběru vyhnout násilnému vytlačování krve z prstu, aby nedocházelo ke kontaminaci krve neurčitým množstvím tkáňového moku. Odebraná krev by neměla obsahovat vzduchové bubliny. U kapilár, jejichž vnitřní strany jsou pokryty vysušeným antikoagulačním prostředkem (většinou heparinem), je zvláště důležité, aby ihned po odběru následovalo uzavření jednoho konce kapiláry čepičkou, vložení ocelového drátku, uzavření druhého konce čepičkou a pak pečlivé promíchání krve a antikoagulačního prostředku pomocí magnetu. Tato

operace nesnese delší časovou prodlevu, mohlo by dojít k vysrážení krve v kapiláře. Z takového vzorku nelze provést vyšetření. K hemolýze může dojít při odběru na vyšetření krevního obrazu také při stírání kapek o hrany mikrozkušavek, které se vkládají do analyzátoru.

2.2.4 Chyby při odběrech a manipulaci s krevním vzorkem

Nejčastější chybou při odběru a manipulaci s krevním vzorkem je hemolýza červených krvinek, která může významně ovlivnit výsledek měření. K hemolýze dochází nejčastěji při:

- použití nestandardní nebo prošlé odběrové soupravy
- neúplném zaschnutí dezinfekčního prostředku na kůži
- použitím tenké jehly a násilným nasáváním krve
- prudkým třepáním krve v odběrové zkumavce
- nesprávném uskladnění krve v lednici
- nadměrném zahřátí vzorku
- dlouhým intervalem mezi odběrem a zpracováním v laboratoři

2.2.5 Transport a uchování krevního vzorku

Vzorky krve, ze kterých má být určen krevní obraz, musí být zpracovány v rozmezí do 2 – 5 hodin od odběru. Transport, vzhledem k tomu, že se jedná o potenciálně infekční materiál, má být rychlý a šetrný tak, aby nedošlo ke změně vlastností vzorku. Za tímto účelem se používají speciální plastová pouzdra a boxy, které jsou velmi odolné. V nemocnicích, které mají svou laboratoř, se často využívá systém potrubní pošty. Tento druh transportu je velmi rychlý, ale není zrovna nejšetrnější pro

krvní vzorky. Pro běžné rutinní měření KO je tento typ dopravy dostačující, ale v případě, že se jedná o požadavek vyšetření KO u obzvláště závažného onemocnění, využije se nejlépe osobní donáška vzorku do laboratoře.

2.3 Morfologické vyšetření krve

2.3.1 Krevní obraz

Vyšetření krevního obrazu patří všeobecně k základnímu vyšetření v lékařství. Důležitost tohoto vyšetření spočívá v tom, že může odhalit primární kvantitativní i kvalitativní odchylky krvetvorby a může upozornit i na jiné onemocnění, které se, mimo jiné, projeví i v krevním obraze – zánětlivé choroby, nádory, a další [15]. Řada dalších vypočítaných parametrů z KO velmi usnadní lékařům diferenciální diagnózu onemocnění. Vyšetření KO je nepostradatelné i při sledování průběhu léčby, aby bylo možné včas upravit terapii.

V praxi se rozlišují 2 základní typy krevních obrazů:

a) osmiparametrový KO zahrnuje:

- leukocyty (WBC)
- erytrocyty (RBC)
- hemoglobin (Hb)
- hematokrit (Hct)
- střední objem erytrocytů (MCV)
- střední objem Hb erytrocytu (MCH)
- střední koncentraci Hb v erytrocytech (MCHC)
- trombocyty (Plt)

b) víceparametrový KO zahrnuje navíc:

- šíři distribuce erytrocytů (RDW)
- destičkový hematokrit (Pct)
- šíři distribuce trombocytů (PDW)

- střední objem trombocytů (MPV)

2.3.2 Diferenciální počet leukocytů

Zjištění přesného zastoupení jednotlivých typů leukocytů v krvi (tzv. diferenciální rozpočet leukocytů, často jen diferenciál) je mnohdy důležité pro stanovení diagnózy, neboť změněné poměry mohou být příznakem infekčních, nádorových, autoimunitních a mnoha dalších onemocnění (infekce, virózy, tyfus, AIDS a mnoho dalších).

Tabulka č. 1: Rozměry a diferenciální rozpočet leukocytů

Leukocyt	Velikost (μm)	Relativní počet (%)
Neutrofilý	12 – 15	50 - 70
Eosinofily	12 – 15	2 - 4
Bazofily	12 – 15	0 - 1
Lymfocyty	6 - 18	20 - 30
Monocyty	12 - 20	3 - 8

2.4 Možnosti počítání krevních buněk

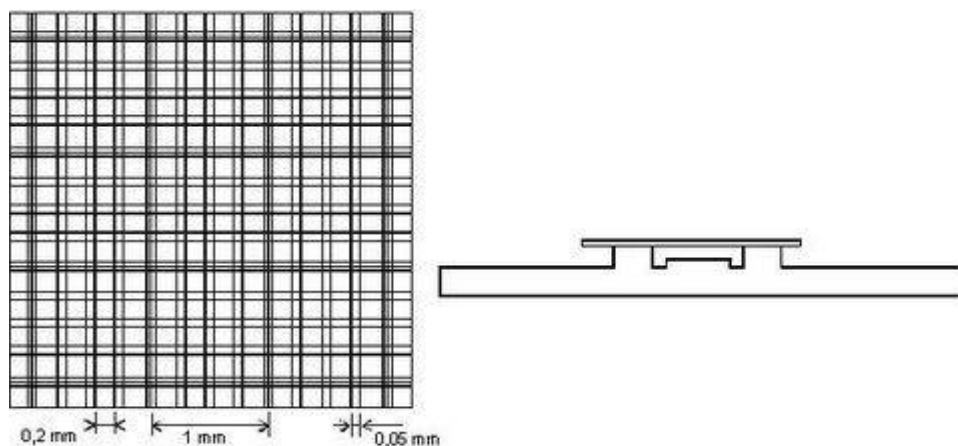
Krevní buňky se dají počítat manuálně pomocí mikroskopu, a nebo elektronicky pomocí poloautomatických a automatických analyzátorů. Základem měření KO je naředění krve izotonickým roztokem (diluentem) v přesně známém poměru. Tímto procesem docházelo vždy k největším nepřesnostem, ale rozvoj počítačové techniky a stále dokonalejších automatických analyzátorů tento proces dokonale vyřešil.

2.4.1 Mikroskopická metoda počítání krevních buněk

2.4.1.1 Bürkerova komůrka

Z počítacích komůrek se nejčastěji používá Bürkerova komůrka. Na této komůrce jsou vyryty dvě počítací mřížky. Každá z nich je rozdělena třemi čarami na devět velkých čtvercových polí, jejichž strana měří 1 mm. Tato pole jsou tvořena středními čtverci o ploše $1/25 \text{ mm}^2$ a v jejich rozích jsou malé čtverce s plochou $1/400 \text{ mm}^2$. Po stranách středních čtverců jsou obdélníky, jejichž plocha se rovná čtyřem malým čtvercům, tedy $1/100 \text{ mm}^2$. Přikrytím ploch s mřížkami krycím sklem vzniká prostor na počítání krvinek vysoký 0,1 mm. Tímto vzniknou tři prostory o přesně známém objemu, ve kterých se pomocí mikroskopu počítají krevní buňky. Při počítání krevních elementů se berou v úvahu jen dvě sousední strany plošného obrazce. Počítají se všechny buňky, které leží uvnitř tohoto obrazce, nebo se dotýkají těch dvou uvažovaných hran, ať leží uvnitř nebo vně. Pro správný výsledek se musí krev nejprve naředit přesně stanoveným množstvím izotonického roztoku a výsledek počítání se musí tímto poměrem upravit. Výpočet se tedy provede:

$$\text{zjištěný počet buněk} / (\text{objem počítané části komůrky} * \text{ředění vzorku})$$



Obr. č.9: Bürkerova komůrka

2.4.2 Elektronické počítání krevních buněk

Impedanční metoda

Měřicí systém používá 2 elektrody, kdy jedna je uvnitř a druhá vně apertury. Elektrody jsou napojeny přes měřič napětí (voltmetr). Na elektrody je přivedeno polarizované stejnosměrné elektrické pole [11], [12]. Částice ve slabém elektrolytu procházejí malou štěrbinou v apertuře, která je pod napětím. Tímto vzniká v oblasti štěrbiny měřicí zóna.

Pro usměrnění proudu buněk se nejčastěji používá hydrodynamická fokusace. To je princip, kdy buňky v nařaděném roztoku vstupují velmi tenkou tryskou do středu širší měřicí květy, po jejímž obvodu zároveň protéká vyšší rychlostí vodící kapalina. Díky laminárnímu proudění nedochází k promíchání tekutin a buňky jsou usměrněny do tenkého proudu a prakticky jedna za druhou vstupují do měřicí zóny, kde jejich průchodem vzniká impedanční impulz. Tyto impulzy jsou softwarem přístroje analyzovány, protože každý druh krevních buněk vyvolá specifickou změnu napětí a tím přístroj určí s velkou přesností krevní obraz.

Optická detekce (detekce pomocí světelného paprsku)

Systém využívá principu průtokové cytometrie, kdy po nasátí měřeného roztoku dojde k seřazení jednotlivých buněk hydrodynamickou fokusací jednotlivě za sebou [11], [12]. V měřicí části jsou buňky vystaveny úzkému paprsku světla (laseru). Když vstoupí buňka do cesty světelnému paprsku, tak způsobí snížení jeho optické hustoty a jeho zalomení, které je detekováno pod různými úhly. Detekce světelného paprsku v přímém směru zaznamenává počet prošlých buněk, zatímco analýzou rozptýleného nebo depolarizovaného světla se určí jednotlivé druhy buněk.

2.5 Kontrola kvality

Kontrola kvality měření na hematologických analyzátoch je základní podmínkou správné diagnostiky patologických stavů. Proto jsou na jejich kvalitu měření

kladeny vysoké požadavky. Pouze systematická kontrola kvality měření na pracovišti může zajistit požadovanou spolehlivost vyšetření a jistotu správnosti a spolehlivosti vydávaných výsledků laboratoří. Základem správně prováděných kontrolních procesů jsou Standardní operační postupy (SOP) s jednoznačnými pravidly, která laboratoři dávají integritu, zabezpečují shodu a spolehlivost, minimalizují chyby a vyjadřují jakost práce dané laboratoře. Nezbytné jsou takové postupy pro laboratoře, které chtějí získat nebo udržet mezinárodní akreditaci.

Programy kontroly kvality klinických laboratoří mají obecná pravidla, ale je nutné tyto pravidla individuálně přizpůsobovat pro každou laboratoř. Kontrolní procesy mají plnit požadavky legislativy, ale současně musí být přiměřené typu laboratoře, typu a počtu hematologických analyzátorů a počtu vlastních měření a vyšetření. Není tedy možné a ani praktické aplikovat proces řízení kvality univerzálně na všechny laboratoře [25]. V obecné rovině platí, že každá klinická laboratoř musí provádět a dodržovat tzv. "minimální kontrolní program".

2.5.1 Zajištění kontroly kvality

Kontrolní procesy zajišťují pro měřené parametry:

- pravdivost a správnost
- přesnost (opakovatelnost a reprodukovatelnost)
- specifická (př. rozlišit RBC x PLT) - součást správného a přesného měření
- porovnatelnost

Kontrolní procesy porovnávají:

- metody měření
- měřicí přístroje (samostatně otevřený i uzavřený náběrový systém pokud jsou možné odlišné aspirace vzorku)

- jednotlivé laboratoře

2.5.2 Typy zajištění kontroly kvality

2.5.2.1 Vnitřní řízení kvality - Internal Quality Control (IQC)

Vnitřní řízení kvality je soubor postupů, prováděných personálem laboratoře při stálém monitorování její činnosti tak, aby bylo možné rozhodnout, zda jsou výsledky činnosti natolik spolehlivé, aby mohly být vydány. Tento soubor postupů musí také zaručovat eliminaci příčin nedostatečné spolehlivosti (prevence chyb). Operativní vnitřní řízení kvality zahrnuje všechna stádia laboratorní činnosti v celé její šíři, tj. v preanalytické, analytické a postanalytické fázi laboratorního procesu.

Kontrola kvality se často provádí pouze ve své základní, redukované podobě jako sledování spolehlivosti analytických a jiných měření pomocí kontrolních materiálů zařazených do jednotlivých sérií měření a ustavení kalibrační funkce pomocí kalibrátorů. To pak lze nazvat vnitřní kontrolou kvality (VKK).

Správně nastavený systém řízení kvality vždy zahrnuje systém pro včasné odhalení neshody následovaný systémem pro analýzu a odstranění příčin, a zpětnou vazbu, pomocí které dojde k úpravě systému tak, aby se zamezil další výskyt podobné neshody [26].

2.5.2.2 Externí kontrola kvality - External Quality Assurance (EQA)

Externí hodnocení kvality (EHK) - je systém objektivního hodnocení laboratorních výsledků externí nezávislou organizací k tomu pověřenou. Provádí se pravidelným porovnáváním výsledků měření hodnocených klinických laboratoří a klinických jednotek navzájem a porovnáním s referenčními hodnotami měření. K vyjádření způsobilosti laboratoře se výsledky zkoušení zpracovávají statisticky a vyjadřují graficky (doporučené způsoby hodnocení EHK definuje norma ISO 13528).

Hlavním cílem EHK je:

- stanovení míry správnosti, pravdivosti, porovnatelnosti a úrovně návaznosti výsledků měření
- dosáhnout srovnatelnosti výsledků měření mezi jednotlivými pracovišti v národním, případně mezinárodním měřítku

2.5.3 Kontrolní materiál

Typy kontrolních materiálů mohou být následující:

- stabilizovaný kontrolní materiál - stabilizovaná a upravená lidská krev, pro kterou je deklarované rozmezí hodnot pro jednotlivé parametry. Tento materiál dodává externí organizace, měla by být také zajištěna návaznost na mezinárodně certifikovaný materiál typu CRM či SRM v souladu s normou ISO 17511
- čerstvě odebraný biologický materiál - zajišťuje si pracoviště samo; tam kde to je možné, nahrazuje stabilizovaný kontrolní materiál
- kontrolní materiál připravený přímo pro účely daného řízení kvality (tzv. tailor made či home made)

2.5.4 Provádění kontrol kvality

2.5.4.1 Rutinní činnosti související s kontrolou kvality

A) Validace přístroje (v souladu s normou ISO 15198)

- 1x ročně (minimálně; nutné vždy po servisním zásahu, který může měřicí systém destabilizovat)
- provádí: pověřený firemní technik
- dokumentuje se validačním protokolem, má platnost 1 rok

B) Kontrola pozadí (Background)

- minimálně 1x denně, většinou při uvedení analyzátoru do chodu nebo po určité době jeho odstavení

- sledují se hodnoty určitých měřených parametrů, které nesmí překročit limity specifické pro daný parametr a daný typ hematologického analyzátoru
- dokumentuje se zápisem do provozního deníku

C) Záznamy do provozního deníku (musí být autorizovány)

- zahájení a ukončení činnosti na měřicím přístroji
- výměna reagensů, či jiných jednorázových prostředků
- závady, opravy, zásahy servisního technika a jejich řešení

D) Kvalita diagnostik

- lze používat pouze diagnostika se značkou "CE" - marking of conformity (označení shody) splňující direktivu IVD MD (Directive 98/79/EC)
- vlastní certifikaci musí firmy dokladovat validací podle platných mezinárodních norem

2.5.4.2 Vlastní provádění kontrolních měření

SOP pro systém řízení kontroly kvality musí mít u každého typu kontrolních analýz uvedeno:

- jak často se měření provádí
- kolik měření se provádí
- s jakým kontrolním materiálem se pracuje
- co daným měřením sledujeme
- jak se výsledky hodnotí

jak se kontrolní procesy dokladují

2.5.4.3 Správnost / pravdivost

Správnost (accuracy) je těsnost souhlasu mezi jediným výsledkem měření a dohodnutou referenční hodnotou měřené veličiny. Správnost kombinuje přesnost a pravdivost, tj. vlivy náhodných a systematických faktorů. Mírou správnosti je odchylka (vychýlení, bias). Správnost v laboratoři zjišťujeme pomocí certifikovaného referenčního materiálu nebo pomocí laboratorního etalonu, jehož referenční hodnota byla získána primární metodou měření.

Pravdivost (trueness) je těsnost souhlasu mezi průměrnou hodnotou získanou z velkého počtu výsledků měření a přijatou referenční hodnotou. Pravdivý výsledek je zatížen zanedbatelnou systematickou chybou. Mírou pravdivosti (skutečnosti) je odchylka (bias). Průměrnou hodnotou je v definici myšlena střední hodnota základního souboru.

- provádí se před začátkem provozu nebo během provozu. Dle počtu vzorků 1x denně, minimálně však 2x týdně
- minimálně 1 - 2 měření od každého typu kontrolního materiálu: L(low - nízká), N (normal), H (high - vysoká)
- používá se stabilizovaný certifikovaný kontrolní materiál pro daný měřicí systém, dodává výrobce analyzátoru
- sleduje se každý analyzátor samostatně (samostatně i otevřený/uzavřený náběrový systém pokud jsou možné odlišné aspirace vzorku)
- hodnocení správnosti/pravdivosti se provádí srovnáním vlastních výsledků s deklarovánými hodnotami použitého kontrolního materiálu pro jednotlivé parametry
- dokladuje se s originálem atestu deklarováných hodnot a autorizovanými výsledky z analyzátoru s naměřenými hodnotami, hodnotami variačního koeficientu, směrodatné odchylky a průměrnými hodnotami pro jednotlivé parametry

2.5.4.4 Přesnost měření analyzátoru v sérii – opakovatelnost

Opakovatelnost (repeatability) je míra těsnosti souhlasu mezi výsledky posloupnosti nezávislých měření stejného analyzovaného vzorku provedených stejnou metodou, stejným experimentátorem, na stejném přístroji, na stejném místě, za stejných podmínek v krátkém časovém intervalu. Opakovatelnost přísluší vlastností metodě, ne výsledku.

- běžná četnost závisí na využití analyzátoru - minimálně 1x měsíčně, při běžném denním provozu 1x týdně
- měří se stejný materiál opakovaně po sobě alespoň 5x
- čerstvý vzorek s hodnotami nejlépe v rozsahu referenčního intervalu, na každý analyzátor může být použit jiný vzorek
- sleduje se každý analyzátor samostatně (i pro otevřený či uzavřený náběrový systém pokud jsou možné odlišné aspirace vzorku)
- definovaná maximální nepřesnost v sérii je daná pro každý měřený parametr a pro každý typ přístroje zvlášť v pracovní dokumentaci přístroje
- dokladuje se autorizovanými výsledky s naměřenými hodnotami, výslednými hodnotami variačního koeficientu, směrodatnou odchylkou a střední hodnotou, vždy se musí uvádět počet měření (n)

2.5.4.5 Přesnost měření analyzátoru v čase – reprodukovatelnost

Reprodukovatelnost (reproducibility) je těsnost souhlasu mezi výsledky měření stejného parametru ve vzorku/vzorcích stejného materiálu, kdy jsou jednotlivá měření prováděna za různých podmínek (experimentátor, přístroj, místo, podmínky, čas), avšak stejnou metodou.

- provádí se dle využití analyzátoru, nejlépe 2x - 3x denně
- provede se výběr 1 až 3 vzorky, které je nutné opakovaně (cca 2 - 3x) změřit během provozu, s různými rutinními sériemi vzorků pacientů, nebo po určitých časových intervalech (tyto vzorky se zařazují mezi vzorky v běžném provozu)

- pro reprodukovatelnost se vybírá čerstvý vzorek s hodnotami v mezích referenčního intervalu nebo patologickém rozmezí (časový interval mezi prvním a posledním měřením téhož vzorku by neměl být delší než je deklarovaná stabilita odebraného vzorku do EDTA, tj. cca do 5 hodin. Na každý analyzátor může být použit jiný vzorek
- sleduje se každý analyzátor samostatně (otevřený i uzavřený náběrový systém pokud jsou možné odlišné aspirace vzorku)
- variační koeficient (CV) dle doporučení WHO je pro HGB, RBC, HCT < 4%; pro MCV, MCH, MCHC < 5%; pro WBC < 10% a pro PLT < 15%, ale laboratoř si může toto rozmezí mírně upravit dle vlastních zkušeností
- dokladuje se autorizovanými výsledky s naměřenými hodnotami a výslednými variačními koeficienty

2.5.4.6 Porovnatelnost různých metod měření a různých hemat. analyzátorů

Porovnatelnost (comparability) je vhodnost procesů nebo metod k současnému užití, tj. schopnost plnit za specifických podmínek dané požadavky bez vzniku nežádoucích interakcí. Obvykle se porovnatelností myslí schopnost různých měřících metod a systémů poskytovat dostatečně porovnatelné výsledky měření.

- dle využití přístroje, cca 1x denně
- provede se 1x měření danou metodou nebo na daném analyzátoru, se všemi třemi typy (L, N, H) kontrolních vzorků
- vybírá se pokud možno čerstvý biologický vzorek - je vhodné vybrat dle možností současně 3 vzorky (1x L, 1x N a 1x H) a ty použít pro všechny hematologické analyzátory (případně otevřený i uzavřený způsob analýzy)
- porovnávají a hodnotí se měření mezi všemi typy analyzátorů a mezi všemi typy měření pro daný parametr a daný typ (L, N, H) vzorku v dané laboratoři
- variační koeficient dle doporučení WHO je pro HGB, RBC, HCT < 4%; pro MCV, MCH, MCHC < 5%; pro WBC < 10% a pro PLT < 15%, ale laboratoř si může toto rozmezí mírně upravit dle vlastních zkušeností

- dokladuje se autorizovanými výsledky naměřenými hodnotami a výslednými variačními koeficienty

2.5.4.7 X-B analýza jednotlivých analyzátorů (klouzavý průměr)

- X-B analýza je automatické kontinuální zpracovávání změřených hodnot, má-li analyzátor odpovídající softwarové vybavení
- analýza se provádí ze všech vzorků změřených na analyzátoru
- provádí se nezávisle, přístroj zahrne do vyhodnocení veškerá provedená měření
- sleduje se každý analyzátor samostatně. X-B analýza sleduje stabilní parametry: MCV, MCH, MCHC
- analyzátor automaticky vypočítává průměrnou hodnotu ze souboru 20 vzorků pro každý parametr a výsledky zaznamenává do Levey - Jenningsových grafů. Výsledky se sledují pomocí Westgardových pravidel a vyhodnocuje se důvod jejich porušení. Odchylka měření by neměla být větší než 2SD nebo $\pm 3\%$ od průměrné hodnoty. Sleduje se průběžně systémová chyba přístroje (trvale rostoucí či klesající trend některého parametru) 1 - 2x měsíčně nebo týdně dle počtu měřených vzorků)
- dokladuje se autorizovanými výsledky z analyzátoru

2.5.4.8 Porovnatelnost mezi klinickými laboratořemi – EHK

- provádí se dle využití přístroje, nejméně 2x ročně, optimálně 4x
- měří se stejně jako vzorky pacientů (k vyhodnocení je nutno zaslat výsledky z prvního měření kontrolního vzorku, ne průměr z několika měření!)
- používá se dodaný stabilizovaný materiál
- pokud je v laboratoři více přístrojů, pak si laboratoř musí určit referenční analyzátor, na kterém kontrolní měření provede - výsledek slouží pro srovnání výsledků analyzátorů dané laboratoře s analyzátory v jiných laboratořích
- každý organizátor EHK dodává vlastní vyhodnocení
- dokladuje se autorizovanými výsledky z analyzátoru a vyhodnocením organizátora EHK, případně certifikátem

2.5.5 Kontrolní měření po změnách na analyzátoru

Toto měření se provádí v těchto případech:

- po změně kalibračních faktorů (správnost)
- po změně šarží dílčích diagnostik (opakovatelnost)
- po údržbě přístroje a technickém zásahu do systému (pokud ovlivňuje měření)

Použití vzorků ke kontrole měření:

- správnost či pravdivost se kontroluje měřením certifikovaného kontrolního materiálu
- ostatní kontrolní měření se provádějí na čerstvých vzorcích

Hodnocení:

- výsledky je nutné porovnat s výsledky změřenými na stejném analyzátoru před zásahem nebo na jiném analyzátoru
- počet a typ kontrolních měření je nutné zvážit dle závažnosti příslušného zásahu
- hodnocení výsledků je vždy nutné dokladovat autorizovanými výsledky příslušných měření

2.5.6 Hodnocení kontrolních měření

Aby výsledky kontrolních měření mohly plně sloužit svému účelu, tj. kontrole kvality, je nutné jejich výsledky a trendy pravidelně vyhodnocovat a závěry využívat k odstraňování poruch a ke zlepšování každodenní práce. K rutinnímu vyhodnocení patří minimálně sledování:

- variačních koeficientů a směrodatných odchylek u měřených parametrů (nemusí být vždy vyhodnocované počítané parametry)

- vyhodnocování lze provádět buďto pomocí jednoduchých statistických programů nebo pomocí Westgardových pravidel
- hematologické analyzátoři mají dnes již zabudované vlastní programy pro statistické vyhodnocování výsledků VKK s výstupem na Levey - Jenningsovy grafy
- nejkratší analytická série se skládá z jednoho vzorku, nejdelší analytickou sérií je jedna pracovní směna, pokud je při ní garantována stabilita analytického měřicího systému.

2.5.6.1 Možné typy chyb

Při vyhodnocování je nutno rozlišovat systematické a nahodilé chyby (vychází se z Westgardových pravidel) [25]:

- jeden výsledek je mimo 2 SD, jedná se o nahodilou chybu nebo varující signál pro systémovou chybu
- jeden výsledek je mimo 3 SD, jedná se o závažnou nahodilou chybu nebo varující signál pro systémovou chybu
- dva výsledky po sobě jsou mimo 2 SD, jedná se o systémovou chybu, musí se neprodleně odstranit příčiny
- tři výsledky po sobě jsou mimo 1 SD, jedná se o systémovou chybu, musí se neprodleně odstranit příčiny
- více výsledků po sobě je na jedné straně od střední hodnoty, jedná se o varující signál pro systémovou chybu
- rozdíl mezi dvěma po sobě následujícími výsledky je větší než 4 SD (např. od +2 SD do -2 SD), jedná se o varující signál

Pokud získáváme neuspokojivé výsledky měření:

- je nutné měření opakovat se stejným vzorkem

- jestliže chybné výsledky přetrvávají, provést měření s jiným kontrolním materiálem
- při opakovaně stejných chybných výsledcích je nutné zvážit technickou nebo přístrojovou chybu

2.5.6.2 Možné příčiny chyb

Ke správnému hodnocení je nezbytné znát všechna hlediska, která stanovení mohou ovlivnit (technické závady přístroje, špatné odběry, záměny vzorků, stav samotného vzorku, klinické aspekty, chyby mimo laboratoř, atd.), aby se včas mohlo reagovat na nesprávný výstup z hodnocení kontrolních procesů [26].

Příklady možných chyb v laboratoři:

- nesprávné skladování vzorků (případně i reagensů)
- nesprávné promíchání vzorku
- nesprávný náběh vzorku analyzátozem, narušení vakua
- nesprávné ředění vzorku
- změny objemových relací používaných roztoků a vyšetřovaného materiálu v počítačové jednotce analyzátozem
- závady při vypouštění roztoků z měřících jednotek analyzátozem
- elektrické interference nebo kolísání napětí uvnitř přístroje
- kontaminace externím šumem z okolních elektrických zařízení (např. interference magnetických a elektrických polí)
- ucpaní měřící apertury
- kontaminace používaných roztoků (vysoké pozadí)
- vzduchové bublinky z prudkého míchání nebo vznikající v apertuře
- posunutí mezí nebo elektrická chyba při rozdělování a zařazování buněk
- zbytky disentu nebo čistícího roztoku, které mohou způsobit hemolýzu

Možné příčiny chyb ze strany měřeného vzorku:

- nesprávný odběr (včetně špatné odběrové zkumavky)
- chylózní a/nebo hemolytický vzorek; ovlivnění měřeného vzorku léčbou
- vzorek starší než doporučená doba stability měřeného biologického materiálu (obecně pro KO > 5 hodin)
- vysoký obsah nebuněčných elementů (rozbité buňky)
- jinak kontaminovaný vzorek

3. Praktická část

3.1. Definice kontrolních souborů

3.1.1. Kontrolní materiály s přesně definovanou hodnotou

Stabilizovaná plná krev dodávaná firmou ke konkrétnímu přístroji s uvedenými hodnotami jednotlivých parametrů krve. Jsou dodávány tři hladiny. Normální kontrolní krev (N) obsahuje fyziologické množství jednotlivých stanovovaných elementů, patologická (L) obsahuje patologicky snížené množství jednotlivých stanovovaných elementů a patologická (H) obsahuje patologicky zvýšené množství jednotlivých stanovovaných elementů. Pro naše měření byly zahrnuty kontrolní materiály pro každý jednotlivý analyzátor a stanovovány všechny tři hladiny.

3.1.2. Kontrolní materiály bez definované hodnoty

Vzorky patientské plné krve odebrané do protisrážlivého činidla volené tak, aby vybrané 3 – 4 vzorky pro jednu sérii měření obsahovaly rozdílné hladiny jednotlivých parametrů krve. Normální vzorek obsahuje fyziologické množství jednotlivých stanovovaných elementů, patologický nízký obsahuje patologicky snížené množství jednotlivých stanovovaných elementů a patologický vysoký obsahuje patologicky zvýšené množství jednotlivých stanovovaných elementů. Pro naše měření byly zahrnuty

3 – 4 vzorky v každé sérii měření pro každý jednotlivý analyzátor a stanovovány všechny tři hladiny.

3.2. Odběr a zpracování vzorků

Vzorkem je plná periferní krev odebraná do zkumavky obsahující K3EDTA, K2EDTA.

Stabilita vzorku plné krve při 5 – 25°C je 30 min. až 5 hod. po odběru. Vzorek z chladničky musí být před vyšetřením vytemperován na pokojovou teplotu (nižší teplota vzorku může způsobit zvětšení objemu erytrocytů a trombocytů MCV, MPV, RDW).

Označená zkumavka se vzorkem se vkládá do podavače a je automaticky změřena v analyzátoru.

3.3 Analyzátoři

3.3.1. Parametry KO stanovované na všech analyzátořích

Tabulka č. 2: Měřené parametry na automatických analyzátořích

Zkratka	Ukazatel	Rožměř
WBC	Leukocyty	$10^9 / l$
RBC	Erytrocyty	$10^{12} / l$
HGB	Hemoglobin	g / l
HCT	Hematokrit	l
MCV	Střední objem erytrocytů	fl
MCH	Barvivo erytrocytů	pg
MCHC	Střední barevná koncentrace	g / l
RDW	Distribuční křivka erytrocytů	% CV
PLT	Trombocyty	$10^9 / l$
MPV	Střední objem trombocytu	fl

Zkratka	Ukazatel	Rozměr
PCT	Hematokrit trombocytů	l
PDW	Distribuční křivka trombocytů	fl,%
NE	Neutrofily	Relat. %, abs. $10^9 / l$
LY	Lymfocyty	Relat. %, abs. $10^9 / l$
MO	Monocyty	Relat. %, abs. $10^9 / l$
EO	Eozinofily	Relat. %, abs. $10^9 / l$
BA	Bazofily	Relat. %, abs. $10^9 / l$

3.3.2. Analyzátor LH 755, LH 750, DxH 800 I, DxH 800 II

Analyzátory pracují na principu Coulterovy metody, kde se přesně počítá a určuje velikost buněk zjišťováním a měřením změn v elektrickém odporu, když částice (jako například buňka) ve vodivé tekutině prochází malou aperturou [18], [19], [20].

Počítání částic (WBC, RBC, PLT) impedanční metodou je postup, který kombinuje počítání částic a určování jiných vlastností (objem buněk a podobně). Metoda měří počet částic na základě změny vodivosti prostředí při průchodu buňky mezi elektrodami. Vzorek je pro měření naředěn elektricky vodivým diluentem. Počet buněk je měřen ve velmi přesném malém množství ředěného vzorku. Na základě údajů o počtu buněk, počítaném objemu vzorku a ředění je vypočten výsledek, který lze vydat například jako početní koncentraci. Podle amplitudy signálu lze odvozovat velikost buněk, výsledek lze vydat například jako entický objem.

WBC se stanovuje po hemolýze erytrocytů, kdy zůstávají buňky s jádry, které prochází přes aperturu, kde jsou umístěny elektrody. Každá prošlá buňka s jádrem znamená jeden impedanční impuls, velikost impulsu udává velikost buněk. Je použita jiná měřicí lázeň a apertura a jiný obvod.

Průměrný objem jednotlivých erytrocytů (MCV) je odvozen z histogramu RBC.

System vynásobí počet RBC v každém z kanálů velikosti RBC v tomto kanálu. Výsledky každého kanálu mezi 36 a 360 femtolitry (fl) se sečtou. Tento součet se vydělí celkovým počtem RBC mezi 36 a 360 fl. Analyzátor potom vynásobí tuto hodnotu kalibračním faktorem.

Hemoglobin se stanovuje fotometricky – vzorek se naředí, zhemolyzuje a koncentrace uvolněného hemoglobinu se určí spektrofotometricky (absorbance při vlnové délce 525 nm)

Pro diferenciální rozpočet leukocytů se využívá fotooptické stanovení - laserový paprsek (laser). Při použití v hematologických analyzátoch proud buněk vystavených laserovému paprsku propouští a částečně lomí nebo polarizuje jeho světlo. Rozptyl světla je detekován čidly a z kombinace údajů čidel je stanoven druh buňky. Úhel a intenzita rozptýleného světla závisí na objemu a vlastnostech buňky.

VCS (analýza částic v trojrozměrném prostoru tří, na sobě vzájemně nezávislých fyzikálních veličin = stejnosměrná vodivost, vysokofrekvenční elektromagnetické pole a modifikovaná laserová průtoková cytometrie) z cca. 10 000 leukocytů v nativním stavu

3.3.3 Sysmex XE-5000

Počítání částic (WBC, NBC, RTC) probíhá v optickém bloku na bázi průtokové cytometrie s použitím polovodičového laseru. V systému dochází k nasátí naředěných krevních buněk, které jsou v měřicí části optického systému vystaveny úzkému paprsku světla [21], [22].

U stanovení RBC a PLT se využívá fluorescenční cytometrie s pomocí metody hydrodynamické fokusace. Ředěná buněčná suspenze v izotonickém roztoku vstupuje velmi tenkou tryskou do středu širší měřicí kyvety, po jejímž obvodu zároveň protéká vyšší rychlostí vodící kapalina. Vzhledem k různým rychlostem a speciálnímu tvarování měřicí kyvety nedochází díky laminárnímu toku k vzájemnému promíchávání obou

kapalin a buňky jsou usměrněny jedna za druhou. Buňky v tenkém proudu prostupují průtokovou komůrkou a v ní jsou jednotlivě analyzovány.

Hemoglobin se měří spektrofotometricky metodou SLS (sodium lauryl sulfate) při 540 nm.

Do rozpuštěné krve se přidá lyzační roztok, který rozbije buněčné stěny červených krvinek a uvolní hemoglobin. Uvolněný hemoglobin reaguje s roztokem SLS a vytvoří se barevně stálý hemoglobinový komplex, který má absorpční maximum při 540 nm. Naměřené absorpční maximum je přímo úměrné koncentraci hemoglobinu.

3.3.4 Celltac E , Celltac F

Pro počítání buněk používá přístroj metodu volumetrické impedance.

V této metodě se skrz aperturu nasaje elektrolytický roztok (diluent) obsahující suspendované krevní buňky. Poblíž apertury se nacházejí dvě elektrody, vnitřní a vnější, a mezi nimi prochází konstantní tok. Když skrz aperturu projde krevní buňka, tak odpor mezi elektrodami na malou chvíli vzroste a objeví se velmi malá změna napětí, která odpovídá odporu. Napěťový signál se zesílí a pošle do elektronických obvodů. Počet signálů pro každou velikost buňky se uloží do paměti jako histogram [23], [24].

Signály způsobené elektrickým šumem, prachem, drtí a částicemi, které jsou menší nebo větší než krevní buňky, odfiltruje prahovací obvod.

Základní parametry WBC, RBC, MCV, PLT, MPV jsou měřeny impedanční metodou. Běžná krev má jasně oddělené rozsahy objemů PLT a RBC , takže lze snadno získat přesné počty PLT. Když se počítá abnormální krev, jako je například mikrocytická krev, tak není oddělení zřetelné. V takových případech pro přesné

počítání PLT určí CPU vzorové rozložení PLT a RBC a nastaví horní práh (PLT HI) na nejnižší počet.

Hemoglobin se měří fotometricky a 5-ti populační diferenciální rozpočet leukocytů funguje na principu průtokové cytometrie - laser, rozptyl laserového světla na buňce a snímání třemi optickými detektory v prostoru. Další parametry jsou vypočtené (MCH, MCHC, HCT, PCT) nebo zjišťovány z histogramů (RDW, PDW). Při určování destiček je využíván tzv. pohyblivý práh, tedy hranice mezi PLT a RBC se mění vzorek od vzorku zjišťováním minima histogram

3.4. Reagencie

Reagencie (potřebné na stanovení KO na jednotlivých analyzátoch) jsou připraveny výrobcem přímo k použití.

Analyzátor:

LH 755, LH 750	LH 700 Series Diluent LH Series Pak Clenz Cleaning Agent LYSE-S III
DxH	COULTER® DxH™ Diluent, COULTER® DxH™ Diff Pack Buněčná lýza COULTER® DxH COULTER® DxH™ Cleaner COULTERT®T 6C Cell Control
Celltac E, F	ISODIL 3 NK

CLEAN 5 NK
HEMOLYSE 3 NK

CLEAN 3 NK
HEMOLYSE 5 NK

Sysmex XE 5000

Sulfolyser
Stromatolyser NR(L)
Stromatolyser 4DL
Stromatolyser FB
Cellpack
Cellsheath
SP Rinse

Stromatolyser NR(S)
Stromatolyser 4DS
Stromatolyser IM
Cellclean
Research
SPslides76x26mm

3.5. Zpracování naměřených dat

3.5.1. Vyhodnocení měření kontrol s definovanou hodnotou

DxH 800 I.

Tabulka č. 3: Definovaná hodnota pro DxH 800 I

Parametr	Definováno výrobcem			Stanoveno analyzátořem L,N,H								
	L	Průměr N	H	x _p	2SD	CV % L	x _p	2SD	CV % N	x _p	2SD	CV % H
WBC	3,40± 0,40	9,2± 0,70	20,20±1,10	3,57	0,15	2,04	9,24	0,34	1,86	20,94	0,55	1,31
RBC	1,810± 0,080	5,210±0,180	4,100±0,120	1,844	0,03	0,91	5,312	0,07	0,64	4,154	0,09	1,05
HGB	5,10± 0,30	16,0 ±0,6	12,90 ±0,41	5,01	0,07	0,74	15,91	0,23	0,72	12,94	0,22	0,86
HCT	14,40± 1,50	46,20 ±2,70	36,70±1,90	14,4	0,28	0,98	46,73	0,9	0,96	36,77	1,09	1,48
MCV	79,4± 40	88,70 ± 4,0	89,60±4,00	78,06	1,11	0,71	87,96	1,02	0,58	88,51	1,33	0,75
MCH	28,2± 2,20	30,7 ± 1,60	31,5 ±1,50	27,15	0,76	1,40	29,95	0,53	0,89	31,15	0,64	1,02
MCHC	354± 45	346,0 ± 27,0	351,0±22,0	347,8	1,04	1,49	34,05	0,77	1,13	351,9	0,89	1,27
PLT	66± 15,0	209 ± 25,0	417,0±40,0	76,5	3,44	2,25	231,9	6,75	1,46	15,36	0,76	2,49

šarže : L 860800 n=38

N 880600 n=36

H 870200 n=33

DxH 800 II.

Tabulka č. 4: Definovaná hodnota pro DxH 800 II

Parametr	Definováno výrobcem			Stanoveno analyzátořem L,N,H								
	L	Průměr N	H	x _p	2SD	CV % L	x _p	2SD	CV % N	x _p	2SD	CV % H
WBC	3,7±0,4	9,2±0,7	20,2±1,1	3,77	0,13	1,78	9,41	0,36	1,93	20,85	0,31	0,74
RBC	1,82±0,08	5,27±0,18	4,09±0,12	1,857	0,02	0,63	5,231	0,16	1,57	4,121	0,05	0,64
HGB	5,1±0,3	16,1±0,6	13,0±0,4	5,28	0,17	1,57	16,07	0,44	1,38	13,14	0,27	1,03
HCT	14,5±1,5	47,4±2,7	37,1±1,9	14,75	0,20	0,69	46,61	1,50	1,61	37,17	0,56	0,75
MCV	79,7±4,0	90±4,0	90,7±4,0	79,45	1,52	0,95	89,10	1,53	0,86	90,2	1,33	0,74
MCH	28,0±2,2	30,6±1,6	31,8±1,5	28,42	0,9	1,58	30,71	0,54	0,88	31,89	0,52	0,82
MCHC	352±45	340±27	350±22	357,7	1,13	1,58	34,47	0,7	1,02	35,36	0,63	0,89
PLT	71±15	216±25	423±40	81	2,90	1,79	15,09	0,49	1,63	469	17,14	1,82

šarže : L 860800 n=38

N 880600 n=36

H 870200 n=33

LH 755.

Tabulka č. 5: Definovaná hodnota pro LH 755

Parametr	Definováno výrobcem			Stanoveno analyzátořem L,N,H								
	L	Průměr N	H	x _p	2SD	CV % L	x _p	2SD	CV % N	x _p	2SD	CV % H
WBC	3,7±0,4	9,2±0,7	20,2±1,1	3,72	0,24	3,22	9,13	0,36	1,96	20,11	0,82	2,04
RBC	1,82±0,08	5,27±0,18	4,09±0,12	1,827	0,07	1,79	5,241	0,18	1,71	4,105	0,06	0,71
HGB	5,1±0,3	16,1±0,6	13,0±0,4	5,09	0,22	2,16	15,87	0,46	1,44	12,93	0,13	0,50
HCT	14,5±1,5	47,4±2,7	37,1±1,9	14,3	0,58	2,04	45,96	1,56	1,69	36,45	0,72	0,99
MCV	79,7±4,0	90±4,0	90,7±4,0	78,3	1,65	1,05	87,7	1,43	0,82	88,79	1,61	0,91
MCH	28,0±2,2	30,6±1,6	31,8±1,5	27,87	0,87	1,55	30,29	0,45	0,74	31,50	0,51	0,8
MCHC	352±45	340±27	350±22	355,9	0,95	1,33	34,54	0,61	0,88	35,48	0,83	1,17
PLT	71±15	216±25	423±40	80,8	2,86	1,77	239,3	11,28	2,36	474,7	16,34	1,72

šarže : L 860800 n=38
 N 880600 n=36
 H 870200 n=33

LH 750 FP

Tabulka č. 6: Definovaná hodnota pro LH 750 FP

Parametr	Definováno výrobcem			Stanoveno analyzátořem L,N,H								
	Průměr L,N,H			x _p	2SD	CV % L	x _p	2SD	CV % N	x _p	2SD	CV % H
WBC	3,7±0,4	9,2±0,7	20,2±1,1	3,8	0,21	2,71	9,3	0,27	1,47	21,1	0,4	0,95
RBC	1,82±0,08	5,27±0,18	4,09±0,12	1,84	0,02	0,66	5,21	0,14	1,33	4,1	0,06	0,71
HGB	5,1±0,3	16,1±0,6	13,0±0,4	5,2	0,17	1,67	15,9	0,44	1,40	12,9	0,19	0,72
HCT	14,5±1,5	47,4±2,7	37,1±1,9	14,3	0,32	1,13	45,4	1,48	1,63	36,2	0,85	1,17
MCV	79,7±4,0	90±4,0	90,7±4,0	77,6	1,77	1,14	87,1	1,91	1,10	88,2	1,96	1,11
MCH	28,0±2,2	30,6±1,6	31,8±1,5	28,0	0,95	1,70	30,4	0,51	0,84	31,5	0,74	1,17
MCHC	352±45	340±27	350±22	361	1,26	1,75	349	0,72	1,03	358	1,01	1,41
PLT	71±15	216±25	423±40	82	3,58	2,18	239	12,02	2,51	480	13,9	1,45

šarže : L 860800 n=32
 N 880600 n=33
 H 870200 n=33

Sysmex XE 5000

Tabulka č. 7: Definovaná hodnota pro Sysmex XE 5000

Parametr	Definováno výrobcem			Stanoveno analyzátořem L,N,H								
	L	Průměr N	H	x _p	2SD	CV % L	x _p	2SD	CV % N	x _p	2SD	CV % H
WBC	2,81±10%	6,27±8%	17,52±7%	2,893	0,134	2,32	6,415	0,626	4,88	18,16	0,404	1,11
RBC	2,31±5%	4,39±5%	5,24±5%	2,313	0,036	0,80	4,351	0,052	0,61	5,203	0,088	0,85
HGB	58±4%	124±3%	160±5%	59,05	0,446	0,37	126,1	1,562	0,61	161,5	2,040	0,63
HCT	17,7±6%	36,4±5%	46,2±5%	17,7	0,1	2,00	36,0	0,6	0,83	45,7	0,6	0,74
MCV	76,6±5%	82,9±4%	88,2±4%	76,57	0,754	0,49	82,84	1,098	0,65	87,96	1,002	0,62
MCH	25,1±5%	28,2±5%	30,5±5%	25,53	0,434	0,85	29,52	4,36	7,38	30,66	3,42	5,57
MCHC	328±6%	34,1±5%	346±5%	333,4	6,134	0,92	356,2	52,39	7,63	348,6	38	2,28
PLT	58±40%	208±11%	482±9%	59,8	5,528	4,62	207,4	8,124	1,95	476,7	26,43	2,77

šarže : L93250810 n=20
 N93260811 n=18
 H93240812 n=19

Celltac F

Tabulka č. 8: Definovaná hodnota pro Celltac F

Parametr	Definováno výrobcem			Stanoveno analyzátořem L,N,H								
	L,	Průměr N	H	x _p	2SD	CV % L	x _p	2SD	CV % N	x _p	2SD	CV % H
WBC	2,1±0,6	8,2±0,8	25,6±2,2	2,165	0,096	2,227	8,41	0,229	1,362	26,52	0,685	1,291
RBC	2,58±0,15	4,66±0,20	5,6±0,25	2,49	0,246	4,945	4,67	0,041	0,440	5,58	0,137	1,225
HGB	70±4,0	143±5	184±7	70,54	1,637	1,160	143	3,205	1,114	184,2	4,468	1,213
HCT	21,1± 2,0	41,1± 2,5	54,3± 3	21,23	0,809	1,905	40,78	1,182	1,449	53,54	1,334	1,244
MCV	81,8±4,0	88,2±4	97±4,0	81,45	1,011	0,620	87,32	0,879	0,503	95,99	0,925	0,482
MCH	27,1±2,4	30,7±2,8	32,9±2,8	27,01	0,618	1,143	30,78	0,658	1,069	33,10	0,718	1,085
MCHC	332±30	348±30	339±30	331,7	9,465	1,427	352,5	9,897	1,404	344	8,39	1,291
PLT	49± 30	271± 50	617± 70	68,21	21,01	15,40	259	38,48	7,417	599	33,1	2,763

Šarže: MEK- 5DN LOT 911 n = 43
 MEK- 5DH n = 33
 MEK- 5DL n = 43

Celltac E

Tabulka č. 9: Definovaná hodnota pro Celltac E

Parametr	Definováno výrobcem			Stanoveno analyzátořem L,N,H								
	L	Průměr N	H	x _p	2SD	CV % L	x _p	2SD	CV % N	x _p	2SD	CV % H
WBC	2,1±0,6	8,3± 0,8	26,2±2,2	2,08	0,137	3,292	8,44	0,525	3,110	26,97	1,231	2,282
RBC	2,58±0,15	4,67± 0,2	5,61±0,25	2,44	0,083	1,693	4,196	0,188	2,008	5,57	0,260	2,338
HGB	70±4	143± 5	184±7	60,75	2,477	2,038	145,2	5,222	1,798	188,9	7,020	1,857
HCT	21,1±2	41,7±2,5	54,4±3	19,36	0,6	1,469	42,3	1,18	2,174	54,6	0,031	2,828
MCV	84,1±4	89,3±4	97±4	79,53	1,086	0,683	90,06	1,063	0,590	98,01	2,474	1,262
MCH	27,1±2,4	30,6±2,8	32,8±2,8	24,82	0,665	1,339	30,9	0,793	1,283	33,92	1,044	1,538
MCHC	323±30	343±30	338±30	312,1	6,678	1,070	343,3	10,8	1,573	345,8	9,88	1,428
PLT	59±30	286±50	617±70	94,57	16,47	8,707	283,9	67,03	7,87	619,6	40,58	3,275

Šarže: MEK- 5DN LOT 911 n = 31
 MEK- 5DH n = 28
 MEK- 5DL n = 14

3.5.2. Vyhodnocení měření kontrol nativní krve bez udané hodnoty

U měřených vzorků byla hodnocena přesnost v sérii (opakovatelnost)

DxH 800 I.

Tabulka č. 10: neznámá hodnota pro DxH 800I

Parametr	Doporučené hodnoty CV %	Stanoveno analyzátořem L,N,H								
		x _p	2SD	CV %	x _p	2SD	CV %	x _p	2SD	CV %
WBC	≤ 2,5 %	4,14	0,12	1,42	7,48	0,184	1,229	12,36	0,18	0,73
RBC	≤ 0,8 %	4,886	0,019	0,193	4,643	0,045	0,487	3,329	0,034	0,511
HGB	≤ 0,8 %	109,7	1,2	0,55	143,7	2,319	0,807	113,4	1,3	0,59
MCV	≤ 0,8 %	70,35	0,75	0,53	91,78	1,429	0,779	102,0	0,69	0,34
PLT	≤ 3,2 %	136,2	16,5	6,1	272,1	13,248	2,434	404,2	14,2	1,8

Měřeno : L 22.2.2012 patientský vzorek n = 8
 N 22.2.2012 patientský vzorek n = 8
 H 22.2.2012 patientský vzorek n = 8

DxH 800 II.

Tabulka č. 11: neznámá hodnota pro DxH 800 II

Parametr	Stanoveno analyzátořem L,N,H									
	Doporučené hodnoty CV %	x _p	2SD	CV % L	x _p	2SD	CV % N	x _p	2SD	CV % H
WBC	≤ 2,5 %	4,88	0,11	1,16	9,24	0,09	0,47	13,21	0,20	0,74
RBC	≤ 0,8 %	3,160	0,026	0,409	5,201	0,029	0,278	3,668	0,016	0,219
HGB	≤ 0,8 %	124,9	1,8	0,71	158,9	0,18	0,57	117,7	0,07	0,32
MCV	≤ 0,8 %	114,41	0,62	0,27	89,31	0,46	0,26	93,72	0,42	0,23
PLT	≤ 3,2 %	360,3	17,4	2,4	217,4	7,9	1,8	199,7	8,6	2,2

Měřeno : L 23.10.2011 pacientský vzorek n = 9
 N 2.11.2011 firemní materiál n=10
 H 21.1.2012 pacientský vzorek n = 7

LH 755

Tabulka č. 12: neznámá hodnota pro LH 755

Parametr	Stanoveno analyzátořem L,N,H									
	Doporučené hodnoty CV %	x _p	2SD	CV % L	x _p	2SD	CV % N	x _p	2SD	CV % H
WBC	≤ 2,5 %	3,45	0,11	1,55	8,71	0,08	0,44	20,42	0,28	0,7
RBC	≤ 0,8 %	1,785	0,022	0,612	5,33	0,058	0,541	4,134	0,025	0,299
HGB	≤ 0,8 %	4,98	0,14	1,44	160,2	0,14	0,45	129,6	0,16	0,63
MCV	≤ 0,8 %	79,15	0,25	0,16	87,02	0,43	0,25	87,82	0,57	0,33
PLT	≤ 3,2 %	16,65	0,38	1,15	242,0	9,8	2,0	422,4	16,2	1,9

Měřeno : L 3.3.2012 firemní kontrola n = 10
 N 20.1.2012 pacientský vzorek n = 10
 H 3.3.2012 firemní kontrola n = 10

LH 750 FP

Tabulka č. 13: neznámá hodnota pro LH 750 FP

Parametr	Stanoveno analyzátořem L,N,H									
	Doporučené hodnoty CV %	x _p	2SD	CV % L	x _p	2SD	CV % N	x _p	2SD	CV % H
WBC	≤ 2,5 %	2,23	0,06	1,35	8,45	0,29	1,69	12,04	0,14	0,56
RBC	≤ 0,8 %	2,582	0,020	0,385	5,105	0,019	0,190	3,748	0,029	0,383
HGB	≤ 0,8 %	8,68	0,09	0,52	14,95	0,2	0,66	13,41	0,2	0,74
MCV	≤ 0,8 %	94,57	0,64	0,34	85,64	0,75	0,44	105,87	0,75	0,35
PLT	≤ 3,2 %	18,82	0,76	2,03	13,41	0,37	1,38	514	16,7	1,6

Měřeno : L 23.2.2012 patientský vzorek n = 5
 N 23.2..2012 patientský vzorek n = 7
 H 23.2.2012 patientský vzorek n = 6

Sysmex XE 5000

Tabulka č. 14: neznámá hodnota pro Sysmex XE 5000

Parametr	Stanoveno analyzátořem L,N,H									
	Doporučené hodnoty CV %	x _p	2SD	CV % L	x _p	2SD	CV % N	x _p	2SD	CV % H
WBC	≤ 2,5 %	2,33	0,166	3,557	6,808	0,294	2,160	12,72	0,156	0,590
RBC	≤ 0,8 %	4,17	0,051	0,612	5,325	0,058	0,548	5,62	0,33	0,291
HGB	≤ 0,8 %	126,7	1,414	0,558	166,1	1,476	0,444	169	1,886	0,558
MCV	≤ 0,8 %	90,144	0,996	0,552	90,91	1,227	0,675	85,45	0,368	0,215
PLT	≤ 3,2 %	152,11	6,815	2,240	202,7	11,157	2,753	272,8	10,362	1,899

Měřeno : L 26.2.2012 patientský vzorek n=9
 N 26.2.2012 patientský vzorek n=9
 H 26.2.2012 patientský vzorek n=10

Celltac E

Tabulka č. 15: neznámá hodnota pro Celltac E

Parametr	Doporučené hodnoty CV %	Stanoveno analyzátořem L,N,H								
		x _p	2SD	CV % L	x _p	2SD	CV % N	x _p	2SD	CV % H
WBC	≤ 2%	2,68	0,158	2,943	7,48	0,184	1,229	11,83	0,389	1,645
RBC	≤ 1,5 %	4,173	0,178	2,129	4,643	0,045	0,487	5,14	0,199	1,937
HGB	≤ 1,5 %	134,3	3,77	1,406	143,7	2,319	0,807	163,1	5,453	1,672
MCV	≤ 1 %	92,41	0,866	0,469	42,61	0,935	1,098	88,69	0,935	0,527
PLT	≤ 4 %	98,1	7,8	3,976	272,1	13,248	2,434	22,8	14,167	3,179

Měřeno : L 23.12.2011 patientský vzorek n = 10
 N 23.12.2011 patientský vzorek n = 10
 H 22.12.2011 patientský vzorek n = 10

Celltac F

Tabulka č. 16: neznámá hodnota pro Celltac F

Parametr	Doporučené hodnoty CV %	Stanoveno analyzátořem L,N,H								
		x _p	2SD	CV % L	x _p	2SD	CV % N	x _p	2SD	CV % H
WBC	≤ 2%	3,77	0,135	1,790	10,14	0,235	1,158	20,5	0,340	0,829
RBC	≤ 1,5 %	2,639	0,144	2,729	4,152	0,144	1,740	5,227	0,152	1,457
HGB	≤ 1,5 %	72,7	3,134	2,155	134,4	1,398	0,520	178,5	2,160	0,605
MCV	≤ 1 %	85,92	0,497	0,289	95,68	0,540	0,282	99,31	0,33	0,167
PLT	≤ 4 %	54,9	7,510	6,84	231,2	13,53	2,925	498,4	26,046	2,613

Měřeno : L 23.2.2012 patientský vzorek n = 10
 N 23.2.2012 patientský vzorek n = 10
 H 22.2.2012 patientský vzorek n = 10

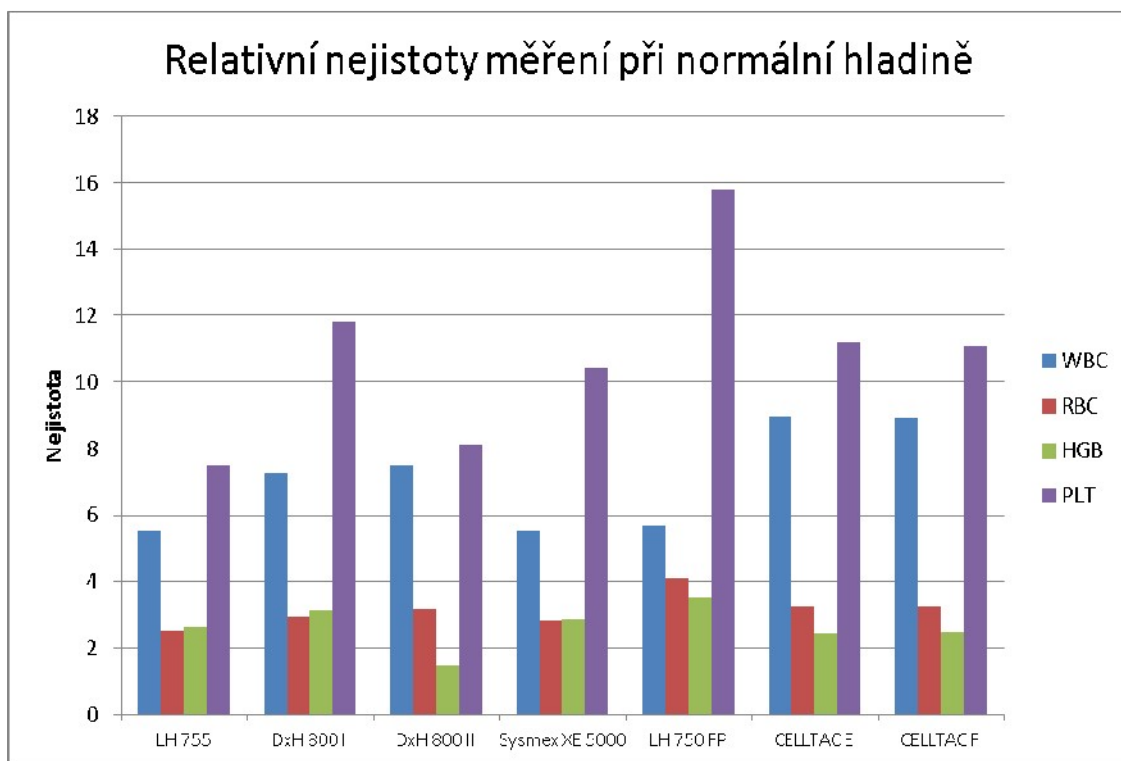
3.5.3. Relativní nejistoty měření při normální hladině

2012		WBC	RBC	HGB	PLT
LH 755	%	5,559	2,525	2,638	7,474
DxH 800 I	%	7,274	2,959	3,139	11,811
DxH 800 II	%	7,491	3,192	1,496	8,124
Sysmex XE 5000	%	5,526	2,801	2,841	10,41
LH 750 FP	%	5,668	4,102	3,52	15,8
CELLTAC E	%	8,95	3,233	2,463	11,22
CELLTAC F	%	8,9	3,241	2,501	11,09

3.5.4. Absolutní nejistoty měření při normální hladině

2012	WBC	RBC	HGB	PLT
LH 755	0,517 /9,58	0,111 /4,4	3,483 /132	17,114 /229
DxH 800 I	0,633 /8,7	0,127 /4,285	4,050 /129	29,764 /252
DxH 800 II	0,631 /8,42	0,135 /4,230	1,945 /130	17,547 /216,0
Sysmex XE 5000	0,481 /8,7	0,124 /4,410	3,694 /130	22,695 /218
LH 750 FP	0,504 /8,9	0,177 /4,310	4,505 /128	35,106 /222
CELLTAC E	0,740 /8,3	0,139 /4,3	3,153 /128	27,499 /245
CELLTAC F	0,738 /8,3	0,141 /4,3	3,151 /128	27,512 /245

Graf 1



4. Diskuse

V teoretické části práce jsme provedli výčet parametrů krevního obrazu, možnosti stanovení jednotlivých krevních elementů a uvedli příklady kontrol systému. V praktické části jsme provedli praktická měření kontrolních materiálů na všech typech analyzátorů krevního obrazu. Měření jsme prováděli v časovém rozmezí září 2011 – březen 2012.

U skupiny kontrol s definovanou hodnotou jsme prováděli měření jednotlivých vzorků den po dni až do doby expirace každé zkumavky. Vzhledem k tomu, že množství kontrolního materiálu bylo pro jednotlivé šarže omezené, data reprodukovatelnosti byla

z více šarží kontrolních firemních materiálů. Získaný CV % byl použit jako vyjádření nejistoty měření uváděné pro jednotlivé parametry ve standardních operačních postupech.

Pro jednotlivé parametry byla dosaženy následující hodnoty minima CV% WBC (L) 1,78; (N) 1,36; (H) 0,74; CV% RBC (L) 0,63; (N) 0,44; (H) 0,64; CV% HGB (L) 0,37; (N) 0,61; (H) 0,50; CV% HCT (L) 0,69; (N) 0,83; (H) 0,74; CV% MCV(L) 0,48; (N) 0,50; (H) 0,74; CV% MCH (L) 0,85; (N) 0,74; (H) 0,80; CV% MCHC (L) 0,92; (N) 0,92; (H) 0,89; CV% PLT (L) 1,77; (N) 1,46; (H) 0,1,45.

Pro jednotlivé parametry byla dosaženy následující hodnoty maxima CV% WBC (L) 3,29; (N) 4,88; (H) 2,28; CV% RBC (L) 4,94; (N) 2,01; (H) 2,34; CV% HGB (L) 2,16; (N) 1,79; (H) 1,86; CV% HCT (L) 2,04; (N) 2,17; (H) 2,83; CV% MCV(L) 1,14; (N) 0,86; (H) 1,26; CV% MCH (L) 1,70; (N) 7,38; (H) 5,57; CV% MCHC (L) 1,75; (N) 7,63; (H) 2,28; CV% PLT (L) 15,4; (N) 7,87; (H) 3,28.

Všechny výsledky kontrolních měření se pohybovaly v rozmezí udaném výrobcem kontrolních materiálů. Nejvyšší hodnoty CV% vykazují analyzátoři Celltac E a Celltac F.

WHO doporučuje pro dané parametry tyto hodnoty CV: WBC \leq 10%, HGB,RBC, HCT \leq 4%, MCV,MCH,MCHC \leq 5 %, PLT \leq 15%

Vypočtené variační koeficienty se pohybují pod doporučenou hranicí, pouze na Celltac F při měření PLT u kontrolního materiálu L byla tato hranice překročena o 0,4% a na Sysmex XE 5000 při měření MCH a MCHC u kontrolního materiálu N,L byla tato hranice také překročena.

U skupiny kontrol bez definované hodnoty byla hodnocena přesnost v sérii (opakovatelnost). Jednalo se o shodu výsledků n-ti opakovaných vyšetření téhož vzorku zpracovaných současně a za identických podmínek. Pro měření byly použity různé vzorky patientské krve. Vzhledem k omezenému množství materiálu zpravidla nebylo možné provést 10 měření. Jednotlivé počty kontrolních měření byly uvedeny i s datem

analýzy u jednotlivých tabulek výsledků. Všechny výsledky kontrolních měření se pohybovaly u spodní hranice doporučeného rozmezí.

Získané hodnoty kontrolních měření byly dále statisticky zpracovány a použity pro výpočet nejistot. Variační koeficienty byly dále zohledněny při navržení tabulek pro hodnocení mezilaboratorních porovnání mezi jednotlivými přístroji a slouží k okamžitému výpočtu odchylek měření viz. Tab. č. v příloze.

5. Závěr

I přes pokroky v hematologii, vyvíjení nových technologií měření a zavádění průtokové cytometrie do rutinní praxe zůstává měření krevního obrazu na automatickém analyzátoru jednou ze základních metod s vysokou výpovědní hodnotou. Základem vydání správných výsledků analýzy je jednak dodržení preanalytické fáze, správné nastavení analyzátorů a především správně nastavená kontrola kvality. Kombinace interní a externí kontroly kvality, která zahrnuje měření kontrolních kreví s udanou hodnotou, měření vzorků pacientů a hodnocení pomocí stanoveného referenčního analyzátoru a mezilaboratorní porovnání tzv. okružních vzorků umožní dobrou kontrolu a podklady pro vydávání správných výsledků a objektivní hodnocení stavu pacienta.

Při našich měřeních jsme si ověřili, že porovnávané analyzátory vykazují vysokou spolehlivost a bylo by možné i zúžit doporučená rozmezí pro variabilitu měření.

V práci byl navržen možný způsob vyjádření nejistoty měření bez zahrnuté opakovatelnosti měření, která je požadována i u hematologických vyšetření a měla by být součástí hodnocení validace metody ve standardním operačním postupu.

6. Seznam použité literatury

- [1] Kittnar, O. a kolektiv: Lékařská fyziologie, Grada publishing, a. s., Praha 2011, ISBN: 978-80-247-3068-4
- [2] Rokyta, R. a kolektiv: Fyziologie pro bakalářská studia v medicíně, ISV nakladatelství, Praha 2000, ISBN: 80-85866-45-5
- [3] Trojan, S. a kolektiv: Lékařská fyziologie, Grada publishing, a. s., Praha 1996, ISBN: 80-7169-311-1
- [4] Ganong, W.F.: Přehled lékařské fyziologie, Nakladatelství a vydavatelství H&H, Jinočany 1997, ISBN: 80-85787-36-9
- [5] Janqueira, L.C. a kolektiv: Základy histologie, Nakladatelství a vydavatelství H&H, Jinočany 1997, ISBN: 80-85787-37-7
- [6] Murray, R.K. a kolektiv: Harperova biochemie, Nakladatelství a vydavatelství H&H, Jinočany 1998, ISBN: 80-85787-38-5
- [7] Silbernagl, S., Despopoulos, A.: Atlas fyziologie člověka, Grada publishing, a. s., Praha 2011, ISBN: 80-85623-79-X
- [8] Klener, P. a kolektiv: Vnitřní lékařství, Galén Praha 1999, ISBN: 80-7262-007-X
- [9] Štern, P. a kolektiv : Obecná a klinická biochemie pro bakalářské obory studia, Nakladatelství Karolinum, Praha 2005, ISBN: 80-246-1025-6
- [10] Vokurka, M. a kolektiv: Patofyziologie pro nelékařské směry, Nakladatelství Karolinum, UK Praha, 2005, ISBN: 80-246-0896-0
- [11] Rozman , J. a kolektiv: Elektronické přístroje v lékařství, Academia, Praha 2006, ISBN: 80-200-1308-3
- [12] Pecka, M. a kolektiv: Praktická hematologie – Laboratorní metody, Nakladatelství Infinity art, s.r.o., Český Těšín, 2010, ISBN: 978-80-903871-9-5
- [13] Pecka, M. a kolektiv: Laboratorní hematologie v přehledu – Fyziologie a patofyziologie krevní buňky, Nakladatelství Infinity art, s.r.o., Český Těšín, 2006, ISBN: 80-86682-00-5

- [14] Navrátil, L. a kolektiv: Vnitřní lékařství pro nelékařské zdravotnické obory, Grada publishing, a. s., Praha 2008, ISBN: 978-80-247-2319-8
- [15] Kočárek, E.: Genetika, pedagogické nakladatelství Scientia, soil. s.r.o., Praha 2004, ISBN: 80-7183-326-6
- [16] Všeobecná fakultní nemocnice v Praze, <http://intranet>, úsek pro nelékařská zdravotnická povolání, Standardní ošetrovatelský postup – Stanovení krevního obrazu na automatických analyzátořech, 10.5.2012
- [17] Kittnar, O., Mlček, M.: Atlas fyziologických regulací, Grada publishing, a. s., Praha 2009, ISBN: 978-80-2722-6
- [18] Beckman Coulter, COULTER LH 755, COULTER LH 755 Hematology Analyzer, operator's manual, 2009
- [19] Beckman Coulter, UniCel DxH 800 Coulter Cellular Analysis System, operator's manual, 2009
- [20] Unicel® DxH 800 Coulter® Cellular Analysis systém, 2009
- [21] Sysmex, XE-5000™ Automated Hematology System, operator's manual, 2011
- [22] http://www.sysmex.cz/files/fl15/Image/pic_9584/XE_5000.pdf, citováno 24.4.2012
- [23] Nihon Kohden, Celltac F, Instruction and operator's manual, 2009
- [24] Nihon Kohden, Celltac E, Instruction and operator's manual, 2007
- [25] Česká hematologická společnost ČSL JEP, Doporučení pro hematologickou laboratoř – Stanovisko ČHS ČSL JEP k tzv. kritickým hodnotám, citováno 2.5.2012
- [26] Česká hematologická společnost ČSL JEP. Doporučení pro hematologickou laboratoř – Stanovisko ČHS ČSL JEP k uvolňování výsledků vyšetření z laboratoře, citováno 2.5.2012

7. Seznam zkratek použitých v textu

Zkratka	Ukazatel	Rozměr
WBC	Leukocyty	$10^9 / l$
RBC	Erytrocyty	$10^{12} / l$
HGB	Hemoglobin	g / l
HCT	Hematokrit	l
MCV	Střední objem erytrocytů	fl
MCH	Barvivo erytrocytů	pg
MCHC	Střední barevná koncentrace	g / l
RDW	Distribuční křivka erytrocytů	% CV
PLT	Trombocyty	$10^9 / l$
MPV	Střední objem trombocytu	fl
PCT	Hematokrit trombocytů	l
PDW	Distribuční křivka trombocytů	fl,%
NE	Neutrofilly	Relat. %, abs. $10^9 / l$
LY	Lymfocyty	Relat. %, abs. $10^9 / l$
MO	Monocyty	Relat. %, abs. $10^9 / l$
EO	Eozinofily	Relat. %, abs. $10^9 / l$
BA	Bazofily	Relat. %, abs. $10^9 / l$

8. Seznam tabulek a obrazové dokumentace

Obr. č. 1: Erytrocyty

Obr.č. 2: Granulocyt neutrofilní

Obr. č. 3: Granulocyt eozinofilní

Obr.č. 4: Granulocyt bazofilní

Obr. č. 5: Monocyt

Obr. č. 6: T-lymfocyt

Obr. č. 7: B-lymfocyt

Obr. č. 8.: Trombocyty

Obr. č.9: Bürkerova komůrka

Tabulka č. 1: Rozměry a diferenciální rozpočet leukocytů

Tabulka č. 2: Měřené parametry na automatických analyzátorech

Tabulka č. 3: Definovaná hodnota pro DxH 800 I

Tabulka č. 4: Definovaná hodnota pro DxH 800 II

Tabulka č. 5: Definovaná hodnota pro LH 755

Tabulka č. 6: Definovaná hodnota pro LH 750 FP

Tabulka č. 7: Definovaná hodnota pro Sysmex XE 5000

Tabulka č. 8: Definovaná hodnota pro Celltac F

Tabulka č. 9: Definovaná hodnota pro Celltac E

Tabulka č. 10: Neznámá hodnota pro DxH 800I

Tabulka č. 11: Neznámá hodnota pro DxH 800 II

Tabulka č. 12: Neznámá hodnota pro LH 755

Tabulka č. 13: Neznámá hodnota pro LH 750 FP

Tabulka č. 14: Neznámá hodnota pro Sysmex XE 5000

Tabulka č. 15: Neznámá hodnota pro Celltac E

Tabulka č. 16: Neznámá hodnota pro Celltac F

Graf č. 1: Relativní nejistoty měření při normální hladině

9. Přílohy

Příloha č. 1

Referenční hodnoty zdravé dospělé populace - Krevní obraz

Parametr	JEDNOTKY	REFERENČNÍ MEZE	
		Muži	ženy
Leukocyty / WBC/	10 ⁹ /l	4,10 - 10,20	4,00 - 10,70
Neutrofilý / NE /	10 ⁹ /l nebo %	1,80 - 7,00	50,0 - 75,0 %
Lymfocyty / LY /	10 ⁹ /l nebo %	1,00 - 4,80	25,0 - 40,0 %
Monocyty / MO /	10 ⁹ /l nebo %	0,10 - 0,80	3,0 - 8,0 %
Eozinofily / EO /	10 ⁹ /l nebo %	0,00 - 0,45	1,0 - 3,0 %
Bazofily / BA /	10 ⁹ /l nebo %	0,00 - 0,20	0,0 - 1,0 %
Erytrocyty / RBC /	10*12/l	4,19 - 5,75	3,54 - 5,18
Hemoglobin / HGB /	g/l	135 - 174	116 - 163
Hematokrit / HCT /	l	0,390 - 0,510	0,330 - 0,470
Střední objem ery / MCV /	fl	82,6 - 98,4	82,3 - 100,6
Barvivo ery /MCH /	pg	28,0 - 34,6	28,1 - 35,6
Stř. barevná koncetr. / MCHC /	g/l	329 - 364	330 - 363
Distribuční křivka ery / RDW /	%	12,1 - 15,0	11,9 - 16,3
Trombocyty / PLT /	10*9/l	142 - 327	131 - 364
Střední objem trombo. / MPV /	fl	7,0 - 10,8	7,1 - 10,4
Tromb. hematokrit / PCT /	l	0,127 - 0,277	0,117 - 0,305
Distribuční křivka trombo. /PDW /	%	15,5 - 17,6	15,3 - 17,9
Počet retikulocytů	10 ¹² /l nebo ‰	0,025 - 0,075	5 - 15‰

Příloha č.2

Výpočet nejistoty měření

Nejistoty pro měření na třech hladinách (L – nízká, N – normální, H – vysoká) byly vypočítány pro parametry WBC, RBC, HGB a PLT z :

- Přesnosti
- Správnosti
- Nejistoty kontrolního materiálu
- Nejistoty přístroje

Přesnost je vyjádřena :

opakovatelností jakéhokoliv materiálu $u_{op} = SD$; $u_{op} = CV (\%) * x_p / 100$
reprodukovatelností kontrolního materiálu $u_{rep} = SD$

$$SD = 1 / (n-1) * \sqrt{\sum (x_i - x_p)^2} \quad i = 1 \dots n \quad n - \text{počet měření}$$

Správnost je vyjádřena:

odchytkou od správné hodnoty $u_{sh} = x_D - x_p$ (zjištěno u kontrolního materiálu při stanovení reprodukovatelnosti)

Nejistota kontrolního materiálu je vyjádřena :

z dané tolerance kontrolního materiálu $u_{r,m} = a / \sqrt{3}$

Celková nejistota $u = \sqrt{u_{op}^2 + u_{rep}^2 + u_{r,m}^2 + u_{sh}^2}$

Příloha č.3

**KONTROLA KVALITY podle mezi Refer. Laboratoře
UKBLD CHLTC VFVN v Praze**

Měřeno dne: 3.11.2011

Zpracoval:

VK

Přístř./lokalita	č.vz.	WBC 10 ⁹ /l				RBC 10 ¹² /l			HGB g/l		
LH 755/ CHL	1	10,40	9,36	-	11,44	3,78	3,55	-	79	76	82
DxH 800 I	1	10,10				3,82			81		
DxH 800 II	1	9,80				3,78			79		
LH 750/ FP	1	9,90				3,81			80		
System XE 5000/FP	1	10,20				3,95			79		
Celliac E	1	9,70				3,90			80		
Celliac F	1	9,90				3,77			80		
LH 755/ CHL	2	6,70	6,03	-	7,37	4,06	3,82	-	4,30	110	120
DxH 800 I	2	6,40				3,95			119		
DxH 800 II	2	6,30				4,09			116		
LH 750/ FP	2	6,80				4,29			116		
System XE 5000/FP	2	6,20				4,02			116		
Celliac E	2	7,00				4,10			116		
Celliac F	2	6,10				4,35	H		111		
LH 755/ CHL	3	3,10	2,79	-	3,41	3,03	2,85	-	3,21	103	111
DxH 800 I	3	3,20				3,15			109		
DxH 800 II	3	2,80				3,01			107		
LH 750/ FP	3	3,00				3,13			106		
System XE 5000/FP	3	3,10				3,02			108		
Celliac E	3	2,80				3,01			107		
Celliac F	3	2,80				2,93			103		
LH 755/ CHL	4	20,40	18,36	-	22,44	3,66	3,44	-	3,88	104	108
DxH 800 I	4	20,30				3,73			107		
DxH 800 II	4	19,20				3,61			105		
LH 750/ FP	4	19,50				3,70			103		
System XE 5000/FP	4	19,20				3,61			105		
Celliac E	4	18,80				3,60			103		
Celliac F	4	19,80				3,54			101		

KONTROLA KVALITY podle mezi Refer. Laboratoře UKBLD CHLTC VFN v Praze

Měřeno dne: 3.11.2011

Zpracoval:

VK

Přístř./lokalita	č.vz.	HCT %		MCV fl		PLT 10 ⁹ /l				
LH 755/ CHL	1	24,5	22,541-	26,46	64,7	61,51-	67,9	499	424-	574
DXH 800 I	1	26,2			65,2			533		
DXH 800 II	1	24,4			64,6			491		
LH 750 FP	1	26,2			64,3			486		
System XE 5000/FP	1	24,4			62,8			521		
Celltac E	1	25,5			65,4			547		
Celltac F	1	24,4			64,8			502		
LH 755/ CHL	2	33,9	31,1881-	36,612	83,3	79,11-	87,5	317	2691-	365
DXH 800 I	2	35,1			86,1			290		
DXH 800 II	2	34,1			83,3			302		
LH 750 FP	2	35,5			82,8			283		
System XE 5000/FP	2	33,6			83,5			308		
Celltac E	2	35,0			85,4			317		
Celltac F	2	34,7			79,6			290		
LH 755/ CHL	3	30,4	27,9681-	32,832	100,2	95,21-	105,2	271	2301-	312
DXH 800 I	3	31,2			103,0			259		
DXH 800 II	3	29,9			99,3			293		
LH 750 FP	3	31,7			101,0			266		
System XE 5000/FP	3	30,4			100,6			263		
Celltac E	3	29,9			99,3			293		
Celltac F	3	30,4			104,0			247		
LH 755/ CHL	4	30,0	27,61-	32,4	82,0	77,91-	86,1	868	7381-	998
DXH 800 I	4	31,6			84,8			823		
DXH 800 II	4	30,0			83,1			895		
LH 750 FP	4	30,9			83,5			752		
System XE 5000/FP	4	30,0			83,1			895		
Celltac E	4	29,7			82,5			971		
Celltac F	4	29,9			84,5			720	L	

KONTROLA KVALITY podle mezí INSTAND

UKBLD CHLTC VFEN v Praze

Měřeno dne: 3.11.2011

Zpracoval: VK

Přístř./lokalita	č.vz.	WBC 10 ⁹ /l	RBC 10 ¹² /l	HGB g/l
LH 755/CHL	1	10,40	3,78	79,00
DxH 800 I	1	10,10	3,82	81,00
DxH 800 II	1	9,80	3,78	79,00
LH 750/FP	1	9,90	3,81	80,00
Sysmex XE 5000/FP	1	10,20	3,95	79,00
Celltac E	1	9,70	3,90	80,00
Celltac F	1	9,90	3,77	80,00
LH 755/CHL	2	6,70	4,06	115,00
DxH 800 I	2	6,40	3,95	119,00
DxH 800 II	2	6,30	4,09	116,00
LH 750/FP	2	6,80	4,29	116,00
Sysmex XE 5000/FP	2	6,20	4,02	116,00
Celltac E	2	7,00	4,10	116,00
Celltac F	2	6,10	4,35	111,00
LH 755/CHL	3	3,10	3,03	107,00
DxH 800 I	3	3,20	3,15	109,00
DxH 800 II	3	2,80	3,01	107,00
LH 750/FP	3	3,00	3,13	106,00
Sysmex XE 5000/FP	3	3,10	3,02	108,00
Celltac E	3	2,80	3,01	107,00
Celltac F	3	2,80	2,93	103,00
LH 755/CHL	4	20,40	3,66	104,00
DxH 800 I	4	20,30	3,73	107,00
DxH 800 II	4	19,20	3,61	105,00
LH 750/FP	4	19,50	3,70	103,00
Sysmex XE 5000/FP	4	19,20	3,61	105,00
Celltac E	4	18,80	3,60	103,00
Celltac F	4	19,80	3,54	101,00

KONTROLA KVALITY podle mezí INSTAND

UKBLD CHLTC VFEN v Praze

Měřeno dne: 3.11.2011

Zpracoval: VK

Přístř./lokalita	č.vz.	HCT %			MCV fl				PLT 10 ⁹ /l			
LH 755/CHL	1	24,50	21,805	-	27,195	64,70	59,5	-	69,9	499,00	389	609
DXH 800 I	1	26,20				65,20				533,00		
DXH 800 II	1	24,40				64,60				491,00		
LH 750/FP	1	26,20				64,30				486,00		
Sysmex XE 5000/FP	1	24,40				62,80				521,00		
Celltac E	1	25,50				65,40				547,00		
Celltac F	1	24,40				64,80				502,00		
LH 755/CHL	2	33,90	30,171	-	37,629	83,30	76,6	-	90,0	317,00	247	387
DXH 800 I	2	35,10				86,10				290,00		
DXH 800 II	2	34,10				83,30				302,00		
LH 750/FP	2	35,50				82,80				283,00		
Sysmex XE 5000/FP	2	33,60				83,50				308,00		
Celltac E	2	35,00				85,40				317,00		
Celltac F	2	34,70				79,60				290,00		
LH 755/CHL	3	30,40	27,056	-	33,744	100,20	92,2	-	108,2	271,00	211	331
DXH 800 I	3	31,20				103,00				259,00		
DXH 800 II	3	29,90				99,30				293,00		
LH 750/FP	3	31,70				101,00				266,00		
Sysmex XE 5000/FP	3	30,40				100,60				263,00		
Celltac E	3	29,90				99,30				293,00		
Celltac F	3	30,40				104,00				247,00		
LH 755/CHL	4	30,00	26,7	-	33,3	82,00	75,4	-	89,6	868,00	677	1059
DXH 800 I	4	31,60				84,80				823,00		
DXH 800 II	4	30,00				83,10				895,00		
LH 750/FP	4	30,90				83,50				752,00		
Sysmex XE 5000/FP	4	30,00				83,10				895,00		
Celltac E	4	29,70				82,50				971,00		
Celltac F	4	29,90				84,50				720,00		

Nejistoty měření 2012 - bez zahrnuté opakovatelnosti

DxH 800

hladina	WBC			RBC			HGB			PLT		
	L	N	H	L	N	H	L	N	H	L	N	H
Reprodukovatelnost												
SD - u(rep)	0,107	0,097	0,258	0,031	0,045	0,07	0,483	0,966	1,434	2,635	5,185	11,478
CV	3,107	1,105	1,288	1,623	0,094	0,14	0,924	0,729	0,882	3,537	2,368	2,712
průměr	3,46	8,74	20,7	1,88	4,12	5,34	52,3	132,6	162,5	74,5	219	423,2
Assay - Xd	3,5	9,1	20,7	1,89	4,2	5,44	52	132	163	76	227	430
A	0,6	0,7	1,2	0,11	0,15	0,23	1,5	2	3	15	25	45
u(sh)	0,04	0,36	0	0,01	0,08	0,1	0,3	0,6	0,5	1,5	8	6,8
u(m)	0,346	0,404	0,693	0,064	0,087	0,133	0,866	1,155	1,732	8,660	14,434	25,981
Opakovatelnost												
SD - u(op)	0,108	0,309	0,158	0,027	0,048	0,049	0,876	1,075	1,969	4,115	2,946	11,653
CV	2,734	3,473	0,875	1,025	1,134	0,93	0,932	0,886	1,178	6,273	1,432	2,708
průměr	3,95	8,1	18,04	2,643	4,265	5,231	93,9	128,6	167,1	65,6	206	450
nejistota abs.	0,380	0,631	0,756	0,076	0,135	0,187	1,357	1,945	3,030	10,056	17,547	31,445
průměr pro nejistotu	3,700	8,420	19,500	2,250	4,230	5,280	72,000	130,000	165,000	71,000	216,000	440,000
nejistota relat %	10,281	7,491	3,877	3,392	3,192	3,540	1,884	1,496	1,837	14,164	8,124	7,147

Nejistoty měření 2012 - bez zahrnuté opakovatelnosti

Systemex XE 5000

	WBC			RBC			HGB			PLT		
	L	N	H	L	N	H	L	N	H	L	N	H
hladina												
Reprodukovatelnost												
SD - u(rep)	0,063	0,211	0,8	0,04	0,069	0,08	0,568	1,814	0,2	7,646	13,558	16
CV	2,414	2,849	4,4	1,679	1,558	1,5	0,888	1,386	1,6	11,532	6,692	3,1
průměr	2,62	7,4	18	2,383	4,451	5,22	63,9	130,8	153	66,3	202,6	494
Assay - Xd	2,5	7,3	17,8	2,37	4,47	5,17	64	133	152	51	201	525
A	0,3	0,6	2	0,11	0,16	0,2	3	4	6	15	30	60
u(sh)	-0,12	0,1	0,2	0,013	0,019	0,05	0,1	2,2	1	15,3	1,6	31
u(rm)	0,173	0,346	1,155	0,064	0,092	0,115	1,732	2,309	3,464	8,660	17,321	34,641
Opakovatelnost												
SD - u(op)	0,063	0,238	0,226	0,014	0,04	0,031	0,422	0,422	0,632	5,343	5,354	10,765
CV	1,63	2,334	1,181	0,94	0,917	0,544	0,913	0,333	0,385	4,906	2,25	1,602
průměr	3,9	10,2	19,2	1,488	4,36	5,641	46,2	126,8	164,2	108,9	238	672,1
nejistota abs.	0,229	0,481	1,437	0,077	0,124	0,152	1,874	3,694	3,666	19,902	22,695	50,328
průměr pro nejistotu	3,200	8,700	20,570	1,900	4,410	4,300	51,000	130,000	125,000	85,000	218,000	401,300
nejistota relat. %	7,149	5,526	6,985	4,076	2,801	3,542	3,674	2,841	2,933	23,414	10,410	12,541

Nejistoty měření 2012 - bez zahrnuté opakovatelnosti

LH 755, 750

	WBC			RBC			HGB			PLT		
	L	N	H	L	N	H	L	N	H	L	N	H
hladina												
Reprodukovatelnost												
SD - u(rep)	0,2	0,271	0,8	0,031	0,132	0,07	0,1	1,647	0,2	2,635	13,895	11,478
CV	5,5	3,162	4,4	1,623	3,089	0,14	1,4	1,334	1,6	3,537	5,598	2,712
průměr	2,9	8,57	18	1,88	4,27	5,34	80	123,4	153	74,5	248,2	423,2
Assay - Xd	2,8	8,9	17,8	1,89	4,27	5,44	80	126	152	76	220	430
A	0,4	0,4	2	0,11	0,11	0,23	4	3	6	15	25	45
u(sh)	-0,1	0,33	0,2	0,01	0	0,1	0	2,6	1	1,5	28,2	6,8
u(rm)	0,231	0,231	1,155	0,064	0,064	0,133	2,309	1,732	3,464	8,660	14,434	25,981
Opakovatelnost												
SD - u(op)	0,067	0,137	0,208	0,029	0,099	0,119	0,527	2,797	0,823	3,091	5,985	15,189
CV	1,754	1,538	0,878	2,301	2,272	2,283	1,27	2,142	0,527	3,254	2,665	3,745
průměr	3,8	8,91	23,69	1,247	4,363	5,2	41,5	130,6	156,3	95	224,6	405,6
nejistota abs.	0,328	0,504	1,434	0,077	0,177	0,216	2,371	4,505	3,704	9,682	35,106	32,919
průměr pro nejistotu	3,800	8,900	23,700	1,247	4,310	5,200	41,500	128,000	156,300	95,000	222,000	405,000
nejistota relat. %	8,641	5,668	6,051	6,178	4,102	4,156	5,713	3,520	2,370	10,192	15,814	8,128

Nejistoty měření 2012 - bez zahrnuté opakovatelnosti

CELLTAC E,F

	WBC			RBC			HGB			PLT		
	L	N	H	L	N	H	L	N	H	L	N	H
hladina												
Reprodukovatelnost												
SD - u(rep)	0,2	0,4	0,8	0,04	0,08	0,08	0,1	0,2	0,2	7	16	16
CV	5,5	5	4,4	1,6	1,9	1,5	1,4	1,5	1,6	11,2	6,2	3,1
průměr	2,9	8,3	18	2,56	4,29	5,22	80	131	153	65	253	494
Assay - Xd	2,8	8,2	17,8	2,53	4,28	5,17	80	131	152	66	260	525
A	0,4	1	2	0,15	0,18	0,2	4	5	6	18	35	60
u(sh)	-0,1	0,1	0,2	0,03	0,01	0,05	0	0	1	1	7	31
u(rm)	0,231	0,577	1,155	0,087	0,104	0,115	2,309	2,887	3,464	10,392	20,207	34,641
Opakovatelnost												
SD - u(op)	0,097	0,211	0,584	0,06	0,045	0,047	1,767	1,252	1,9	3,596	6,546	10,765
CV	3,774	2,565	2,978	2,241	1,046	0,871	1,906	1,004	1,128	4,153	2,764	1,602
průměr	2,56	8,23	19,61	2,696	4,3	5,365	92,7	124,7	168,5	86,6	236,8	672,1
nejistota abs.	0,336	0,740	1,534	0,117	0,139	0,156	2,910	3,153	4,080	13,074	27,499	50,328
průměr pro nejistotu	2,8	8,3	18,8	2,6	4,3	5,3	86,0	128,0	160,0	76,0	245,0	430,7
nejistota relat. %	12,210	8,950	8,162	4,485	3,233	2,955	3,383	2,463	2,550	17,203	11,224	11,685