

KARLOVA UNIVERZITA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA HRADEC KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



Diplomová práce
v oboru Odborný pracovník v laboratorních metodách

VYŠETŘENÍ POČTU BUNĚČNÝCH ELEMENTŮ
V MOZKOMÍŠNÍM MOKU NA ANALYZÁTORU SYSMEX XE-5000
METODOU „BODY FLUID“.

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Ilona Fátorová

Autor: Bc. Jana Davídková

Hradec Králové, 2014

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Ilony Fátorové a uvedla v seznamu literatury všechny použité literární a odborné zdroje. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne:

Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí mé diplomové práce paní Mgr. Iloně Fátorové za odborné vedení, důležité rady při zpracovávání teoretické i praktické části diplomové práce, za věnovaný čas a milé jednání.

Obsah:

1. Úvod a zadání práce	9
2. Teoretická část	10
2.1. Mozkomíšní mok	10
2.1.1. Fyziologie	10
2.1.2. Funkce	11
2.1.3. Hematoencefalická bariéra	11
2.2. Vyšetření mozkomíšního moku	12
2.2.1. Indikace k odběru	12
2.2.2. Lumbální punkce	13
2.2.3. Druhy vyšetření	14
2.2.3.1. Makroskopický vzhled likvoru	14
2.2.3.2. Biochemické vyšetření	15
2.2.3.3. Mikrobiologické vyšetření	19
2.2.3.4. Cytologické vyšetření likvoru	20
2.3. Patofyziologie mozkomíšního moku.....	23
2.3.1. Pleocytóza.....	23
2.3.1.1. Granulocytární pleocytóza	24
2.3.1.2. Lymfocytární pleocytóza	26
2.3.1.3. Monocytární pleocytóza.....	28
2.3.1.4. Tumorózní pleocytóza.....	28
2.3.2. Patologická oligocytóza.....	29
2.3.2.1. Patologická granulocytární oligocytóza.....	29
2.3.2.2. Patologická lymfocytární oligocytóza.....	29
2.3.2.3. Patologická monocytární oligocytóza	30
2.3.2.4. Patologická tumorózní oligocytóza.....	30
3. Praktická část.....	31
3.1. Materiál	31
3.1.1. Charakteristika vyšetřovaných vzorků	31
3.2. Metody	32
3.2.1. Mikroskopické vyšetření	32
3.2.2. Sysmex XE-5000, metoda „Body Fluid“	33
3.3. Výsledky	37

3.3.1.	Statistické zpracování	37
3.3.2.	Bland-Altmanovy grafy	37
3.3.3.	Srovnávací grafy	47
3.3.4.	Opakovatelnost	49
3.3.5.	Stabilita v čase	50
4.	Diskuze a závěr	53
5.	Seznam tabulek	56
6.	Seznam obrázků	57
7.	Seznam grafů	58
8.	Použitá literatura	59
	Přílohy	64

Abstrakt

Mozkomíšní mok bývá vyšetřen pomocí různých metod, ke kterým patří také stanovení počtu a druhu jednotlivých buněk. Nyní je metodou první volby ke stanovení buněčných elementů mikroskopická metoda. Toto stanovení je však možné provést i pomocí analyzátorové metody, která zatím není tolik rozšířená. Cílem mé diplomové práce bylo porovnat tyto dvě metody a zjistit, zda vyšetření likvoru na analyzátoru Sysmex XE-5000 v režimu „Body Fluid“ může nahradit běžně užívanou mikroskopickou metodu. Za tímto účelem jsme shromáždili laboratorní data naměřená pomocí obou metod, porovnali je, vyhodnotili a statisticky zpracovali. Výsledné údaje nasvědčují, že hodnoty naměřené na analyzátoru Sysmex XE-5000 jsou přesnější než mikroskopické stanovení, a to především u vysoce buněčných vzorků likvorů. K tomuto závěru jsme došli vyhodnocením Bland-Altmanových grafů a srovnávacích grafů s vyznačenými limity fyziologické oligocytózy. Pro kontrolu přesnosti měření jsme na analyzátoru ověřili opakovatelnost u hodnot leukocytů a erytrocytů, variační koeficienty odpovídají hodnotám udávaným výrobcem v dokumentaci k přístroji. Zjišťovali jsme také stabilitu vzorků likvoru v závislosti na teplotě uskladnění. Vzorky uchovávané při teplotě 2 – 8 °C byly stabilnější. Z naší práce vyplývá, že vyšetření na analyzátoru Sysmex XE-5000 v režimu „Body Fluid“ je vhodnou alternativou k mikroskopické metodě a může ji plně nahradit.

Abstract

Cerebrospinal fluid is examined using a variety of methods, which also include determining the number and type of each cell. Now the method of the first choice to determine the cellular elements is a microscopic method. This determination, however, can also be done using the analyzer method, which is not yet so widespread. The aim of my thesis was to compare these two methods and determine whether the examination of cerebrospinal fluid on the analyzer Sysmex XE-5000 in the „Body Fluid“ mode can replace commonly used microscopic methods. To this purpose, we gathered the laboratory data measured by using both these methods. These data was compared, evaluated and statistically processed. The resulting data suggest that the values measured on the analyzer Sysmex XE-5000 are more accurate than from microscopic determination, especially at highly cell samples of cerebrospinal fluid. To this end, we came evaluation of Bland-Altman graphs and comparison graphs with marked of limits of physiological oligocytosis. For checking of the accuracy of measurements, we verified the repeatability of the analyzer for the values of leukocytes and erythrocytes, coefficients of variation corresponding to the values specified by the manufacturer's documentation. We also investigated the stability of samples of cerebrospinal fluid, depending on the storage temperature. Samples stored at 2 – 8 °C were more stable. Our work implies that the examination on the analyzer Sysmex XE-5000 in the „Body Fluid“ mode is a good alternative to the existing microscopic method and can be fully replaced with it.

Použité zkratky

BF – Body fluid

CNS – Centrální nervový systém

CV – Variační koeficient

DC detekce – Impedanční měřicí metoda

DIFF – Diferenciální rozpočet leukocytů

DNA – Deoxyribonukleová kyselina

FL – Fluorescence

FSC – Forward scatter channel

HF – High fluorescence

IEF – Izoelektrická fokusace

KEB – Koeficient energetické bilance

MN – Mononukleáry

NIS – Nemocniční informační systém

NS – Nervový systém

PCR – Polymerázová řetězová reakce

PMN – Polymorfonukleáry

Q_{alb} – Albuminový kvocient

Q_{glu} – Glukózový kvocient

RBC-BF – Erytrocyty

RNA – Ribonukleová kyselina

SD – Směrodatná odchylka

SSC – Side scatter channel

WBC-BF – Leukocyty

1. Úvod a zadání práce

Vyšetření mozkomíšního moku má pro lékaře velkou výpovědní hodnotu, o kterou se opírá jejich následné rozhodování ohledně diagnózy, léčby či prognózy. Likvor může být vyšetřen různými metodami, mezi které patří také stanovení počtu a druhu jednotlivých buněčných elementů přítomných v mozkomíšním moku. V současnosti můžeme počet těchto elementů zjistit mikroskopicky ve Fuchs-Rosenthalově komůrce, což je metoda první volby, nebo pomocí novější analyzátorové metody. Mikroskopická metoda má však jistá omezení, spolehlivě lze rozpoznat a početně vyhodnotit pouze segmenty a malé mononukleáry a není nezanedbatelné, že s rostoucí buněčností ve vzorku se přesnost této metody výrazně snižuje.

Cílem a zadáním mé diplomové práce bylo zjistit, zda nová metoda vyšetření buněčných elementů v mozkomíšním moku na analyzátoru Sysmex XE-5000 metodou „Body Fluid“ může nahradit stávající, běžně užívanou mikroskopickou metodu. Za tímto účelem jsme shromáždili laboratorní data z vyšetření počtu buněčných elementů v mozkomíšním moku mikroskopickou metodou a na analyzátoru Sysmex XE-5000 v režimu „Body Fluid“. Data jsme následně porovnali, vyhodnotili a statisticky zpracovali.

2. Teoretická část

2.1. Mozkomíšní mok

Mozkomíšní mok, jinak také likvor či cerebrospinalní tekutina, je tekutina nacházející se v místě vymezeném cerebrospinalním prostorem a komorovým systémem (Langmeier, 2009).

2.1.1. Fyziologie

Mozkomíšní mok je čirá bezbarvá tekutina se slabě alkalickým pH (pH 7,33), které je poměrně stálé i při vychýlení pH plazmy (Langmeier, 2009). Ve srovnání s plazmou obsahuje méně vápníku, proteinů, lipidů i glukózy. Zatímco chloridy, sodík a hořčík se v mozkomíšním moku nachází ve vyšší koncentraci. (Merkunová a kol., 2008)

Tabulka 1: Porovnání složení likvoru a plazmy (Otomar a kol., 2011)

	<i>Likvor</i>	<i>Plazma</i>
<i>Bílkoviny</i>	200 – 400 mg/l	60 – 80 g/l
<i>Lipidy</i>	10 – 30 mg/l	4 – 9 g/l
<i>Glukóza</i>	2,2 – 4,2 mmol/l	3,9 – 5,6 mmol/l
<i>Vápník</i>	1,1 – 1,3 mmol/l	2,2 – 2,8 mmol/l
<i>Chloridy</i>	113 – 131 mmol/l	97 – 108 mmol/l
<i>Sodík</i>	144 – 152 mmol/l	137 – 146 mmol/l
<i>Hořčík</i>	2,2 – 2,5 mmol/l	0,7 – 1,3 mmol/l

Celkový objem likvoru je asi 100 – 180 ml a nachází se v mozkových komorách a v sucharachoideálním prostoru. Mozkomíšní mok se stále obnovuje - cca 720 ml za 24 hodin. Za den se objem likvoru vymění asi 4 – 6krát. (Merkunová a kol., 2008)

Mozkomíšní mok je tvořen v krevních cévách chorioideálního plexu mozkových komor, dále ultrafiltrací krevní plazmy cév pia mater a přestupem z mozkových buněk. Mok za normálních podmínek odtéká z postranních komor mozkových přes foramen

Monroi do třetí komory mozkové a poté přes aqueductus Sylvii do čtvrté komory mozkové. Ze čtvrté komory vytéká do subarachnoideálního prostoru. (Otomar, a kol., 2011)

Reabsorpce likvoru probíhá na základě tlakového gradientu prostřednictvím arachnoidálních klků ve velkých venózních sinusech na konvexitě mozku. Buňky klků obsahují velké vakuoly, díky kterým je likvor transportován do krve. Absorpce mozkomíšního moku do krve je též ovlivňována onkotickým tlakem plazmatických bílkovin – koncentrace plazmatických proteinů je výrazně vyšší než koncentrace proteinů v likvoru. (Trojan, 2003; Otomar, a kol., 2011)

2.1.2. Funkce

Likvor má 4 základní funkce:

- 1) Likvor zajišťuje **ochrannou funkci** tím, že tvoří tzv. vodní plášť kolem mozku a páteřní míchy, čímž nadnáší CNS a chrání ji před mechanickými nárazy a otřesy (Merkunová, a kol., 2008).
- 2) Další funkce mozkomíšního moku je **funkce drenážní**. Metabolity, které v mozku a míše vznikají, jsou odváděny pomocí drenážního mechanismu do likvoru a díky němu jsou odstraněny. Tímto je nahrazen lymfatický oběh v CNS. (Kalvach, a kol., 2010)
- 3) Díky **homeostatické funkci** likvoru je udržováno vhodné prostředí pro buňky CNS. Složení likvoru je konstattní, liší se jen regionálně. (Kalvach, a kol., 2010)
- 4) Likvor plní **výživovou funkci** – přivádí výživné látky, hormony a transmitery. (Šternberk, 2003)

2.1.3. Hematoencefalická bariéra

Hematoencefalická bariéra ovlivňuje transport látek mezi krví a CNS, krví a likvorem, likvorem a CNS, díky tomu nacházíme rozdílné koncentrace látek v séru a v mozkomíšním moku. Mechanismy bariéry jsou mechanické a enzymatické. Mechanický, fyzikální mechanismus je dán obtížnou propustností kapilár danou těsným

spojením endotelových buněk a také organizací neuroglií. Enzymatické mechanismy jsou tvořeny transportními přenašeči a aktivními transportními systémy, které zajišťují koncentrování látek nebo zbavování se látek jiných. Jedná se o selektivní přesun látek jedním nebo oběma směry, průnik může být úplný, částečný nebo také žádný. Díky bariéře je složení likvoru poměrně stálé. (CEVA Education, 2013)

2.2. Vyšetření mozkomíšního moku

Vyšetření mozkomíšního moku se provádí u zánětlivých onemocnění CNS, nádorových onemocnění, neurodegenerativních chorob, cévní mozkové příhody, atd. Analýza likvoru umožní stanovení základní diagnózy, kontrolu průběhu choroby během léčby a podobně. Při vyšetření likvoru je využíváno biochemických analýz, imunologických metod, mikrobiologických stanovení či cytologického vyšetření. (Sobek, 2013)

2.2.1. Indikace k odběru

Vyšetření likvoru je důležitá součást diagnostiky onemocnění CNS. Odběr se indikuje, pokud má lékař podezření na postižení CNS na základě anamnézy a příznaků projevujících se u pacienta. Příznaky poškození CNS jsou variabilní a mohou se překrývat s jiným onemocněním. U akutních stavů je nástup symptomů náhlý (krvácení, infekce), u chronických chorob je naopak plíživý (nádorové onemocnění, mnohočetná skleróza). Mezi příznaky, které se mohou u pacienta objevit, patří například změna v psychickém stavu a vědomí, svalová slabost a vyčerpání, pocity na zvracení, stupňující se chřipkové příznaky, vyrážka, náhlá a výrazná nebo neutichající bolest hlavy, citlivost na světlo, snížená citivost nebo třes, poruchy řeči, poruchy při chůzi, ztráta koordinace, kolísání nálady, deprese a podobně. (Lab Tests Online, 2010)

Indikaci k odběru lze rozdělit (Pecka, 2010):

- 1) *Statimová indikace* – podezření na neuroinfekce, subarachnoidální krvácení, nádorová infiltrace.
- 2) *Subakutní a chronické zánětlivé procesy* – roztroušená skleróza, chronická neuroborelióza, postižení CNS v rámci systémových autoimunitních onemocnění.

- 3) *Méně běžné indikace* – vyšetření má pouze pomocný význam – cévní mozková příhoda, kraniocerebrální onemocnění.

2.2.2. Lumbální punkce

Při lumbální punkci dochází k nabodnutí subarachnoidálního prostoru a odebrání mozkomíšního moku. Vpich se provádí v oblasti bederní páteře ve výši L3-L4, L4-L5 (výška pánevní hrany). V tomto místě nedojde k poškození míchy a nervových zakončení. Odběr se provádí v poloze s maximálně vyklenutou bederní páteří, čímž dojde k oddálení obratlů. Likvor se nejčastěji odebírá v poloze vleže – pacient leží na boku s hlavou sehnutou k přitaženým kolenům. Dále je možná poloha vsedě s vyhrbenými zády. Mozkomíšní mok je odebírán po ošetření dezinfekčním roztokem do sterilní zkumavky bez protisrážlivého a konzervačního roztoku pomocí speciální jehly. Množství získaného likvoru je 10 – 15 ml. (Krajská nemocnice T. Bati, 2012; Mikšová, a kol., 2006)



Obrázek 1: Poloha při lumbální punkci vleže (Krajská nemocnice T. Bati, 2012)



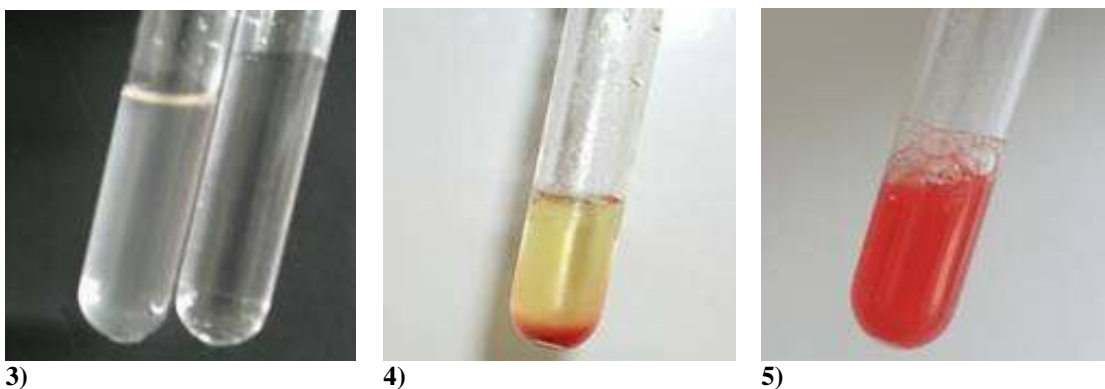
Obrázek 2: Poloha při lumbální punkci vsedě (Krajská nemocnice T. Bati, 2012)

2.2.3. *Druhy vyšetření*

Likvor je co nejdříve po odběru zasílán do daných laboratoří, aby mohla být provedena potřebná vyšetření.

2.2.3.1. *Makroskopický vzhled likvoru*

Před samotnou analýzou je posuzován vzhled likvoru. Zabarvení nám dá předběžnou informaci o tom, co můžeme během dalších vyšetření očekávat. Za fyziologického stavu je likvor čirý a bezbarvý. Pokud je přítomna patologie v CNS může dojít k zakalení či změně zbarvení. Například u bakteriálních zánětlivých onemocnění dochází k zakalení likvoru (zákal je úměrný množství přítomných leukocytů), narůžovělé až červené (erytrochromní) zbarvení značí příměs krve a nažloutlé neboli xantochromní zbarvení je způsobeno přeměnou hemoglobinu na bilirubin, což značí starší krvácení nebo přechod bilirubinu ze séra přes hematolikorovou bariéru při hodnotách vyšších jak 170 mol/l. (CEVA Education, 2013; Dastych, a kol., 2008)



Obrázek 3 (vlevo): rozdíl mezi zakaleným a čirým likvorem (Zilvarová, a kol., 2013)

Obrázek 4 (uprostřed): xantochromní likvor (Zilvarová, a kol., 2013)

Obrázek 5 (vpravo): erythrochromní likvor (Zilvarová, a kol., 2013)

2.2.3.2. *Biochemické vyšetření*

Biochemická analýza likvoru je důležitá součást diagnostiky. Mezi požadovaná vyšetření patří analýza celkové bílkoviny, albuminu, glukózy, laktátu, spektrofotometrie a další. (Sobek, 2013)

- **Celková bílkovina**

Stanovení celkové bílkoviny patří mezi nescifická vyšetření. Jedná se o základní rychlý orientační parametr, který je nezbytný pro stručný celkový pohled a orientačně informuje o permeabilitě hemato-likvorové bariéry. (Sobek, 2013)

K vyšetření je možno využít Pandyho zkoušky či elektroforézu.

Pandyho zkouška – jedná se o kvalitativní stanovení koncentrace proteinů v likvoru. Principem metody je reakce bílkoviny (albuminu a globulinu) s Pandyho činidlem za vzniku modravě bílého zákalu. Výsledek může být hodnocen jako negativní, opalescentní nebo pozitivní (hodnoceno na +, ++, +++). (Fátorová SOPV č. 111, 2013)

Elektroforéza – tato metoda informuje o změnách propustnosti hematoencefalické bariéry, o změnách imunologických, lokálních či difúzních. Interpretace je složitá a vyžaduje zkušenost interpretátora. Častěji se však využívá stanovení jednotlivých proteinů. (Šternberk, 2003)

- **Albumin**

Albumin je do likvoru přesouván z plazmy přes hematolikorovou bariéru, je to tedy vhodný parametr pro posouzení funkčnosti této bariéry. Ze stanoveného albuminu v séru a likvoru se počítá albuminový kvocient (Q_{alb}):

$$Q_{alb} = \text{albumin}_{\text{likvor}} / \text{albumin}_{\text{sérum}}$$

Hodnoty kvocientu jsou závislé jak na permeabilitě bariéry, tak na cirkulaci likvoru. Je též závislý na věku, výrazněji bývá zvýšen u novorozenců. Míra poruchy hematolikorové bariéry je podle výsledných hodnot kvocientu rozdělena na mírně, středně a vysoce porušenou.

Mírně propustná	$Q_{alb} = 7,3 - 10,0 \times 10^{-3}$
Středně propustná	$Q_{alb} = 10,0 - 20,0 \times 10^{-3}$
Vysoce propustná	$Q_{alb} = 20,0 \times 10^{-3}$

(Dastych, a kol., 2008; Sobek, 2009)

- **Glukóza**

Glukóza patří mezi základní zdroj energie pro nervovou tkáň. Koncentrace glukózy v likvoru tvoří asi 60 % sérové hodnoty. Pro zjištění energetických poměrů v likvorovém kompartmentu se využívá stanovení glukózy v likvoru a v krvi, z nichž se následně vypočítá glukózový kvocient (Q_{glu}):

$$Q_{glu} = \text{glukóza}_{\text{likvor}} / \text{glukóza}_{\text{krv}}$$

Norma Q_{glu} je od 0,55 do 0,65. Z klinického pohledu mají význam snížené hodnoty, které značí bakteriální zánět (hodnota může být až nulová), nádorové infiltrace, subarachnoidální krvácení, u kterého glukózu spotřebovávají erytrocyty. (Dastych, a kol., 2008; Kelbich, a kol., 2009)

- **Laktát**

Laktát je produkt anaerobního metabolismu v likvoru. Koncentrace laktátu však není přesným parametrem rozsahu anaerobního metabolismu, jelikož je ovlivněna množstvím glukózy vstupujícím do metabolických procesů, proto je využíván koeficient

energetické bilance (KEB), který podává přesnější informaci o anaerobním metabolismu. (Kelbich, a kol., 2009)

$$\text{KEB} = 38 - 18 \times \text{laktát}_{\text{likvor}} / \text{glukóza}_{\text{likvor}}$$

Koncentrace laktátu se zvyšuje například při poruchách cévního zásobení, intoxikacích, hemoragiích, nádorových onemocnění a zánětlivých stavech CNS. Výrazně zvýšené hodnoty nacházíme u bakteriálních a mykotických infekcí, nikoli u virových. Stanovení tohoto parametru se využívá i ke stanovování prognózy onemocnění. Zvýšené a zvyšující se hodnoty značí probíhající zánět, oproti tomu snižující se hodnoty znamenají úspěšnou léčbu. (Kelbich, a kol., 1998)

- **Chloridy**

Dříve bylo snížení chloridů patognomické pro tuberkulózní zánět CNS, dnes už toto tvrzení neplatí. Význam stanovení chloridů je malý. Snížení hladiny chloridů v likvoru můžeme nacházet u hnisavých (tedy včetně tuberkulózních) zánětů. Je to odraz celkového metabolického rozvratu, v kterém se tito pacienti často nacházejí. Hladina chloridů je rovněž závislá na aktuální chlorémii. (Dufek, 2002)

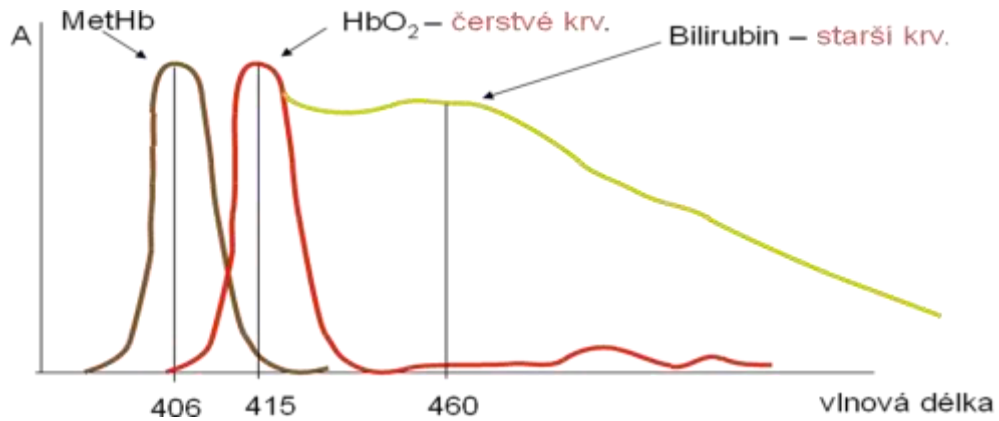
- **Imunoglobuliny**

Stanovení imunoglobulinů patří mezi základní stanovované parametry. Imunoglobuliny nacházíme v mozkomíšním moku buď z důvodu poruchy bariéry, nebo dochází k syntéze přímo v likvoru jako reakce imunitního systému na onemocnění CNS. Důležitý je průkaz intratekální syntézy příslušného imunoglobulinu, který se stanovuje pomocí izoelektrické fokusace (IEF). Současně probíhá analýza likvoru i séra a odečítá se tzv. zrcadlový obraz. Při poruše bariéry nacházíme polyklonální protilátky, kdežto u intratekální syntézy nacházíme protilátky odrážející izolovanou odpověď na daný antigen. Je možné stanovit oligoklonální produkci ve třídě IgG, IgA i IgM a volné lehké řetězce. (Dastych, a kol., 2008; Sobek, 2009)

- **Spektrofotometrické vyšetření**

Spektrofotometrie mozkomíšního moku je využívána při podezření na krvácení do subarachnoidálního prostoru. Tímto stanovením určíme stáří krvácení, a zda se jedná o protražované či opakované krvácení. Likvor je proměřován v rozsahu délek 370 –

600 nm a na základě rozdílných absorpčních maxim můžeme určit, zda se jedná o oxyhemoglobin (při 415 nm), methemoglobin (při 405 nm) nebo bilirubin (při 420 – 460 nm). (Orlickoústecká nemocnice, 2013)



Obrázek 6: Spektrofotometrie likvoru (Šolcová, 2012)

Průkaz oxyhemoglobinu svědčí pro čerstvé krvácení (objevuje se 4 – 8 hod. po začátku krvácení), pozitivní průkaz bilirubinu značí starší subarachnoidální krvácení či výraznou poruchu hematolikvorové bariery s hyperproteinorachií (maxima dosahuje 3. den od začátku krvácení a přetrvává 3 týdny). Přítomnost methemoglobinu může nasvědčovat pro krvácení do preformovaných a metabolicky uzavřených prostorů, například subdurální či epidurální hematom, parenchymový hematom či o prokrvácený tumor CNS. (Dastyh, a kol., 2008; Sobek, 2009)

Makroskopický vzhled likvoru a nález typu buněk souvisí s dobou, která uplynula od ukončení krvácení (viz. Tab. 2)

Tabulka 2: Stáří ukončení krvácení (Pecka, 2010)

Stáří krvácení	Vzhled moku po centrifugaci	Cytologický nález
17 - 24 hod	Velmi slabě nažloutlý	Pleocytóza neutrofilních granulocytů, erythrocyty
do 48 hod	Žlutý	Pleocytóza (asi 50 % neutrofilních granulocytů, aktivované monocyty a erytrofágy), lýza erythrocytů
3 dny	Jasně žlutý	Pleocytóza, pokles počtu neutrofilních segmentů, erytrofágy s vybledlými i dosud zbarvenými erythrocyty, lýza erythrocytů
4 dny	Jasně žlutý	Ústup pleocytózy, neutrofilní segmenty jen ojediněle, erytrofágy jednotlivě i ve skupinách s vybledlými erythrocyty
5 dní	Jasně žlutý	Neutrofilní granulocyty, ojediněle erytrofágy, makrofágy s jemným hemosiderinem
6 dní	Jasně žlutý	Makrofágy s vakuolami (po rozkladu hemoglobinu v erythrocytech), jemná zrnka hemosiderinu v makrofázích
7 dní	Žlutý	Makrofágy s vakuolami, hemosiderofágy
10 dní	Slabě žlutý	Hemosiderofágy jednotlivě i ve skupinách, monocyty, lymfocyty
14 dní	Velmi slabě nažloutlý	Hemosiderofágy s hrubými zrny hemosiderinu, hematoidin, lymfocyty, monocyty
3 týdny	Čirý	Hemosiderofágy
2 - 6 měsíců	Čirý	Kvantitativní nález je normální, v kvalitativní cytologii – ojedinělé hemosiderofágy v rozpadu

2.2.3.3. Mikrobiologické vyšetření

Mikrobiologické vyšetření mozkomíšního moku spočívá v barvení preparátu dle Grama, kultivačním a sérologickým vyšetření moku a případné specifikaci infekčního agens PCR technikou (Černý, 2011). Kultivační vyšetření je dlouho trvající

metoda a klinik vždy nemůže čekat na výsledky tohoto vyšetření pro akutní nebezpečí z prodlení. U tohoto typu vyšetření se také musí myslet na léčbu antibiotiky, pokud byla antibiotická léčba nasazena ještě před odběrem mozkomíšního moku, je možnost kultivačního průkazu infekčního agens značně snížena. (Adam, a kol., 2008)

Zpracování primokultury se může v jednotlivých mikrobiologických laboratořích mírně lišit (Vobejdová, 2013).

U virových a bakteriálních infekcí, kde hrozí nebezpečí z prodlení, je vhodné použít metodu polymerázové řetězové reakce (PCR). PCR je metoda identifikující konkrétní infekční agens. (Adam, a kol., 2008)

V našich podmínkách patří k nejčastějším infekcím meningitidy bakteriální i aseptické, lymeská neuroborelióza, klíšťová meningoencefalitida a herpetické neuroinfekce. K nově objevujícím se infekcím CNS řadíme například HIV a západonilskou horečku. Jako příklad infekcí, které prakticky vymizely, uvádím mozkovou tuberkulózu a neurolyse. (Černý, 2011)

2.2.3.4. Cytologické vyšetření likvoru

Cytologické vyšetření likvoru patří mezi základní vyšetření a dělí se na cytologii kvantitativní a kvalitativní (Štourač, 2013). Kvantifikaci buněk lze provádět pomocí mikroskopické metody nebo na analyzátoru krevních buněk. Kvalitativní hodnocení buněčných elementů nacházejících se v mozkomíšním moku se provádí mikroskopicky.

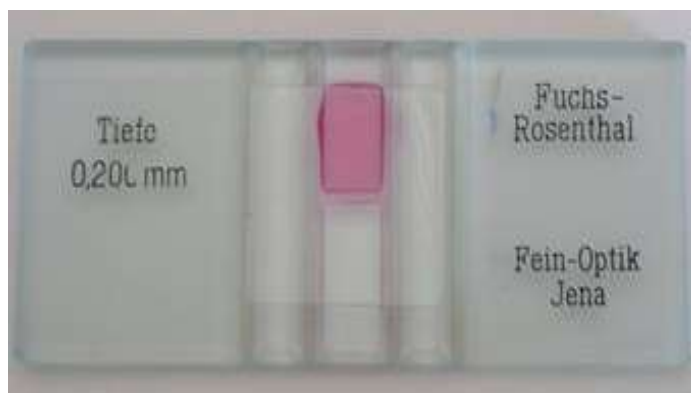
1) Kvantitativní cytologie mozkomíšního moku

Kvantitativní cytologické vyšetření nám dává informaci o počtu přítomných buněk v likvoru (Štourač, 2013).

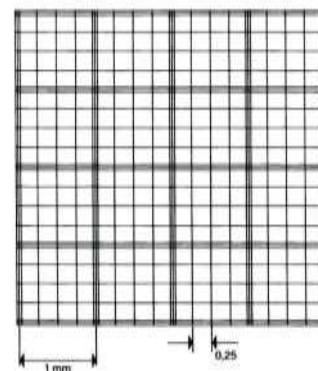
- **Kvantitativní stanovení ve Fuchs-Rosenthalově komůrce**

Buněčnost likvoru zjišťujeme ve Fuchs-Rosenthalově komůrce v nativním vzorku, ve kterém počítáme množství erytrocytů a dále v barveném likvoru pro stanovení množství leukocytů (Kelbich, a kol., 2007). Fuchs-Rosenthalova komůrka má dvě oddělené části, každá je složena z 256 malých čtverců (16 řad) a celkový objem komůrky je 3,2 μ l (Pecka, 2010). K barvení mozkomíšního moku se používá barnátové

barvivo, hodnotíme počet lymfocytů, segmentů a nezařaditelných buněk v $1 \mu\text{l}$ (tzn. počet buněk /3) a sledujeme přítomnost a vzhled erytrocytů při 200násobném zvětšení (Pecka, 2010, Fátorová SOPV č. 110, 2013)



7)



8)

Obrázek 7: Fuchs-Rosenthalova komůrka (Zilvarová, a kol., 2013)

Obrázek 8: Detail Fuchs-Rosenthalovy komůrky (Rozsypal, 2004)

Normální počet buněk je do $10/3 \mu\text{l}$, což nazýváme jako oligocytóza. Za fyziologického stavu jsou v likvoru přítomny pouze mononukleáry (lymfocyty, méně často i monocyty) převážně v klidových formách. Ojediněle můžeme nacházet buňky výstelky likvorových cest. U novorozenců je fyziologicky počet buněk zvýšen až na $90/3 \mu\text{l}$, ale do 4 – 5 měsíců věku dítěte je dosaženo hodnot jako u dospělých jedinců. Kvantitativní hodnocení je pouze orientační stanovení (oligocytóza vždy nevylučuje patologický stav), proto se doporučuje zhotovit trvalý cytologický preparát, ve kterém je možná lepší diferenciací buněčných elementů. (Pecka, 2010)

- **Kvantitativní stanovení na analyzátoru krevních buněk**

Stanovení krevních buněk na analyzátoru využívá impedanční metody a průtokové fluorescenční cytometrie (tzv. optické metody).

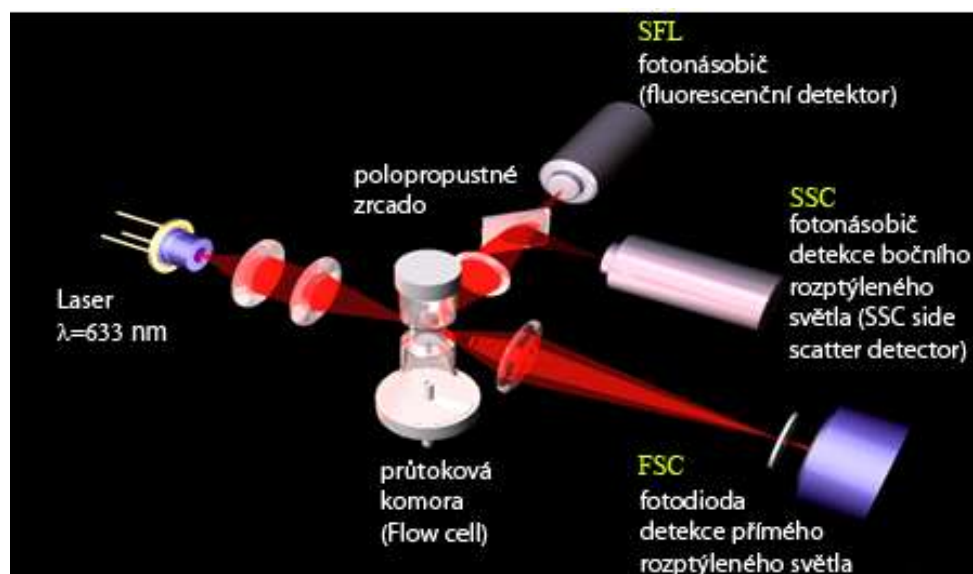
U **impedanční metody** je principem měření pulzu (změny napětí), který vzniká díky negativnímu náboji na membránách buněk. Stejnoseměrný proud nemůže membránou projít a dojde k pulznímu zvýšení elektrického odporu prostředí a změní se napětí mezi elektrodami, které se měří na voltmetru. Následně je vydávána kvantitativní (počet pulzů) a kvalitativní (velikost pulzu) informace o měřených buňkách. (Pecka, 2010)

Optická metoda je založena na principu průtokové fluorescenční cytometrie, u které dochází k proměřování buněčných elementů rozdělených hydrodynamickou fokusací pomocí světelného záření (nejčastěji laser), u něhož se při průchodu buňky sníží optická hustota a dojde k zalomení paprsku detekovaného pod různými úhly. Rozptyl světla do všech směrů je ovlivněn velikostí a vnitřní strukturou (granulace) buňky. Buňky se zároveň obarví fluorescenčním barvivem, u kterého dochází k excitaci fluorochromů laserovým paprskem a následné emisi fluorescenčního záření. Základní parametry analýzy jsou:

Forward scatter channel (FSC) – rozptyl světla v malém úhlu – informace o velikosti buněk

Side scatter channel (SSC) – boční rozptyl – informace o vnitřní struktuře buněk (granulace)

Fluorescence (FL) – informace o strukturách, na které bylo barvivo navázáno. (Beňovská, a kol., 2011; Pecka, 2010)



Obrázek 9: Schéma průtokové fluorescenční cytometrie (Pavlík, 2010)

2) *Kvalitativní cytologie mozkomíšního moku*

Kvalitativní vyšetření buněčných elementů v likvoru přináší informaci o typu a četnosti přítomných buněk. Buněčnou skladbu je možné zjistit z trvalého cytologického preparátu připraveného cytosedimentační metodou či cytocentrifugací a obarveného základním barvením dle Maye-Grünwalda a Giemsy-Romanowského

(Pappenheimova metoda), případně některou z řady speciálních barvicích technik. (Kelbich, a kol., 2007; Sysmex CZ s.r.o., 2010)



10)



11)

Obrázek 10: Sedimentační komůrka (MIKROPUR s.r.o., 2013)

Obrázek 11: Ukázka cytocentrifugy – Cytofuge 12 (StatSpin) (LAB MARK a. s., 2013)

Fyziologicky jsou přítomny v likvoru pouze mononukleáry (lymfocyty a monocyty). U lymfocytů i monocytů rozlišujeme, zdali jsou přítomny v klidové nebo aktivované formě. Monocyty s prokázanou fagocytózou (makrofágy) dále klasifikujeme podle fagocytovaných substrátů na erytrofágy, siderofágy, lymfofágy, leukofágy a lipofágy. (Sysmex CZ s.r.o., 2010)

2.3. Patofyziologie mozkomíšního moku

U cytologického vyšetření se kromě nálezů normálního počtu buněčných elementů a fyziologické morfologie buněk, můžeme setkat s pleocytózou neboli patologickým zvýšením počtu buněk nebo s tzv. patologickou oligocytózou, což odpovídá nálezům buněk v normálním počtu s patologií v morfologii, jako je například přítomnost aktivovaných buněk (Dufek, 2002).

2.3.1. Pleocytóza

Pleocytóza značí patologicky zvýšený počet celulárních elementů v mozkomíšním moku. Podle typu převažujících buněk můžeme pleocytózu rozdělit na granulocytární, lymfocytární, monocytární či tumorózní. (Dufek, 2002; Vokurka, a kol., 2007)

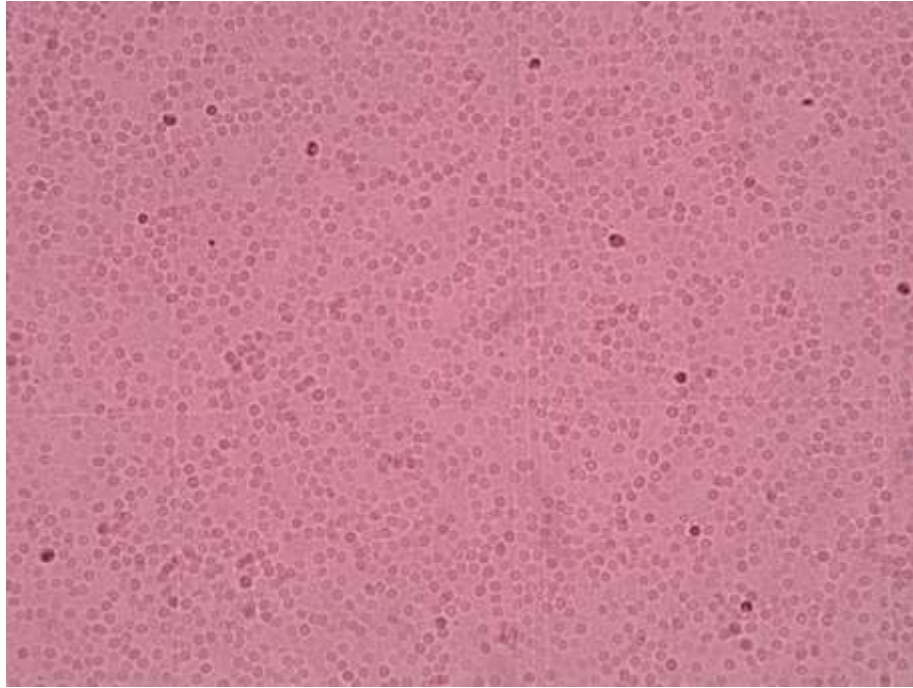
2.3.1.1. Granulocytární pleocytóza

Granulocytární pleocytózu lze dále rozdělit podle převahy jednotlivých druhů granulocytárních buněk na pleocytózu neutrofilních granulocytů, eozinofilních granulocytů a bazofilů. (Kelbich, a kol., 2009)

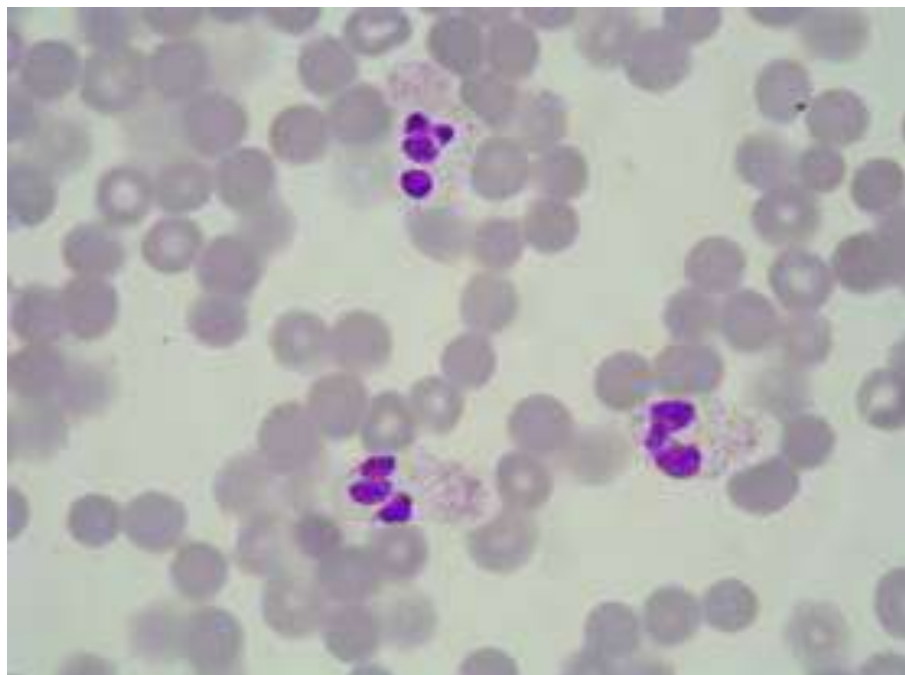
Neutrofilní granulocyty (mikrofágy) jsou buňky nespecifické imunity a mají za úkol fagocytovat a likvidovat příslušné patogenní agens. Účastní se především eliminace extracelulárních bakterií při infekci. Mohou být v mozkomíšním moku přítomny také jako tzv. „preventivní neuroprotektce“ při systémové přítomnosti některých extracelulárních bakterií s vysokou afinitou k CNS (například *Neisseria meningitidis*), přičemž tento stav ještě neznámá patologický proces v CNS, ale jedná se o přípravu na možný průnik patogenních agens do CNS. Neutrofilní granulocyty fagocytují také virové částice, pouze však ve velice časném stádiu virové infekce CNS a následně přechází nespecifická imunitní odpověď ve specifickou, které se dominantně účastní lymfocyty. Příležitostně se neutrofilní granulocyty vyskytují u krvácivých stavů a fagocytují neinfekční substrát – erytrocyty. (Kelbich, a kol., 2009)

Eozinofilní granulocyty mohou být přítomny při alergickém, parazitárním nebo mykotickém onemocnění, u autoimunitních chorob, chronických patologických procesů či po operaci mozku (Pecka, 2010). Výskyt těchto buněčných elementů v mozkomíšním moku s významnějším a dominujícím zastoupením však bývá poměrně vzácný (Kelbich, a kol., 2009).

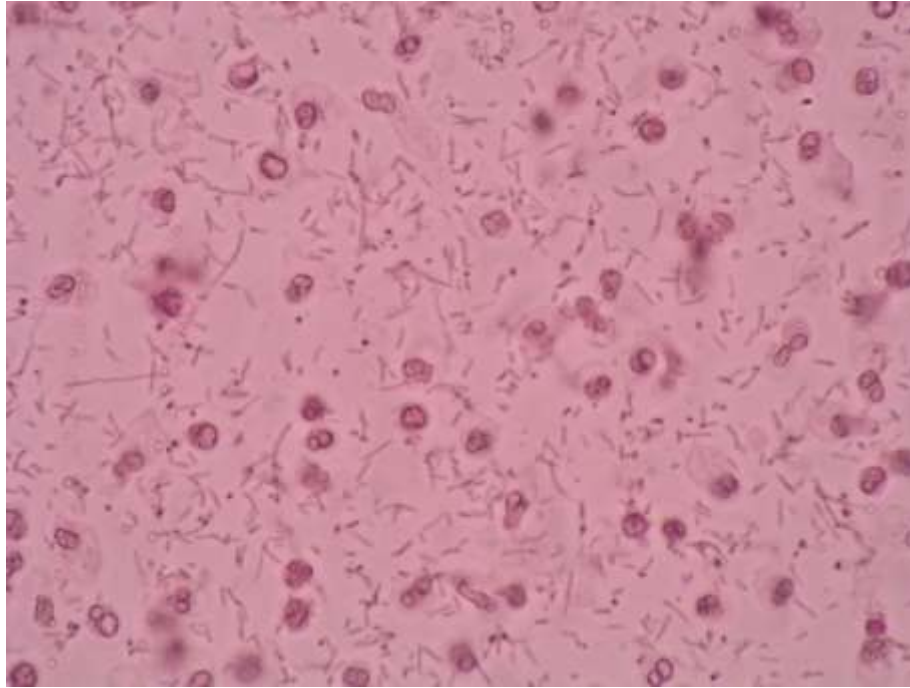
Bazofily bývají přítomny u chronických neuroinfekcí, jako je například listerióza, ale nikdy nebývají převažující buněčnou řadou (Pecka, 2010).



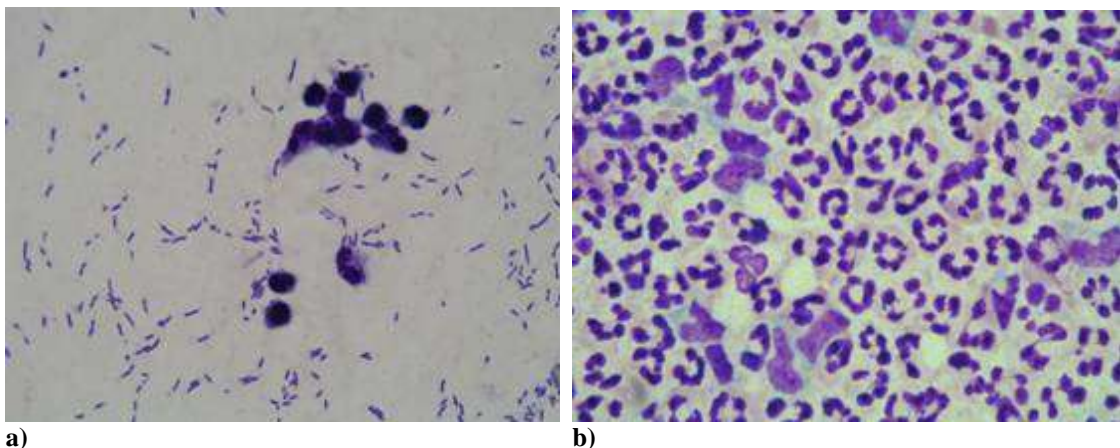
Obrázek 12: Fuchs-Rosenthalova komůrka – subarachnoidální krvácení (neutrofilní granulocyty a erythrocyty) (100x). (Autor fotografie: Ilona Fátorová)



Obrázek 13: Cytologický preparát – subarachnoidální krvácení (neutrofilní granulocyty a erythrocyty) (1000x). (Autor fotografie: Ilona Fátorová)



Obrázek 14: Fuchs-Rosenthalova komůrka – bakteriální meningitida (neutrofilní granulocyty a bakterie) (200x). (Autor fotografie: Ilona Fátorová)



Obrázek 15: Cytologický preparát – a) bakteriální meningitida (neutrofilní granulocyty a bakterie), b) bakteriální meningitida (neutrofilní granulocyty a velké mononukleáry) (1000x). (Autor fotografií: Ilona Fátorová)

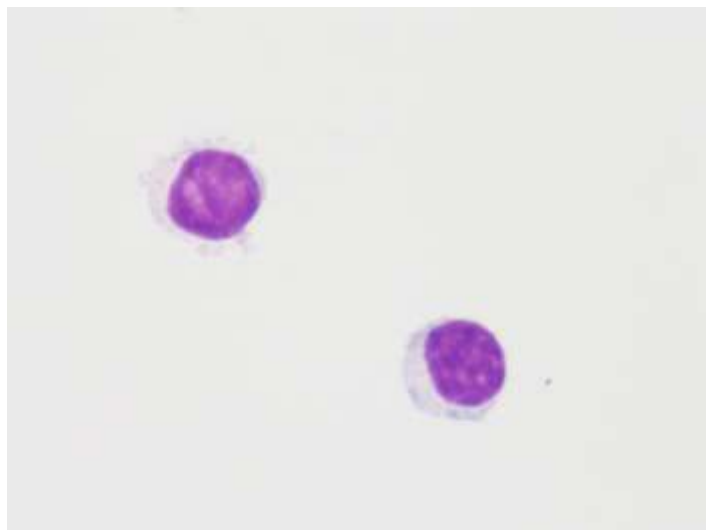
2.3.1.2. Lymfocytární pleocytóza

U lymfocytární pleocytózy můžeme pozorovat aktivované lymfocytární formy, případně plazmatické buňky. Lymfocyty patří funkčně do heterogenní skupiny elementů. Lze je rozdělit na regulační T_H lymfocyty ($CD4^+$), cytotoxické T_C lymfocyty ($CD8^+$), B lymfocyty tvořící protilátky a NK buňky (tzv. přirození zabíječi). Světelnou

mikroskopií lze rozpoznat vyšší aktivovaná stadia B buněk, jako jsou lymfoplazmocyty a plazmocyty, ostatní lymfocyty rozpoznat nelze. Zvýšené počty a aktivace lymfocytů v mozkomíšním moku jsou spojeny s tzv. serózním zánětlivým postižením CNS infekční i neinfekční etiologie po odeznění časné nespecifické zánětlivé odpovědi, nebo s přítomností zánětlivého procesu s oxidačním vzplanutím makrofágů, kterým imunitní systém eliminuje z organismu intracelulární bakterie, kvasinky a plísň. (Kelbich, a kol., 2009)



Obrázek 16: Fuchs-Rosenthalova komůrka – virová meningitida - lymfocyty (100x). (Autor fotografie: Ilona Fátorová)



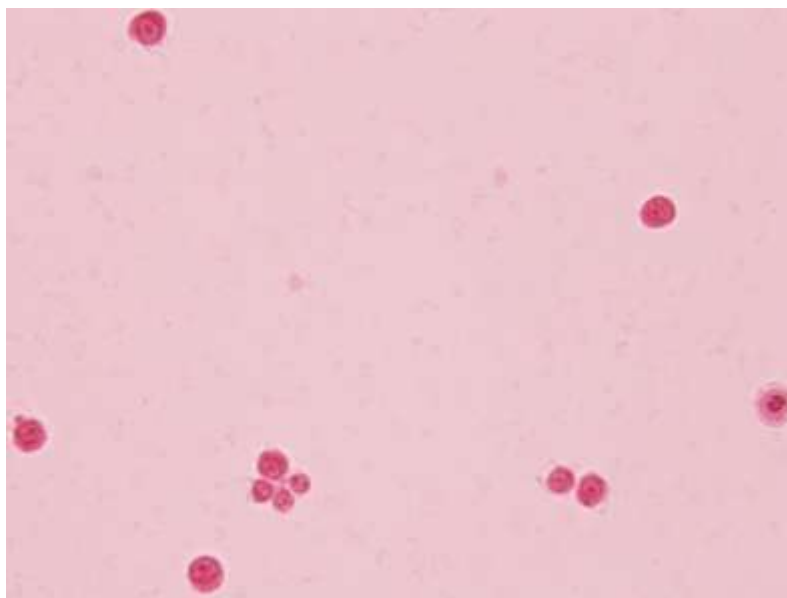
Obrázek 17: Cytologický preparát – virová meningitida - lymfocyty (1000x). (Autor fotografie: Ilona Fátorová)

2.3.1.3. Monocytní pleocytóza

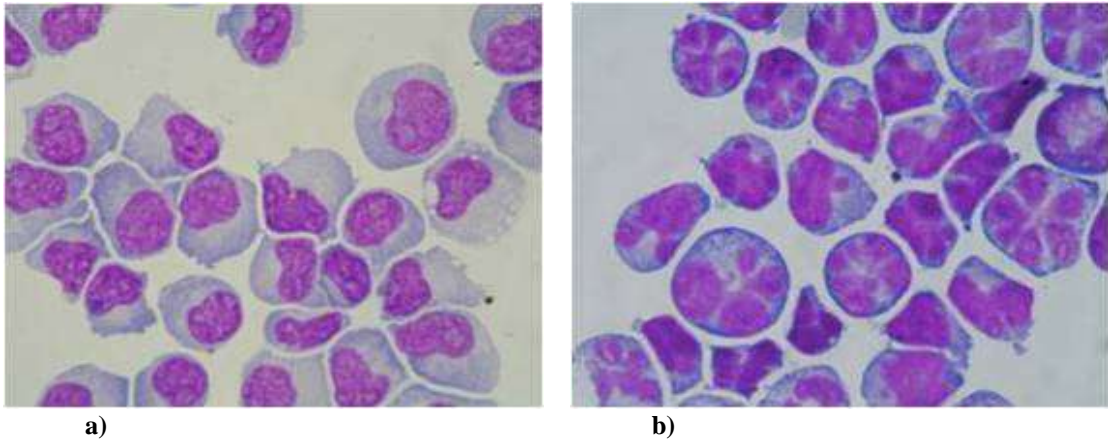
Elementy monocytně-makrofágového systému mají za úkol pohlcovat různé částice endogenního i exogenního původu a po intracelulární úpravě je prezentovat na svém povrchu příslušným lymfocytům, čímž se zapojuje i specifická imunita. Při vyšetření je hodnocena kvantita těchto elementů, morfologické znaky určující míru jejich aktivace a identifikuje se fagocytovaný substrát. Makrofágy můžeme podle fagocytovaného substrátu rozdělit na erytrofágy, siderofágy, leukofágy, lymfofágy a lipofágy, což nám může dát informaci o přítomnosti infekčního agens v CNS, detekovat krvácení do CNS a určit jeho dynamiku, odhalit tkáňový rozpad, určit přítomnost tzv. „pozánětlivé úklidové reakce“ atd. (Kelbich, a kol., 2009; Pecka, 2010)

2.3.1.4. Tumorózní pleocytóza

Nález nádorových buněk v mozkomíšním moku pomocí cytologického vyšetření má velký význam. Cytologie likvoru může být často jedinou metodou, která potvrdí původ nádorového onemocnění a současně umožní i odpovídající onkologickou klasifikaci nálezu. Klasická morfologie nádorových buněk bývá doplněna imunocytologií a molekulární genetikou. Pomocí cytologie je tedy možný průkaz nádorových buněk a také určení procesů, které doprovázejí nádorové onemocnění, například hemoragické a zánětlivé komplikace. (Štourač, a kol., 2009)



Obrázek 18: Fuchs-Rosenthalova komůrka – velké mononukleáry – infiltrace tumorózními buňkami neznámého původu (200x). (Autor fotografie: Ilona Fátorová)



Obrázek 19: Cytologický preparát – a) i b) Akutní lymfoblastická leukémie - lymfoblasty (1000x).
(Autor fotografie: Ilona Fátorová)

2.3.2. Patologická oligocytóza

Patologická oligocytóza značí stav, při kterém je patologie nikoli v počtu, ale ve skladbě a morfologii buněk. Podle buněčných elementů lze patologickou oligocytózu rozdělit na oligocytózu lymfocytární, monocytární, případně lymfo-monocytární, granulocytární a tumorózní. (Dufek, 2002)

2.3.2.1. Patologická granulocytární oligocytóza

Granulocyty by neměly být v likvoru přítomny ani ojedinele. Granulocytární oligocytóza může být zachycena například v počáteční fázi serózního zánětu. Tento stav však netrvá dlouho a přechází v lymfocytární pleocytózu. Také může být granulocytární oligocytóza přítomna u ischemické léze CNS, v tomto případě je však rychlý přechod na monocytární oligocytózu a následně monocytární pleocytózu, nikoli na granulocytární pleocytózu. (Pecka, 2010)

2.3.2.2. Patologická lymfocytární oligocytóza

I za normálních okolností mohou být v mozkomíšním moku lymfocyty ojedinele přítomny. Pokud ale zaznamenáme přítomnost aktivovaných a plazmatických buněk, jedná se o patologický nález. Většinou lymfocytární oligocytóza plynule přechází v lymfocytární pleocytózu. Patologická oligocytóza je přítomna u chronických zánětů a v klidové fázi roztroušené sklerózy. (Adam, a kol., 2009; Pecka, 2010)

2.3.2.3. Patologická monocytární oligocytoza

O patologické oligocytoze mluvíme tehdy, jeli počet monocytů převažující nad lymfocyty a/nebo je vyšší zastoupení aktivovaných monocytů. V častých případech je přítomna fagocytoza. Pokud není zachycen substrát fagocytozy, jedná se o nespecifický nález. Monocytární oligocytoza je přítomna v terminální fázi serózních i purulentních neuroinfekcí, u mozkových ischémii, může doprovázet nádorová onemocnění CNS. (Pecka, 2010)

2.3.2.4. Patologická tumorózní oligocytoza

U tumorózní oligocytozy jsou zachyceny nádorové buňky, které nepřekračují početní normu. Následně dochází k plynulému přechodu tumorózní oligocytozy k pleocytoze. Tato oligocytoza bývá doprovázena buněčnou reakcí, nejčastěji aktivací monocytární řady a fagocytozou maligních buněk, případně mohou být zachyceny neutrofilní granulocyty nebo aktivované lymfocyty, to ale nebývá časté. (Adam, a kol., 2009; Pecka, 2010)

V mozkomíšním moku můžeme nalézt nádorové buňky, které jsou v komůrce těžko rozpoznatelné například od buněk výstelky likvorových cest. Leukemické buňky mohou být v komůrce značně podobné mononukleárním buňkám a nemusí být od sebe rozpoznány. Nádorové buňky splňují většinu z těchto kritérií – polymorfní buňky, polymorfní jádra, četná aktivovaná jádérka, obří buňky, mnohojaderné buňky, zvýšený poměr jádra a cytoplazmy, četné atypické mitózy, bazofilní cytoplazma a další. (Adam, a kol., 2009)

3. Praktická část

3.1. Materiál

Mozkomíšni mok se odebírá do sterilní zkumavky bez protisrážlivého a konzervačního roztoku. Likvor je nutné zpracovat co nejdříve po odběru.

3.1.1. Charakteristika vyšetřovaných vzorků

Mozkomíšni mok byl odebrán pacientům ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové. Sběr výsledků z vyšetření mikroskopickou metodou a z analyzátoru Sysmex XE-5000 probíhal v období od dubna 2010 do března 2013. V tomto časovém období bylo pomocí obou metod vyšetřeno 291 vzorků, 4 vzorky byly vyřazeny z důvodu nemožnosti mikroskopického spočítání buněk (příliš velká záplava buněk ve vzorku), proto byly do statistiky zahrnuty výsledky od 287 odebraných pacientů. V následující tabulce je charakteristika testovaného souboru pacientů (viz. Tab. 3).

Pacienti byli muži, ženy i děti všech věkových skupin s různými diagnózami. Mezi nejčastější diagnózy, při kterých byl odběr likvoru indikován, patří lymeská nemoc, meningitida (bakteriální, tuberkulózní, pneumokoková, nepyogenní, atd.), encefalitida, subarachnoidální krvácení, hydrocefalus. Méně často byla uvedena diagnóza cévní mozková příhoda, bolest hlavy, Bellova nemoc, roztroušená skleróza či různé typy lymfomů a leukémií.

Tabulka 3: Charakteristika testovaného souboru pacientů

Sběr dat od – do	6.4.2010 – 20.3.2013	
Počet vzorků	287	
Počet mužů	151	
Počet žen	136	
Věk – průměr	celkový	51
	muži	54
	ženy	48
Věk – medián	celkový	56
	muži	57
	ženy	52
Věkové rozmezí	1 měsíc – 89 let	

3.2. Metody

K vyšetření mozkomíšního moku jsme využili dvě metody, mikroskopické stanovení ve Fuchs-Rosenthalově komůrce a vyšetření na analyzátoru Sysmex XE-5000 v režimu „Body fluid“, které jsme následně vzájemně porovnávali.

3.2.1. Mikroskopické vyšetření

Vyšetřením likvoru získáme přehled o kvantitě přítomných typů buněk v likvoru. Při přípravě vzorku likvoru na mikroskopii ve Fuchs-Rosenthalově komůrce byl postup následující (Fátorová SOPV č. 110, 2013):

Vybavení a pomůcky:

- Světelný mikroskop Olympus BX 40
- Fuchs-Rosenthalova komůrka
- Barnátové barvivo (Připraveno z lékárny – koncentrovaná kyselina octová, fenol liquefactum, fuchsin 10% vodný roztok, čištěná voda)
- Petriho miska s navlhčenou gázou
- Pasteurovy pipety

Postup:

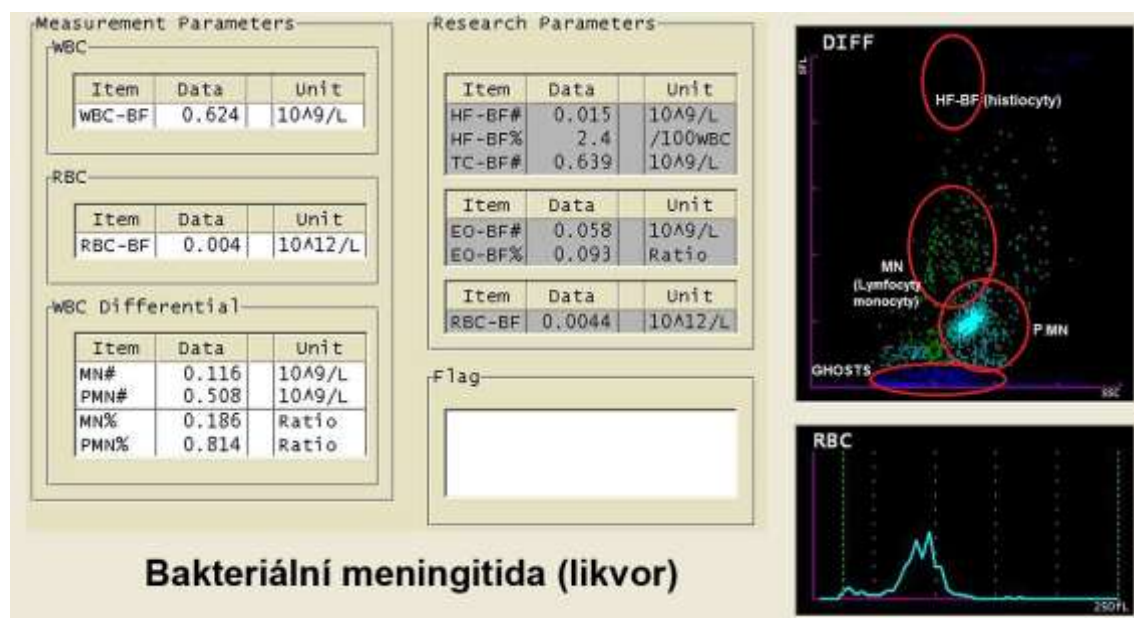
- Do zkumavky napipetovat 225 μ l likvoru a 25 μ l barnátového barviva a nechat působit 5 minut.
- Obarvený likvor Pasteurovou pipetou nakapat do Fuchs-Rosenthalovy komůrky a nechat 5 minut sedimentovat ve vlhkém prostředí (například ve velké uzavřené Petriho misce s navlhčenou gázou).
- Hodnocení preparátu – postupovat dle metody popsané v oddíle 2.2.3.4. Spočítat množství lymfocytů, segmentů, případně jiných buněk (nejčastěji velkých mononukleárů) v celé komůrce, zhodnotit přítomnost a vzhled erytrocytů.
- Jednotlivé počty buněk vydělit třemi. Výsledkem je počet jednotlivých typů buněk v 1 μ l likvoru.

Pokud je mozkomíšní mok příliš buněčný (záplava buněk), je velmi obtížné a někdy i nemožné buňky v likvoru zhodnotit. V takových případech se likvor pouze slovně zhodnotí formou textového komentáře místo číselných hodnot. Slovní popis se využívá i při hodnocení přítomnosti a vzhledu erytrocytů (přítomny ojedinele, četně, záplava; plné, stíny), někdy i v případě zaznamenání neobvyklých buněk.

3.2.2. Sysmex XE-5000, metoda „Body Fluid“

Sysmex XE-5000 je hematologický analyzátor, na kterém se stanovují počty a charakteristiky buněk z plné krve, ale i z ostatních tělních tekutin (serózní tekutina, synoviální tekutina, mozkomíšní mok apod.). (Sysmex CZ s.r.o., 2012)

Pomocí „Body Fluid“ analýzy můžeme v tělních tekutinách stanovit počet leukocytů (WBC-BF), erytrocytů (RBC-BF), mononukleárů (MN, výsledná hodnota v procentech a absolutních hodnotách), polymorfonukleárů (PMN, výsledná hodnota v procentech a absolutních hodnotách) a počet tzv. vysoce fluorescenčních buněk (HF buněk, výsledná hodnota v relativních a absolutních hodnotách), které se nezapočítávají do celkového počtu leukocytů. Jedná se především o aktivované makrofágy, mezotelie, siderofágy nebo i o tumorózní buňky. (Sysmex, 2007)



Obrázek 20: Výstup z analyzátoru Sysmex XE-5000 režim „Body Fluid“ – likvor bakteriální meningitida (Autor výstupu: Ilona Fátorová)

Technické parametry metody „Body Fluid“ (Sysmex CZ s.r.o., 2012; Sysmex, 2007):

- Rychlost BF analýz je 38 vzorků za hodinu
- Objem vzorku: 130 μ l v otevřeném režimu, 200 μ l v uzavřeném režimu
- Opakovatelnost – WBC-BF 30 % nebo méně
- Opakovatelnost – RBC-BF 40 % nebo méně
- Přesnost (celkový počet buněk)
 - WBC-BF $r = 0,9$ nebo více
 - RBC-BF $r = 0,8$ nebo více
- Přesnost (diferenciální rozpočet)
 - MN %, PMN % $r = 0,7$ nebo více
 - MN #, PMN # $r = 0,9$ nebo více
 - MN %, PMN %, MN #, PMN # slope = $1 \pm 0,5$

Reagencie potřebné pro analýzu mozkomíšního moku metodou „Body Fluid“ jsou sepsány v následující tabulce:

Tabulka 4: Reagencie pro metodu „Body Fluid“ na Sysmex XE-5000 (Sysmex, 2007)

Reagencie	Použití
CELLPACK	Ředící roztok pro měření erytrocytů (DC detekce)
CELLSHEATH	Reagencie kombinovaná s ředícím roztokem pro měření erytrocytů (DC detekce)
STROMATOLYSER-4DL	Ředící roztok kombinovaný s barvicím roztokem (STROMATOLYSER-4DS) ke klasifikaci leukocytů (průtoková cytometrie)
STROMATOLYSER-4DS	Barvicí roztok kombinovaný s diluentem (STROMATOLYSER-4DL) ke klasifikaci leukocytů (průtoková cytometrie)
CELLCLEAN	Silný alkalický detergent k promývání analyzátoru mezi analýzami – odstranění reagensů, zbylých buněk apod.

Při přechodu na režim pro stanovení tělních tekutin se analyzátor automaticky promývá, aby byla zajištěna čistota pozadí (počet leukocytů se pohybuje v rozmezí

0 – 1 buňka/ μ l). Na čistotu pozadí je kladen velký důraz, proto může být promývání za sebou vícekrát opakováno. Analyzátor se automaticky promývá i mezi každou analýzou a tím je zabráněno možným interferencím mezi jednotlivými vyšetřovanými vzorky. (Sysmex CZ s.r.o., 2011)

Technologické principy měření u „Body Fluid“ modu jsou fluorescenční průtoková cytometrie (WBC, DIFF) a impedanční metoda hydrodynamické fokusace (RBC). (Sysmex CZ s.r.o., 2011)

- Fluorescenční průtoková cytometrie

Jedná se o optickou metodu, která měřením fyzikálních vlastností, jako je velikost a vnitřní struktura buňky, určí kvalitu a kvantitu buněčných populací. Buňky lze obarvit fluorescenčním barvivem. Fluorescenční barviva se váží a interagují s různými buněčnými složkami, jako je například DNA nebo RNA. U buněk označených fluorescenční barvou dojde po průchodu světelným zdrojem (laserem) k excitaci fluorochromu a následné emisi záření. (Brown, a kol., 2000)

Před samotným procesem měření musí analyzovaný vzorek projít preanalytickou úpravou, což zahrnuje ředění a chemické reakce. Buňky jsou následně obarveny fluorescenčním barvivem a v suspenzi pomocí tenkého laminárního proudu protékají kapilárou, což umožňuje buňkám jednotlivě projít přes měřicí paprsek monochromatického světla (laser), který protíná buňky. Emitované světlo je vyzařováno ve všech směrech a pomocí optiky, filtrů a zrcadel, dochází k izolaci konkrétních vlnových délek. Každá buňka vykazuje specifické charakteristiky signálů, které jsou zaznamenány třemi fotodetektory (forward scatter detektor, side scatter detektor, boční fluorescenční detektor) a následně zobrazeny v počítači jako výsledek měření (konkrétní hodnota a scattergram). (Brown, a kol., 2000; Pavlík, 2010)

Jak již bylo řečeno dříve v teoretické části, základními měřenými parametry v průtokové fluorescenční cytometrii jsou: rozptyl světla v malém úhlu podávající informace o velikosti buněk = Forward Scatter Channal (FSC), boční rozptyl, který informuje o vnitřní struktuře buněk (granulace) = Side Scatter Channal (SSC) a následně informace o strukturách fluorescenčně nabarvených = Fluorescence (FL). (Beňovská, a kol., 2011)

Tímto způsobem se na analyzátoru Sysmex XE-5000 v režimu „Body Fluid“ stanovuje celkový počet leukocytů, dále počty polymorfonukleárů, mononukleárů a HF buněk. (Sysmex, 2007)

- Hydrodynamická fokusace – DC detekce (Impedanční měřicí metoda)

Pomocí hydrodynamické fokusace dojde k rozdělení buněk v suspenzi tak, aby postupovaly v řadě jedna za druhou a každá mohla být jednotlivě proměřena. Suspenze buněk je tryskou (tenká kapilára) vháněna do trubice (silnější kapilára), ve které proudí nosná kapalina rychleji. Dojde ke strhávání buněk proudem a tím k usměrnění jejich pohybu. Buněčné elementy se rovnoměrně rozprostřou a udržují mezi sebou vhodnou vzdálenost. Hydrodynamická fokusace zefektivňuje a zpřesňuje celkové měření, dojde ke zvýšení účinnosti metody. (Beňovská, a kol., 2011; Pavlík, 2010)

Kvantita buněk je stanovována pomocí impedanční analýzy. Díky metodě hydrodynamické fokusace procházejí buněčné elementy jednotlivě za sebou průtokovou měřicí kyvetou, ve které jsou měřeny změny elektrického odporu (impedance) mezi dvěma elektrodami. Projde-li částice mezi elektrodami, dojde ke vzniku impedančního impulzu. Počet impulzů za časovou jednotku odpovídá počtu buněk v hodnoceném vzorku. (Penka, a kol., 2011)

Tímto způsobem se na analyzátoru Sysmex XE-5000 v modu „Body Fluid“ stanovují erytrocyty. (Sysmex, 2007)

3.3. Výsledky

3.3.1. Statistické zpracování

Naším úkolem bylo porovnat tyto dvě metody, pomocí kterých je možné určit počet buněk v mozkomíšním moku. Pro statistické zpracování jsme využili Bland-Altmanovy grafy. Tyto grafy hodnotí vztah rozdílu hodnot získaných oběma metodami (na ose y) k průměru těchto hodnot (na ose x). Také jsme srovnali hodnoty nízkobuněčných vzorků stanovených mikroskopickou metodou a metodou „Body Fluid“ na analyzátoru Sysmex XE-5000 s vyznačením limitů pro normální nález, toto porovnání slouží pro zachycení falešně negativních výsledků naměřených oběma metodami. Na 10 vzorcích o dostatečném objemu jsme ověřili opakovatelnost analyzátorové metody, kdy jsme opakovaně v krátkých časových intervalech po sobě měřili v režimu „Body Fluid“ stejný vzorek mozkomíšního moku. Z naměřených hodnot jsme vypočetli variační koeficient. Na 4 vzorcích likvoru o dostatečném objemu jsme zkusili ověřit stabilitu materiálu v čase. Statistické a grafické vyhodnocení jsme provedli pomocí Microsoft Office Excel 2007. (Dohnal, 2000; Hendl, 1997; Pernikář, 2005)

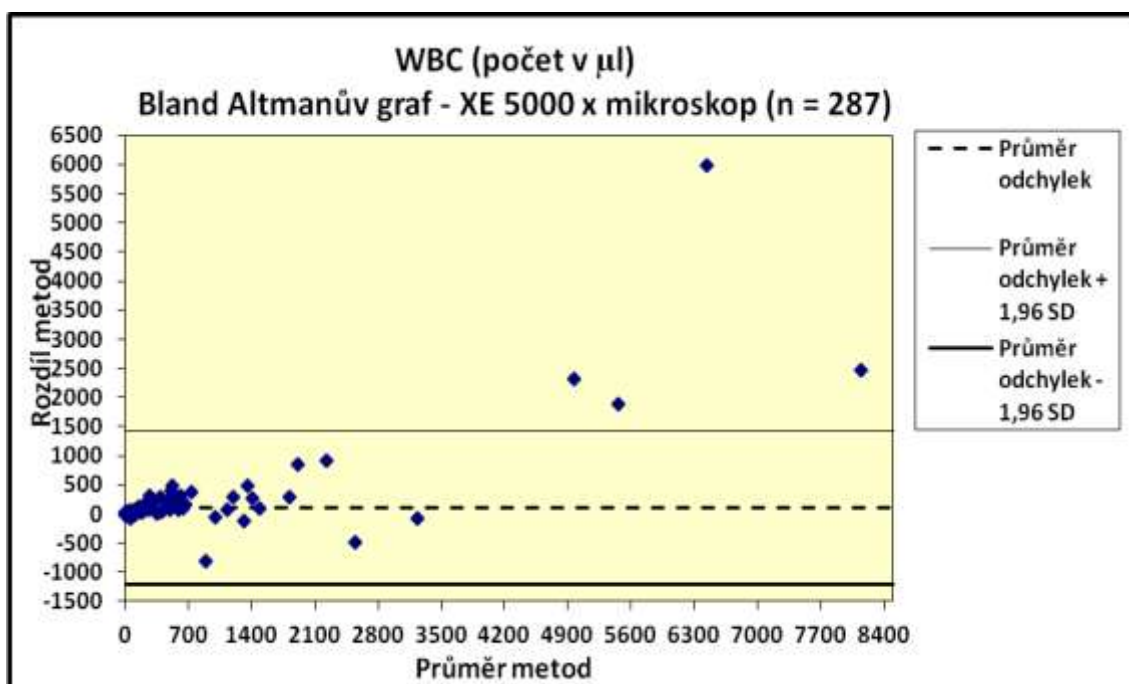
3.3.2. Bland-Altmanovy grafy

Bland-Altmanovy grafy jsou vytvořeny pro porovnání celkového počtu leukocytů, polymorfonukleárů, mononukleárů (graf 1 – 3) a také pro počet leukocytů, PMN a MN vyšší než 100 buněk v 1 μ l (graf 4 – 6) a nižší než 100 buněk v 1 μ l (graf 7 – 9). Pro přehlednost jsou v tabulce před danými grafy zaznamenány hodnoty, ze kterých jsme vycházeli.

- Leukocyty - celý soubor

Tabulka 5: Údaje ke grafu 1

Potřebné údaje pro vytvoření Bland-Altmanova grafu – WBC	
Výpočet rozdílů (XE-5000 – Mikroskopie) a průměrů z naměřených hodnot u jednotlivých vzorků	
Průměr (z vypočítaných rozdílových hodnot)	110,2
SD (z vypočítaných rozdílových hodnot)	672,4
1,96*SD	1317,9
Průměr + 1,96 SD	1428,1
Průměr - 1,96 SD	-1207,7

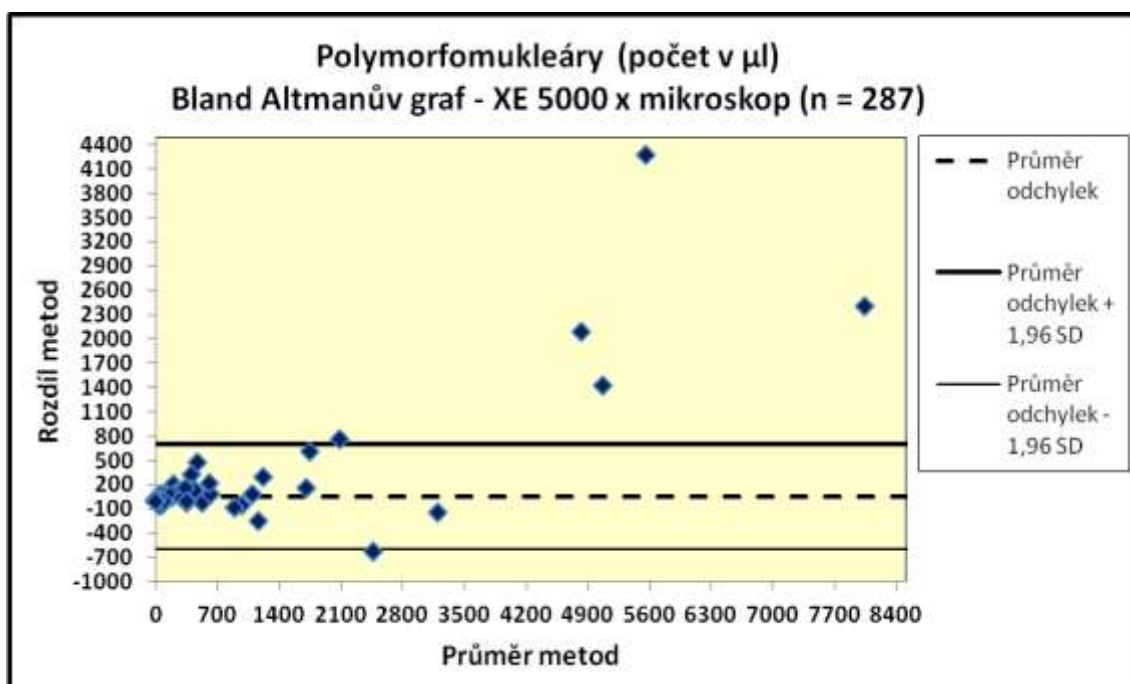


Graf 1: Bland-Altmanův graf – leukocyty

- Polymorfonukleáry – celý soubor

Tabulka 6: Údaje ke grafu 2

Potřebné údaje pro vytvoření Bland-Altmanova grafu – PMN	
Výpočet rozdílů (XE-5000 – Mikroskopie) a průměrů z naměřených hodnot u jednotlivých vzorků	
Průměr (z vypočítaných rozdílových hodnot)	82,3
SD (z vypočítaných rozdílových hodnot)	602,9
1,96*SD	1181,7
Průměr + 1,96 SD	1264,0
Průměr-1,96 SD	-1099,5

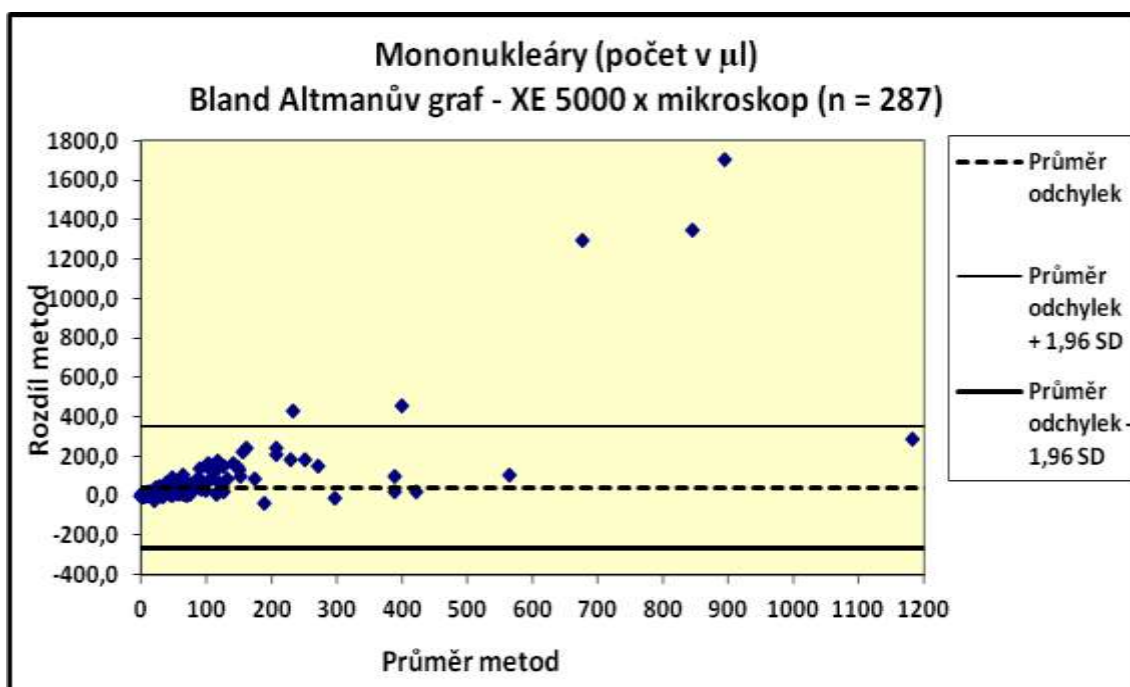


Graf 2: Bland-Altmanův graf – polymorfonukleáry

- Mononukleáry – celý soubor

Tabulka 7: Údaje ke grafu 3

Potřebné údaje pro vytvoření Bland-Altmanova grafu – MN	
Výpočet rozdílů (XE-5000 – Mikroskopie) a průměrů z naměřených hodnot u jednotlivých vzorků	
Průměr (z vypočítaných rozdílových hodnot)	40,4
SD (z vypočítaných rozdílových hodnot)	157,8
1,96*SD	309,3
Průměr + 1,96 SD	349,7
Průměr-1,96 SD	-268,9

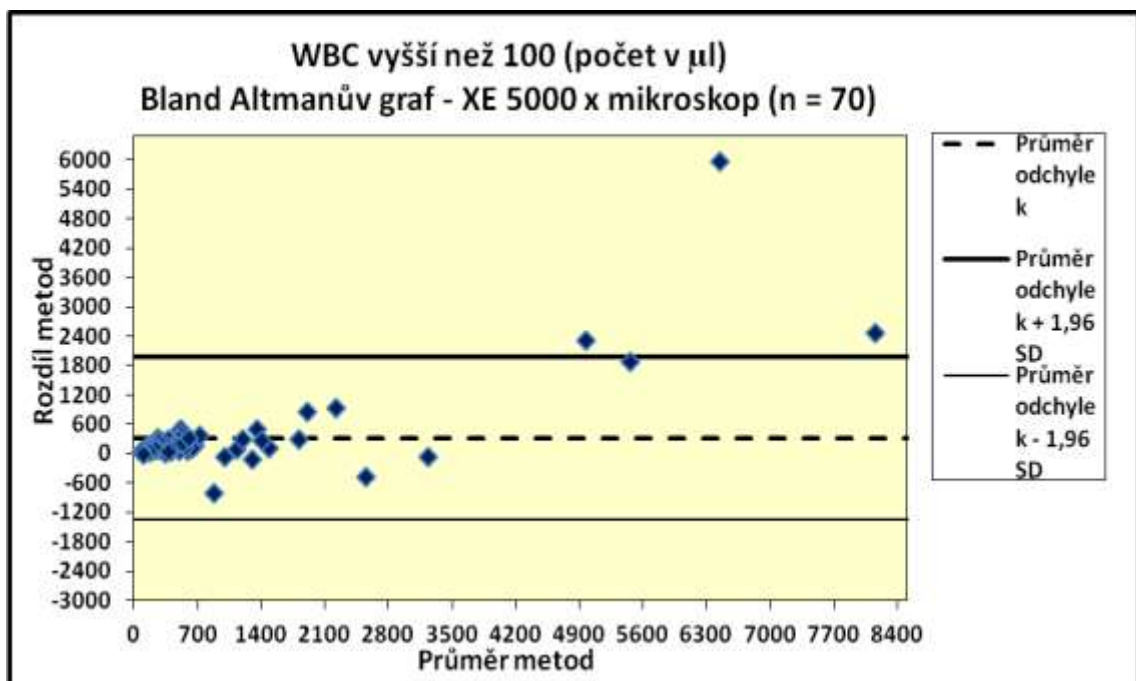


Graf 3: Bland-Altmanův graf – mononukleáry

- Leukocyty – hodnoty vyšší než 100 buněk v 1 μ l

Tabulka 8: Údaje ke grafu 4

Potřebné údaje pro vytvoření Bland-Altmanova grafu – WBC vyšší než 100 buněk v 1 μ l	
Výpočet rozdílů (XE-5000 – Mikroskopie) a průměrů z naměřených hodnot u jednotlivých vzorků	
Průměr (z vypočítaných rozdílových hodnot)	428,6
SD (z vypočítaných rozdílových hodnot)	1318,2
1,96*SD	2583,6
Průměr + 1,96 SD	3012,2
Průměr-1,96 SD	-2155,0

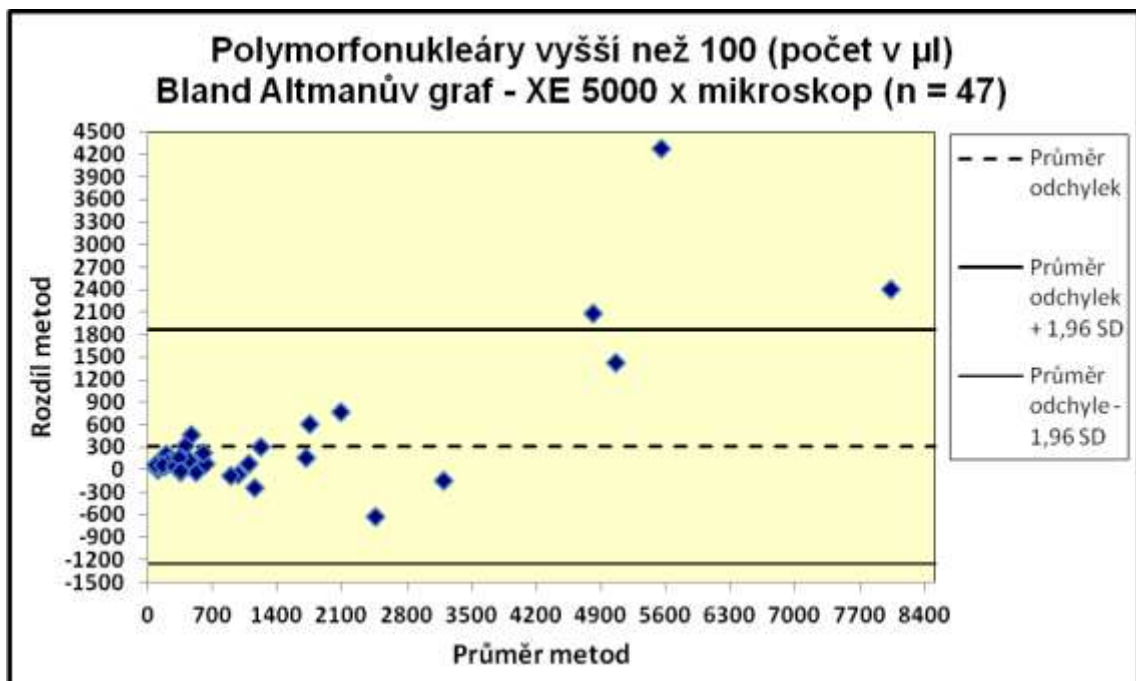


Graf 4: Bland-Altmanův graf – leukocyty vyšší než 100 v 1 μ l

- **Polymorfonukleáry – hodnoty vyšší než 100 buněk v 1 μ l**

Tabulka 9: Údaje ke grafu 5

Potřebné údaje pro vytvoření Bland-Altmanova grafu – PMN vyšší než 100 buněk v 1 μ l	
Výpočet rozdílů (XE-5000 – Mikroskopie) a průměrů z naměřených hodnot u jednotlivých vzorků	
Průměr (z vypočítaných rozdílových hodnot)	482,6
SD (z vypočítaných rozdílových hodnot)	1436,6
1,96*SD	2815,7
Průměr + 1,96 SD	3298,2
Průměr-1,96 SD	-2333,1

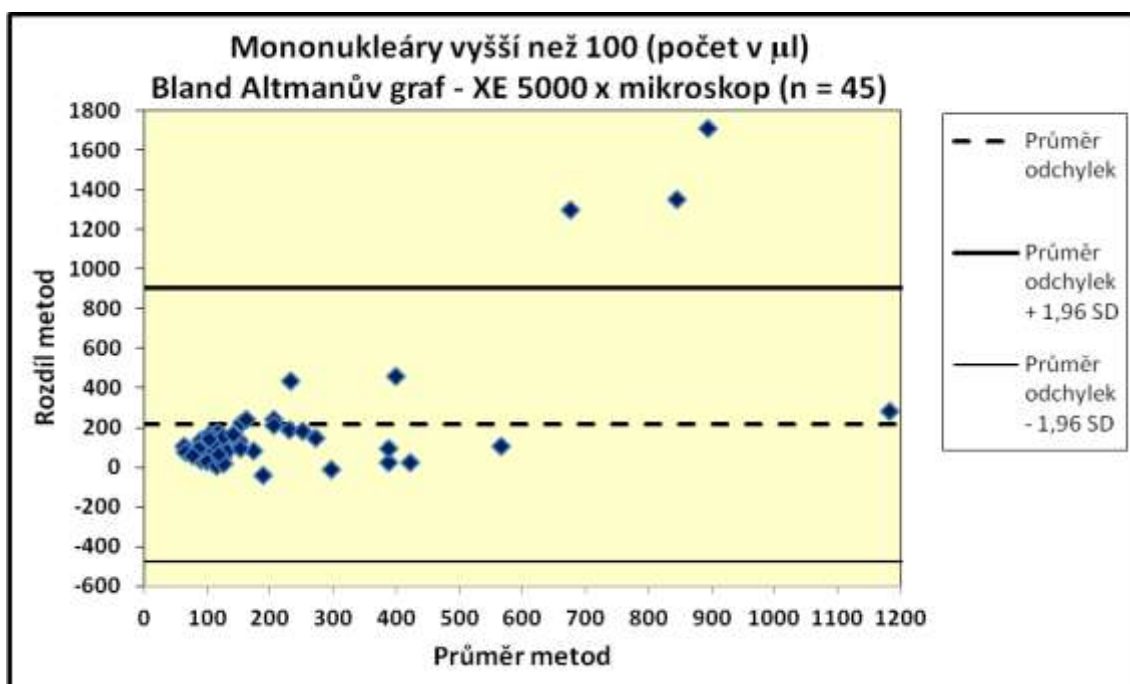


Graf 5: Bland-Altmanův graf – polymorfonukleáry vyšší než 100 v 1 μ l

- **Mononukleáry – hodnoty vyšší než 100 buněk v 1 μ l**

Tabulka 10: Údaje ke grafu 6

Potřebné údaje pro vytvoření Bland-Altmanova grafu – MN vyšší než 100 buněk v 1 μ l	
Výpočet rozdílů (XE-5000 – Mikroskopie) a průměrů z naměřených hodnot u jednotlivých vzorků	
Průměr (z vypočítaných rozdílových hodnot)	214,9
SD (z vypočítaných rozdílových hodnot)	351,9
1,96*SD	689,7
Průměr + 1,96 SD	904,6
Průměr-1,96 SD	- 474,8

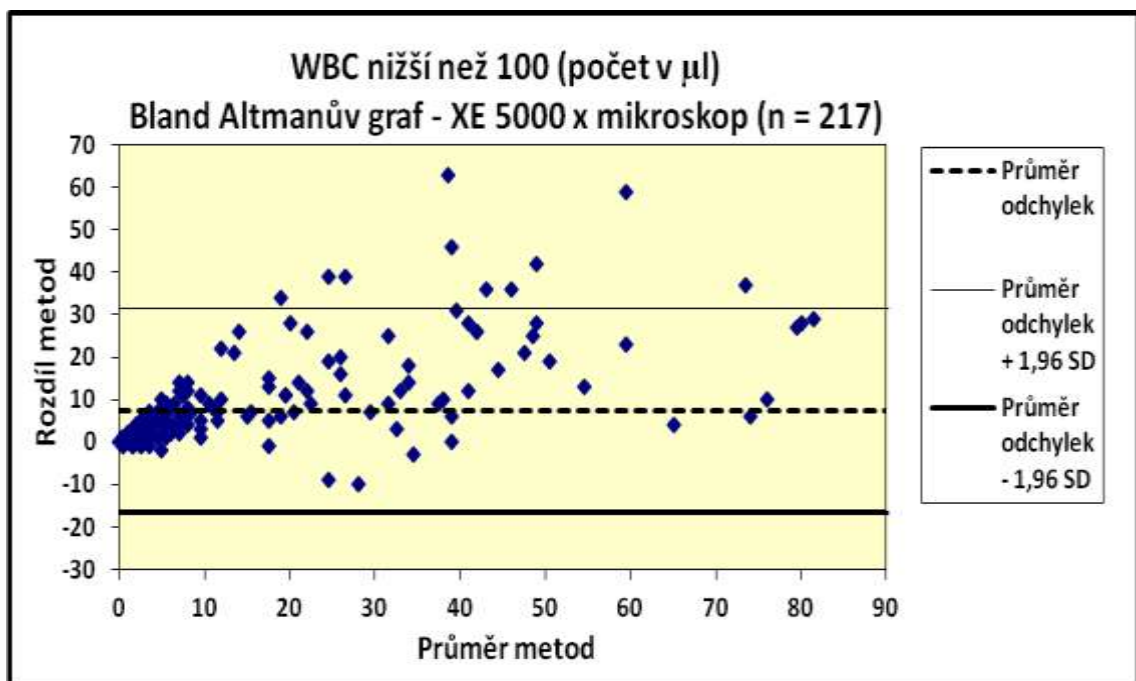


Graf 6: Bland-Altmanův graf – mononukleáry vyšší než 100 v 1 μ l

- Leukocyty – hodnoty nižší než 100 buněk v 1 μ l

Tabulka 11: Údaje ke grafu 7

Potřebné údaje pro vytvoření Bland-Altmanova grafu – WBC nižší než 100 buněk v 1 μ l	
Výpočet rozdílů (XE-5000 – Mikroskopie) a průměrů z naměřených hodnot u jednotlivých vzorků	
Průměr (z vypočítaných rozdílových hodnot)	7,5
SD (z vypočítaných rozdílových hodnot)	12,3
1,96*SD	24,1
Průměr + 1,96 SD	31,6
Průměr-1,96 SD	-16,6

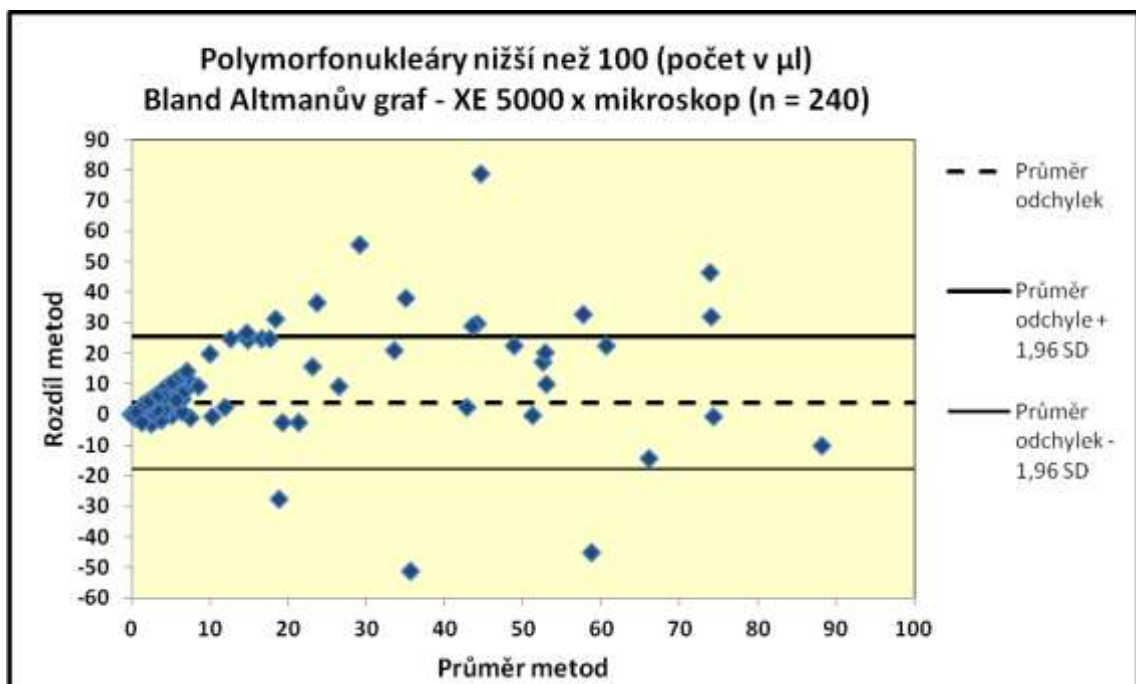


Graf 7: Bland-Altmanův graf – leukocyty nižší než 100 v 1 μ l

- **Polymorfonukleáry – hodnoty nižší než 100 buněk v 1 μ l**

Tabulka 12: Údaje ke grafu 8

Potřebné údaje pro vytvoření Bland-Altmanova grafu – PMN nižší než 100 buněk v 1 μ l	
Výpočet rozdílů (XE-5000 – Mikroskopie) a průměrů z naměřených hodnot u jednotlivých vzorků	
Průměr (z vypočítaných rozdílových hodnot)	3,9
SD (z vypočítaných rozdílových hodnot)	11,1
1,96*SD	21,8
Průměr + 1,96 SD	25,7
Průměr-1,96 SD	-17,9

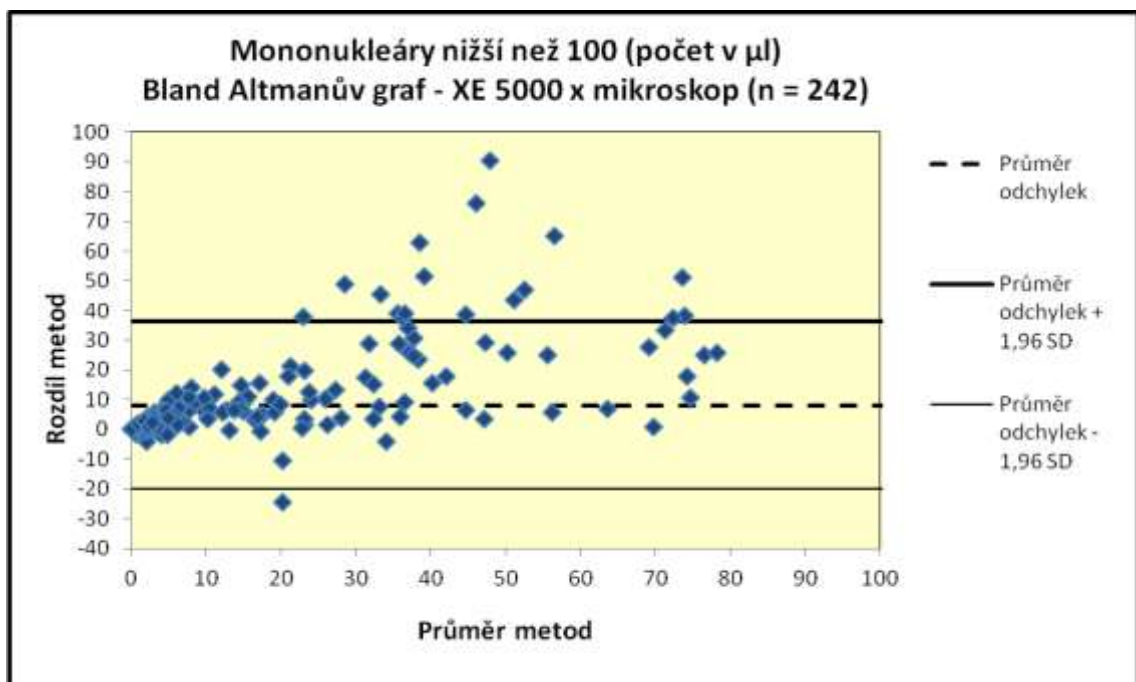


Graf 8: Bland-Altmanův graf – polymorfonukleáry nižší než 100 v 1 μ l

- **Mononukleáry – hodnoty nižší než 100 buněk v 1 μ l**

Tabulka 13: Údaje ke grafu 9

Potřebné údaje pro vytvoření Bland-Altmanova grafu – MN nižší než 100 buněk v 1 μ l	
Výpočet rozdílů (XE-5000 – Mikroskopie) a průměrů z naměřených hodnot u jednotlivých vzorků	
Průměr (z vypočítaných rozdílových hodnot)	8,1
SD (z vypočítaných rozdílových hodnot)	14,4
1,96*SD	28,1
Průměr + 1,96 SD	36,2
Průměr-1,96 SD	-20,1



Graf 9: Bland-Altmanův graf – mononukleáry nižší než 100 v 1 μ l

3.3.3. Srovnávací grafy

Na následujícím grafu je prezentováno srovnání hodnot nízkobuněčných vzorků (naměřené hodnoty do 100 buněk v μl) stanovených mikroskopickou metodou a metodou „Body Fluid“ na analyzátoru Sysmex XE-5000 s vyznačením limitů pro normální nález (fyziologická oligocytóza). Limity pro analyzované buněčné elementy jsou uvedeny v tabulce 14. Porovnání slouží pro zachycení falešně negativních výsledků naměřených oběma metodami.

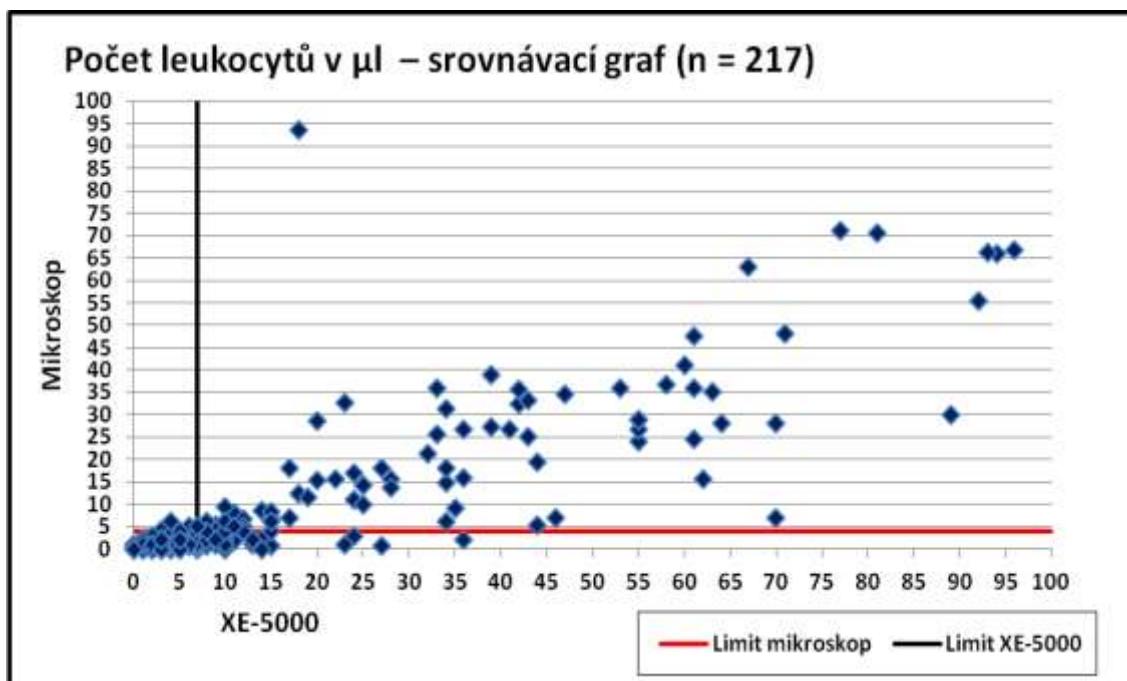
Tabulka 14: Fyziologická oligocytóza (Fátorová SOPV č. 110, 2013; Pešková, 2013)

	Mikroskop		Analyzátor	
	Výstupní hodnota	Přepočet na μl	Výstupní hodnota	Přepočet na μl
Leukocyty	nevydávají se	3 - 4	$0,007 \times 10^9/l$	7
Lymfocyty*	10/3	3 - 4	$0,007 \times 10^9/l$	7
Segmenty	0/3	0	$0,003 \times 10^9/l$	3
Velké MN**	0/3 (slovně)	0	nevydávají se	-
Eozinofily	nevydávají se	-	$0,000 \times 10^9/l$	0
HF buňky***	nevydávají se	-	$0,000 \times 10^9/l$	0
Erytrocyty	0/3 (slovně)	0	$0,000 \times 10^9/l$	0

* Analyzátor hodnotí MN (lymfocyty + monocyty)

**Velké MN – monocyty, makrofágy, mezotelie, tumorózní buňky

***HF buňky – makrofágy, mezotelie, tumorózní buňky



Graf 10: Srovnávací graf – leukocyty

Falešná negativita u leukocytů byla zaznamenána celkově u 37 vzorků. Z toho byly u metody „Body Fluid“ stanoveny 4 vzorky jako falešně negativní a u mikroskopické metody to bylo zbylých 33 vzorků.

Tabulka 15: Falešně negativní vzorky

	Falešně negativní vzorky – metoda „Body Fluid“	Falešně negativní vzorky – mikroskopická metoda
Leukocyty	4	33

3.3.4. Opakovatelnost

U deseti vzorků jsme ověřovali opakovatelnost v sérii. Každý vzorek mozkomíšního moku byl proměřen metodou „Body Fluid“ na analyzátoru Sysmex XE-5000 pětkrát v krátkých časových intervalech po sobě. Mezi opakovaným proměřováním nebyl stanovován jiný vzorek. Následně jsme z opakovaných měření vypočítali průměrnou hodnotu, směrodatnou odchylku a variační koeficient (viz. Tab. 16).

Tabulka 16: Souhrn výsledků – opakovatelnost

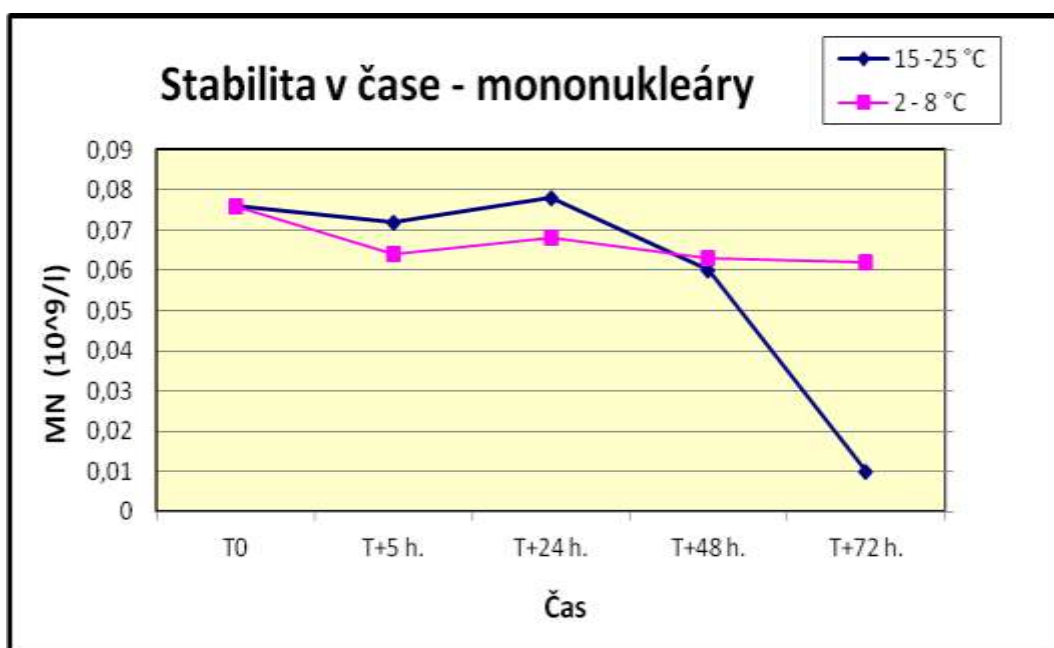
<i>Pacient</i>	<u>Průměr</u>		<u>SD</u>		<u>CV</u>	
	<i>WBC</i>	<i>RBC</i>	<i>WBC</i>	<i>RBC</i>	<i>WBC</i>	<i>RBC</i>
1	0,336	0	0,00757	0	22,5288	0
2	1,4324	0,003	0,032876	0	2,295136	0
3	1,3356	0,001	0,011845	0	0,886855	0
4	0,268	0	0,001673	0	0,624373	0
5	0,0116	0	0,001342	0	11,56587	0
6	0,4196	0,0056	0,013903	0,000548	3,31345	9,78076
7	0,0122	0	0,003033	0	24,86189	0
8	0,2608	0,0018	0,020801	0,000447	7,976013	24,8452
9	0,162	0,009	0,006124	0	3,780077	0
10	0,4554	0	0,033516	0	7,359611	0

Jak již bylo uvedeno dříve v technických parametrech analyzátoru, hodnoty opakovatelnosti pro WBC-BF jsou 30 % nebo méně a pro RBC-BF je to 40 % nebo méně.

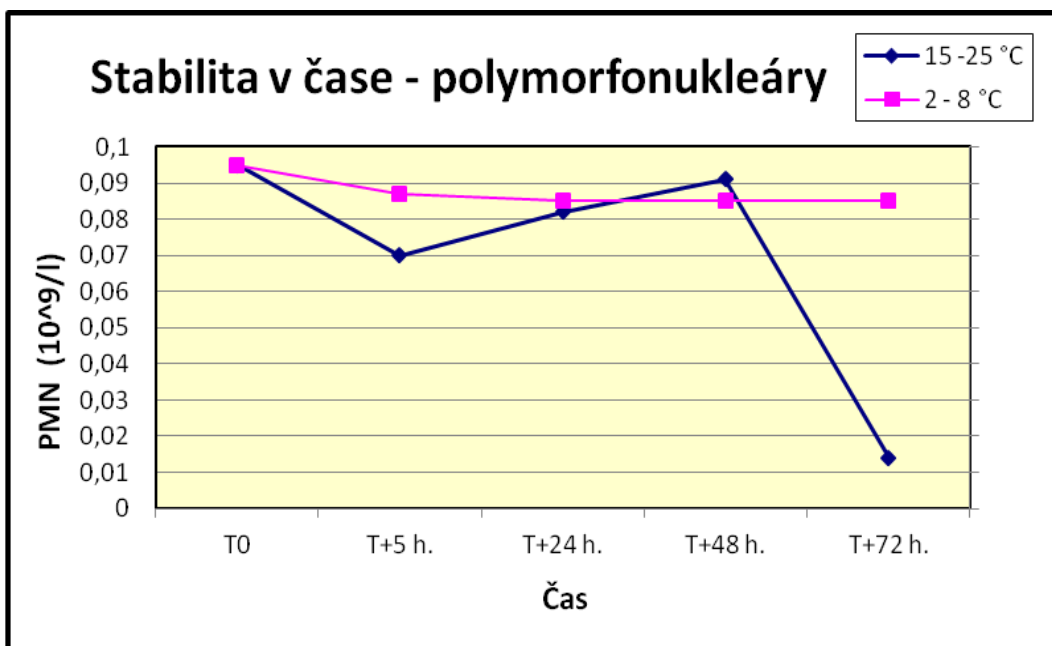
3.3.5. *Stabilita v čase*

Při stanovování počtu buněk v rámci sledování stability v čase, byl vzorek mozkomíšního moku rozdělen do dvou zkumavek. Jedna zkumavka byla mezi měření uchovávána při pokojové teplotě a druhá zkumavka se vzorkem byla uchovávána v chladničce. Měření obou vzorků metodou „Body Fluid“ na analyzátoru Sysmex XE-5000 probíhalo celkem pětkrát – po přijetí vzorku do laboratoře (T0), za 5 hodin po prvním měření (T+5), za 24 hodin po prvním měření (T+24), za 48 hodin po prvním měření (T+48) a naposledy za 72 hodin po prvním měření (T+72). Takto jsme proměřili celkem čtyři vzorky likvoru o dostatečném objemu.

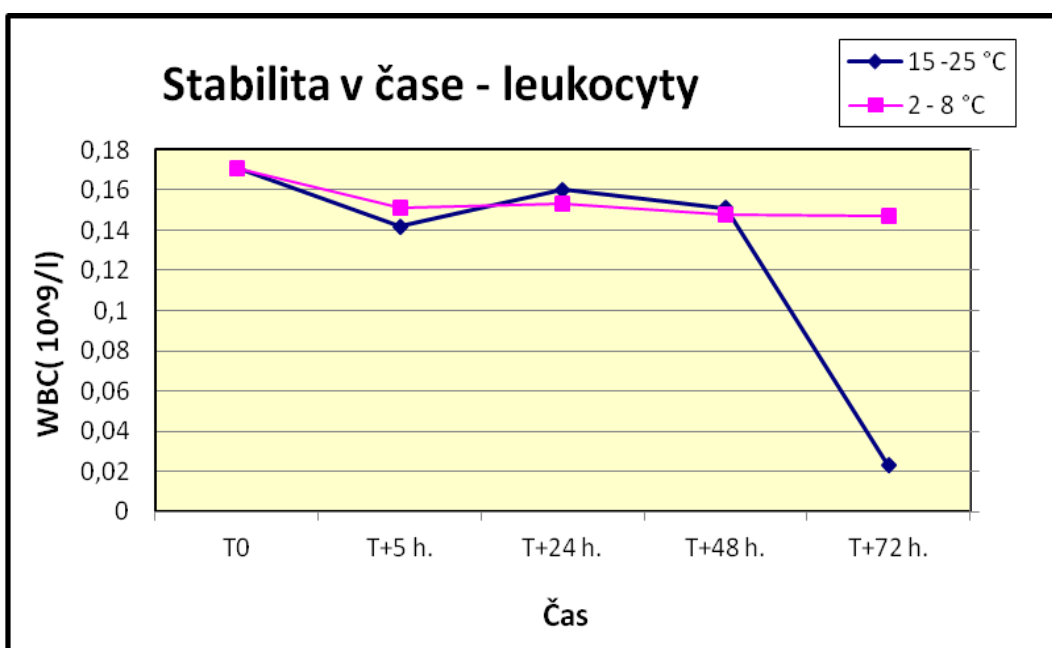
Na ukázkou uvádím výsledné grafy, které vznikly z proměření vzorku od jednoho pacienta. Jde o čtyři grafy, na kterých je znázorněna stabilita v čase pro mononukleáry, polymorfonukleáry, leukocyty a erytrocyty. Z grafu (i z těch, které zde nejsou uvedeny) vyplývá, že stabilita buněk z bílé řady u vzorků, které byly uchovávány při pokojové teplotě, je přibližně 48 hodin, následně dochází k poklesu počtu buněk, což je patrné u měření po 72 hodinách. U vzorků, které byly skladovány při nižších teplotách v chladničce, nedošlo k výraznějším změnám ani za 72 hodin. Co se týká počtu erytrocytů, nedocházelo k výraznému ovlivnění teplotou ani dobou skladování vzorku.



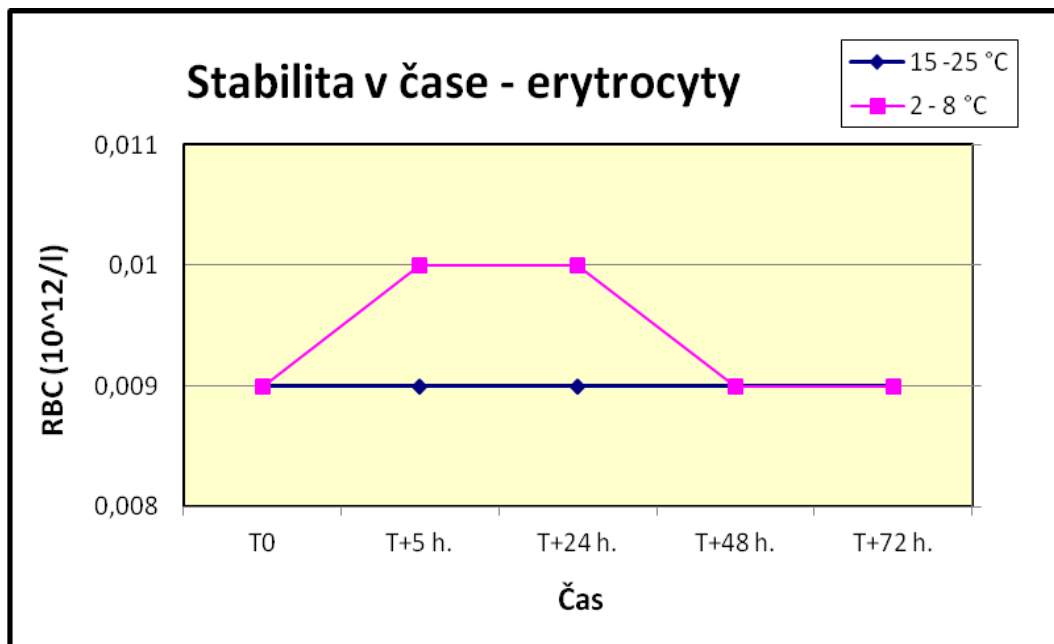
Graf 11: Stabilita v čase – mononukleáry



Graf 12: Stabilita v čase – polymorfonukleáry



Graf 13: Stabilita v čase – leukocyty



Graf 14: Stabilita v čase – erytrocyty

4. Diskuze a závěr

Naším úkolem bylo zjistit, zda by bylo možné nahradit mikroskopickou metodu pro stanovení počtu buněk v mozkomíšním moku za stanovení pomocí režimu „Body Fluid“ na analyzátoru Sysmex XE-5000. Abychom byli schopni odpovědět na zadanou otázku, museli jsme shromáždit data z obou metod a ta vyhodnotit.

Z Bland-Altmanových grafů při porovnávání obou metod jasně vyplývá, že pokud je likvor málo buněčný (počty WBC, MN, PMN $\leq 100/\mu\text{l}$), jsou výsledné počty všech buněk získané oběma metodami srovnatelné. Rozptyl hodnot rozdílů obou metod je velmi úzký a pohybuje se blízko průměrné hodnoty rozdílů (viz grafy 7 – 9). S rostoucím počtem buněk v mozkomíšním moku se rozptyl hodnot od průměrné hodnoty rozdílů obou metod zvětšuje a je dobře patrné, že získáváme vyšší hodnoty z analyzátoru metodou „Body Fluid“ než při mikroskopickém stanovení (viz grafy 1 – 6). Je to dáno tím, že výsledky z analyzátoru Sysmex XE-5000 jsou přesnější. Při mikroskopickém stanovení vstupuje do procesu lidský faktor (manuální barvení likvoru a následné manuální naplnění komůrky, subjektivní mikroskopická analýza při malém zvětšení). Mikroskopická metoda je tudíž zatížena subjektivní chybou, jejíž vliv se při vyšetření buněčně bohatých vzorků výrazně zvyšuje. U několika odlehých hodnot při hodnocení vysoce buněčných vzorků oběma metodami je potřeba vzít v úvahu právě tyto faktory.

Pomocí srovnávacího grafu s vyznačenými limity fyziologických mezí pro obě metody jsme na skupině málo buněčných vzorků (počet WBC $\leq 100/\mu\text{l}$) ověřili, kolik falešně negativních výsledků získáme oběma metodami. V případě analyzátorové metody byly falešně negativní 4 vzorky, a to pouze o několik buněk. U mikroskopické metody jsme falešnou negativitu zaznamenali ve 33 případech, často s rozdílem i několika desítek buněk (viz graf 10). Z tohoto zjištění opět vyplývá, že analyzátorová metoda je přesnější.

U metody „Body Fluid“ jsme ověřili i opakovatelnost v sérii. 10 vybraných vzorků likvorů jsme změřili opakovaně 5x za sebou za podmínek opakovatelnosti. Variační koeficient byl vypočítán z naměřených hodnot leukocytů a erytrocytů. U všech

deseti vzorků jsme dosáhli hodnot, které odpovídaly limitům uvedeným výrobcem – pro WBC je $CV \leq 30 \%$ a pro RBC je $CV \leq 40 \%$ (viz tabulka 16).

U 4 vybraných vzorků mozkomíšního moku (patologický nález, větší objem vzorku) jsme zjišťovali stabilitu materiálu v čase. Materiál jsme po prvním vyšetření rozdělili na polovinu, jednu část jsme uchovávali při teplotě 15 – 25 °C, druhou při teplotě 2 – 8 °C a postupně jsme obě části analyzovali v časových intervalech – 5, 24, 48 a 72 hodin od odběru. Zjistili jsme, že leukocyty ve vzorcích uchovávaných při teplotě 2 – 8 °C jsou stabilnější než leukocyty uchovávané při teplotě 15 – 25 °C (viz grafy 11 – 13). Erytrocyty byly stabilní po celou dobu sledování ve vzorcích uchovávaných při obou teplotách (viz graf 14). V likvorech, které jsme takto analyzovali, však nebyla přítomna výrazná patologie. Neměli jsme možnost, z důvodu nedostatečného množství odebraného materiálu, ověřit stabilitu buněk v likvorech vysoce buněčných nebo tumorózních, ve kterých se buňky rozpadají daleko rychleji, a vyžadují co nejrychlejší zpracování.

Vyšetření mozkomíšního moku v režimu „Body Fluid“ na analyzátoru Sysmex XE-5000 má nesporné výhody proti manuální mikroskopické metodě a těmi jsou rychlost metody a její automatizace. Tím je zaručena její vyšší přesnost, což bylo prokázáno i pomocí Bland-Altmanových grafů a srovnávacího grafu. Při vyšetření vysoce buněčných vzorků likvorů (meningitida, subarachnoidální krvácení atd.), patologických vzorků likvorů (léčení pacienti, tumorózní infiltrace) nebo vzorků mozkomíšního moku, u kterých interferuje nějaká příměs (např. bakterie, fibrinová vlákna apod.), je při mikroskopickém hodnocení problém se zařazením jednotlivých typů buněk, v některých případech není možné početní hodnoty buněk vydat vůbec (záplava buněk v likvoru, nečitelná morfologie buněčných jader apod.). Tento problém u analyzátorové metody odpadá. Analyzátor rovněž vydává početní hodnoty erytrocytů a tzv. HF buněk (makrofágů, mezotelií nebo tumorózních buněk), které se při mikroskopickém hodnocení většinou popisují pouze slovně.

Z naší práce vyplývá, že vyšetření mozkomíšního moku v režimu „Body Fluid“ na analyzátoru Sysmex XE-5000 se jeví jako vhodná alternativa k mikroskopickému stanovení počtu buněk ve Fuchs-Rosenthalově komůrce a může tuto metodu plně nahradit. Nemůže však v žádném případě nahradit cytologické hodnocení likvoru, které

má v klinice nezastupitelný diagnostický význam. Časová odezva tohoto vyšetření je však delší, v řádu několika dní.

První informaci o pleocytóze nebo patologické oligocytóze v likvoru obdrží klinik právě díky vyšetření ve Fuchs-Rosenthalově komůrce. Zavedením nové analyzátorové metody dojde k rychlejšímu vydávání přesnějších výsledků, které nebudou ovlivněny subjektivní chybou pracovníka nebo vnějšími vlivy, které nedovolí vzorky adekvátně zhodnotit.

5. *Seznam tabulek*

Tabulka 1: Porovnání složení likvoru a plazmy (Otomar a kol., 2011).....	10
Tabulka 2: Stáří ukončení krvácení (Pecka, 2010).....	19
Tabulka 3: Charakteristika testovaného souboru pacientů	31
Tabulka 4: Reagencie pro metodu „Body Fluid“ na Sysmex XE-5000 (Sysmex, 2007)34	
Tabulka 5: Údaje ke grafu 1	38
Tabulka 6: Údaje ke grafu 2	39
Tabulka 7: Údaje ke grafu 3	40
Tabulka 8: Údaje ke grafu 4	41
Tabulka 9: Údaje ke grafu 5	42
Tabulka 10: Údaje ke grafu 6	43
Tabulka 11: Údaje ke grafu 7	44
Tabulka 12: Údaje ke grafu 8	45
Tabulka 13: Údaje ke grafu 9	46
Tabulka 14: Fyziologická oligocytóza (Fátorová SOPV č. 110, 2013; Pešková, 2013)47	
Tabulka 15: Falešně negativní vzorky	48
Tabulka 16: Souhrn výsledků – opakovatelnost	49
Tabulka 17: Primární data.....	64
Tabulka 18: Primární data – opakovatelnost	71
Tabulka 19: Primární data – stabilita v čase	71

6. Seznam obrázků

Obrázek 1: Poloha při lumbální punkci vleže (Krajská nemocnice T. Bati, 2012)	13
Obrázek 2: Poloha při lumbální punkci vsedě (Krajská nemocnice T. Bati, 2012).....	14
Obrázek 3 (vlevo): rozdíl mezi zakaleným a čirým likvorem (Zilvarová, a kol., 2013)	15
Obrázek 4 (uprostřed): xantochromní likvor (Zilvarová, a kol., 2013)	15
Obrázek 5 (vpravo): erytrochromní likvor (Zilvarová, a kol., 2013)	15
Obrázek 6: Spektrofotometrie likvoru (Šolcová, 2012).....	18
Obrázek 7: Fuchs-Rosenthalova komůrka (Zilvarová, a kol., 2013).....	21
Obrázek 8: Detail Fuchs-Rosenthalovy komůrky (Rozsypal, 2004)	21
Obrázek 9: Schéma průtokové fluorescenční cytometrie (Pavlík, 2010)	22
Obrázek 10: Sedimentační komůrka (MIKROPUR s.r.o., 2013)	23
Obrázek 11: Ukázka cytocentrifugy – Cytofuge 12 (StatSpin) (LAB MARK a. s., 2013)	23
Obrázek 12: Fuchs-Rosenthalova komůrka – subarachnoidální krvácení (neutrofilní granulocyty a erytrocyty) (100x). (Autor fotografie: Ilona Fátorová).....	25
Obrázek 13: Cytologický preparát – subarachnoidální krvácení (neutrofilní granulocyty a erytrocyty) (1000x). (Autor fotografie: Ilona Fátorová)	25
Obrázek 14: Fuchs-Rosenthalova komůrka – bakteriální meningitida (neutrofilní granulocyty a bakterie) (200x). (Autor fotografie: Ilona Fátorová)	26
Obrázek 15: Cytologický preparát – a) bakteriální meningitida (neutrofilní granulocyty a bakterie), b) bakteriální meningitida (neutrofilní granulocyty a velké mononukleáry) (1000x). (Autor fotografií: Ilona Fátorová)	26
Obrázek 16: Fuchs-Rosenthalova komůrka – virová meningitida - lymfocyty (100x). (Autor fotografie: Ilona Fátorová)	27
Obrázek 17: Cytologický preparát – virová meningitida - lymfocyty (1000x). (Autor fotografie: Ilona Fátorová).....	27
Obrázek 18: Fuchs-Rosenthalova komůrka – velké mononukleáry – infiltrace tumorózními buňkami neznámého původu (200x). (Autor fotografie: Ilona Fátorová). 28	
Obrázek 19: Cytologický preparát – a) i b) Akutní lymfoblastická leukémie - lymfoblasty (1000x). (Autor fotografie: Ilona Fátorová)	29
Obrázek 20: Výstup z analyzátoru Sysmex XE-5000 režim „Body Fluid“ – likvor bakteriální meningitida (Autor výstupu: Ilona Fátorová).....	33

7. *Seznam grafů*

Graf 1: Bland-Altmanův graf – leukocyty	38
Graf 2: Bland-Altmanův graf – polymorfonukleáry	39
Graf 3: Bland-Altmanův graf – mononukleáry	40
Graf 4: Bland-Altmanův graf – leukocyty vyšší než 100 v 1 μ l	41
Graf 5: Bland-Altmanův graf – polymorfonukleáry vyšší než 100 v 1 μ l	42
Graf 6: Bland-Altmanův graf – mononukleáry vyšší než 100 v 1 μ l	43
Graf 7: Bland-Altmanův graf – leukocyty nižší než 100 v 1 μ l	44
Graf 8: Bland-Altmanův graf – polymorfonukleáry nižší než 100 v 1 μ l	45
Graf 9: Bland-Altmanův graf – mononukleáry nižší než 100 v 1 μ l	46
Graf 10: Srovnávací graf – leukocyty	48
Graf 11: Stabilita v čase – mononukleáry	50
Graf 12: Stabilita v čase – polymorfonukleáry	51
Graf 13: Stabilita v čase – leukocyty	51
Graf 14: Stabilita v čase – erytrocyty	52

8. Použitá literatura

Adam Pavel, Sobek Ondřej a kolektiv: Speciální likvorologie: Diagnostické možnosti cytologie mozkomíšního moku. Návrh klasifikace cytologických nálezů, klinický přínos a meze používaných metodik. [Článek] // Labor aktuell, 03/09. - Praha: Roche Diagnostics, 2009.

Adam Pavel, Sobek Ondřej a kolektiv: Algoritmus vyšetření likvoru a indikace jednotlivých metodik [Článek] // Labor Aktuell, 04/08. - Praha: Roche s.r.o., 2008.

Beňovská Miroslava, Breinek Petr a kolektiv: Aplikované analytické a instrumentální techniky v laboratorní medicíně / editor Dastych Milan. - 2011.

Brown Michael a Wittwer Carl: Flow Cytometry: Principles and Clinical [Článek] // Clinical Chemistry 46:8(B). - 2000. - stránky 1221–1229.

Černý Rudolf: Neuroinfekce z pohledu neurologa [Článek] // Parazitární neuroinfekce. - Praha: Společnost pro epidemiologii a mikrobiologii ČLS JEP ve spolupráci se Společností infekčního lékařství ČLS JEP a Českou parazitologickou společností, 2011.

CEVA Education: Mozkomíšní mok a další tělní tekutiny [Článek] // 2013. - http://www.ceva-edu.cz/pluginfile.php/2994/mod_resource/content/0/030129_Mozkomisni_mok_a_dalsi_telni_tekutiny_CEVA_CIZ.pdf (3.10.2013).

Dastych Milan, Breinek Petr a kolektiv: Klinická biochemie bakalářský obor Zdravotní laborant [Kniha]. - Brno: Masarykova univerzita, 2008. ISBN 978-80-210-4572-9.

Dastych Milan a Čermáková Zdeňka: Vyšetření mozkomíšního moku // Lékařská fakulta Masarykovy univerzity - <https://is.muni.cz/auth/el/1411/podzim2013/BLK051p/um/web/pdf/vysetreni-mozkomisniho-moku.pdf> (3.10.2013).

Dohnal, L.: Desatero pro porovnávání výsledků dvou metod [Článek] // FONS No.3, 27-32, 2000 - http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/publik/Kap_4_Desatero.pdf (13.1.2014)

Dufek Michal: Vyšetření likvoru a jeho přínos v současné době [Článek] // Zdravotnické noviny, 1. leden 2002. - ISSN: 1805-2355.

Fátorová Ilona: Likvor – Pandyho zkouška // SOPV č. 111 - Fakultní nemocnice Hradec Králové – IV. interní hematologická klinika – laboratoř, veze 4; platnost od 1. 9. 2013, počet stran 3.

Fátorová Ilona: Morfologické vyšetření likvoru // SOPV č. 110 - Fakultní nemocnice Hradec Králové – IV. interní hematologická klinika – laboratoř, veze 4; platnost od 1. 9. 2013, počet stran 9.

Hendl Jan: Statistické přístupy k porovnání biomedicínských metod měření [Článek] // Česká kinantropologie 6, 1997, 2, s.87-96 - <http://www.ftvs.cuni.cz/hendl/metodologie/blandaltmanclanek1.pdf> (13.1.2014)

Kalvach Pavel a kolektiv: Mozkové ischemie a hemoragie - 3., přepracované a doplněné vydání [Kniha]. Grada Publishing a.s, 2010. - ISBN 978-80-247-2765-3.

Kelbich P., Koudelková M. a kolektiv: Význam urgentního vyšetření mozkomíšního moku pro včasnou diagnostiku neuroinfekcí. [Článek] // Klinická mikrobiologie a infekční lékařství. - 2007. - 13(1):9-20. - <http://kmil.trios.cz/Predchozi/kmil07013c.htm> (3.10.2013).

Kelbich P., Slavík S. a kolektiv: Hodnocení energetických poměrů v likvorovém kompartmentu pomocí vyšetřování vybraných parametrů metabolismu glukózy v CSF [Článek] // Klinická biochemie a metabolismus, 6(27). - 1998. - stránky 213-225.

Kelbich Petr, Pavel Adam a kolektiv: Základní vyšetření likvoru v diagnostice postižení centrálního nervového systému [Článek] // Neurologie pro praxi. - Olomouc: Solen, s.r.o, 2009. - 10(5).

Kleine Tilmann O., Nebe Carl Thomas a kolektiv: Cell analysis in cerebrospinal fluid (CSF) using Sysmex® hematology analyzers XT-4000i and XE-5000: evaluation

with CSF controls of the Joint German Society for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (DGKL). [Článek] // CYTOMETRY PART A. - 2012. - 81a: 255-264.

Krajská nemocnice T. Bati a. s.: Lumbální punkce [Online]. - 2012.; 10. Zář 2013. - <http://www.kntb.cz/lumbalni-punkce>.

LAB MARK a. s.: Cytofuge 12 (StatSpin) [Online]. - 2013.; 13. listopad 2013. - <http://www.labmark.cz/centrifugy/cytofuge-12/>.

Lab Tests Online: Vyšetření mozkomíšního moku [Online]. - 2. květen 2010.; 10. září 2013. - http://www.labtestsonline.cz/tests/CSF_Analysis.html?tab=3.

Langmeier Miloš: Základy lékařské fyziologie [Kniha]. Grada Publishing a.s., 2009. - ISBN-13: 978-80-247-2526-0.

Merkunová Alena a Orel Miroslav: Anatomie a fyziologie člověka [Kniha]. Grada Publishing a.s., 2008. - ISBN 978-80-247-1521-6 .

MIKROPUR s.r.o.: Laboratorní a zkušební zařízení pro separace a filtrace [Online]. - 10. září 2013.; 13. listopad 2013. - <http://www.mikropur.cz/aaa.htm>.

Mikšová Zdeňka a Zajíčková Marie: Kapitoly z ošetrovatelské péče [Kniha]. Grada Publishing a.s., 2006. - ISBN 80-247-1443-4.

Orlickoústecká nemocnice a.s.: Laboratorní příručka OKBD – Spektrofotometrie mozkomíšního moku. - 2013. - <http://www.ou-nem.cz/lab/prirucka/HVEZDALATI.htm>. (13. 11. 2013)

Otomar Kittnar a kolektiv: Lékařská fyziologie [Kniha]. Grada Publishing a.s., 2011. - ISBN 978-80-247-3068-4.

Pavlík Jan: Analýza diferenciálního rozpočtu leukocytů v periferní krvi různými diagnostickými metodami [Kniha]. - Brno: Vysoké učení technické v Brně, 2010. - Bakalářská práce.

Pecka Miroslav a kolektiv: Praktická hematologie Laboratorní metody [Kniha]. Nakladatelství Infiniti art s. r. o., 2010. - ISBN 978-80-903871-9-5.

Penka Miroslav, Tesařová Eva a kolektiv: Hematologie a transfuzní lékařství I [Kniha]. Grada Publishing, a.s., 2011. - ISBN 978-80-247-3459-0.

Perne Andrea, Hainfellner Johannes A. a kolektiv: Performance Evaluation of the Sysmex XE-5000 Hematology Analyzer for White Blood Cell Analysis in Cerebrospinal Fluid [Článek] // Archives of Pathology & Laboratory Medicine. - February 2012. - str. Vol. 136 Issue 2.

Pernikář Jiří: Hodnocení způsobilosti kontrolních prostředků [Článek] // Sborník přednášek z mezinárodní konference v oboru měření délek, geometrických veličin a struktury povrchu KVALITA A GPS 2005. Brno: 2005. s. 97-100. ISBN: 80-214-3033-8.

Pešková Eliška: Vyšetření tělních tekutin // SOPV č. 108 - Fakultní nemocnice Hradec Králové – IV. interní hematologická klinika – laboratoř, veze 2; platnost od 1. 7. 2013, počet stran 5.

Rozsypal Hanuš: Diagnostika neuroinfekcí // Neuroinfekce. - Klinika infekčních a tropických nemocí, I. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze, 2004.

Sobek Ondřej: Laboratoř pro likvorologii a neuroimunologii [Online] // Topelex s.r.o., Expertní pracoviště SEKK. - 22. červenec 2013. - 9. září 2013. - <http://www.likvor.cz/>.

Sobek Ondřej: Vyšetření likvoru – současné možnosti [Článek] // Neurologie pro praxi. - 2009. - 10(5). - stránky 280-284.

Šolcová M.: Mozkomíšní mok [Online] // BioHema. - 2012; 25. listopad 2013. - https://docs.google.com/document/d/1YRobHzzU_Jfwwt_1xSSKHmBVNXUaEwSgtcQnDsAxiIlg/edit?pli=1.

Šternberk nemocnice: Charakteristika analýzy: vyšetření likvoru [Online] // Oddělení laboratorní medicíny nemocnice Šternberk - 2003; 27. Srpen 2013. - <http://laborator.nemsne.cz/metody/laboratorni-metody/soubory/likvor.pdf>.

Štourač Pavel: Likvorologie na letošních Jedličkových dnech [Článek] // Zdravotnické noviny. - 1. červenec 2013.

Štourač Pavel, Bednářová Jana a kolektiv: Význam cytologie mozkomíšního moku v diagnostice nádorových onemocnění nervového systému [Článek] // Neurologie pro praxi. - 2009. - 10(5). - stránky 294-296. -

Systemex CZ s.r.o.: Systemex XE-5000 Instructions for use [Kniha]. - Systemex Corporation Kobe, Japan, 2007 - Code No. 461-2642-1 - Date of Last Revision: June 2008.

Systemex CZ s.r.o.: Mozkomíšní mok (CSF): materiál se zvláštními požadavky [Online] // Systemex Xtra Online. - červenec 2010; 10. prosinec 2013. - http://www.systemex.cz/files/f15/Image/pic_9584/STE_mozkomisni_mok_A4_3.pdf.

Systemex CZ s.r.o.: XE-5000 Analýza tělních tekutin [Online] // Systemex Xtra Online. - 2011. - 10. únor 2014. - http://www.systemex.cz/files/f15/Image/pic_9584/XE_5000.pdf.

Trojan Stanislav: Lékařská fyziologie [Kniha]. Grada Publishing a.s., 2003. - ISBN 80-247-0512-5.

Vobejdová Jana: Kultivační vyšetření ostatního klinického materiálu // Standardní operační postup vyšetřovací. - Litomyšl: Litomyšlská nemocnice, a.s. - Oddělení infekční diagnostiky a ATB středisko, 2013.

Vokurka Milan a Hugo Jan: Velký lékařský slovník [Kniha]. Maxdorf, 2007. - Jessenius. - ISBN 978-80-7345-130-1.

Williams James E., Walters Jeri a Kabb Kimberley: Automated Body Fluid Cell Counts: Evaluation of the Body Fluid Application on the Systemex XE-5000 Hematology Analyzer [Článek] // LabMedicine. - July 2011. - Volume 42 Number 7. - <http://labmed.ascpjournals.org/content/42/7/395.full.pdf+html> (27.2.2014).

Zilvarová E., Kopecká I. a kolektiv: Morfologické vyšetření mozkomíšního moku. - Hradec Králové: Fakultní nemocnice Hradec Králové – II interní klinika – oddělení klinické hematologie (PDF).

Přílohy

Tabulka 17: Primární data

	Věk	XE-5000 „Body Fluid“					Mikroskop				
		WBC	RBC	PMN#	MN#	HF-BF#	WBC	RBC	PMN	MN	Hist-mono
1	0	0,263	0,084	0,213	0,05	0	496	Záplava, plné i stíny	416	80	Přítomny
2	64	0,01	0	0,004	0,006	0	15	0	0	15	0
3	78	0,011	0	0,003	0,008	0	24	0	2	22	0
4	73	0,028	0,001	0,008	0,02	0	47	Plné i stíny	2	45	0
5	36	0,033	0	0,009	0,024	0	77	Ojedinele stíny	10	67	0
6	54	0,298	0,002	0,214	0,084	0,015	656	Plné i stíny	488	24	144
7	57	0,014	0	0,001	0,013	0	26	Ojedinele stíny	3	23	0
8	36	0,07	0,003	0,054	0,016	0	84	Plné i stíny	48	28	8
9	61	13,156	0,008	12,828	0,328	0,15	13056	0	12800	256	Přítomny
10	61	216,994	0,4	215,63	1,364	1,812	Nelze	Nelze	Nelze	Nelze	Nelze
11	64	2,306	0	2,147	0,159	0,004	8384	0	8320	64	Ojedinele
12	64	6,131	0,001	5,863	0,268	0,008	11456	Ojedinele stíny	11328	128	Ojedinele
13	52	0,024	0,022	0,009	0,015	0	33	Četné, plné i stíny	5	28	Ojedinele
14	52	0,02	0,019	0,005	0,015	0	86	Četné, plné i stíny	10	76	Ojedinele
15	52	0,357	0,008	0,034	0,323	0,004	420	Plné i stíny	8	412	Ojedinele
16	52	0,243	0,002	0,027	0,216	0,003	408	Plné	8	400	Ojedinele
17	52	0,13	0,001	0,007	0,123	0,001	336	Ojedinele	8	328	Ojedinele
18	52	0,096	0	0,007	0,089	0	200	Ojedinele	8	192	Ojedinele
19	52	0,042	0	0,001	0,041	0	97	0	1	96	Ojedinele
20	36	0,766	0,762	0,703	0,063	0,001	816	Četně	704	112	Ojedinele
21	0	0,055	0	0,001	0,054	0,001	72	Ojedinele plné	12	60	Přítomny
22	0	0,055	0	0,005	0,05	0	80	Ojedinele	16	64	Ojedinele
23	0	0,145	0,024	0,09	0,055	0,001	222	Četné, plné i stíny	174	48	Přítomny
24	76	0,004	0,005	0,002	0,002	0	6	Plné i stíny	0	6	0
25	54	0,514	0,01	0,406	0,108	0,005	1152	Četné	928	224	Přítomny
26	54	9,432	0,07	7,684	1,748	0,037	10363	Četné, plné i stíny	10240	123	Přítomny
27	54	0,189	0,004	0,13	0,059	0	384	Plné i stíny	224	160	Ojedinele
28	54	0,006	0	0,002	0,004	0	4	0	2	2	Velmi ojedinele
29	41	55,003	1,722	52,812	2,191	1,989	Nelze	Záplava	Nelze	Nelze	Přítomny
30	41	0,536	0,001	0,33	0,206	0,002	706	Stíny	620	86	Ojedinele
31	41	0,223	0,001	0,134	0,089	0,004	288	Ojedinele stíny	216	72	Přítomny

	Věk	XE-5000 „Body Fluid“					Mikroskop				
		WBC	RBC	PMN#	MN#	HF-BF#	WBC	RBC	PMN	MN	Hist-mono
32	65	0,624	0,004	0,508	0,186	0,015	1674	Stíny	1610	64	Přítomny
33	40	0,006	0	0,004	0,002	0	3	2	1	2	0
34	88	0,024	0,001	0,012	0,012	0	9	Stíny	8	1	0
35	12	0,003	0	0,003	0	0,002	13	0	0	12	1
36	12	0,287	0	0,232	0,055	0,003	498	Ojediněle stíny	446	52	Ojediněle
37	12	0,101	0	0,036	0,065	0,001	284	0	244	40	0
38	55	0,007	0	0,002	0,005	0	1	0	0	1	0
39	53	0,002	0	0,001	0,001	0,001	6	0	2	4	0
40	73	0,044	0,067	0,029	0,015	0,003	16	Přítomny	13	3	2
41	54	0,011	0	0,003	0,008	0	5	0	1	4	0
42	58	0,002	0	0,001	0,001	0,001	2	0	0	2	0
43	63	0,023	0	0,02	0,003	0	3	0	0	3	0
44	40	0,003	0	0,002	0,001	0,001	5	0	1	4	0
45	57	0,01	0	0,007	0,003	0,001	28	Ojediněle	24	4	0
46	73	0,039	0	0,005	0,034	0	82	0	12	62	8
47	57	0,089	0,002	0,013	0,076	0,002	90	Přítomny	3	87	0
48	28	0,008	0	0,004	0,004	0,002	3	0	0	3	0
49	40	0,004	0	0,003	0,001	0	0	0	0	0	0
50	60	0,007	0	0,005	0,002	0	11	0	9	2	0
51	34	0,007	0	0,002	0,005	0	4	0	0	4	0
52	8	0,002	0,001	0	0,002	0	8	Ojediněle	1	7	0
53	32	0,108	0,017	0,06	0,048	0,001	237	Četné	113	124	Ojediněle
54	34	0,001	0	0,001	0	0,001	1	0	0	1	0
55	68	0,014	0	0,004	0,01	0,001	7	0	0	7	0
56	60	0,007	0	0,003	0,004	0	0	oj.	0	0	0
57	70	0,061	0,02	0,044	0,017	0,004	143	Četné	125	16	2
58	57	0,002	0	0,001	0,001	0	1	0	0	1	0
59	42	0,423	0,004	0,305	0,118	0,006	320	0	288	32	0
60	35	0,007	0	0,004	0,003	0	2	0	0	2	0
61	51	0,07	0,111	0,057	0,013	0	21	Četné	4	17	0
62	7	0,047	0	0,013	0,034	0,002	104	0	12	92	Přítomny
63	61	0,009	0	0,005	0,004	0,001	16	Ojediněle	5	11	0
64	87	0,043	0,001	0,006	0,037	0	100	Ojediněle	12	88	Místy
65	62	0,01	0	0,01	0	0	0	0	0	0	0
66	37	0,012	0,001	0,002	0,01	0	20	Ojediněle	6	12	2
67	58	0,005	0	0,003	0,002	0	7	Ojediněle	2	5	0
68	72	0,003	0,002	0,001	0,002	0	4	Přítomny	3	1	0
69	61	0,202	0,047	0,109	0,093	0,002	488	Četné	324	164	Přítomny
70	74	0,003	0	0	0,003	0,001	2	0	0	2	0
71	63	0,003	0	0,003	0	0	4	0	0	4	0
72	19	0,094	0	0,011	0,083	0,001	198	0	2	196	Přítomny
73	24	0,006	0	0,004	0,002	0	7	0	2	5	0
74	37	0,034	0,0001	0,002	0,032	0	44	Ojediněle	12	32	Přítomny
75	6	0,017	0,001	0,006	0,011	0	21	Ojediněle	8	13	0
76	22	0,013	0	0,012	0,001	0	3	0	0	3	0

	Věk	XE-5000 „Body Fluid“					Mikroskop				
		WBC	RBC	PMN#	MN#	HF-BF#	WBC	RBC	PMN	MN	Hist-mono
77	66	0,006	0,001	0,003	0,003	0	3	Přítomny	0	3	0
78	48	0,003	0	0,002	0,001	0	4	0	1	3	0
79	10	0,034	0,002	0,028	0,006	0	18	Ojediněle	4	14	Ojediněle
80	41	0,004	0	0,002	0,002	0	3	0	1	2	0
81	87	0,092	0	0,004	0,088	0,001	166	0	2	164	Místy
82	35	0,002	0	0,001	0,001	0	2	0	1	1	0
83	15	0,042	0,009	0,004	0,038	0,001	107	Četné	6	101	Ojediněle
84	51	0,444	0,011	0,339	0,105	0,005	1176	Přítomny	1096	80	Přítomny
85	0	0,004	0,0001	0,001	0,003	0	7	Ojediněle	4	3	0
86	1	0,036	0,0001	0,014	0,022	0,001	6	0	0	6	0
87	79	0,001	0	0	0,001	0,001	7	0	3	4	0
88	75	0,007	0	0,001	0,006	0	1	0	0	1	0
89	35	0,001	0	0,001	0	0	1	0	1	0	0
90	67	0,039	0	0,007	0,032	0	117	0	9	108	Místy
91	4	0	0	0	0	0,001	1	0	0	1	0
92	71	0	0	0	0	0	3	0	0	3	0
93	68	0,062	0,031	0,042	0,02	0,001	47	Přítomny	16	31	Přítomny
94	68	0,159	0,053	0,129	0,03	0,001	292	Četné	256	36	0
95	68	0,317	0,013	0,268	0,049	0,001	660	Přítomny	524	136	Přítomny
96	68	0,705	0,016	0,565	0,14	0,005	932	Přítomny	736	196	Přítomny
97	68	0,358	0,005	0,294	0,064	0,001	612	Přítomny	536	76	Přítomny
98	68	0,044	0,002	0,031	0,013	0	58	Přítomny	46	12	Přítomny
99	57	0,206	0,119	0,133	0,073	0,002	296	Četné	208	88	Přítomny
100	57	0,064	0,046	0,018	0,022	0,002	84	Četné	62	22	Přítomny
101	56	0,022	0	0,004	0,018	0	47	0	2	45	0
102	58	0,061	0,001	0,008	0,053	0	74	Přítomny	7	67	Místy
103	67	0,645	0,056	0,459	0,186	0,01	1088	Četné	944	144	Četné
104	67	0,107	0,014	0,061	0,046	0,002	184	Četné	132	52	Přítomny
105	40	0,023	0	0,003	0,02	0,001	98	0	13	45	40
106	71	220,411	0,173	176,678	43,733	1,053	Nelze	Nelze	Nelze	Nelze	Nelze
107	47	0,004	0	0,002	0,002	0	0	0	0	0	0
108	63	0,002	0	0,002	0	0	4	0	0	4	0
109	66	0,001	0	0	0,001	0	2	0	0	2	0
110	71	0,001	0	0	0,001	0,001	0	0	0	0	0
111	70	0,349	0	0,059	0,29	0,003	1000	0	88	912	Ojediněle
112	41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
113	60	0,006	0	0,004	0,002	0	15	0	8	4	3
114	44	0,135	0,156	0,044	0,091	0,002	230	Záplava	69	161	Ojediněle
115	70	0,006	0	0,003	0,003	0	5	0	2	3	0
116	56	0,027	0	0,025	0,002	0	2	Stíny	1	1	0
117	50	0,004	0	0,002	0,002	0	2	0	1	1	0
118	42	0,754	0,049	0,661	0,093	0,003	1752	Stíny	1744	8	0
119	70	0,531	0	0,097	0,434	0,016	1386	Stíny	152	1234	Přítomny
120	51	0,002	0	0	0,002	0	4	0	0	4	0
121	59	0,001	0	0	0,001	0,001	3	0	0	3	0
122	62	0,009	0	0,001	0,008	0	3	0	1	2	0

	Věk	XE-5000 „Body Fluid“					Mikroskop				
		WBC	RBC	PMN#	MN#	HF-BF#	WBC	RBC	PMN	MN	Hist-mono
123	40	0,002	0	0,001	0,001	0	5	0	2	3	0
124	41	0,001	0	0	0,001	0	4	0	1	3	0
125	54	0,001	0	0,001	0	0	1	0	0	1	0
126	62	0,005	0	0	0,005	0	1	0	0	1	0
127	64	9,537	0,001	8,543	0,994	0,113	Nelze	Nelze	Nelze	Nelze	Nelze
128	34	0,007	0	0	0,007	0	10	0	3	7	0
129	64	0,433	0	0,25	0,183	0,008	596	0	492	104	Přítomny
130	38	0,002	0	0	0,002	0	3	0	0	3	0
131	58	0,004	0	0,003	0,001	0	5	0	2	3	0
132	74	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
133	56	0,003	0	0,001	0,002	0	3	0	1	2	0
134	64	0,376	0,001	0,063	0,313	0,057	446	Ojediněle	128	302	16
135	31	0,003	0	0,001	0,002	0	6	0	0	6	0
136	10	0,209	0	0,074	0,135	0,002	244	0	124	120	Přítomny
137	10	0,229	0	0,059	0,17	0,002	380	0	220	160	Přítomny
138	48	0,004	0	0	0,004	0	2	0	0	2	Přítomny
139	0	0,063	0	0,013	0,05	0,005	105	Stíny	32	73	Přítomny
140	65	1,169	0,002	0,948	0,221	0,003	3254	Ojediněle stíny	3022	232	0
141	64	0,034	0	0,007	0,027	0,001	94	0	18	76	Přítomny
142	65	1,537	0,011	1,137	0,4	0,018	4296	Stíny	3164	1132	Přítomny
143	50	0,008	0,003	0,005	0	0	10	0	10	0	
144	71	0,207	0,011	0,058	0,149	0,002	448	Přítomny	144	304	0
145	3	0,033	0,014	0,02	0,013	0,001	108	Četné stíny	68	40	Ojediněle
146	65	0,025	0	0,004	0,021	0	43	Ojediněle stíny	13	30	Přítomny
147	48	0,005	0	0,004	0,001	0	2	0	0	2	0
148	47	0,006	0	0,004	0,002	0,001	2	0	2	0	0
149	47	0,008	0	0,003	0,005	0,001	2	0	0	2	0
150	48	0,004	0	0,001	0,003	0	4	0	0	4	0
151	56	0,005	0	0,002	0,003	0,001	1	0	0	1	0
152	71	0,007	0,002	0,003	0,004	0	3	0	1	2	0
153	65	0,01	0	0,006	0,004	0	7	0	4	3	0
154	7	0,003	0	0,001	0,002	0	6	0	1	5	0
155	43	0,015	0	0,011	0,004	0,002	2	0	0	2	0
156	54	0,004	0	0,001	0,003	0	10	0	0	10	0
157	66	0,005	0	0,002	0,003	0,001	4	0	1	3	0
158	59	0,008	0	0,003	0,005	0,001	3	0	1	2	0
159	65	0,028	0,001	0,009	0,019	0	41	Ojediněle stíny	12	29	Přítomny
160	79	0,001	0	0,001	0	0,001	0	0	0	0	0
161	41	0,01	0	0,001	0,009	0	3	0	0	3	0
162	20	0,008	0	0	0,008	0,001	18	0	1	17	0
163	71	0,093	0	0,002	0,091	0	199	0	3	196	0
164	71	0,061	0	0,01	0,051	0,001	108	0	9	99	0
165	71	0,058	0,001	0,005	0,053	0,001	110	Místy stíny	98	12	0

	Věk	XE-5000 „Body Fluid“					Mikroskop				
		WBC	RBC	PMN#	MN#	HF-BF#	WBC	RBC	PMN	MN	Hist-mono
166	37	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
167	19	0,001	0	0	0,001	0	3	0	0	3	0
168	70	0,107	0,074	0,051	0,056	0	205	Četné, plné i stíny	154	51	Přítomny
169	70	0,018	0,021	0,01	0,008	0	281	Četné plné i stíny	184	97	Přítomny
170	37	0,002	0	0	0,002	0	2	0	0	2	0
171	71	0,055	0	0,005	0,05	0	87	Ojedinele stíny	11	76	0
172	65	0,002	0	0,001	0,001	0,001	2	0	0	2	0
173	49	0,005	0	0,004	0,001	0	4	0	0	4	0
174	21	0,002	0	0,001	0,001	0	6	0	3	3	0
175	30	0,003	0	0,001	0,002	0,001	7	0	0	7	0
176	34	0,041	0	0,001	0,04	0,002	80	0	12	68	Přítomny
177	64	0,081	0	0,001	0,08	0	212	0	4	208	0
178	70	0,968	0,23	0,854	0,114	0	3072	Četné stíny	2816	256	0
179	48	1,251	0,053	1,035	0,216	0,001	4096	Přítomny	3840	256	Místy
180	52	0,006	0	0,001	0,005	0	2	0	0	2	0
181	65	0,015	0	0,001	0,0014	0,002	21	0	1	20	0
182	39	0,002	0	0,001	0,001	0,001	2	0	0	2	0
183	55	0,007	0	0,002	0,005	0	4	0	1	3	0
184	77	0,915	0,001	0,712	0,203	0,01	1636	Přítomny stíny i plné	1480	152	4
185	57	0,004	0	0,001	0,003	0	18	0	3	15	0
186	71	0,032	0,001	0,001	0,031	0	64	Ojedinele stíny	2	62	0
187	49	0,01	0	0,009	0,001	0	4	0	0	4	0
188	68	0,479	0	0,03	0,449	1,234	3872	0	16	48	3808
189	71	0,02	0,001	0,001	0,019	0	46	Ojedinele	2	44	0
190	49	1,603	0,001	0,084	1,519	0,017	3328	0	16	512	2800
191	71	0,025	0	0,001	0,024	0	43	0	1	42	0
192	65	0,036	0	0,003	0,033	0,004	48	0	8	40	0
193	4	0,141	0	0,123	0,018	0	329	0	319	10	0
194	71	0,017	0	0	0,017	0,001	54	0	1	53	0
195	62	0,002	0	0,001	0,001	0	0	0	0	0	0
196	23	0,005	0,002	0	0,005	0	4	Ojedinele plné	1	3	0
197	52	6,401	0,107	5,771	0,63	0,006	13568	Přítomny plné i stíny	13056	512	0
198	77	0,008	0,002	0,006	0,002	0	6	Přítomny plné i stíny	4	2	0
199	71	0,015	0	0,003	0,012	0	25	Ojedinele plné	0	25	0
200	71	0,024	0	0,002	0,022	0,025	51	0	2	49	0
201	62	0,709	0,099	0,601	0,108	0,004	1376	Četné stíny i plné	1232	144	0

	Věk	XE-5000 „Body Fluid“					Mikroskop				
		WBC	RBC	PMN#	MN#	HF-BF#	WBC	RBC	PMN	MN	Hist-mono
202	23	0,173	0	0	0,173	0,002	272	0	0	272	Místy
203	68	3,198	0,001	3,128	0,07	0,004	9829	Přítomny	9808	21	0
204	54	2,692	0,001	2,469	0,223	0,006	5300	Ojedinele	5120	180	Ojedinele
205	51	0,693	0	0,074	0,619	0,015	1760	0	224	1536	0
206	71	0,018	0	0	0,018	0,001	37	0	1	36	0
207	68	2,337	0,001	2,055	0,282	0,004	4464	0	4336	128	0
208	68	0,249	0	0,15	0,099	0	444	0	300	144	0
209	22	0,036	0	0,006	0,03	0,001	80	0	2	78	0
210	54	1,959	0	1,784	0,175	0,001	4992	0	4896	96	0
211	71	0,019	0	0,001	0,018	0,001	35	0	2	33	0
212	35	0,002	0	0,001	0,0001	0	0	0	0	0	0
213	56	1,54	0	1,371	0,169	0	3840	Ojedinele stiny	3216	624	0
214	55	0,182	0,001	0,157	0,025	0,001	299	Ojedinele stiny	235	64	0
215	60	0,001	0	0	0,001	0	1	0	0	1	0
216	72	0,01	0	0,002	0,008	0	4	Ojedinele stiny	0	4	0
217	53	0,322	0,032	0,121	0,201	0	484	Četné plné i stiny	168	316	Přítomny
218	56	0,035	0	0,01	0,025	0,001	28	0	0	28	Ojedinele
219	38	0,001	0	0,001	0	0	3	0	0	3	0
220	72	0,277	0	0,194	0,083	0,001	560	Ojedinele stiny	394	166	0
221	38	0,002	0	0	0,002	0	4	0	0	4	0
222	15	0,043	0	0,003	0,04	0	75	0	1	74	0
223	69	0,071	0	0,003	0,068	0,002	143	0	14	129	Přítomny
224	79	0,002	0	0,001	0,001	0	1	0	0	1	0
225	66	0,025	0	0,008	0,017	0,001	31	0	0	31	0
226	72	0,191	0	0,072	0,119	0,001	480	Ojedinele stiny	148	332	Přítomny
227	26	0,001	0	0,001	0	0	6	0	3	3	0
228	67	0,014	0	0,002	0,012	0,001	0	0	0	0	0
229	72	0,12	0	0,058	0,062	0,001	185	oj.	87	98	Přítomny
230	84	0,002	0	0,001	0,001	0	8	0	3	5	Přítomny
231	19	0,003	0	0,001	0,002	0	1	0	0	1	0
232	64	0,001	0	0	0,001	0,001	0	0	0	0	0
233	60	0,012	0	0,002	0,01	0	14	0	6	8	0
234	48	0,053	0,001	0,005	0,048	0	107	Velmi ojedinele	10	97	Ojedinele
235	51	0,637	0,089	0,501	0,136	0	1488	Plné i stiny	1136	352	0
236	66	0,002	0	0,002	0	0	2	0	1	1	0
237	6	0,004	0	0,003	0,001	0	3	0	0	3	0
238	80	0,002	0	0,001	0,001	0	3	0	1	2	0
239	24	0,013	0	0	0,013	0,001	7	0	0	7	Ojedinele
240	35	0,001	0	0	0,001	0	0	0	0	0	0

	Věk	XE-5000 „Body Fluid“					Mikroskop				
		WBC	RBC	PMN#	MN#	HF-BF#	WBC	RBC	PMN	MN	Hist-mono
241	51	0,001	0	0	0,001	0	1	0	0	1	0
242	44	0,006	0	0,001	0,005	0	2	0	0	2	0
243	36	0,001	0	0	0,001	0,001	0	0	0	0	0
244	17	0,012	0	0,005	0,007	0	12	0	0	12	0
245	49	0,06	0,001	0,031	0,029	0,001	123	Ojediněle plné i stíny	66	57	Makrofágy
246	79	0,01	0,001	0,002	0,008	0	12	0	2	10	oj.
247	27	0,56	0	0,123	0,437	0,009	1160	0	140	1020	Přítomny
248	5	0	0	0	0	0	3	0	0	3	0
249	63	9,388	0,006	9,2335	0,153	0,001	20736	Stíny i plné	20480	256	0
250	59	0,003	0	0,002	0,001	0	3	0	0	3	0
251	45	0,001	0	0	0,001	0,001	6	0	0	6	0
252	89	0,653	0,001	0,311	0,342	0,003	1296	Plné i stíny	816	480	0
253	71	0,003	0	0,002	0,001	0	0	0	0	0	0
254	81	0,003	0	0	0,003	0,001	2	0	0	2	0
255	15	0,002	0	0	0,002	0	1	0	0	1	0
256	81	0,004	0	0,003	0,001	0,001	4	Ojediněle stíny i plné	1	3	0
257	70	0,106	0,446	0,083	0,023	0,003	348	Záplava	280	68	0
258	35	0,01	0	0,006	0,004	0	17	0	0	17	0
259	81	0,001	0	0,001	0	0	4	0	1	3	0
260	87	0,027	0	0,003	0,024	0,001	55	0	8	47	Místy
261	27	0,077	0	0,007	0,07	0,002	212	0	4	208	Přítomny
262	44	0,006	0	0,005	0,001	0,001	4	0	2	2	0
263	23	0,015	0	0	0,015	0	13	0	0	13	Ojediněle
264	8	0,008	0	0,004	0,004	0	11	0	7	4	0
265	53	0,003	0	0	0,003	0	3	0	1	2	0
266	63	0,003	0	0,001	0,002	0	7	0	0	7	0
267	63	0,005	0	0,004	0,001	0	1	0	0	1	0
268	73	0,002	0	0	0,002	0	1	0	0	1	0
269	47	0,007	0	0	0,007	0,001	14	0	1	13	0
270	81	0,009	0	0,006	0,003	0,001	5	0	1	4	0
271	17	0,005	0	0,001	0,004	0	11	0	2	9	0
272	59	0,003	0	0	0,003	0,001	4	0	1	3	0
273	47	0,002	0	0	0,002	0	4	0	0	4	Ojediněle
274	23	0,034	0,001	0,004	0,03	0	53	Místy stíny	1	52	Přítomny
275	63	0,046	0	0,004	0,042	0,009	21	Ojediněle	2	12	7
276	28	0,002	0	0	0,002	0	2	0	1	1	0
277	62	0,765	0	0,419	0,346	0,005	1360	0	768	592	Ojediněle
278	80	0,003	0	0,002	0,001	0,002	1	Ojediněle	0	1	0
279	62	0,005	0	0,002	0,003	0	7	0	1	6	Ojediněle
280	48	0,011	0	0,004	0,007	0	16	0	0	16	Ojediněle
281	39	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
282	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
283	79	0,015	0,016	0,008	0,007	0,001	19	Stíny	10	9	0
284	66	1,335	0,001	0,01	1,325	0,007	3152	0	32	3120	0

	Věk	XE-5000 „Body Fluid“					Mikroskop				
		WBC	RBC	PMN#	MN#	HF-BF#	WBC	RBC	PMN	MN	Hist-mono
285	62	0,055	0	0	1,325	0,007	88	0	3	85	?
286	75	0,003	0	0,001	0,002	0	0	0	0	0	0
287	35	0,403	0,005	0,347	0,056	0,001	1104	Četně	1072	32	Místy
288	42	0,005	0	0,002	0,003	0	1	0	0	1	0
289	63	0,003	0	0	0,003	0	6	0	1	5	0
290	43	0,005	0	0,001	0,004	0	5	0	0	5	0
291	71	0,067	0	0	0,067	0,003	188	0	8	180	0

Tabulka 18: Primární data – opakovatelnost

Pacient	1. měření		2. měření		3. měření		4. měření		5. měření	
	WBC	RBC	WBC	RBC	WBC	RBC	WBC	RBC	WBC	RBC
1.	0,025	0	0,03	0	0,03	0	0,04	0	0,043	0
2.	1,455	0,003	1,413	0,003	1,384	0,003	1,461	0,003	1,449	0,003
3.	1,335	0,001	1,347	0,001	1,348	0,001	1,326	0,001	1,322	0,001
4.	0,055	0	0,053	0	0,055	0	0,051	0	0,054	0
5.	0,011	0	0,011	0	0,011	0	0,014	0	0,011	0
6.	0,403	0,005	0,437	0,005	0,408	0,006	0,426	0,006	0,424	0,006
7.	0,011	0	0,017	0	0,009	0	0,013	0	0,011	0
8.	0,228	0,002	0,26	0,001	0,285	0,002	0,269	0,002	0,262	0,002
9.	0,171	0,009	0,154	0,009	0,163	0,009	0,16	0,009	0,162	0,009
10.	0,434	0	0,413	0	0,453	0	0,484	0	0,493	0

Tabulka 19: Primární data – stabilita v čase

	Pokožová teplota				2 - 8 °C			
	WBC	RBC	PMN	MN	WBC	RBC	PMN	MN
T0	0,171	0,009	0,095	0,076	0,171	0,009	0,095	0,076
T+5 h.	0,142	0,009	0,07	0,072	0,151	0,01	0,087	0,064
T+24 h.	0,16	0,009	0,082	0,078	0,153	0,01	0,085	0,068
T+48 h.	0,151	0,009	0,091	0,06	0,148	0,009	0,085	0,063
T+72 h.	0,023	0,009	0,014	0,01	0,147	0,009	0,085	0,062