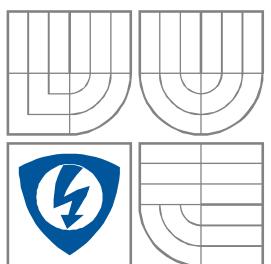


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH
TECHNOLOGIÍ

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

ANALÝZA DIFERENCIÁLNÍHO ROZPOČTU LEUKOCYTŮ V PERIFERNÍ KRVÍ RŮZNÝMI DIAGNOSTICKÝMI METODAMI

METHODS OF BLOODCELLS COUNTING

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

JAN PAVLÍK

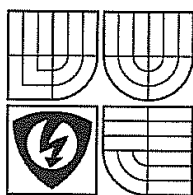
AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE

Ing. Jan Hruběš

SUPERVISOR

BRNO, 2010



VYSOKÉ UČENÍ
TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

Ústav biomedicínského inženýrství

Bakalářská práce

bakalářský studijní obor
Biomedicínská technika a bioinformatika

Student: Jan Pavlík

Ročník: 3

ID: 106123

Akademický rok: 2009/10

NÁZEV TÉMATU:

Analýza diferenciálního rozpočtu leukocytů v periferní krvi různými diagnostickými metodami

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

Nasbírejte dostatečné množství výsledků diferenciálního rozpočtu leukocytů z průtokového cytometru. Analyzujte vzorky pomocí digitální morfologie, srovnajte s výsledky primárního hodnocení analyzátoru digitální morfologie s korekcí laborantky. Vybraná data zpracujte, zjistěte rozdíl mezi primárním hodnocení analyzátoru a korekcí laborantky. Zjistěte vztah výsledků k hodnotám hematokritu.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] Kačírková P., Campr V.: Hematoonkologický atlas krve a kostní dřeně. Grada, 2007, ISBN: 978-80-247-1853-8

[2] Vokurka M., Hugo J. a kol: Praktický slovník medicíny. Maxdorf, 2008, ISBN: 978-80-7345-159-2

Termín zadání: 8.2.2010

Termín odevzdání: 31.5.2010

Vedoucí práce: Ing. Jan Hrubeš

Konzultanti bakalářské práce:

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.

předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor bakalářské práce nesmí při vytváření bakalářské práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI, díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

Abstrakt

V současné době je standardizace morfologického vyšetření cytologických preparátů velice obtížné. Digitalizace obrazu a rozvoj výpočetní technologie umožňuje najít vhodné řešení k efektivnímu zpracování cytologických vzorků. Firma Cellavision vyvinula ve spolupráci s předními morfology přístroj Cellavision DM96, který využívá digitalizaci obrazu krevních buněk pro jejich morfologickou diagnostiku a následnou archivaci. Je důležité se na tento systém zaměřit a prověřit jeho využití v klinické praxi. Výsledky získané dvěma různými metodami byly statisticky zpracovány a vyhodnoceny.

Klíčová slova

cytologie, leukocyty, krevní nátěr, hematokrit, digitální morfologie, průtoková cytometrie, statistika

Abstract

At present, the standardization of morphological examination of cytological preparations appears to be very difficult. Digitization and development of computer technology makes it possible to find a suitable solution for the effective processing of cytological samples. Company Cellavision, in collaboration with leading morphologist, developed a device Cellavision DM96, which uses image capture of blood cells for their morphological diagnosis and subsequent archiving. It is of great importance to focus on this system and examine its use in clinical practice. The results obtained by two different methods were statistically processed and evaluated.

Keywords

cytology, white blood cells, blood smear, hematocrit, digital morphology, flow cytometry, statistics

Bibliografická citace práce

PAVLÍK, J. *Analýza diferenciálního rozpočtu leukocytů v periferní krvi různými diagnostickými metodami*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2010. 36 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Jan Hruběš.

Prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci na téma Analýza diferenciálního rozpočtu leukocytů v periferní krvi různými diagnostickými metodami jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením tohoto projektu jsem neporušil autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení § 152 trestního zákona č. 140/1961 Sb.

V Brně dne 31. května 2010

.....
podpis autora

Poděkování

Děkuji vedoucímu bakalářské práce Ing. Janu Hrubešovi za metodickou, pedagogickou a odbornou pomoc a další cenné rady. Poděkování také patří RNDr. Janě Šmídové za metodickou výpomoc a zapůjčení odborných materiálů firmy SYSMEX CZ s.r.o. Děkuji zdravotnickému personálu laboratorního oddělení klinické hematologie, zejména RNDr. Ludmile Bourkové a Jaroslavě Hoblové za jejich pomoc při sběru krevních vzorků, realizace hodnocení pomocí telehematologie. Děkuji doc. Jaromíru Baštincovi, CSc. a RNDr. Jiřímu Jarkovskému Ph.D. za konzultace a velmi užitečné a cenné rady v oblasti statistického zpracování dat.

V Brně dne 31. května 2010

.....
podpis autora

Obsah

1.	Úvod	9
2.	Cíl práce	9
3.	Teoretická část.....	10
3.1	Charakteristika bílých krvinek (dále jen leukocyty).....	10
3.2	Dělení leukocytů.....	11
3.3	Leukocyty hodnocené v barveném nátěru periferní krve	12
	Nesegmentovaný granulocyt (tyč).....	12
	Segmentovaný neutrofilní granulocyt (neutrofilní segment, neutrofil).....	12
	Segmentovaný eozinofilní granulocyt (eozinofilní segment, eozinofil)	13
	Segmentovaný bazofilní granulocyt (bazofilní segment, bazofil).....	13
	Monocyt.....	14
	Malý lymfocyt	14
	Velký lymfocyt	15
3.4	Hematokrit	15
3.5	Měřicí principy přístrojů.....	16
	Princip hodnocení diferenciálního rozpočtu leukocytů (diffu)	16
	Princip měření parametrů leukocytů analyzátozem Sysmex XE-5000.....	17
	Princip analyzátoru digitální morfologie Cellavision DM96	20
3.6	Statistické zpracování	22
	Popisná statistika	22
	Histogramy	22
	Korelace, korelační grafy	23
	Test normality.....	23
	Wilcoxonův párový test.....	23
4.	Praktická část.....	25
4.1	Sběr a charakter vzorků	25
	Postup sběru vzorků, záznam výsledků	25
	Sledované skupiny	26
	Základní soubor proměnných	26
4.2	Použitý software	26
4.3	Výsledky statistického zpracování	26
	Popisná statistika	26

Výsledky korelační analýzy	30
Výsledky Wilcoxonova párového testu.....	31
Hodnocení vztahu hematokritu.....	32
5. Závěr.....	33
6. Seznam použitých zkratk.....	34
7. Slovník pojmů	34
8. Citovaná literatura	35
9. Seznam příloh.....	36

Seznam obrázků

OBR. 1 MYELOIDNÍ VÝVOJOVÁ LINIE (GRANULOCYTÁRNÍ A MONOCYTÁRNÍ) [11]	10
OBR. 2 LYMFODNÍ VÝVOJOVÁ LINIE [11]	11
OBR. 3 NEUTROFILNÍ TYČ [1]	12
OBR. 4 NEUTROFILNÍ SEGMENT [1].....	12
OBR. 5 EOZINOFILNÍ GRANULOCYT [1].....	13
OBR. 6 BAZOFILNÍ SEGMENT [1]	13
OBR. 7 MONOCYT [1]	14
OBR. 8 MALÝ LYMFOCYT [1].....	14
OBR. 9 VELKÝ LYMFOCYT [1]	15
OBR. 10 SCHÉMA PRŮTOKOVÉ FLUORESCENČNÍ CYTOMETRIE [4]	17
OBR. 11 SCHÉMA A PRINCIP HYDRODYNAMICKÉ FOKUSACE. [4]	18
OBR. 12 SCATTERGRAM DIFF KANÁLU SE ČTYŘMI POPULACEMI BUNĚK [4].....	18
OBR. 13 SCATTERGRAM BASO KANÁLU S VÝSKYTEM ZAZNAMENANÝCH POPULACÍ [4]	19
OBR. 14 SCATTERGRAM IMI KANÁLU S POPULACEMI NEZRALÝCH BUNĚK [4]	20
OBR. 15 CELLAVISION DM96 [6].....	21

Seznam grafů

GRAF 1 SOUHRN NAMĚŘENÝCH DAT DIFFU XE-5000, HISTOGRAMY	27
GRAF 2 GRAFY TESTU NORMALITY (SW-W = SAPHIRO – WILKŮV TEST, HODNOTA W (VIZ STR. 23)).....	27
GRAF 3 SOUHRN NAMĚŘENÝCH DAT DIFFŮ DM96 BK, HISTOGRAMY	28
GRAF 4 GRAFY TESTU NORMALITY (SW-W = SAPHIRO – WILKŮV TEST, HODNOTA W (VIZ STR. 23)).....	28
GRAF 5 SOUHRN NAMĚŘENÝCH DAT DIFFŮ DM96 SK, HISTOGRAMY	29
GRAF 6 GRAFY TESTU NORMALITY (SW-W = SAPHIRO – WILKŮV TEST, HODNOTA W (VIZ STR. 23)).....	29
GRAF 7 VLEVO: KORELACE DM96 BK A XE-5000 VPRAVO: KORELACE DM96 BK A XE-5000	30
GRAF 8 VÝSLEDKY KORELACÍ MONOCYTŮ PRO JEDNOTLIVÉ HEMATOKRITOVÉ HLADINY	32

Seznam tabulek

TABULKA 1 HEMATOKRITOVÉ HLADINY (LEVELY).....	15
TABULKA 2 FYZIOLOGICKÉ HODNOTY DIFERENCIÁLNÍHO ROZPOČTU LEUKOCYTŮ [3].....	16
TABULKA 3 VÝSLEDKY WILCOXONOVA PÁROVÉHO TESTU.....	31

1. Úvod

V dnešní laboratorní praxi je vyvíjen velký tlak na kvalitu analýzy, rychlost jejího provedení a rychlost získání výsledku. Standardizace výstupů z laboratoře významnou mírou přispívá zkvalitnění diferenciální diagnostiky biologického materiálu. Každá hematologická klinická laboratoř provádí hodnocení kvality a kvantity buněk. Morfologické hodnocení cytologického preparátu (krevních nátěrů) je závislé do jisté míry na subjektivním úsudku a je podmíněno úrovní jeho zpracování. V současné době je standardizace morfologického vyšetření cytologických preparátů velice obtížné. Digitalizace obrazu a rozvoj výpočetní technologie umožňuje najít vhodné řešení k efektivnímu zpracování cytologických vzorků. Jednou z technických novinek je tzv. „digitální morfologie“.

Firma Cellavision vyvinula ve spolupráci s předními morfology přístroj Cellavision DM96, který využívá digitalizaci obrazu krevních buněk pro jejich morfologickou diagnostiku a následnou archivaci. Tato technologie je určena především pro laboratoře, kde se provádí diferenciální diagnostika morfologie buněčných populací. Přínosem tohoto systému je standardizace a urychlení celého procesu vyšetření krevního vzorku. Digitalizace krevních nátěrů navíc umožňuje zvýšit úroveň archivace a umožňuje následné zpracování potřebné informace a flexibilitu konzultace s dalšími odborníky.

Digitální morfologie je základním článkem systému Telehematologie. Telehematologie pomáhá zkrátit vzdálenost mezi odborníky rozsetými po celé republice, ale i po celém světě. Redukuje se pomalé a rizikové posílání krevních skel poštou a k dispozici je i online konzultace specialistů pomocí internetu či videokonference. Z hlediska pacienta digitální morfologie umožňuje zkvalitnění péče zrychlením či upřesněním důležitých fází prediagnostiky a klasifikace onemocnění.

Teoretická část této práce se zaměřuje na morfologickou stránku buněk a základní měřicí principy, které jsou důležité pro pochopení a orientaci v metodách měření porovnávaných přístrojů. V teoretické části je také zahrnuta teorie použitých statistických postupů a testů. Praktickou část reprezentuje sběr a manipulace se vzorky, statistické zpracování zkoumaných metod. Všechna nasbíraná data a tabulky jsou umístěny v přílohách.

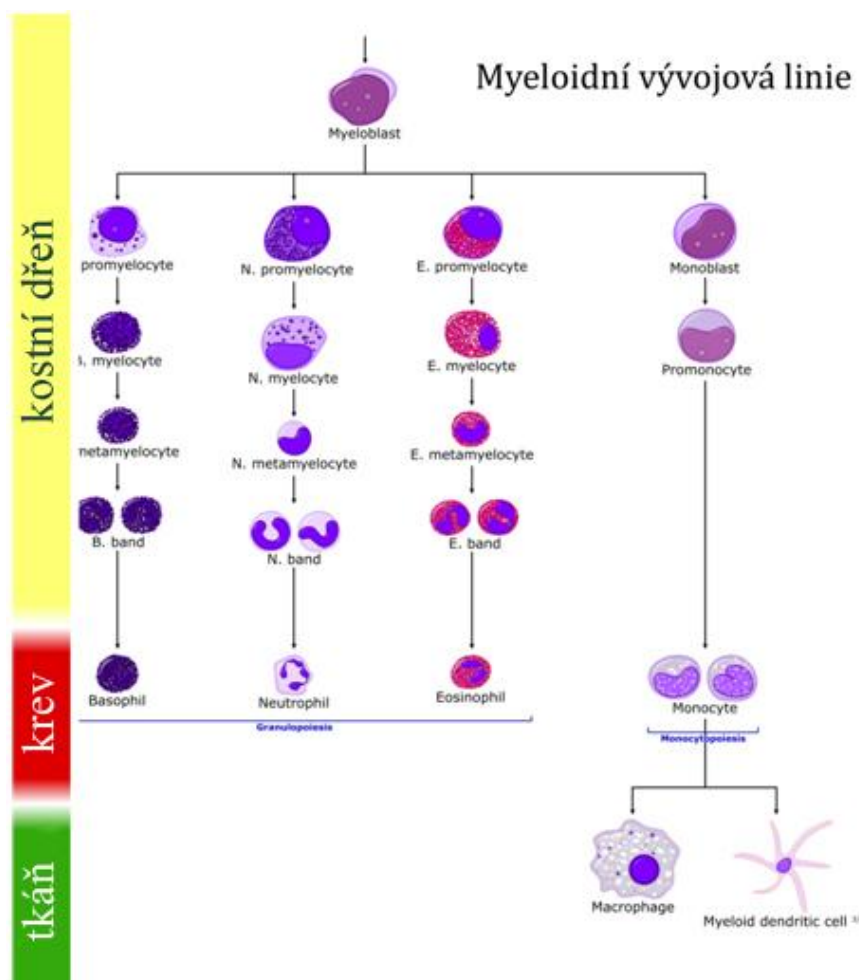
2. Cíl práce

Cílem této bakalářské práce je zjistit jakýkoliv vztah či rozdíl mezi měřením průtokovým cytometrem Sysmex XE-5000 a analyzátozem digitální morfologie Cellavision DM96. Mým úkolem je nashromáždit dostatečné množství dat z přístroje digitální morfologie Cellavision DM96. Důležité je zaměřit se na odečítání dat diferenciálního rozpočtu bílých krvinek z primárního rozřazení analyzátoru Cellavision DM96 bez zásahu personálu laboratoře a poté zaznamenat ta samá data, ovšem již po korekci zdravotnického personálu. Jako zlatý standard jsou použity hodnoty diferenciálního rozpočtu bílých krvinek krevních obrazů získané z průtokového cytometru XE-5000. Ze získaných hodnot jsem zjišťoval, do jaké míry se hodnoty mezi sebou liší, a tyto hodnoty byly podrobeny statistickým analýzám.

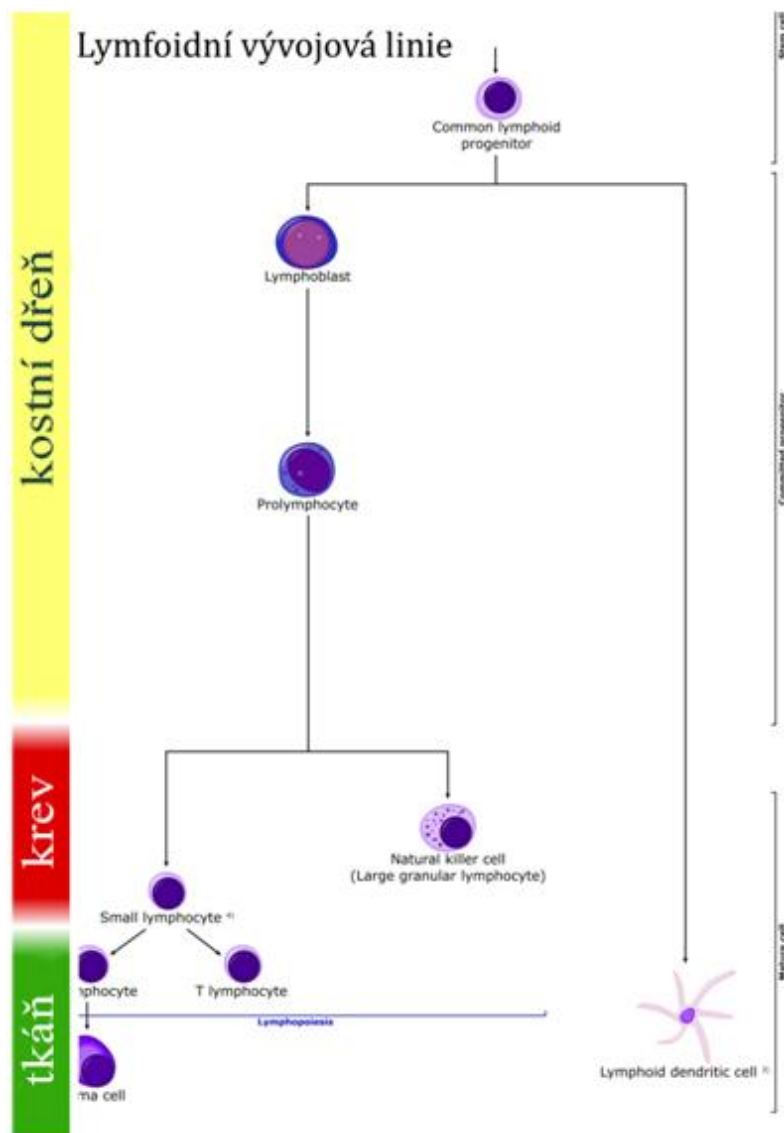
3. Teoretická část

3.1 Charakteristika bílých krvinek (dále jen leukocyty)

Leukocyty jsou součástí buněčné složky krve. Uplatňují se zejména při obranyschopnosti organismu. Za fyziologických podmínek se nachází v lidské krvi v koncentraci $4 - 10 \times 10^9/l$ bílých krvinek. Leukocyty vznikají v krvetvorných orgánech. Granulocytární řada dává vznik efektorovým buňkám s obsahem specifických granul (Obr. 1). V monocytární řadě vznikají monocyty. Granulocytární a monocytární vývojová řada mají společnou prekurzorovou buňku a tím jsou zahrnuty v tzv. myeloidní vývojové linii (Obr. 1). Z prekurzorové lymfoidní buňky vznikají postupným vyzríváním v jednotlivých krvetvorných orgánech (kostní dřeň, thymus) všechny formy lymfocytů (lymfocyty T a B, NK buňky). (Obr. 2). Zralé nebo téměř zralé buňky opouští kostní dřeň, granulocyty a monocyty přecházejí do krevního oběhu, T a B lymfocyty do lymfatických systémů, kde dozrávají a jsou pak částečně vyplavovány do obvodové krve. V průběhu zrání se buňka leukocytu morfologicky mění. Cytoplazma během vývoje ztrácí svou bazofilii, u některých buněk (granulocyty) se objevují specifická granula. Jaderný chromatin se zahušťuje a ztrácí jemné uspořádání, u zralých granulocytů může segmentovat. Buňka postupně zmenšuje i svůj objem a mění tvar. [1]



Obr. 1 myeloidní vývojová linie (Granulocytární a monocytární) [11]



Obr. 2 lymfoidní vývojová linie [11]

3.2 Dělení leukocytů

K rozlišení bílých krvinek v nátěrech periferní krve využíváme některé jejich morfologické charakteristiky. Všímáme si zejména tvaru a vzhledu jádra, vyzrálosti jaderného chromatinu, vzhledu a zabarvení cytoplazmy, přítomnosti granul aj. Polymorfonukleáry (polynukleáry) mají laločnaté a členěné jádro. Řadí se k nim efektorové buňky granulocytární řady (viz slovník pojmů). Naopak mononukleáry mají na rozdíl od předešlé skupiny jádro jednoduté, kulovitého nebo oválného tvaru. Jiné dělení, které vychází z toho, zda cytoplazma obsahuje či neobsahuje granula, rozlišuje granulocyty a agranulocyty. Granulocyty od stádia zralého myelocytu obsahují specifická granula v cytoplazmě a v této řadě rozlišujeme neutrofilní, eozinofilní a bazofilní granulaci. Agranulocyty nemají specifickou granulaci, pouze u některých lymfocytů může být v cytoplazmě přítomno malé množství azurofilních granul. [1]

3.3 Leukocyty hodnocené v barveném nátěru periferní krve

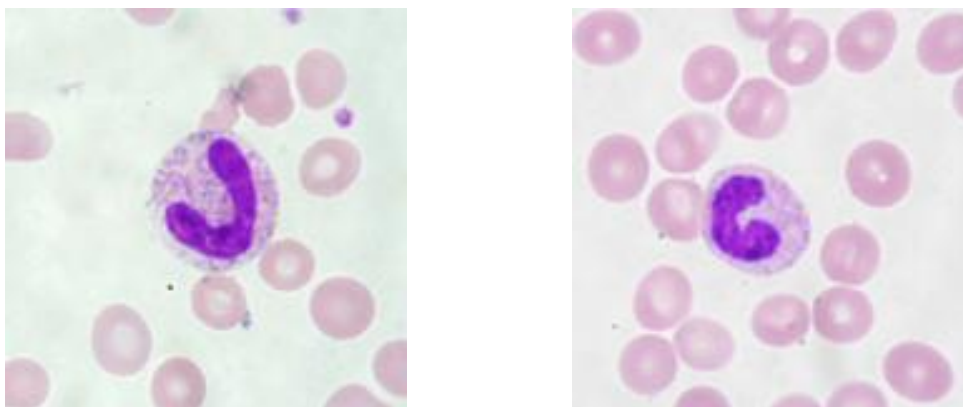
Nesegmentovaný granulocyt (tyč)

Průměr: 10 – 16 μm .

Jádro: není segmentováno, má tvar podkovy nebo kličky či rovné nebo lehce do oblouku stočené tyčky. Povrch jádra je pravidelný bez výraznějšího zaškrcení.

Chromatin: hutný, nerovnoměrně rozmístěn, má hrudkovitý charakter, tvoří tmavší a světlejší políčka.

Cytoplazma: většinou slabě oxyfilní s granulací. [1]



Obr. 3 neutrofilní tyč [1]

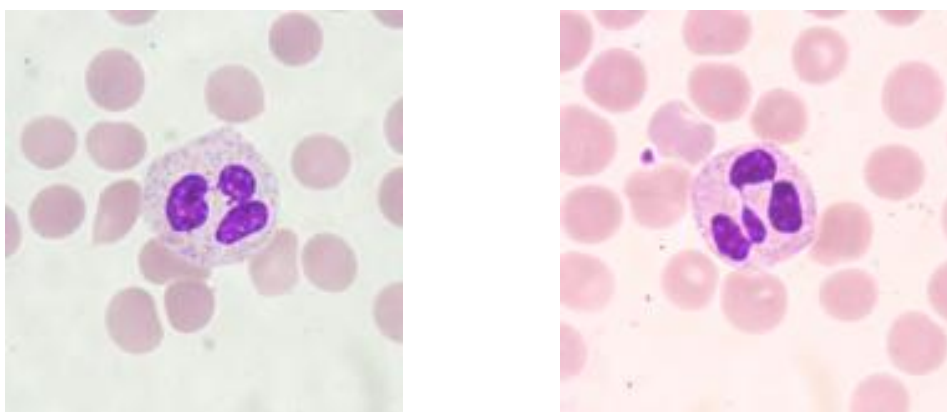
Segmentovaný neutrofilní granulocyt (neutrofilní segment, neutrofil)

Průměr: 12 - 15 μm .

Jádro: zaškrcené většinou rozdělené na 2 - 5 částí (segmentů) spojených tenkými nitkovitými můstky.

Chromatin: hutný, tmavší políčka jsou seskupena po obvodu jádra.

Cytoplazma: oxyfilní s četným zastoupením specifických granul, která obsahují enzymy (neutrální proteázy, kyselé hydrolázy, myeloperoxidázu, esterázy), cytotoxické a antimikrobní látky, cytoplazmatické membránové receptory. [1]



Obr. 4 neutrofilní segment [1]

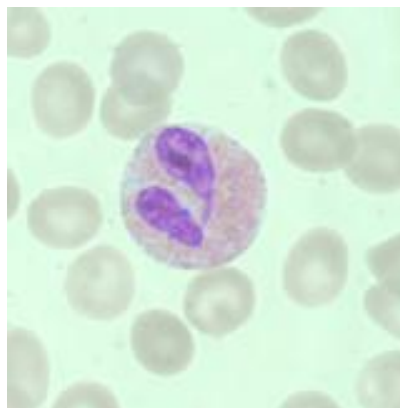
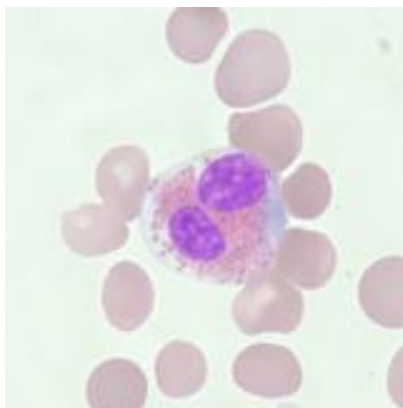
Segmentovaný eozinofilní granulocyt (eozinofilní segment, eozinofil)

Průměr: 10 - 16 μm .

Jádro: většinou segmentováno na 2 fragmenty propojené vzájemně chromatinovým můstkem. Vzhledem připomíná činku nebo brýle.

Chromatin: hutný, místy prosvětlený.

Cytoplazma: oxyfilně zabarvená s četným zastoupením specifických eozinofilních granul, která obsahují např. bazický protein, histaminázu, histamin, kyselé hydrolázy, eozinofilní peroxidázu, plazminogen. [1]



Obr. 5 eozinofilní granulocyt [1]

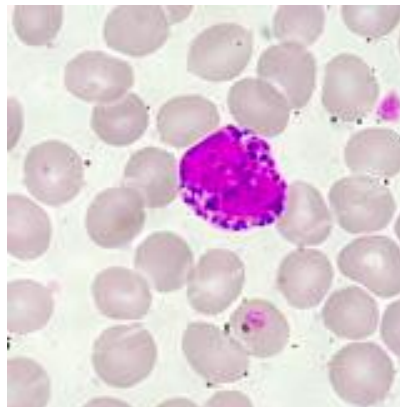
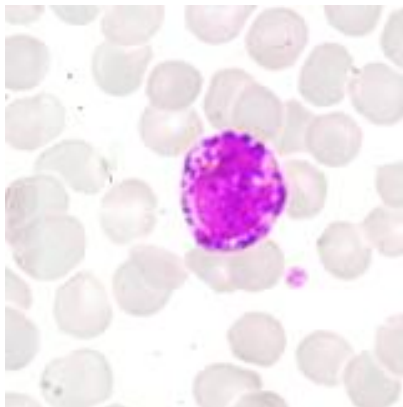
Segmentovaný bazofilní granulocyt (bazofilní segment, bazofil)

Průměr: přibližně 11 μm .

Jádro: laločnaté, připomíná jetelový list, často rozděleno na 3 segmenty, spojené mezi sebou silnějším chromatinovým můstkem. Jádro nemusí být mnohdy díky výrazné granulaci dobře viditelné. [1]

Chromatin: obsažen v menší míře než u neutrofilního segmentu, tvoří hutná, tmavá políčka.

Cytoplazma: obsahuje specifická granula hrubá a větší než u ostatních typů segmentů. Granula obsahují histamin, serotonin, prostaglandiny a heparin.



Obr. 6 bazofilní segment [1]

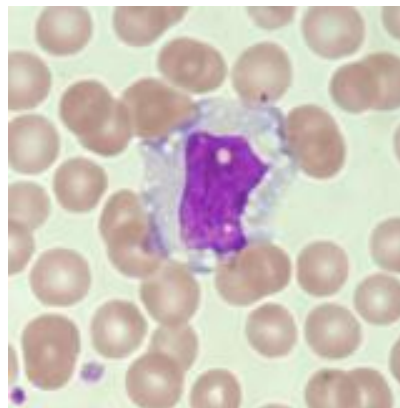
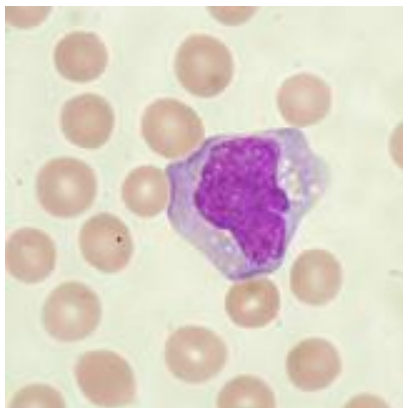
Monocyt

Průměr: přibližně stejný jako u promonocyty.

Jádro: nepravidelné, ledvinovité.

Chromatin: řídký, vláknitý s tmavšími políčky.

Cytoplazma: šedomodrá, často s vakuolizací, většinou s jemnou granulací, která není v běžném barvení příliš zřetelná. [1]



Obr. 7 monocyt [1]

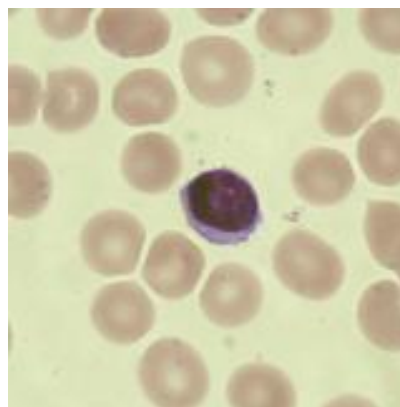
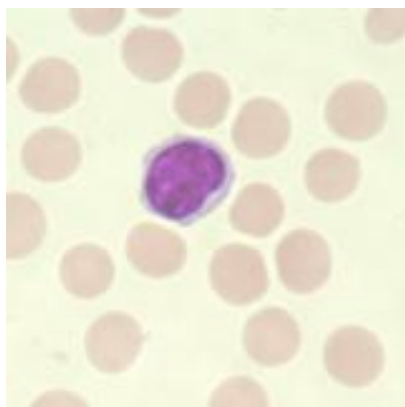
Malý lymfocyt

Průměr: 8 – 10 μm .

Jádro: kulaté, vyplňuje velkou část buňky.

Chromatin: hutný homogenní, jadérko není viditelné.

Cytoplazma: slabě až středně bazofilní, tvoří okolo jádra úzký lem. [1]



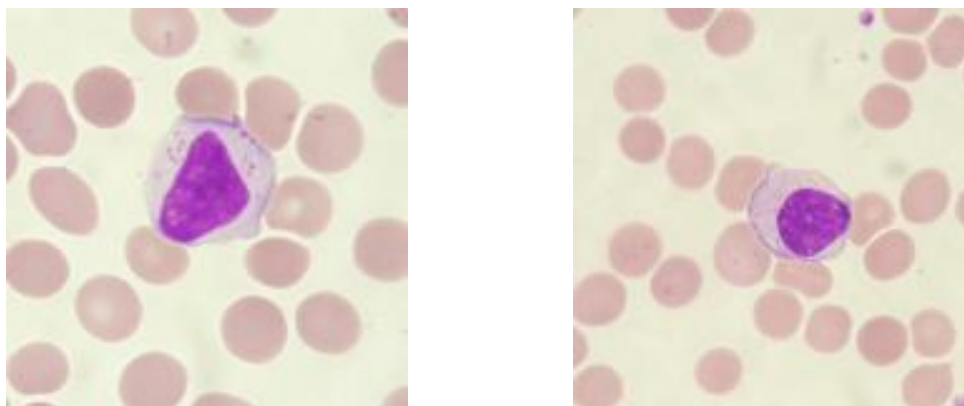
Obr. 8 malý lymfocyt [1]

Velký lymfocyt

Průměr: 12 – 16 μm .

Chromatin: oproti malému lymfocytu řidší, mohou být i viditelná jadérka.

Cytoplazma: oxyfilní nebo lehce bazofilní, v některých případech může obsahovat několik primárních azurofilních granul seskupených většinou v jednom místě. [1]



Obr. 9 velký lymfocyt [1]

3.4 Hematokrit

Hematokrit (HCT) patří mezi základní parametry červené krvinky a udává poměr objemu erytrocytů k celkovému objemu krve. Fyziologické hodnoty jsou pro muže 0,42-0,52 a pro ženy 0,37-0,47. Hematokrit můžeme zjistit buď centrifugací nesrážlivé krve, nebo pomocí krevních analyzátorů, kde je počítán z několika krevních parametrů. Nátěrový automat potřebuje ke své funkci znát hodnotu hematokritu. Proto jsou hodnoty hematokritů sestaveny do 8 hladin (levelů), (Tabulka 1). Níže popsané hodnoty pocházejí z oddělení klinické hematologie Fakultní nemocnice v Brně Bohunicích. Hladina hematokritu může ovlivnit umístění některých krvinek v nátěru, vzhledem jejich velikosti. V praktické části práce tomuto tématu je věnována pozornost. Diferenciální rozpočty leukocytů byly naměřeny v osmi hematokritových hladinách (přílohy A - H). [2]

Level	Hodnota HCT
Level 1	<0,20
Level 2	0,20 - 0,25
Level 3	0,25 - 0,30
Level 4	0,30 - 0,35
Level 5	0,35 - 0,40
Level 6	0,40 - 0,45
Level 7	0,45 - 0,50
Level 8	>0,50

Tabulka 1 hematokritové hladiny (levely)

3.5 Měřící principy přístrojů

Princip hodnocení diferenciálního rozpočtu leukocytů (diffu)

Jelikož jsou leukocyty značně morfologicky i funkčně rozmanité, je pouhé stanovení jejich koncentrace v krvi pro správnou klinickou diagnostiku nedostačující. Je nutné provést hodnocení barveného krevního nátěru a zjistit poměrné zastoupení jednotlivých druhů leukocytů. Diferenciální rozpočet bílých krvinek se v běžné laboratorní praxi provádí zhodnocením 100 leukocytů a jejich morfologickým rozdělením do odpovídajících linií. I při fyziologickém celkovém počtu leukocytů může být určitá linie zmnožena nebo naopak zastoupena menší měrou. U některých onemocnění bývá charakteristická změna v procentuálním zastoupení určitých typů leukocytů (např. zmnožení neutrofilů, lymfocytů nebo eozinofilů). Z krevního nátěru lze tak odvodit procentuelní počty mladších nebo starších vývojových forem neutrofilních granulocytů. Převaha starších forem je charakterizována jádry s více segmenty a je svědectvím útlumu jejich produkce. Naopak větší výskyt neutrofilních tyčí svědčí o stimulaci leukopoézy (tvorby leukocytů). Dále se hodnotí bazofilní a eozinofilní segmenty, lymfocyty a monocyty, jejichž počty a poměry mohou být spjaty s různými chorobami. Číselné výsledky jsou klinikům vydávány v procentuelní podobě, nebo v absolutním počtu, který je vztažen k celkovému počtu leukocytů. Pro hodnocení krevních nátěrů je nutné použít standardních postupů pro optimalizaci a možnost porovnatelnosti mezi subjekty (jednotliví pracovníci, laboratoře). Kontrola kvality v hematologické laboratoři je řízena ústavem SEKK (Systém externí kontroly kvality). Tabulka 2 popisuje fyziologické hodnoty získané z protokolu SEKK pro hodnocení krevních nátěrů. [2; 3]

<i>Leukocyty</i>	<i>%</i>
<i>Neutrofilny</i>	47 – 70 %
<i>Tyče</i>	0 – 4 %
<i>Lymfocyty</i>	20 – 45 %
<i>Monocyty</i>	2 – 10 %
<i>Eozinofily</i>	0 – 5 %
<i>Bazofily</i>	0 – 1 %

Tabulka 2 fyziologické hodnoty diferenciálního rozpočtu leukocytů [3]

Princip zhotovení krevního nátěru nátěrovým automatem Sysmex SP-1000i

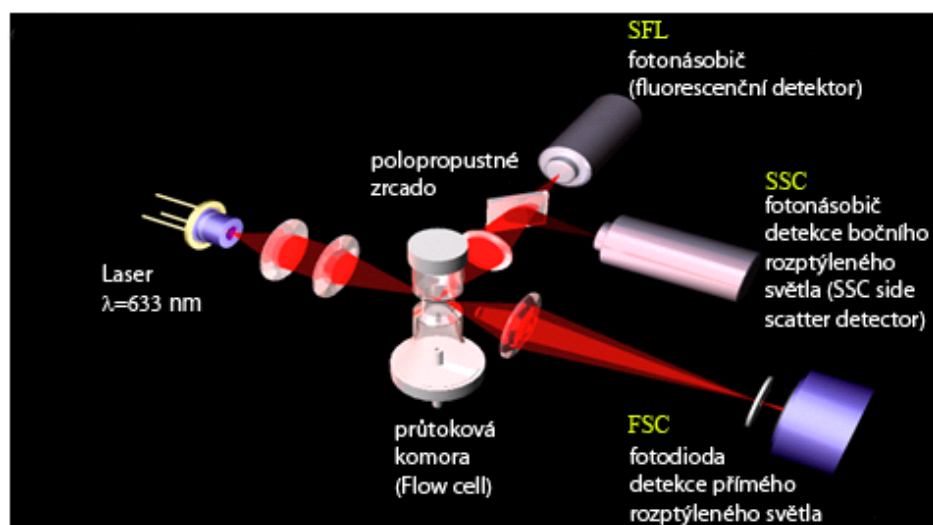
Aby bylo možné leukocyty mikroskopicky hodnotit, je potřeba krevní vzorek aplikovat a rozetřít na podložní mikroskopové sklíčko, nátěr zafixovat pomocí metanolu a dále ho obarvit potřebným barvením. Ruční technika tvorby nátěrů je nepřípustná pro další strojové zpracování proto i v tomto odvětví zapůsobila síla automatizace. Nátěrový automat Sysmex SP-1000i zhotovuje precizní barvené krevní nátěry. Zhotovení se provádí na základě krevního hematokritu, který vypovídá o hustotě a viskozitě krve a následně podle tohoto parametru se řídí úhel roztěrového skla a rychlost natírání, pro každou z osmi hladin jsou parametry jiné. Výsledkem jsou nátěry o standardní délce a rozprostření buněk. Skla jsou dále podle potřeby barvena v barvicí lince téhož automatu. Za standardní barvicí techniku se

v hematologické praxi uvádí barvení May Grünwald a Giemsa Romanowski (viz slovník pojmů). Těmito kroky je docílena unifikace krevních nátěrů při různých hladinách hematokritu, z hlediska docílení jedné konstantní a rovnoměrné vrstvy buněk (monolayeru) a jeho probarvení. Tyto podmínky jsou ideální pro standardizaci krevního nátěru, který takto vytvořený lze použít pro následnou přístrojovou analýzu pomocí digitální morfologie. [4]

Princip měření parametrů leukocytů analyzátozem Sysmex XE-5000

Průtoková cytometrie

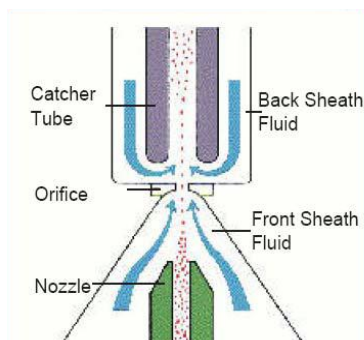
Průtoková cytometrie je optická metoda používaná k analýze fyzikálních a chemických vlastností buněk. Informuje o velikosti buňky a její vnitřní stavbě, například velikost a hustota jádra a přítomnost granul v cytoplasmě. Při analýze prochází měřený vzorek před samotným procesem měření preanalytickou úpravou (ředění, chem. reakce). Buňky jsou následně obarveny fluorescenčním barvivem. Takto připravené jsou vstříkované pomocí hydrodynamické fokusace (viz dále) do průtokové komory (skleněná kapilára o určitém průměru), zde jsou prosvíceny laserovým paprskem o vlnové délce 633 nm. Dlouhá vlnová délka zaručuje fokusaci paprsku na co nejmenší plochu, a tím zaručuje pouze detekci námi požadovaného elementu. Každá buňka vykazuje specifické charakteristiky signálů, které jsou zaznamenány třemi fotodetektory (Obr. 10). Forward scatter detektor (FSC) zaznamenává odchytku paprsku od jeho původního směru při dopadu na buňku, která prochází průtokovou komorou. Úhel odchytky je přímo úměrný objemu buňky. Side scatter detektor (SSC) zachycuje světelný signál paprsku odraženého od vnitřních struktur buňky v úhlu. Intenzita signálu z tohoto detektoru vypovídá o kvalitě buněčného obsahu, jádra či přítomnosti specifických granul. V optické soustavě analyzátoru se nachází boční fluorescenční detektor (SFL), indikující množství fluorescenčního záření generovaným obarvenou DNA a RNA přítomnou v buňce. Po použití specifických barev a činidel je možné buňky selektivně lyzovat (rozpouštět), barvit a počítat v daných kanálech. Výstupem jsou číselné hodnoty jednotlivých typů leukocytů a jejich grafické zobrazení v rozptylových grafech (scattergramech). Během analýzy probíhá detekce několika tisíc buněk (až 10000). [4; 5]



Obr. 10 schéma průtokové fluorescenční cytometrie [4]

Hydrodynamická fokusace

Hydrodynamická fokusace umožňuje zlepšit účinnost měření pomocí usměrnění proudu diluentu (viz slovník pojmů) s buňkami a jejich průchodem měřicím kanálem „po jedné“. Suspenze buněk je pomocí trysky vháněna do trubice, ve které proudí okolní kapalina rychleji, buňky v diluentu jsou strhávány okolním proudem, který usměrní jejich pohyb, rovnoměrně je rozprostře a drží ve vhodné fokusační vzdálenosti od laseru (Obr. 11). Hydrodynamická fokusace zefektivňuje a zpřesňuje celkové měření. [4; 5]

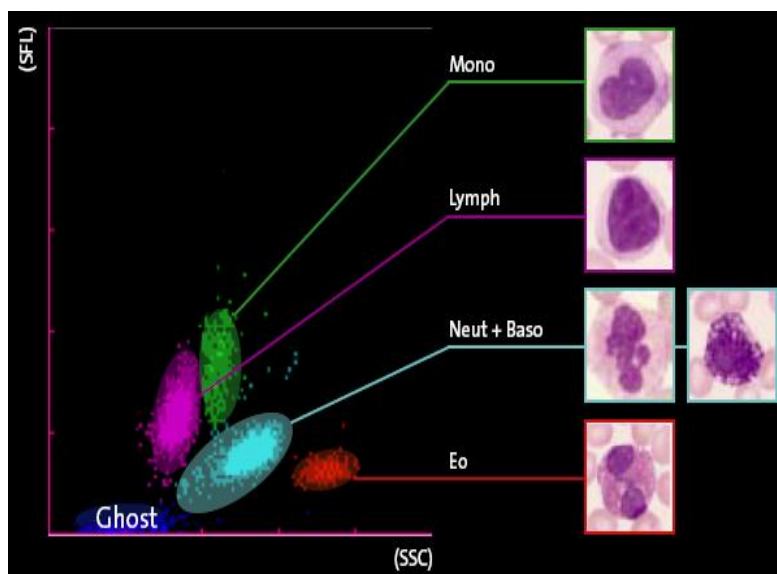


nozzle – tryska
catcher tube – záchytná trubice
orifice – měrný bod DC a RF metody
Front/Bank fluid – rovnoběžný/boční proud diluentu

Obr. 11 schéma a princip hydrodynamické fokusace. [4]

DIFF kanál

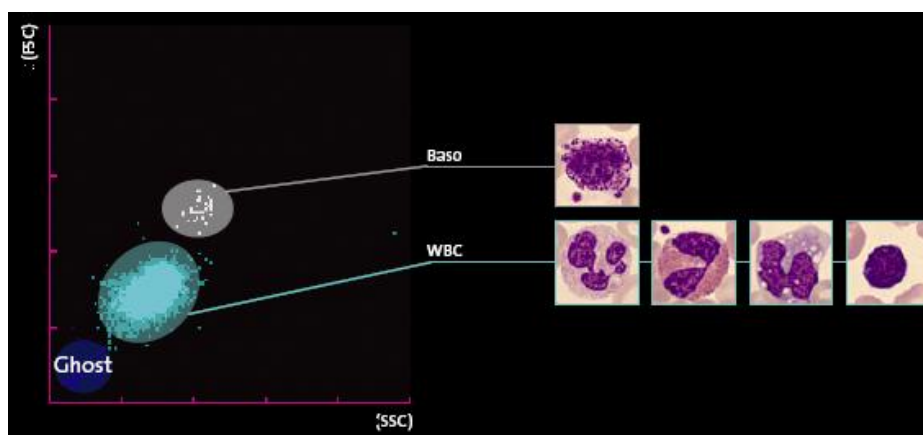
Do měřicího kanálu DIFF je vstřikováno společně s buněčnou suspenzí činidlo Stromatolyser-4DL, které způsobuje hemolýzu červených krvinek a trombocytů. U bílých krvinek toto činidlo způsobí jemnou perforaci buněčné membrány avšak jejich tvar a velikost zůstávají pro následné měření zachováni. Následně dávkované polymethinové fluorescenční barvivo Stromatolyser-4DS díky perforované membráně leukocytů snadno pronikne do buňky a naváže se na DNA, RNA obsažené v jádře, cytoplasmě a v dalších buněčných organelách. Grafické a číselné hodnocení leukocytů (Obr. 12) je výsledkem kombinace měření signálů bočního fluorescenčního detektoru (FSC) a Side scatter detektoru (SSC). [4]



Obr. 12 scattergram DIFF kanálu se čtyřmi populacemi buněk [4]

WBC/BASO kanál

Do měřicího kanálu WBC/BASO je vstřikováno společně s buněčnou suspenzí činidlo Stromatolyser-FB, které způsobí lýzu (rozpad) erytrocytů, trombocytů a rozpouští membránu leukocytů, dochází tak ke snížení objemu leukocytů na velikost jádra. Úplná lýza membrány však neproběhne u bazofilních granulocytů, které tímto zůstávají zachovány pro měření ve své původní velikosti. Výsledný objemový rozdíl mezi skupinou bazofilních segmentů a ostatními krevními elementy umožňuje přesnou analýzu jejich počtu (Obr. 13). Pro stanovení celkového počtu leukocytů a populace bazofilních segmentů jsou využity signály z detektorů SSC a FSC – tj. kombinace informací o vnitřní struktuře buňky a její velikosti. [4]



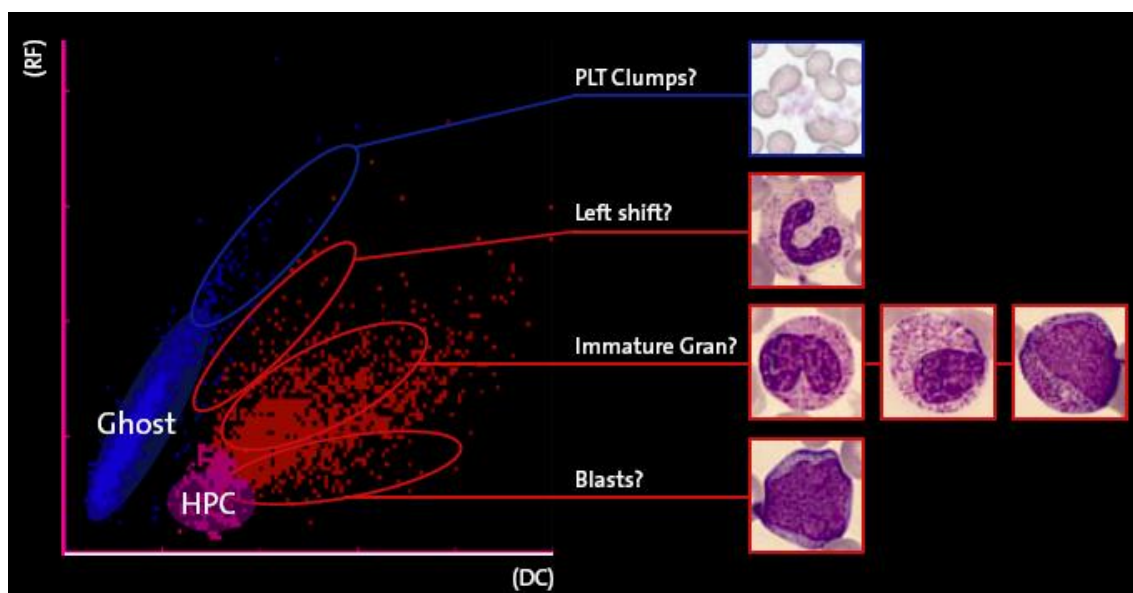
IMI kanál

19

Impedanční měřicí metoda (DC): buňka v detekční komůrce, naplněné vodivým roztokem prochází měřicí aperturou (orifice, Obr. 11), kterou prochází stejnosměrný proud mezi dvěma elektrodami. Buňka průchodem přes aperturu způsobí změnu v odporu mezi elektrodami, tato změna iniciuje vznik signálu, který je přímo úměrný velikosti buňky. [4]

Metoda vysokofrekvenčního pole (RF): měření probíhá také v orifice (Obr. 11), ale na rozdíl od stejnosměrného pole, které neprochází dovnitř buňky, vysokofrekvenční elektrické pole proniká dovnitř buňky a jeho charakteristiky se mění úměrně s denzitou buňky (vliv hustoty jádra, vliv poměru objemu jádra a cytoplasmy). Lze charakterizovat vnitřní strukturu buněk. [4]

V kanále IMI jsou analyzované mladé formy buněk, jejichž vývojové stádium je typické vnitřní strukturou a objemu (velikosti) buňky. Nejmladší formy myeloidní řady mají velmi nízkou denzitu jádra a vysoký poměr objemu jádro/cytoplasma. Na základě kombinace signálů DC a RF lze v rozptylových grafech (scattergramech) odlišit jednotlivá vývojová stádía buněk myeloidní linie (blasty – nezralé buňky, myelocyty, metamyelocyty, promyelocyty, tyče). [4]



Obr. 14 scattergram IMI kanálu s populacemi nezralých buněk [4]

Princip analyzátoru digitální morfologie Cellavision DM96

Cellavision DM96 (Obr. 15) slouží k rozřazení a diagnostice leukocytů v krevním nátěru barveném metodou May Grünwald a Giemsa Romanowski. K detekci a snímání buněk slouží kamera připojená na upravený mikroskop uvnitř přístroje. Software dodávaný s analyzátozem umožňuje správu naměřených nátěrů, hodnocení červené krevní řady, hodnocení krevních destiček a hodnocení leukocytů. Tento software je určen také pro hodnocení patologických anomálií výše zmíněných frakcí buněk. Analýzu obrazu vykonává umělá neuronová síť. Následná korekce, validace výsledku a spojení s laboratorním informačním systémem umožňují plynulý a rychlý výdej výsledků přímo ke specialistovi. [6; 7]

Postup analýzy:

1. Po vložení barveného krevního preparátu do zásobníku přístroje Cellavision DM96 je sklíčko automaticky přemístěno na mikroskopický stolek přístroje. Analyzátor nejdříve hledá na sklíčku s preparátem vhodnou tloušťku nátěru pro analýzu – používá při tom zvětšení 10x. Nejvhodnější oblast pro analýzu je místo, kde se buňky nepřekrývají – tzv. monolayer. [6; 7]
2. Po nalezení vhodné oblasti následuje výměna objektivu na zvětšení 50x, na základě optických signálů jsou vyhledávány jaderné – obarvené buňky a zaznamenávány jejich souřadnice. Při zvětšení 50x je na základě barevných kontur a dalších optických signálů hodnocena morfologie červených krvinek, které mají na rozdíl od leukocytů odlišné zbarvení. [6; 7]
3. Po ukončení hodnocení morfologie červených krvinek je vyměněn objektiv na 100 násobné zvětšení a na sklíčko s preparátem je nadávkován imerzní olej pro dosažení vyššího zvětšení. Vyhledání a snímání jednotlivých leukocytů proběhne již rychle na základě dříve zaznamenaných souřadnic. Samotné diferencování, klasifikace a rozpočítání buněk probíhá v samotném softwaru počítače pomocí umělé neuronové sítě. Každá buňka je klasifikována na základě zpracování 300 signálů, např. hodnotí se barva cytoplazmy, tvar jádra, velikost buňky, obsah granulí atd. Skladba neuronové sítě a další softwarové prvky však zůstávají výrobcem utajeny. Pokud analyzátor dostane z laboratorního informačního systému informaci o nízkém počtu leukocytů, zvýší konečný počet detekovaných buněk ze 100 až na 200 i více, aby se zvýšila přesnost detekce. [6; 7]



Obr. 15 Cellavision DM96 [6]

3.6 Statistické zpracování

Popisná statistika

Aby byl zřejmý charakter, a rozložení naměřených vzorků je vhodné provést základní popisnou statistiku.

Minimální sada statistických veličin bývá zastoupena:

- **počtem vzorků** – Počet vzorků je značen písmenem n . [8]
- **průměrem** - Značí se $\bar{x}$ či μ a vypočítá se součtem všech hodnot x_i podílem rozsahu výběru n . [8]

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (1)$$

- **mediánem** – lépe interpretuje střední hodnotu v asymetrickém rozložení dat. Poukazuje na posun v rozdělení dat. Značí se $\tilde{x}$ a dělí pozorování na dvě stejně velké skupiny. [8]
- **rozptylem** – průměr čtverců odchylek od průměru. Je značen s^2 nebo σ^2 , dělitel $(n-1)$ se nazývá počet stupňů volnosti rozptylu. [8]

$$s^2 = \frac{1}{(n-1)} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad (2)$$

- **směrodatnou odchylkou**

$$s = \sqrt{s^2} \quad (3)$$

- **minimem, maximem, rozpětím** - mohou poukázat na odlehlou nebo extrémní hodnotu. [8]

Takto vypočtenou statistiku je vhodné doplnit základními grafy [8]

Histogramy

Histogramy jsou sloupcové grafy, které znázorňují rozdělení absolutních a relativních četností spojitého znaku. Kde na osu X se vynášejí intervalové třídy měřených veličin a na osu Y se vynášejí četnosti jejich výskytu v populaci. [8]

Korelace, korelační grafy

Korelace se používají pro měření síly mezi dvěma spojitými náhodnými veličinami. K vyjádření vztahu těchto dvou skupin se používá tzv. Korelační koeficient r počítaný dle vzorce

$$r = \frac{s_{xy}}{\sqrt{s_x^2 s_y^2}} \quad (4)$$

Kde s_x^2 a s_y^2 jsou výběrové rozptyly a s_{xy} je kovariance (střední hodnota součinu odchylek obou náhodných veličin X , Y). Hodnota korelačního koeficientu se pohybuje v rozmezí od $\{-1; 1\}$, kdy hodnot ± 1 dosahuje tehdy, pokud všechny body $[x_i, y_i]$ leží na regresní přímce. Korelační koeficient může být nulový i v případě funkční závislosti veličin, ale jejich závislost není být lineární. Při měření lineární závislosti je znaménko korelačního koeficientu kladné, pokud obě veličiny X a Y zároveň rostou nebo zároveň klesají. Korelační koeficient je záporný, pokud jedna z veličin roste a druhá zároveň klesá. Korelační graf sestojíme tak, že na jednotlivé osy vyneseme párové hodnoty obou sledovaných veličin. Jedná se o bodový graf, kde každý bod je reprezentován dvojicí výsledků. Skupinu vynesných bodů je vhodné proložit regresní přímkou. Na základě vzdálenosti všech bodů od regresní přímky se mění i velikost korelačního koeficientu, čím blíže jsou body ke přímce, tím je korelační koeficient bližší hodnotě ± 1 . Z korelačního grafu můžeme odhalit přítomnost vychýlených (vlivných) bodů. Bod vychýlený ve směru obou souřadnic označujeme jako extrém a bod vychýlený z jedné souřadnice jako odlehlý. [8]

Test normality

Aby bylo možné provést formální analýzu či testování hypotéz, kde používáme ke zhodnocení dosaženou hladinu významnosti ($p - vaule$). Hladina významnosti závisí na tom, jakou shodu vykazují naměřená data s teoretickým normálním rozdělením. K tomuto otestování slouží testy normality a jejich grafy. Nejčastěji používaným testem je Shapiro – Wilkův test, který je určen pro malý až střední rozsah dat ($n \leq 2000$). Výstupní hodnotou je již zmíněná $p - vaule$ a hodnota W , která může být interpretována jako korelace mezi pozorovanými hodnotami a jejich normalitní hodnotou. Testová statistika W dosahuje hodnoty 1, když jde o perfektní shodu naměřených hodnot a teoretickým rozdělením. U pravděpodobnostního grafu osa X znázorňuje naměřené hodnoty x_i seřazené podle velikosti. Osa Y představuje kvantily modelového normálního rozdělení. [9; 8]

Wilcoxonův párový test

Využívá se pro párové hodnoty x_i a y_i ($i = 1, 2, 3 \dots n$). U tohoto testu se hypotézy týkají mediánu rozdílů. Následující postup je pouze pro teoretickou demonstraci, praktický výpočet je proveden pomocí statistického softwaru STATISTICA. Wilcoxonův párový test nelze použít pro soubor čítající méně jak 25 jedinců. Použijeme následující postup. [8]

- Spočítáme rozdíly mezi jednotlivými páry

$$d_i = x_i - y_i \quad (5)$$

- nulové hodnoty rozdílů d_i nezahrnujeme do dalších výpočtů
- zbývajícím hodnotám rozdílů párů d_i přiřadíme pořadí dle jejich vzájemné velikosti od nejmenší hodnoty po největší. (Bráno v absolutní hodnotě)
- Nejmenší hodnota má pořadové číslo 1, další 2 až největší hodnota má pořadí m (m = počet nenulových hodnot rozdílů párů d_i)
- Pokud jsou některá d_j ($j = k, k + 1, \dots, K + l \leq m$) stejná, přiřadíme všem průměr pořadí, tj. hodnotu

$$\frac{1}{l+1} \sum_{j=k}^{k+l} j \quad (6)$$

- Sečteme pořadí příslušná ke kladným hodnotám d_i a pořadí příslušná k záporným hodnotám d_i .
- Předpoklad nulové hypotézy je takový, že máme párové hodnoty pocházející ze stejného základního souboru. V tomto případě by měly být součty kladných i záporných pořadí shodné. To je ovšem ideální stav, kterého většinou není dosaženo.
- Menší ze součtů se značí T . Pokud je $T \leq T_p$ tvrdíme, že soubory nemají společný základ
- Pro malé rozsahy výběru určujeme T_p podle tabulek, pro velké rozsahy se používají vzorce pro normální rozdělení, kde

$$\mu = \frac{m(m+1)}{4}, \sigma = \sqrt{\frac{m(m+1)(m+2)}{24}} \quad (7)$$

- Odpovídající normovaná náhodná veličina

$$u = \frac{T - \mu}{\sigma} = \frac{T - \left(\frac{m(m+1)}{4}\right)}{\sqrt{\frac{m(m+1)(m+2)}{24}}} \quad (8)$$

- Má pro $p = 5\%$ hodnoty $\pm 1,96$ a pro $p = 1\%$ hodnoty $\pm 2,58$. Je-li u mimo interval, hypotézu zamítáme. [8; 9; 10]

4. Praktická část

4.1 Sběr a charakter vzorků

Krevní vzorky byly shromažďovány zdravotnickým personálem na oddělení klinické hematologie ve Fakultní nemocnici Brno Bohunice. Výsledky diferenciálních rozpočtů leukocytů (nazýváno také jako „diff“) jsou z morfologického hlediska fyziologického charakteru, průtokový cytometr Sysmex XE-5000 neoznámil při analýze žádné patologické hlášení. Celkový počet leukocytů a parametry ostatních elementů fyziologické již být nemusí, protože se jedná o parametry, které nemají vliv na naše sledované hodnoty. Z důvodu variability absolutních počtů u každého pacienta (celkový počet buněk na litr krve), je vhodné tyto odchylky eliminovat použitím procentuálních počtů buněk (v textu i grafech značeno jako [%]). Krevní nátěry zhotovil nátěrový automat Sysmex SP-1000i. Jako základní barvení byla použita metoda May Grümwald – Giemsa Romanowski.

Postup sběru vzorků, záznam výsledků

Fyziologické vzorky vybírala obsluha analyzátoru a výsledky uložila do pořadače s připravenými deskami. Změřený výsledek z průtokového cytometru Sysmex XE-5000, slouží jako zlatý standard.

1. Pomocí barvicího automatu Sysmex SP-1000i byl zhotoven krevní nátěr, barvený metodou May Grümwald – Giemsa Romanowski. Krevní nátěr jsem označil samolepkou s vygenerovaným čárovým kódem nesoucí hodnotu levelu hematokritu a pořadového čísla (např. L1-22).
2. Skla jsem zařadil do zásobníků pro měření analyzátozem Cellavision DM96. Poté analyzátor provedl analýzu diferenciálního rozpočtu leukocytů. Kompletní analýza krevních nátěrů probíhala v edukačním centru firmy Sysmex CZ s.r.o. (Elgartova 4, Brno). Přenos výsledků do databáze na serveru telehematologie probíhal prostřednictvím internetového spojení, aby byla zároveň telehematologie testována. Výsledky se serveru jsem ručně zaznamenal do připravených tabulek. Ruční záznam byl nutný, jelikož se jednalo o nezvalidované výsledky. Po validaci nelze provádět změny a tím by následná manipulace s výsledky byla znemožněna.
3. Po dohodě s laborantkou na oddělení klinické hematologie začala analýza výsledků pomocí telehematologického přenosu. Na serveru jí byl zřízen přístupový profil s právy pro hodnocení a validaci výsledků v mé databázi. Korekce spočívala v odstranění či převedení špatně zařazených krvinek do skupin, kam patří. Zkorigované výsledky následně validovala a odeslala zpět do databáze. Upravené výsledky diferenciálních rozpočtů jsem zaznamenal do připravených tabulek. Tabulky jsou uloženy v přílohách této práce (viz příloha A - H).

Sledované skupiny

- Procentuelní výsledky diffů 5-ti populačního cytometru Sysmex XE-5000
- Procentuelní výsledky diffů digitální morfologie Cellavision DM96 bez korekce obsluhy (značeno jako BK)
- Procentuelní výsledky diffů digitální morfologie Cellavision DM96 s korekcí obsluhy (značeno jako SK)

Základní soubor proměnných

Základná soubor proměnných reprezentuje 5 typů populací buněk:

- Neutrofilní segmenty (značeno jako NEU)
- Lymfocyty (značeno jako LYM)
- Monocyty (značeno jako MONO)
- Eozinofilní segmenty (značeno jako EO)
- Bazofilní segmenty (značeno jako BAZO)

4.2 Použitý software

Pro statistické zpracování byl použit software Statsoft STATISTICA Cz ver. 9. Pro pomocné účely byl použit kancelářský software MS Office 2007.

4.3 Výsledky statistického zpracování

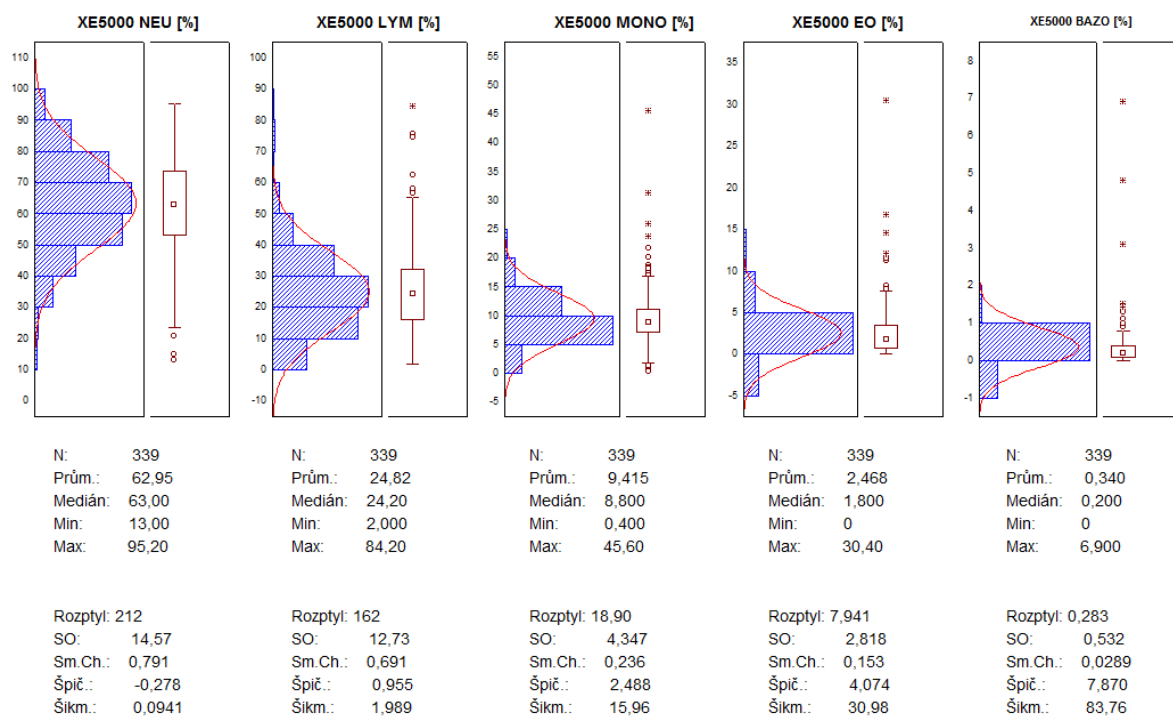
Nashromáždil jsem přibližně 340 různých výsledků diferenciálních rozpočtů leukocytů. Z důvodu absence výsledků jednoho měření průtokovým cytometrem jsem tento vzorek vyřadil z analýzy (netvořil by párové hodnoty). Jeden krevní nátěr nebyl dle komentáře laborantky standardně nabarven, proto jsem ho vyřadil také, mohl by ovlivnit výsledky analýzy. Konečný počet vzorků je $n = 338$.

Popisná statistika

Výsledky diffů analyzátoru Sysmex XE-5000

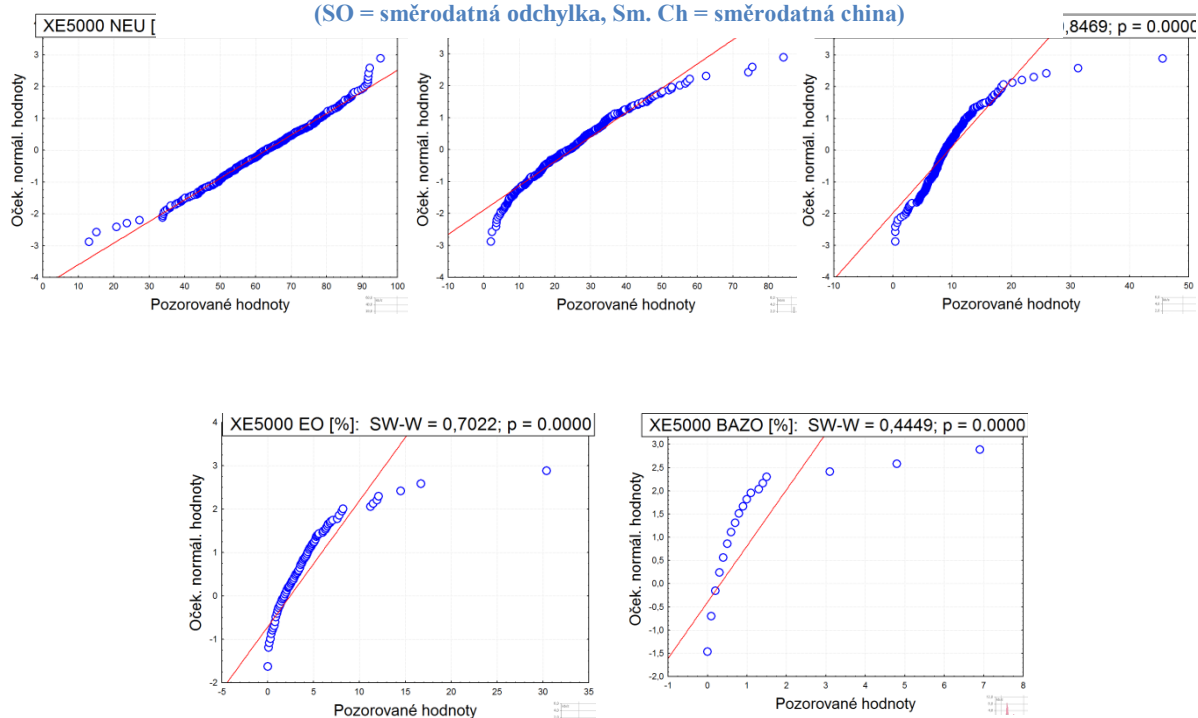
Z grafu 1 je zřejmé, že neutrofilní granulocyty, lymfocyty a monocyty vykazují normální rozdělení dat, přičemž eozinofilní a bazofilní segmenty nemají normální rozdělení dat. Příčinou je nízké procentuelní zastoupení těchto dvou typů buněk v krvi (viz fyziologické hodnoty na str. 16), u těchto výsledků se proto nachází spíše více nulových hodnot. Ze statistického hlediska se proto těmito dvěma typy buněk zabývat již nebudu, výsledky by neměly výpovědní hodnotu. Histogramy zobrazují i odlehlé či extrémní hodnoty, většinou se však jedná o ojedinělé případy

Normální rozdělení dat potvrdily i testy normality a sestavené grafy (Graf 2). Dle Saphiro – Wilkova testu ukazují hodnoty W u neutrofilů, lymfocytů a monocytů výraznou shodu s normálním rozdělením. Eozinofily a bazofily jsou na hranici normality. Zobrazené grafy mají pouze informační funkci.



Graf 1 souhrn naměřených dat diffu XE-5000, histogramy

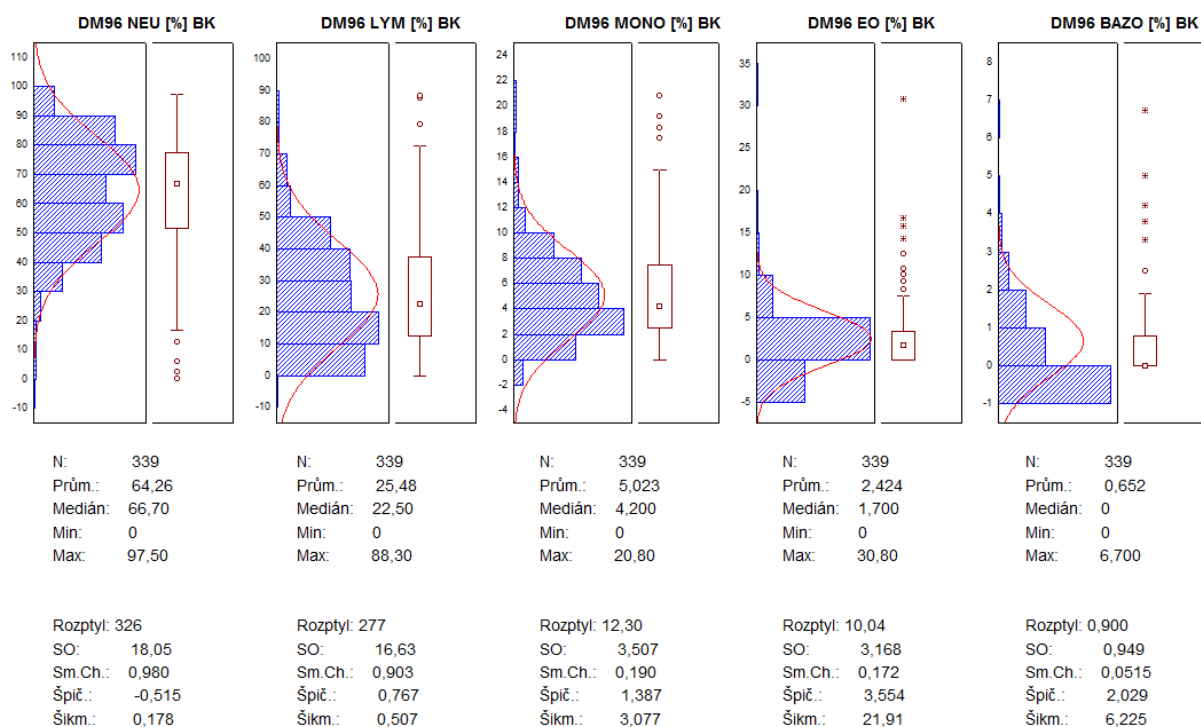
(SO = směrodatná odchylka, Sm. Ch = směrodatná chýna)



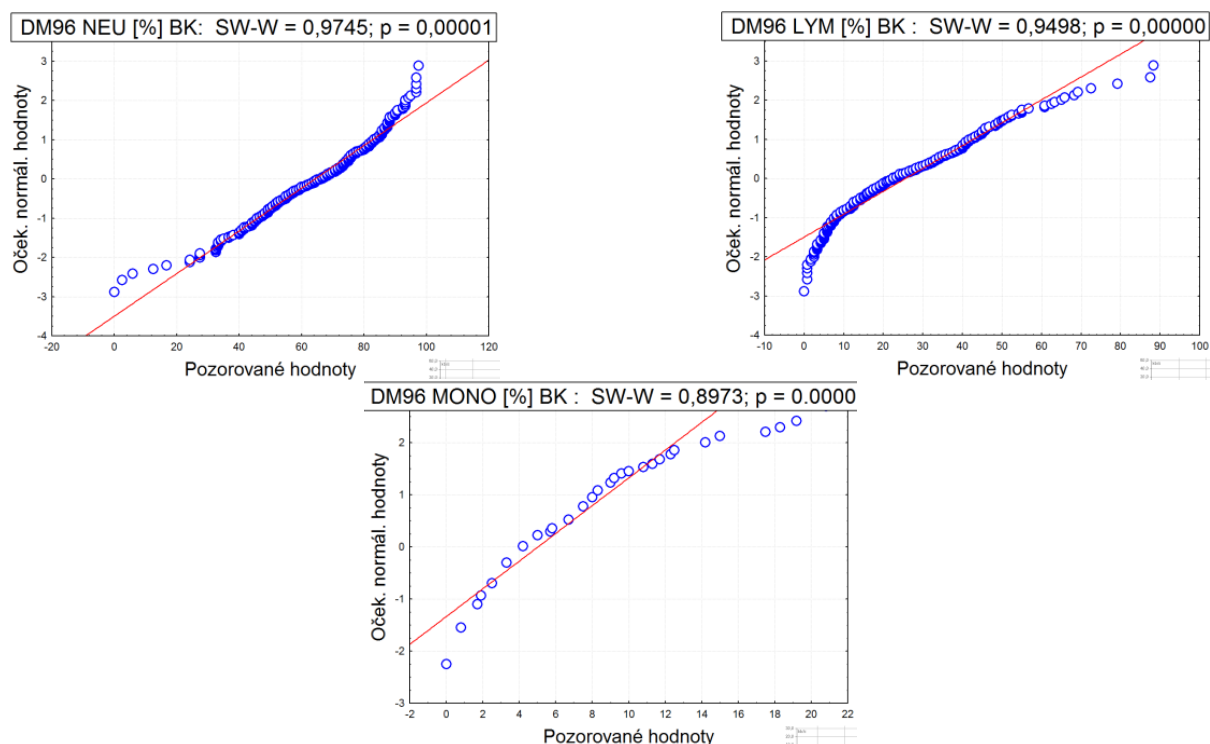
Graf 2 grafy testu normality (SW-W = Saphiro – Wilkův test, hodnota W (viz str. 23)

Výsledky diffú analyzátoru Cellavision DM96 bez korekce (BK)

Sledované neutrofil, lymfocyty (Graf 3 a 4) a vykazují obdobné výsledky jako popisné statistiky cytometru XE-5000. Monocyty mají oproti cytometru nižší hodnoty. Eozinofily a bazofily nejsou hodnoceny. Rozptyl u všech skupin je výrazně vyšší než u cytometru. Graf 4 znázorňuje potvrzené testy normality u prvních tří populací buněk.



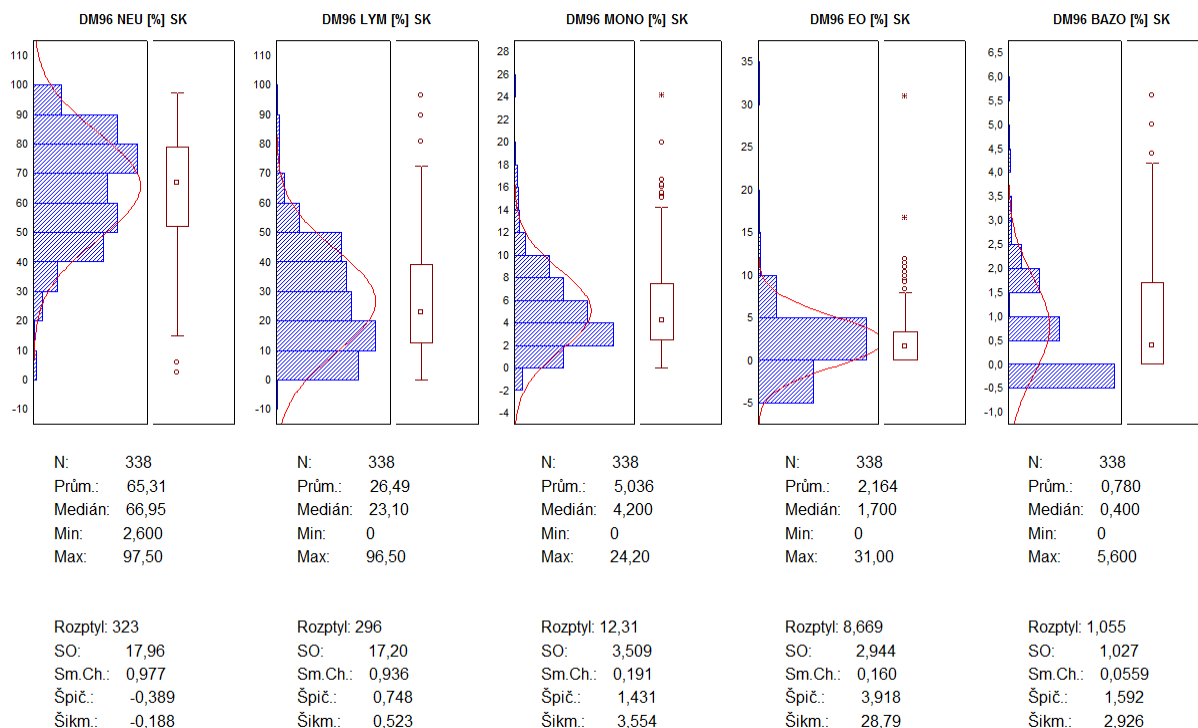
Graf 3 souhrn naměřených dat diffú DM96 BK, histogramy



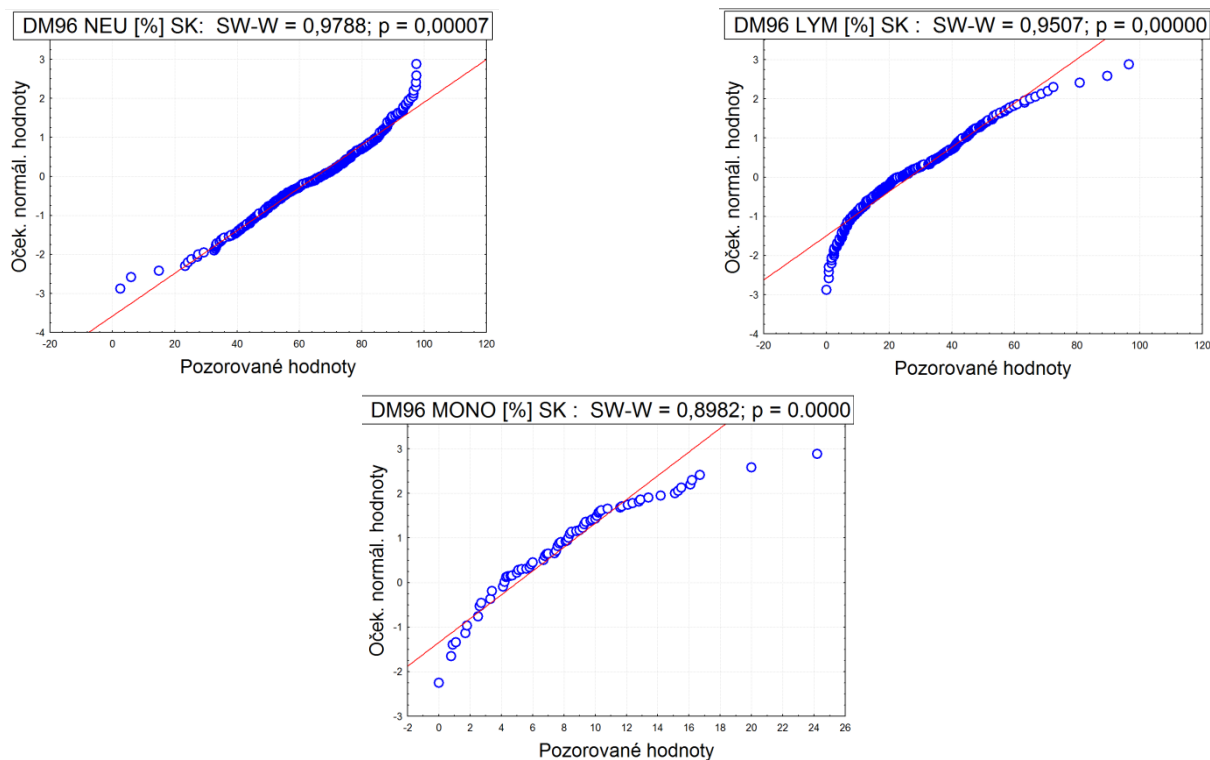
Graf 4 grafy testu normality (SW-W = Saphiro – Wilkův test, hodnota W (viz str. 23))

Výsledky diffú analyzátoru Cellavision DM96 s korekcí (SK)

Graf 5 znázorňuje hodnoty popisné statistiky, která se výrazně neliší od popisné statistiky DM96 BK. Eozinofily a bazofily nejsou hodnoceny. Testy normality prokázaly dobrou shodu výsledků s normálním rozdělením.



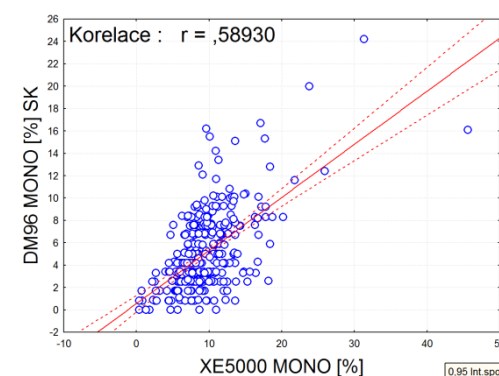
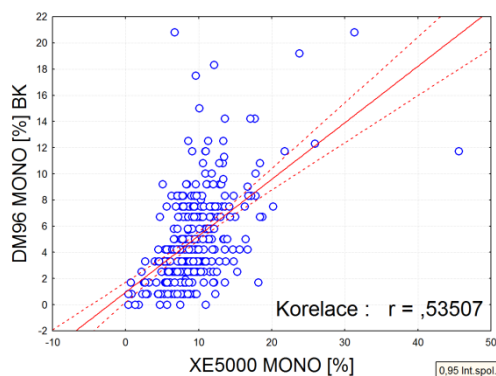
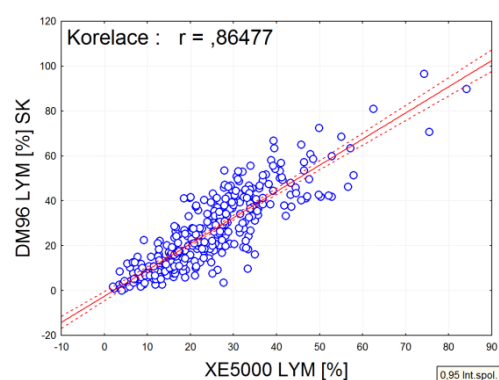
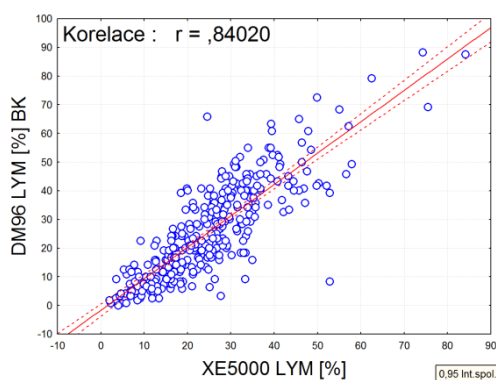
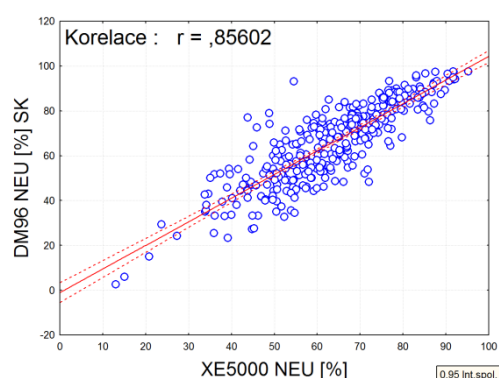
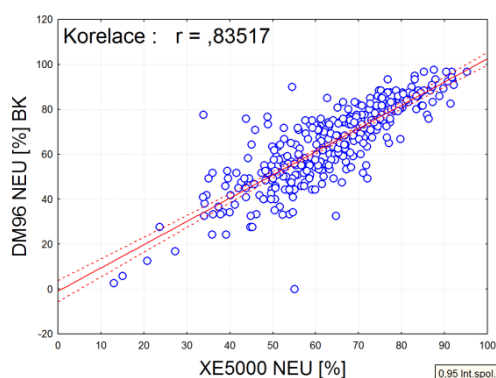
Graf 5 souhrn naměřených dat diffú DM96 SK, histogramy



Graf 6 grafy testu normality (SW-W = Saphiro – Wilkův test, hodnota W (viz str. 23))

Výsledky korelační analýzy

Na Grafu 7 jsou vyobrazeny grafy korelací výsledků analyzátoru DM96 bez kontroly (vlevo) a s kontrolou (vpravo) proti výsledkům z analyzátoru XE5000. Korelační koeficienty neutrofilů a lymfocytů ukazují výraznou shodu, u výsledků s korekcí je korelační koeficient přesnější. Problematický korelační koeficient projevují monocyty, kde grafy značí nízkou míru shody, pokud se vrátíme k základní statistice, tak zjistíme, že rozptyly XE-5000 a DM96 BK byly odlišné. Po korekci došlo k mírnému zvýšení korelačního koeficientu, ovšem změna nebyla tak výrazná, aby se jednalo o zlepšení. Výsledky eozinofilů a bazofilů mají nečekaně vysokou shodu, ovšem z důvodu jejich nízkého zastoupení v krvi a neprůkaznosti tvrzení nejsou uvedeny.



Graf 7 vlevo: korelace DM96 BK a XE-5000

vpravo: korelace DM96 SK a XE-5000

Výsledky Wilcoxonova párového testu

Před testováním bylo potřeba upravit naměřená data, provedl jsem standardizaci dat (popisné statistiky – příloha L) dle vzorce

$$\frac{x - \mu}{\sigma} \quad (9)$$

Kde x značí jednotlivé pozorované hodnoty souboru, μ je průměr hodnot souboru, σ je směrodatná odchylka souboru. Tato regulerní úprava zaručí, že rozptyly testovaných skupin budou převedeny na koeficienty normálního rozdělení a tím nebudou do testu vnášeny odchylky rozdílných rozptylů. Možnost standardizace jsem využil, jelikož výsledky testů neodpovídaly očekáváním. Wilcoxonův párový test jsem pro kontrolu realizoval krok za krokem v tabulkovém procesoru MS Excel 2007, abych ověřil, zda statistický software STATISTICA využívá tentýž postup. Po srovnání výsledků jsem zjistil, že oba výsledky jsou shodné. Po standardizaci jsem provedl znovu testování.

Wilcoxonův párový test potvrdil, že hodnoty sledovaných populací buněk u cytometru XE-5000 a analyzátoru DM96 bez korekce (Tabulka 3 - vlevo) jsou párové a že tedy ze statistického hlediska mezi nimi není žádný podstatný rozdíl na hladině významnosti 5%.

Výsledky cytometru XE-5000 a DM96 s korekcí potvrdily, že se jedná o párové hodnoty i po zásahu obsluhy (Tabulka 3 - uprostřed).

Výsledky testu pro proměnné DM96 bez korekce a s korekcí laborantky ukázaly, že její zásah změnil hodnoty tak, že hodnoty neutrofilů, lymfocytů, monocytů a bazofilů nejsou párové (Tabulka 3 – vpravo, značeno červeně). Klinicky se nemusí jednat o problém.

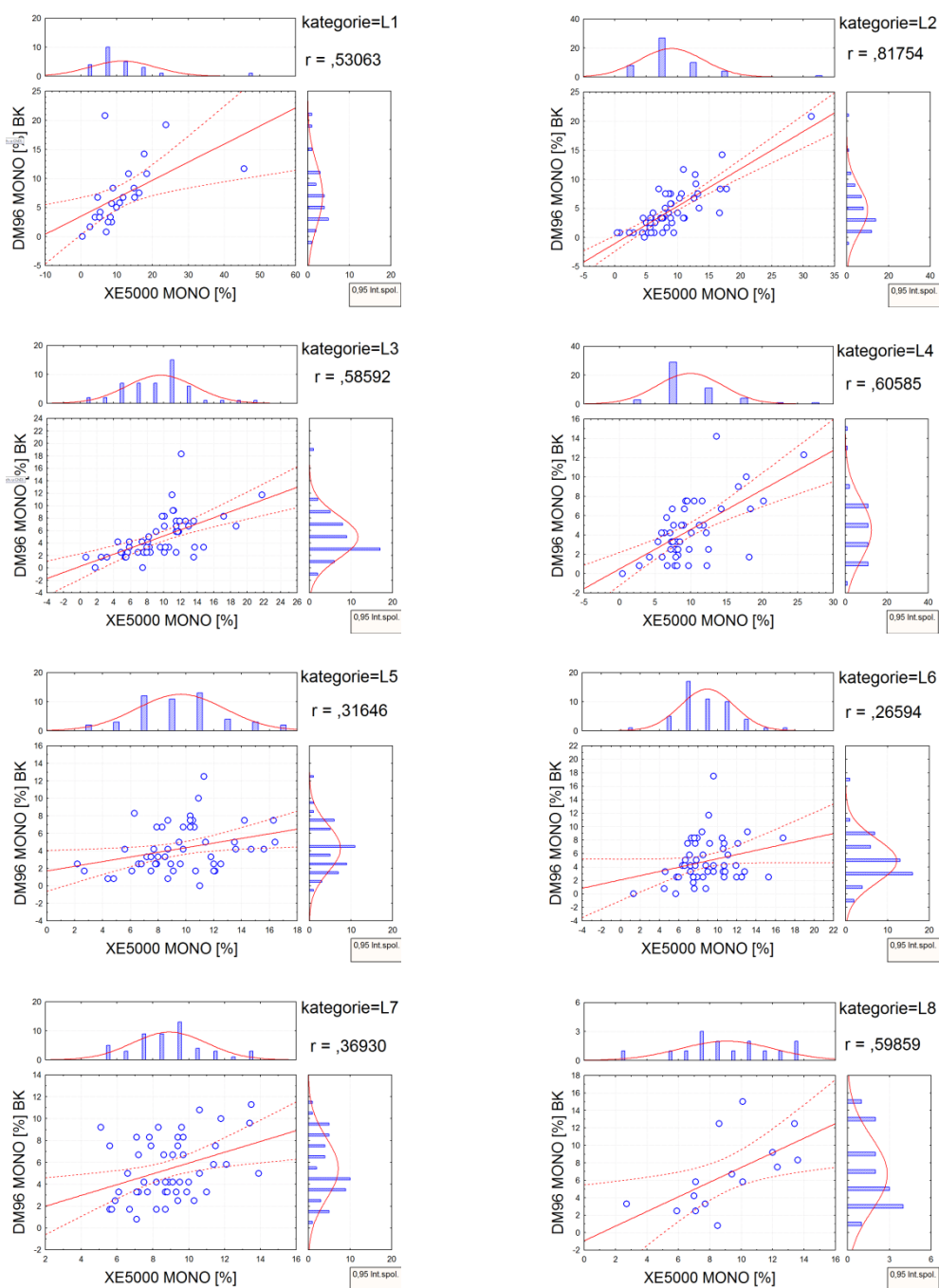
Hodnoty monocytů zůstaly téměř nezměněny, a tím i párové. Vzhledem k základní statistice a korelační analýze monocytů korekce nebylo potřeba, jelikož analyzátor DM96 měřil všeobecně méně monocytů než cytometr XE-5000. Výsledky monocytů nebylo možno navýšit, proto zůstaly hodnoty párové. To znamená, že korekce upravila hodnoty analyzátoru DM96 ale přitom zachovala párování s výsledky analyzátoru XE-5000.

Wilcox. Test: XE-5000 [%] & DM96 BK [%]				Wilcox. Test: XE-5000 [%] & DM96 SK [%]				Wilcox. Test: DM96 BK [%] & DM96 SK [%]			
	n	T	p-hodn.		n	T	p-hodn.		n	T	p-hodn.
NEU	338	28123,0	0,771	NEU	338	28004,0	0,357	NEU	338	7694,0	0,000
LYM	338	27728,0	0,610	LYM	338	27882,0	0,425	LYM	338	3281,0	0,003
MONO	338	28352,0	0,870	MONO	338	28194,0	0,251	MONO	338	6311,0	0,194
EO	338	28433,0	0,906	EO	338	28050,00	0,331	EO	338	9718,0	0,000
BAZO	338	26581,0	0,251	BAZO	338	26474,0	1,208	BAZO	338	8911,0	0,000

Tabulka 3 výsledky Wilcoxonova párového testu

Hodnocení vztahu hematokritu

Na základě problematiky hodnocení monocytů jsem se rozhodl zaměřit pouze na tuto buněčnou frakci a provedl základní popisnou statistiku (viz Příloha I - K) a korelační analýzu (viz Graf 8). Grafy korelací napovídají, že horší výsledky budou zřejmě u nízkých hematokritů, u ostatních levelů korelace kolísá. Nelze přesně říci, zdali je vztah prokazatelný, na analýzu každého hematokritového levelu připadá málo hodnot pro vyslovení věrohodného závěru (hematokrit L8 pouze 14 hodnot, hematokrit L1 hodnot 25). Krajní hodnoty hematokritu jsou výskytem vzácné a nejsou fyziologické, je obtížné jich získat dostatečný počet.



Graf 8 výsledky korelací monocytů pro jednotlivé hematokritové hladiny

5. Závěr

Pomocí Wilkoxonova párového testu jsem ověřil, že metody měření průtokovým cytometrem Sysmex XE-5000 a

1) s analyzátozem digitální morfologie Cellavision DM96 bez korekce

2) a s následnou korekcí obsluhy

jsou ekvivalentní při měření neutrofilních granulocytů, lymfocytů, eozinofilních granulocytů a bazofilních granulocytů.

Z výsledků korelační analýzy je patrné, že korekce laborantky má vliv na zpřesnění naměřených výsledků DM96.

Výsledky popisné statistiky a korelační analýzy ukázaly, že analyzátor digitální morfologie Cellavision DM96 detekuje oproti cytometru Sysmex XE-5000 méně monocytů. Testovou statistikou jsem domněnku potvrdil. Tyto výsledky potvrzují i laborantky na oddělení klinické hematologie fakultní nemocnici v Brně Bohunicích. Podle jejich názoru je příčinou větší velikost monocytů, které při zhotovování nátěru putují ke krajům nátěru. Analyzátor Cellavision DM96 hledá pouze ve standardizované části nátěru a na kraje nátěru oproti laborantce nenahlíží. Přikláním se k tomuto názoru, jelikož jsem měl opakovaně možnost nahlédnout do mikroskopu a ověřit si tuto skutečnost na nasbíraných nátěrech.

U eozinofilních a bazofilních granulocytů je nutno podotknout, že jejich procentuelní zastoupení v periferní krvi je v řádech jednotek i desetin procent, i přes dobré výsledky korelací a testové statistiky nemusejí být konečné výsledky spolehlivé. Bude potřeba provést další analýzy, které potvrdí či vyvrátí tento předpoklad.

Problematika detekce monocytů mne přiměla ke statistickému průzkumu vzhledem k různým hladinám hematokritu. Malý počet vzorků všech hematokritových hladin mi však nedovolil zpracovat korektní a věrohodnou statistiku. Jelikož toto téma vyžaduje více hodnot a důkladné statistické vyhodnocení, považuji ho za otevřený problém pro další zpracování a dál jsem se jím v této práci nezabýval.

Prostřednictvím této práce byl mnou a paní laborantkou otestován systém telehematologie, který by měl v následujících letech v české republice procházet dynamickým vývojem k cíli standardizovat hodnocení barveného krevního nátěru. Poprosil jsem paní laborantku, která se mnou spolupracovala na sběru a hodnocení vzorků, aby sepsala krátkou zprávu o tom, jak probíhalo testování telehematologie (viz příloha M).

Z mého hlediska se jedná o perspektivní metodu, která díky své digitalizaci umožní zefektivnit práci laboratoře a zlepšit dostupnost výsledků specialistům z více míst bez nutnosti hodnotit znovu krevní nátěr.

6. Seznam použitých zkratk

DIFF	diferenciální rozpočet
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FSC	Forward Scatter detektor
HCT	Hematokrit
NK Buňky	Nature Killer buňky
RNA	ribonukleová kyselina
SFL	Side fluorescent detektor
SSC	Side Scatter detektor
WBC	celkový počet leukocytů v krvi

7. Slovník pojmů

- **Morfologie** - vědní obor biologie, který se zabývá vnější stavbou organismů. Od fyziologie se tedy liší tím, že zkoumá tvar a nikoliv funkci.
- **Segmentace jádra** – Jádro postupem vyztváření mění svůj tvar, až je tvořeno menšími částmi spolu spojenými tenkými jadernými můstky.
- **Bazofilie cytoplazmy** – cytoplasma se barví bazofilními barvivy (dofialova)
- **Eozinofilie cytoplazmy** – cytoplasma se barví oxyfilními barvivy (dočervena)
- **Neutrofilní cytoplazma** – cytoplazma zbarvená domodra
- **Efektorové buňky** - krátce žijící buňky, účastníci se imunitní reakce, bojující s daným antigenem
- **Barvení May Grünwald – Giemsa Romanowski** – Barvicí technika:
fixujeme roztokem May Grünwald a barvíme roztokem Giemsa-Romanowski.
Základem tohoto barvení jsou:
 - a) Kationtové (zásadité) barvivo azur B: váže se na aniontové části molekul a barví modrošedě nukleové kyseliny (DNA nebo RNA), nukleoproteiny, granule bazofilů a sekundární granula neutrofilů.
 - b) Aniontové (kyselé) barvivo eozin Y: váže se na kationtové části molekul proteinů a barví oranžovočerveně hemoglobin a eozinofilní granula.
- **Diluent** – ředící, nosný roztok, může způsobovat lýzu buněk
- **Lýza buňky** – eliminace buňky za pomoci degradace její buněčné membrány a rozpuštění jejího obsahu
- **Gate** – místo v grafu řídící vztah pro každou populaci buněk (Shluková analýza)

8. Citovaná literatura

- [1] PAVLÍK, J.; FÁTOROVÁ, I. *Interaktivní atlas krvinek periferní krve*, [CD-ROM] 2008
- [2] PECKA, M. *Laboratorní hematologie v přehledu - Fyziologie a patofyziologie buňky*, Český Těšín : FINIDR s.r.o., 2006, ISBN 80-8682-02-1
- [3] MATÝŠKOVÁ, M. *Hodnocení nátěru periferní krve – Pokyny pro vypracování průvodního listu*, [PDF dokument] místo neznámé : SEKK, 2009, staženo ze: www.sekk.cz
- [4] *Measurement principles*, [PDF document] německo : Sysmex, 2008 firemní materiál
- [5] *Fluorescence flow cytometry in haematology*, [PDF document] , Norderstedt, Germany : SYSMEX EUROPE GMBH, 2005, firemní materiál
- [6] CORNET, E.; PEROL, J.-P.; THOUSSARD, X. Performance evaluation and relevance of the CellaVision DM96 system in routine analysis and in patients with malignant hematological diseases, *International journal of laboratory hematology* 20. January 2007
- [7] *Automated Digital Morphology – a big step forward in standardising the differential blood count*, [PDF document] Norderstedt, Germany : SYSMEX EUROPE GMBH, 2008 Automated Digital Morphology Sysmex Xtra Online 08/2008, firemní materiál
- [8] *Základy statistiky pro biomedicínské obory* [Online] Euromise, 1999 [Citace: 26.12.2009] dostupné z URL: <http://new.euromise.org/czech/tajne/ucebnice/html/html/node11.html>
- [9] FROST, M. *Statistické metody v ekonomii*, [PDF dokument] České Budějovice : Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 2007 , staženo z: <http://www2.zf.jcu.cz/~rost/courses/state/PREDNES/prednes4.pdf> [5.5.2010]
- [10] BAŠTINEC, J. *Pravděpodobnost, statistika, operační výzkum*, Brno : [rozpracováno]
- [11] RAD, A. *wikimedia commons* <http://commons.wikimedia.org> [Online] [Citace: 26.12.2009] [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/69/Hematopoiesis_\(human\)_diagram.png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/69/Hematopoiesis_(human)_diagram.png) , zdroj obrázku

9. Seznam příloh

PŘÍLOHA A – TABULKA HEMATOKRIT LEVEL 1	I
PŘÍLOHA B – TABULKA HEMATOKRIT LEVEL 2.....	II
PŘÍLOHA C – TABULKA HEMATOKRIT LEVEL 3.....	III
PŘÍLOHA D – TABULKA HEMATOKRIT LEVEL 4	IV
PŘÍLOHA E – TABULKA HEMATOKRIT LEVEL 5.....	V
PŘÍLOHA F – TABULKA HEMATOKRIT LEVEL 6.....	VI
PŘÍLOHA G – TABULKA HEMATOKRIT LEVEL 7	VII
PŘÍLOHA H – TABULKA HEMATOKRIT LEVEL 8	VIII
PŘÍLOHA I – POPISNÉ STATISTIKY – MONOCYTY L1 – L3	IX
PŘÍLOHA J – POPISNÉ STATISTIKY – MONOCYTY L4 – L6	X
PŘÍLOHA K – POPISNÉ STATISTIKY – MONOCYTY L7 – L8.....	XI
PŘÍLOHA L – POPISNÉ STATISTIKY STANDARDIZOVANÝCH DAT	XII
PŘÍLOHA M – HODNOCENÍ PRÁCE S TELEHEMATOLOGÍI	XIII

PŘÍLOHA A – tabulka hematokrit level 1

XE-5000 [%]					
level-pořadí	NEU	LYM	MONO	EO	BAZO
L1-1	35,9	55,1	8,6	0,4	0,0
L1-3	55,4	21,4	18,4	4,3	0,5
L1-4	60,9	16,5	16,3	5,0	1,3
L1-5	79,5	15,1	5,4	0,0	0,0
L1-6	43,8	10,6	45,6	0,0	0,0
L1-7	78,8	10,2	10,8	0,1	0,1
L1-8	57,3	16,8	23,8	2,1	0,0
L1-9	52,7	33,5	11,8	2,0	0,0
L1-10	74,2	21,4	4,0	0,4	0,0
L1-11	43,8	46,9	9,0	0,3	0,0
L1-12	61,3	18,8	17,7	1,5	0,7
L1-13	69,7	22,3	7,1	0,6	0,3
L1-14	80,4	9,1	5,2	5,2	0,1
L1-15	78,5	19,0	2,5	0,0	0,0
L1-16	82,4	8,8	8,6	0,1	0,1
L1-17	23,7	75,5	0,4	0,4	0,0
L1-18	62,8	28,2	8,2	0,4	0,4
L1-19	86,7	8,6	4,7	0,0	0,0
L1-20	63,2	21,0	15,0	0,3	0,5
L1-21	41,6	50,3	7,6	0,3	0,2
L1-22	60,9	22,7	14,8	0,8	0,8
L1-23	61,1	27,3	9,9	1,4	0,3
L1-24	33,9	52,8	13,3	0,0	0,0
L1-25	64,7	28,6	6,7	0,0	0,0

DM96 BK [%]				
NEU	LYM	MONO	EO	BAZO
24,2	68,3	5,7	0,0	0,0
55,0	21,7	10,8	10,0	0,0
70,0	15,8	7,5	5,0	0,0
84,2	9,2	4,2	0,0	0,0
75,8	6,7	11,7	0,0	0,0
85,8	7,5	5,8	0,0	0,8
57,5	17,5	19,2	2,5	0,8
66,7	24,2	6,7	2,5	0,0
70,8	21,7	3,3	0,8	1,7
48,3	40,8	8,3	0,8	0,0
64,2	19,2	14,2	1,7	0,0
82,5	12,5	0,8	0,0	0,8
84,2	2,5	3,3	1,7	0,8
81,7	8,3	1,7	1,7	0,0
90,0	5,8	2,5	0,0	0,8
27,5	69,2	0,0	0,0	0,0
61,7	23,3	3,3	0,8	1,7
88,3	5,0	6,7	0,0	0,0
72,5	13,3	6,7	1,7	0,8
51,7	42,5	2,5	0,8	0,0
67,5	20,8	8,3	0,0	0,0
72,5	15,8	5,0	2,5	0,0
77,5	8,3	10,8	2,5	0,8
32,5	34,2	20,8	4,2	1,7

DM96-SK [%]				
NEU	LYM	MONO	EO	BAZO
25,4	68,6	5,9	0,0	0,0
55,6	20,5	12,8	9,4	1,7
70,0	15,8	8,3	5,0	0,0
85,5	10,3	4,3	0,0	0,0
77,1	6,8	16,1	0,0	0,0
85,8	7,5	5,8	0,0	0,8
59,1	17,4	20,0	2,6	0,9
66,7	24,2	6,7	2,5	0,0
70,3	22,0	3,4	0,8	1,7
48,7	41,0	9,4	0,9	0,0
65,3	17,8	15,3	1,7	0,0
82,4	12,6	1,7	0,0	1,7
91,5	2,6	4,3	0,9	0,0
89,9	9,2	0,8	0,0	0,0
89,7	6,0	3,4	0,0	0,9
29,3	70,7	0,0	0,0	0,0
69,7	24,4	4,2	0,8	0,0
88,3	5,0	6,7	0,0	0,0
73,0	13,0	10,4	0,9	0,9
53,9	41,7	2,6	0,0	0,0
68,4	21,4	10,3	0,0	0,0
74,8	16,8	8,4	0,0	0,0
35,0	59,8	4,3	0,0	0,0
60,0	36,5	2,6	0,0	0,0

PŘÍLOHA B – tabulka hematokrit level 2

XE-5000 [%]					
level- pořadí	NEU	LYM	MONO	EO	BAZO
L2-1	80,2	8,1	10,9	0,7	0,1
L2-2	85,2	4,8	9,1	0,8	0,1
L2-3	67,6	18,2	11,1	2,9	0,2
L2-4	57,4	41,8	0,8	0,0	0,0
L2-5	80,2	14,4	5,0	0,4	0,0
L2-6	83,8	7,1	8,9	0,1	0,1
L2-7	77,3	14,6	7,7	0,3	0,1
L2-8	62,1	24,7	8,0	4,3	0,9
L2-9	20,8	62,5	16,7	0,0	0,0
L2-10	44,3	42,2	10,0	3,0	0,5
L2-11	63,0	27,5	7,3	2,0	0,2
L2-12	67,4	26,8	5,8	0,0	0,0
L2-13	91,9	3,5	4,5	0,1	0,0
L2-14	77,2	15,2	7,6	0,0	0,0
L2-15	65,6	19,5	13,4	1,2	0,3
L2-16	66,3	17,8	8,6	6,9	0,4
L2-17	87,2	6,2	5,7	0,8	0,1
L2-18	74,2	12,8	7,5	5,3	0,2
L2-19	74,8	13,4	10,6	0,8	0,4
L2-20	74,5	18,3	6,3	0,8	0,1
L2-21	76,8	18,8	4,4	0,0	0,0
L2-22	87,9	5,7	6,4	0,0	0,0
L2-23	63,0	19,5	9,0	8,1	0,4
L2-24	75,4	10,5	12,8	1,2	0,1
L2-25	34,1	31,6	31,3	2,8	0,2
L2-26	91,4	3,7	3,0	1,8	0,1
L2-27	87,1	7,0	5,6	0,2	0,1
L2-28	67,0	21,5	9,4	1,5	0,6
L2-29	77,1	12,3	5,7	4,5	0,4
L2-30	36,0	35,0	7,6	14,5	6,9
L2-31	42,7	45,8	10,3	0,8	0,4
L2-32	70,3	21,3	6,1	1,3	1,0
L2-33	60,4	23,1	12,9	3,1	0,5
L2-34	49,7	31,5	17,1	1,4	0,3
L2-35	49,7	24,3	8,6	16,7	0,7
L2-36	81,2	17,5	0,4	0,9	0,0
L2-37	56,1	26,3	16,8	0,4	0,4
L2-38	81,6	9,5	7,0	1,7	0,2
L2-39	61,8	23,3	12,6	2,2	0,1
L2-40	27,3	57,2	8,9	6,3	0,3
L2-41	75,8	14,1	8,1	1,8	0,2
L2-42	91,8	5,9	2,3	0,0	0,0
L2-43	37,4	56,6	5,3	0,7	0,0
L2-44	83,1	8,5	8,3	0,0	0,1
L2-45	57,7	21,6	17,8	2,9	0,0
L2-46	62,7	26,3	8,9	1,8	0,3
L2-47	83,1	12,2	4,7	0,0	0,0
L2-48	78,1	10,0	10,9	0,9	0,1
L2-49	91,7	2,3	5,8	0,1	0,1
L2-50	73,2	13,4	13,2	0,2	0,0

DM96 BK [%]				
NEU	LYM	MONO	EO	BAZO
80,8	5,0	11,7	0,0	0,0
96,7	0,8	2,5	0,0	0,0
80,0	11,7	3,3	1,7	0,0
58,3	36,7	0,8	0,0	0,0
82,5	12,5	2,5	0,0	0,8
85,8	5,8	7,5	0,0	0,0
87,5	7,5	3,3	0,0	0,0
70,8	16,7	5,0	4,2	0,8
12,5	79,2	4,2	0,0	0,0
58,3	32,5	4,2	2,5	1,7
68,3	26,7	3,3	1,7	0,0
75,8	20,0	3,3	0,0	0,0
92,5	2,5	3,3	0,0	0,0
82,5	13,3	3,3	0,0	0,0
74,2	20,0	5,0	0,8	0,0
74,2	14,2	4,2	5,8	0,0
90,0	4,2	3,3	0,0	0,0
81,7	9,2	3,3	5,8	0,0
88,3	2,5	7,5	0,0	0,8
85,8	8,3	0,8	0,8	0,0
93,3	5,8	0,8	0,0	0,0
93,3	4,2	2,5	0,0	0,0
74,2	14,2	5,8	5,8	0,0
77,5	8,3	10,8	2,5	0,8
32,5	34,2	20,8	4,2	1,7
82,5	0,8	0,8	2,5	3,3
90,8	4,2	1,7	0,8	0,0
74,2	19,2	0,8	2,5	0,8
85,0	6,7	2,5	3,3	0,0
51,7	31,7	0,8	9,2	3,3
47,5	40,0	6,7	5,0	0,0
73,3	20,0	4,2	0,0	1,7
71,7	17,5	9,2	0,0	0,8
53,3	25,8	14,2	2,5	0,0
55,0	13,3	7,5	16,7	2,5
86,7	12,5	0,8	0,0	0,0
59,2	25,8	8,3	0,0	0,0
83,3	6,7	8,3	0,8	0,8
69,2	19,2	6,7	2,5	0,0
16,7	62,5	3,3	9,2	2,5
75,0	11,7	7,5	2,5	0,0
93,3	0,8	0,8	0,0	0,0
36,7	45,8	0,8	0,0	2,5
95,0	1,7	1,7	0,0	0,0
69,2	20,0	8,3	1,7	0,0
85,0	9,2	5,8	0,0	0,0
93,3	5,0	0,0	0,0	0,0
87,5	5,8	3,3	0,8	0,0
96,7	0,8	0,8	0,8	0,0
75,0	12,5	7,5	1,7	0,0

DM96-SK [%]				
NEU	LYM	MONO	EO	BAZO
80,0	5,0	14,2	0,0	0,8
96,7	0,8	2,5	0,0	0,0
81,4	12,7	4,2	0,8	0,8
60,5	37,8	0,8	0,0	0,8
84,6	12,8	2,6	0,0	0,0
85,8	5,8	7,5	0,0	0,0
89,1	6,7	3,4	0,0	0,0
71,4	16,8	6,7	3,4	0,8
14,9	80,9	4,3	0,0	0,0
58,3	33,3	3,3	2,5	1,7
68,1	26,9	3,4	1,7	0,0
76,5	20,2	3,4	0,0	0,0
94,1	2,5	3,4	0,0	0,0
83,9	12,7	3,4	0,0	0,0
74,2	20,0	5,0	0,8	0,0
74,2	15,0	5,0	5,8	0,0
92,5	4,2	3,3	0,0	0,0
81,7	9,2	3,3	5,8	0,0
87,5	2,5	9,2	0,0	0,0
88,0	8,5	0,9	0,9	0,0
93,3	5,8	0,8	0,0	0,0
93,3	2,5	4,2	0,0	0,0
74,2	14,2	5,8	5,8	0,0
78,3	8,3	10,8	1,7	0,8
35,8	34,2	24,2	4,2	1,7
96,7	0,8	1,7	0,8	0,0
91,7	4,2	1,7	0,8	0,0
76,3	18,6	1,7	2,5	0,8
85,6	6,8	3,4	2,5	0,0
51,7	31,1	1,7	9,2	4,2
47,0	40,2	7,7	5,1	0,0
72,9	20,3	4,2	0,0	2,5
71,7	17,5	10,0	0,0	0,8
54,2	25,8	16,7	2,5	0,0
60,0	14,2	7,5	16,7	1,7
86,6	12,6	0,8	0,0	0,0
61,3	26,1	10,1	0,0	0,0
83,3	6,7	8,3	0,8	0,8
70,3	19,5	6,8	2,5	0,0
24,2	63,3	3,3	9,2	0,0
75,6	11,8	7,6	2,5	0,8
97,4	1,7	0,9	0,0	0,0
52,1	46,2	1,7	0,0	0,0
95,0	1,7	3,3	0,0	0,0
69,2	20,0	8,3	1,7	0,0
85,0	9,2	5,8	0,0	0,0
95,8	4,2	0,0	0,0	0,0
88,3	5,8	5,0	0,8	0,0
97,5	0,8	1,7	0,0	0,0
76,5	13,4	10,1	0,0	0,0

PŘÍLOHA C – tabulka hematokrit level 3

XE-5000 [%]						DM96 BK [%]					DM96-SK [%]				
level- pořadí	NEU	LYM	MONO	EO	BAZO	NEU	LYM	MONO	EO	BAZO	NEU	LYM	MONO	EO	BAZO
L3-1	15,1	84,2	0,7	0,0	0,0	5,8	87,5	1,7	3,3	0,0	6,0	89,7	1,7	2,6	0,0
L3-2	75,5	18,8	5,7	0,0	0,0	80,8	14,2	2,5	0,0	0,0	82,4	14,3	2,5	0,0	0,0
L3-3	39,4	52,8	7,8	0,0	0,0	52,5	39,2	2,5	0,0	0,8	54,2	41,7	2,5	0,0	0,8
L3-4	81,7	8,6	7,5	2,0	0,2	87,5	6,7	0,0	2,5	0,0	88,2	5,9	0,8	1,7	0,0
L3-5	61,9	25,8	8,3	3,8	0,2	68,3	19,2	3,3	3,3	0,0	67,5	20,8	8,3	3,3	0,0
L3-6	51,3	25,5	11,5	11,2	0,5	63,3	16,7	5,8	12,5	0,0	65,0	17,9	6,0	10,3	0,9
L3-7	75,2	11,9	8,4	4,4	0,1	88,3	2,5	2,5	5,8	0,0	85,8	2,5	5,0	5,8	0,0
L3-8	90,4	6,8	1,8	1,0	0,0	96,7	3,3	0,0	0,0	0,0	96,6	3,4	0,0	0,0	0,0
L3-9	83,9	11,5	4,5	0,0	0,1	88,3	5,0	4,2	0,0	0,0	90,8	5,0	4,2	0,0	0,0
L3-10	78,4	14,1	2,5	4,8	0,2	79,2	5,8	1,7	4,2	0,8	84,0	8,4	2,5	3,4	0,8
L3-11	48,9	32,3	13,7	4,5	0,6	73,3	18,3	3,3	4,2	0,0	74,2	19,2	2,5	3,3	0,8
L3-12	57,7	28,5	11,0	2,4	0,4	52,5	33,3	11,7	1,7	0,8	52,5	33,3	11,7	1,7	0,8
L3-13	66,4	24,9	7,6	0,9	0,2	83,3	12,5	2,5	0,8	0,0	84,0	12,6	2,5	0,8	0,0
L3-14	62,0	21,1	12,6	4,1	0,2	70,0	6,7	7,5	5,0	1,7	80,8	6,7	7,5	5,0	0,0
L3-15	77,7	9,4	11,8	1,1	0,0	85,8	3,3	5,8	2,5	0,8	86,7	3,3	6,7	2,5	0,8
L3-16	69,3	12,9	13,6	4,0	0,2	69,2	5,8	7,5	8,3	2,5	79,0	6,7	6,7	7,6	0,0
L3-17	80,2	12,5	5,4	1,9	0,0	87,5	8,3	1,7	0,8	0,0	88,2	8,4	1,7	0,8	0,0
L3-18	84,1	9,9	5,9	0,0	0,1	86,7	7,5	3,3	0,8	0,0	89,7	7,8	2,6	0,0	0,0
L3-19	54,5	27,7	11,5	6,3	0,0	90,0	3,3	2,5	0,8	0,8	93,2	3,4	2,5	0,8	0,0
L3-20	60,5	29,0	9,1	1,1	0,3	71,7	20,0	5,8	0,8	0,0	72,5	20,8	5,8	0,8	0,0
L3-21	85,2	6,7	8,0	0,0	0,1	88,3	7,5	3,3	0,0	0,0	88,3	7,5	9,2	0,0	0,0
L3-22	49,8	36,8	11,2	1,9	0,3	48,3	40,0	9,2	0,8	0,0	51,7	38,3	9,2	0,8	0,0
L3-23	68,7	17,8	9,6	3,5	0,4	75,0	12,5	3,3	3,3	1,7	77,9	13,3	5,3	1,8	1,8
L3-24	61,2	21,3	10,6	5,4	1,5	75,8	10,8	3,3	8,3	0,0	76,7	10,0	5,0	7,5	0,8
L3-25	78,7	12,0	5,9	3,0	0,4	88,3	5,8	4,2	1,7	0,0	88,3	5,8	4,2	1,7	0,0
L3-26	64,1	15,7	18,7	1,3	0,2	75,0	15,0	6,7	0,0	0,0	75,0	15,0	8,3	0,0	0,0
L3-27	92,2	4,4	3,2	0,1	0,1	90,8	3,3	1,7	1,7	0,8	94,2	3,3	1,7	0,8	0,0
L3-28	75,4	9,6	11,5	3,5	0,0	81,7	5,0	7,5	3,3	0,0	82,4	6,7	7,6	3,4	0,0
L3-29	63,2	25,0	8,0	3,6	0,2	73,3	21,7	2,5	1,7	0,0	72,7	21,5	3,3	1,7	0,8
L3-30	72,7	12,0	11,7	3,5	0,1	85,0	5,0	5,8	0,8	1,7	85,0	5,0	6,7	0,8	2,5
L3-31	68,4	21,4	10,1	0,0	0,1	73,3	11,7	6,7	2,5	0,0	81,7	10,8	7,5	0,0	0,0
L3-32	55,4	26,2	17,2	1,0	0,2	64,2	24,2	8,3	0,8	0,0	65,0	25,0	9,2	0,8	0,0
L3-33	60,8	24,2	11,9	3,0	0,1	70,8	20,8	7,5	0,0	0,0	71,7	20,8	7,5	0,0	0,0
L3-34	70,3	15,0	10,1	4,2	0,4	72,5	15,8	8,3	0,8	0,0	74,6	16,9	6,8	0,8	0,0
L3-35	54,3	34,0	8,1	3,0	0,6	65,0	25,8	4,2	3,3	0,0	65,0	26,7	4,2	3,3	0,0
L3-36	68,1	16,1	11,5	4,1	0,2	76,7	5,8	6,7	6,7	0,8	78,8	5,9	7,6	6,8	0,8
L3-37	76,6	16,1	6,9	0,3	0,1	87,5	7,5	2,5	0,0	0,0	89,2	7,5	3,3	0,0	0,0
L3-38	81,2	13,0	4,9	0,8	0,1	84,2	6,7	2,5	1,7	0,0	89,7	6,0	2,6	1,7	0,0
L3-39	76,8	11,7	10,1	1,4	0,0	87,5	7,5	2,5	0,0	0,0	88,1	9,3	2,5	0,0	0,0
L3-40	75,3	10,4	13,6	0,5	0,2	85,0	10,0	1,7	2,5	0,8	85,0	10,8	0,8	2,5	0,8
L3-41	67,8	20,0	5,5	6,4	0,3	73,3	15,8	1,7	6,7	1,7	73,3	15,8	1,7	6,7	2,5
L3-42	56,0	33,4	9,8	0,5	0,3	70,8	18,3	8,3	1,7	0,0	70,8	18,3	8,3	1,7	0,0
L3-43	65,1	22,7	10,2	1,0	1,0	68,3	27,5	3,3	0,0	0,0	68,3	27,5	3,3	0,0	0,8
L3-44	79,2	13,2	7,4	0,0	0,2	85,8	5,0	4,2	0,0	0,0	88,3	5,0	4,2	0,0	0,0
L3-45	67,1	19,6	13,0	0,0	0,3	56,7	33,3	6,7	0,0	0,0	57,6	33,1	8,5	0,0	0,0
L3-46	51,8	22,5	21,8	3,2	0,7	64,2	16,7	11,7	5,0	0,0	62,5	20,5	11,6	3,6	0,0
L3-47	48,8	35,0	14,8	1,1	0,3	76,7	15,8	3,3	0,8	0,0	79,0	16,0	3,4	0,8	0,0
L3-48	69,1	16,5	8,2	6,0	0,2	83,3	7,5	5,0	3,3	0,0	83,1	7,6	5,1	3,4	0,8
L3-49	58,3	27,3	11,1	2,9	0,4	66,7	17,5	9,2	4,2	0,0	67,2	16,8	10,1	4,2	0,8
L3-50	55,1	24,6	12,1	7,6	0,6	0,0	65,8	18,3	8,3	6,7	65,3	18,6	7,6	6,8	1,7

PŘÍLOHA D – tabulka hematokrit level 4

XE-5000 [%]					
level- pořadí	NEU	LYM	MONO	EO	BAZO
L4-1	34,6	57,9	6,3	0,7	0,5
L4-2	63,3	27,6	8,1	0,8	0,2
L4-3	68,7	21,8	8,2	1,2	0,1
L4-4	58,7	29,2	8,0	3,7	0,4
L4-5	59,7	17,6	18,4	3,5	0,8
L4-6	35,1	52,1	9,8	2,9	0,1
L4-7	52,6	28,2	12,2	6,8	0,2
L4-8	70,6	16,6	7,3	5,2	0,3
L4-9	73,8	15,6	9,1	1,4	0,1
L4-10	39,6	43,5	11,6	0,5	4,8
L4-11	70,8	16,9	10,1	2,1	0,1
L4-12	68,2	25,1	6,0	0,5	0,2
L4-13	55,8	27,3	12,5	4,0	0,4
L4-14	71,4	15,4	7,8	5,2	0,2
L4-15	34,2	34,0	25,9	5,1	0,8
L4-16	44,8	43,3	9,0	2,6	0,3
L4-18	77,3	12,7	7,4	2,1	0,5
L4-19	43,8	47,6	5,9	2,5	0,2
L4-20	66,8	32,4	0,4	0,4	0,0
L4-21	49,9	33,3	10,5	5,2	1,1
L4-22	44,5	44,5	8,7	1,8	0,5
L4-23	84,5	8,6	6,7	0,1	0,1
L4-24	60,6	15,8	20,2	0,3	3,1
L4-25	59,9	21,8	17,8	0,4	0,1
L4-26	83,5	6,0	10,5	0,0	0,0
L4-27	87,5	4,0	8,2	0,2	0,1
L4-28	13,0	74,3	12,3	0,2	0,2
L4-29	72,1	19,3	7,4	1,2	0,0
L4-30	77,5	10,9	9,7	1,6	0,3
L4-31	65,1	18,4	14,3	2,0	0,2
L4-32	68,3	23,3	5,4	2,8	0,2
L4-33	71,2	18,7	8,5	1,2	0,4
L4-34	33,8	49,8	9,3	6,5	0,7
L4-35	72,5	16,9	7,6	2,7	0,3
L4-36	70,8	16,2	9,5	3,2	0,3
L4-37	80,4	11,5	7,8	0,3	0,0
L4-38	69,6	15,6	7,2	7,1	0,5
L4-39	67,8	16,6	11,8	3,6	0,2
L4-40	50,8	32,9	7,1	7,8	1,4
L4-41	45,9	33,0	18,2	2,6	0,3
L4-42	72,7	15,2	11,2	0,8	0,1
L4-43	78,5	14,4	6,6	0,4	0,1
L4-44	63,0	27,4	7,9	1,5	0,2
L4-45	67,2	18,6	13,6	0,5	0,1
L4-46	73,2	17,2	7,5	1,6	0,5
L4-47	95,2	2,0	2,8	0,0	0,0
L4-48	74,5	20,3	4,2	0,9	0,1
L4-49	70,5	20,4	8,1	0,8	0,2
L4-50	53,9	27,9	16,7	1,1	0,4

DM96 BK [%]				
NEU	LYM	MONO	EO	BAZO
41,7	49,2	4,2	1,7	1,7
60,0	30,8	3,3	2,5	0,0
66,7	21,3	1,9	2,8	0,9
73,3	20,8	2,5	1,7	0,0
73,3	12,5	6,7	3,3	0,0
49,2	41,7	2,5	4,2	0,8
71,7	20,8	4,2	3,3	0,0
75,0	14,2	3,3	5,8	0,8
78,3	12,5	6,7	0,8	0,8
49,2	33,3	7,5	3,3	0,8
81,7	8,3	4,2	1,7	0,0
76,7	17,5	1,7	1,7	0,0
71,7	22,5	2,5	2,5	0,8
77,5	15,8	2,5	3,3	0,8
38,1	40,0	12,3	5,7	1,9
46,7	45,0	5,0	0,8	0,0
74,2	15,8	6,7	0,8	0,0
45,0	46,7	4,2	2,5	0,8
68,3	28,3	0,0	2,5	0,0
63,3	9,2	7,5	14,2	3,3
49,2	43,3	5,0	0,0	1,7
87,5	11,7	0,8	0,0	0,0
70,8	17,5	7,5	0,0	3,3
54,2	33,3	10,0	0,0	0,0
80,0	10,8	7,5	0,0	0,0
97,5	0,0	2,5	0,0	0,0
2,5	88,3	0,8	1,7	0,8
68,3	24,2	6,7	0,0	0,0
80,0	14,2	0,8	1,7	2,5
80,8	7,5	6,7	0,0	0,0
73,3	19,2	3,3	3,3	0,0
67,5	24,2	3,3	0,8	1,7
40,8	41,7	7,5	4,2	2,5
80,0	11,7	5,0	0,8	1,7
77,5	9,2	7,5	3,3	0,8
86,7	10,0	0,8	0,0	0,0
77,5	10,0	2,5	7,5	0,8
75,8	15,8	5,0	1,7	0,0
59,2	22,5	4,2	12,5	0,8
70,8	18,3	1,7	3,3	1,7
82,5	9,2	5,0	1,7	0,0
80,8	11,7	5,8	0,8	0,0
66,7	26,7	1,7	2,5	0,8
53,3	27,5	14,2	2,5	0,8
67,5	24,2	3,3	2,5	1,7
96,7	1,7	0,8	0,8	0,0
72,5	22,5	1,7	1,7	0,0
69,2	28,3	0,8	0,8	0,8
33,3	44,9	9,0	0,0	3,8

DM96-SK [%]				
NEU	LYM	MONO	EO	BAZO
42,9	51,3	2,5	1,7	1,7
60,8	34,2	2,5	1,7	0,0
71,0	21,5	5,6	1,9	0,0
72,5	20,8	2,5	1,7	2,5
78,2	14,3	5,9	0,8	0,8
50,0	42,2	2,6	3,4	1,7
71,1	19,8	4,1	3,3	1,7
76,9	12,8	3,4	6,0	0,9
78,3	12,5	7,5	0,0	1,7
51,7	37,3	6,8	2,5	0,8
83,2	11,8	3,4	1,7	0,0
78,3	20,0	0,9	0,9	0,0
71,7	22,5	2,5	2,5	0,8
77,5	15,8	2,5	3,3	0,8
38,1	41,9	12,4	4,8	2,9
47,1	47,9	4,2	0,8	0,0
71,8	16,1	5,6	0,8	5,6
44,5	49,6	2,5	2,5	0,8
70,7	27,6	0,0	1,7	0,0
65,8	9,6	8,8	11,4	4,4
48,3	45,8	3,3	0,0	2,5
87,4	11,8	0,8	0,0	0,0
69,2	17,5	8,3	0,0	5,0
54,2	35,8	9,2	0,0	0,8
80,5	10,2	9,3	0,0	0,0
97,4	0,0	2,6	0,0	0,0
2,6	96,5	0,9	0,0	0,0
68,3	24,2	7,5	0,0	0,0
80,0	15,0	0,8	1,7	2,5
81,7	10,8	7,5	0,0	0,0
75,4	18,6	3,4	2,5	0,0
67,8	26,3	3,4	0,8	1,7
42,7	42,6	7,7	4,3	1,7
80,0	12,5	5,0	0,8	1,7
77,5	9,2	7,5	3,3	0,8
86,7	10,8	0,8	0,0	0,0
77,5	10,0	4,2	7,5	0,8
76,7	16,7	5,0	1,7	0,0
60,2	22,0	4,2	11,9	1,7
72,6	18,8	2,6	2,6	1,7
81,7	10,0	5,0	0,8	2,5
80,8	11,7	6,7	0,8	0,0
67,2	26,1	2,5	2,5	0,8
54,6	26,9	15,1	2,5	0,8
70,1	24,8	2,6	1,7	0,9
97,5	1,7	0,8	0,0	0,0
73,9	22,7	1,7	0,8	0,0
69,7	27,7	0,8	0,8	0,8
35,6	53,4	8,2	0,0	2,7

PŘÍLOHA E – tabulka hematokrit level 5

XE-5000 [%]					
level- pořadí	NEU	LYM	MONO	EO	BAZO
L5-1	39,0	40,8	16,4	2,9	0,9
L5-2	71,2	17,5	9,5	1,6	0,2
L5-3	44,8	32,1	10,5	11,9	0,7
L5-4	54,4	30,4	13,6	1,5	0,1
L5-5	61,1	26,7	8,3	3,8	0,1
L5-6	47,4	43,3	6,6	2,2	0,5
L5-7	46,9	38,2	10,6	3,9	0,4
L5-8	73,0	14,5	8,9	3,5	0,1
L5-9	61,5	29,6	7,9	0,9	0,1
L5-10	39,2	49,9	8,7	2,0	0,2
L5-11	66,4	21,3	10,7	1,6	0,0
L5-12	45,1	31,3	11,0	12,1	0,5
L5-13	43,4	15,6	9,8	30,4	0,8
L5-14	52,6	29,7	14,7	2,4	0,6
L5-15	48,1	35,4	12,1	3,5	0,9
L5-16	36,1	47,9	12,5	2,7	0,8
L5-17	59,2	25,0	15,6	0,1	0,1
L5-18	79,6	7,7	11,8	0,8	0,1
L5-19	55,8	32,3	9,6	2,1	0,2
L5-20	63,5	22,0	13,5	0,9	0,1
L5-21	77,5	7,2	14,2	0,9	0,2
L5-22	43,8	39,2	10,3	6,5	0,2
L5-23	64,8	26,2	7,7	1,1	0,2
L5-24	67,2	26,0	6,8	0,0	0,0
L5-25	90,8	4,7	4,4	0,0	0,1
L5-26	86,0	5,3	8,7	0,0	0,0
L5-27	76,4	15,6	7,2	0,6	0,2
L5-28	62,3	25,9	8,0	3,5	0,3
L5-29	54,3	31,3	10,9	3,1	0,4
L5-30	48,9	33,9	12,0	4,7	0,5
L5-31	89,8	7,9	2,2	0,0	0,1
L5-32	65,3	22,7	10,3	1,5	0,2
L5-33	64,8	20,5	9,8	4,8	0,1
L5-34	48,3	28,6	11,3	11,5	0,3
L5-35	68,7	22,2	6,3	2,6	0,2
L5-36	68,3	23,2	7,5	0,8	0,2
L5-37	61,2	26,2	11,4	0,8	0,4
L5-38	49,8	41,4	7,5	0,9	0,4
L5-39	75,8	16,3	6,1	1,4	0,4
L5-40	60,8	28,8	7,8	2,5	0,1
L5-41	71,0	19,9	7,9	1,1	0,1
L5-42	49,6	36,0	8,5	5,3	0,6
L5-43	52,1	31,5	12,0	3,9	0,5
L5-44	46,9	41,2	10,3	1,3	0,3
L5-45	42,0	35,7	16,3	5,2	0,8
L5-46	84,7	12,5	2,7	0,0	0,1
L5-47	73,6	17,0	5,6	3,5	0,3
L5-48	40,0	46,4	8,7	4,5	0,4
L5-49	54,0	34,4	9,1	2,1	0,4
L5-50	52,9	40,8	4,8	1,0	0,5

DM96 BK [%]				
NEU	LYM	MONO	EO	BAZO
45,8	43,3	5,0	0,8	0,0
71,7	18,3	5,0	4,2	0,0
27,5	51,7	7,5	10,8	0,0
56,7	39,2	4,2	0,0	0,0
61,7	25,0	6,7	4,2	0,0
51,7	41,7	2,5	2,5	0,8
41,7	45,8	6,7	2,5	0,8
75,0	19,2	2,5	1,7	0,0
52,5	45,0	2,5	0,0	0,0
24,2	72,5	0,8	0,8	0,8
59,2	35,8	1,7	0,8	1,7
64,2	26,7	0,0	9,2	0,0
49,2	13,3	4,2	30,8	0,0
55,0	30,0	4,2	5,0	0,0
55,0	40,0	1,7	2,5	0,0
33,3	60,8	2,5	3,3	0,0
75,0	20,0	4,2	0,0	0,0
80,0	14,2	3,3	0,0	0,0
50,8	40,8	2,5	1,7	4,2
69,2	24,2	5,0	0,0	0,0
83,3	5,0	7,5	0,8	2,5
40,8	44,2	6,7	5,0	2,5
60,0	32,5	4,2	0,8	0,8
61,7	35,8	2,5	0,0	0,0
92,5	4,2	0,8	0,0	0,8
77,5	12,5	7,5	0,0	0,0
76,7	17,5	3,3	0,0	0,0
55,8	37,5	3,3	2,5	0,0
43,3	42,5	10,0	2,5	0,8
51,7	38,3	2,5	7,5	0,0
89,2	8,3	2,5	0,0	0,0
73,6	16,1	8,0	0,0	0,0
68,3	20,8	6,7	2,5	0,8
48,3	29,2	12,5	8,3	0,8
59,2	28,3	8,3	1,7	2,5
54,2	40,8	1,7	0,8	1,7
56,7	35,8	5,0	0,8	0,0
44,2	49,2	3,3	0,8	1,7
85,8	10,8	1,7	0,8	0,0
53,3	40,8	2,5	1,7	0,0
51,7	40,8	6,7	0,8	0,0
42,5	45,0	3,3	6,7	1,7
50,8	35,0	1,7	4,2	2,5
41,7	48,3	7,5	0,0	0,0
45,0	35,8	7,5	6,7	5,0
81,7	15,8	1,7	0,0	0,0
74,2	14,2	4,2	5,0	0,8
34,2	56,7	4,2	4,2	0,0
48,3	45,8	1,7	1,7	1,7
44,2	52,5	0,8	0,8	0,8

DM96-SK [%]				
NEU	LYM	MONO	EO	BAZO
45,8	50,0	3,3	0,8	0,0
71,7	17,5	6,7	4,2	0,0
27,3	52,9	7,4	9,9	2,5
55,8	39,2	4,2	0,0	0,8
61,0	25,4	6,8	4,2	0,8
52,1	42,7	2,6	1,7	0,9
41,7	47,5	5,8	2,5	1,7
74,8	20,2	2,5	1,7	0,8
52,5	45,0	2,5	0,0	0,0
23,3	72,5	0,0	0,8	3,3
59,3	37,3	0,8	0,8	1,7
64,3	27,7	0,0	8,0	0,0
50,0	16,4	2,6	31,0	0,0
54,2	36,7	3,3	4,2	0,8
54,2	40,0	1,7	2,5	1,7
33,3	60,8	1,7	2,5	1,7
74,6	22,0	3,4	0,0	0,0
80,8	15,0	3,3	0,0	0,8
51,3	42,9	0,8	1,7	3,4
70,3	24,6	5,1	0,0	0,0
84,2	5,0	7,5	0,8	2,5
41,2	44,5	6,7	5,0	2,5
60,7	33,3	6,0	0,0	0,0
62,2	35,3	2,5	0,0	0,0
93,3	4,2	0,8	0,0	0,8
79,7	11,9	8,5	0,0	0,0
78,2	16,8	3,4	0,8	0,0
55,8	37,5	3,3	2,5	0,0
44,1	43,2	9,3	2,5	0,8
51,3	38,7	2,5	7,6	0,0
89,2	8,3	2,5	0,0	0,0
74,4	18,6	7,0	0,0	0,0
68,3	20,8	7,5	2,5	0,8
47,1	30,3	13,4	8,4	0,8
59,7	27,7	8,4	1,7	2,5
55,5	40,3	1,7	0,8	1,7
56,3	37,0	5,9	0,8	0,0
44,2	49,2	4,2	0,8	1,7
85,8	10,8	2,5	0,8	0,0
52,9	42,0	3,4	1,7	0,0
52,1	41,2	5,9	0,8	0,0
42,1	45,5	2,5	6,6	3,3
50,8	39,2	1,7	3,3	4,2
42,0	50,4	7,6	0,0	0,0
44,5	36,1	7,6	6,7	5,0
82,4	15,1	1,7	0,0	0,0
73,7	16,1	4,2	5,1	0,8
33,6	57,1	4,2	4,2	0,0
48,7	45,4	1,7	1,7	2,5
44,2	53,3	0,8	0,8	0,8

PŘÍLOHA F – tabulka hematokrit level 6

XE-5000 [%]					
level- pořadí	NEU	LYM	MONO	EO	BAZO
L6-1	52,6	34,8	10,6	1,5	0,5
L6-2	55,3	29,2	10,7	4,6	0,2
L6-3	86,3	9,2	4,5	0,0	0,0
L6-4	64,5	25,0	8,5	1,3	0,7
L6-5	66,1	25,2	7,7	0,8	0,2
L6-6	50,4	28,8	16,8	3,4	0,6
L6-7	54,5	33,5	7,9	3,8	0,3
L6-8	51,5	32,7	10,7	4,7	0,4
L6-9	79,5	12,8	7,5	0,2	0,0
L6-10	75,0	16,7	7,3	0,9	0,1
L6-11	54,5	27,8	13,1	4,3	0,3
L6-12	61,9	28,2	7,1	2,4	0,4
L6-13	57,1	28,1	8,4	6,1	0,3
L6-14	48,0	36,8	10,5	4,5	0,2
L6-15	53,2	33,7	10,8	2,2	0,1
L6-16	64,1	24,6	7,6	3,5	0,2
L6-17	50,7	34,9	9,6	4,4	0,4
L6-18	61,3	27,5	7,8	3,0	0,4
L6-19	68,1	16,3	12,8	2,5	0,3
L6-20	65,3	25,6	7,9	1,0	0,2
L6-21	45,7	33,6	12,0	8,2	0,5
L6-22	56,5	26,5	9,0	7,8	0,2
L6-23	91,7	6,9	1,3	0,0	0,1
L6-24	72,1	20,1	6,9	0,6	0,3
L6-25	65,2	26,9	7,2	0,6	0,1
L6-26	58,6	30,1	5,8	4,9	0,6
L6-27	47,9	39,7	8,8	3,3	0,3
L6-28	66,4	20,5	12,5	0,3	0,3
L6-29	88,8	3,6	7,5	0,0	0,1
L6-30	45,3	39,3	12,1	2,9	0,4
L6-31	68,9	18,8	10,6	1,4	0,3
L6-32	61,1	23,9	9,6	4,7	0,7
L6-33	54,7	34,0	6,7	4,2	0,4
L6-34	46,2	45,8	5,7	1,7	0,6
L6-35	58,4	30,0	7,2	4,2	0,2
L6-36	70,1	21,3	6,4	2,1	0,1
L6-37	38,4	48,5	11,1	1,5	0,5
L6-38	53,4	34,5	9,2	2,4	0,5
L6-39	50,3	35,7	10,7	2,6	0,7
L6-40	68,7	25,5	4,6	1,1	0,1
L6-41	63,3	25,7	7,6	3,2	0,2
L6-42	57,2	30,3	9,6	2,4	0,5
L6-43	54,4	33,9	7,7	3,6	0,4
L6-44	53,6	27,9	15,3	3,0	0,2
L6-45	54,4	34,4	9,1	1,9	0,2
L6-46	66,9	26,9	6,0	0,2	0,0
L6-47	64,6	26,7	6,6	2,0	0,1
L6-48	52,5	35,3	8,5	3,3	0,4
L6-49	69,8	20,9	8,8	0,4	0,1
L6-50	69,5	16,9	11,9	1,6	0,1

DM96 BK [%]				
NEU	LYM	MONO	EO	BAZO
58,3	33,3	3,3	1,7	1,7
50,8	35	4,2	5,8	0
75,8	22,5	0,8	0,8	0
60	30,8	5,8	0	0
47,5	40,8	7,5	1,7	0
61,7	22,5	8,3	2,5	2,5
49,2	40	8,3	0,8	0
57,5	28,3	7,5	4,2	0
81,7	12,5	1,7	0	0
75,8	15	8,3	0,8	0
45	44,2	9,2	0,8	0
50	39,2	5,8	2,5	0
55,8	27,5	9,2	4,2	0,8
40	45,8	8,3	1,7	0
50	45	3,3	0,8	0
63,3	28,3	0,8	6,7	0
45,8	32,5	17,5	0,8	0
65,8	28,3	5	0,8	0
75	16,7	3,3	3,3	0
60,8	34,2	2,5	0,8	0
46,7	45,8	2,5	4,2	0
56,7	29,2	3,3	9,2	0
94,2	3,3	0	0	0
49,2	40	7,5	1,7	1,7
62,5	32,5	4,2	0	0
50	38,3	2,5	5,8	1,7
40	52,5	4,2	1,7	0
75,8	19,2	2,5	0,8	0,8
85,8	9,2	2,5	0	0
27,5	63,3	7,5	0	1,7
65,8	25	6,7	0,8	1,7
56,7	34,2	3,3	3,3	2,5
34,2	55	5	1,7	1,7
33,3	65	0	0	0,8
55,8	37,5	3,3	1,7	0,8
66,7	23,3	4,2	3,3	0,8
34,2	54,2	5,8	1,7	2,5
59,2	29,2	7,5	2,5	0,8
57,5	34,2	2,5	2,5	3,3
68,3	25	3,3	2,5	0
53,3	32,5	8,3	5	0
51,7	41,7	4,2	0,8	1,7
45,8	44,2	4,2	4,2	0
55,8	36,7	2,5	2,5	1,7
47,5	37,5	11,7	0,8	0,8
62,5	31,7	2,5	0	0,8
57,5	33,3	4,2	1,7	1,7
50	37,5	2,5	5,8	0,8
75	20,8	0,8	0	0
76,7	16,7	4,2	1,7	0,8

DM96-SK [%]				
NEU	LYM	MONO	EO	BAZO
58,8	35,3	2,5	1,7	1,7
53,1	36,3	4,4	6,2	0,0
75,8	22,5	0,8	0,8	0,0
61,0	33,1	5,9	0,0	0,0
48,3	43,2	6,8	1,7	0,0
62,2	26,1	6,7	2,5	2,5
49,2	41,5	7,6	0,8	0,0
57,6	30,5	5,9	4,2	1,7
84,0	13,4	1,7	0,0	0,0
76,5	15,1	8,4	0,0	0,0
43,2	45,8	9,3	0,8	0,8
50,0	40,8	5,8	2,5	0,8
56,3	29,4	9,2	2,5	2,5
40,5	49,1	6,9	1,7	0,9
49,2	45,8	3,3	0,8	0,8
63,3	29,2	0,8	6,7	0,0
47,0	35,9	16,2	0,9	0,0
65,5	29,4	4,2	0,8	0,0
75,0	15,8	4,2	2,5	2,5
61,3	35,3	2,5	0,8	0,0
46,7	46,7	2,5	4,2	0,0
57,1	30,3	2,5	9,2	0,8
95,0	5,0	0,0	0,0	0,0
48,3	41,5	6,8	1,7	1,7
62,5	33,3	4,2	0,0	0,0
50,0	39,2	3,3	5,8	1,7
40,0	54,2	4,2	1,7	0,0
76,7	20,0	1,7	0,8	0,8
87,4	8,4	4,2	0,0	0,0
27,5	66,7	4,2	0,0	1,7
66,4	25,2	5,9	0,8	1,7
56,7	34,2	3,3	3,3	2,5
34,5	55,5	6,7	1,7	1,7
33,3	65,0	0,0	0,0	1,7
56,8	38,1	2,5	1,7	0,8
66,7	25,0	4,2	3,3	0,8
33,1	58,5	4,2	1,7	2,5
59,7	33,6	2,5	2,5	0,0
58,0	33,6	2,5	2,5	3,4
68,9	26,1	3,4	1,7	0,0
53,3	33,3	8,3	5,0	0,0
51,7	42,5	3,3	0,8	1,7
45,8	45,0	5,0	4,2	0,0
56,3	37,8	2,5	2,5	0,8
49,1	37,1	12,1	0,9	0,9
63,6	33,1	3,4	0,0	0,0
57,5	35,0	4,2	1,7	1,7
49,1	40,7	4,6	4,6	0,0
76,3	21,1	1,8	0,0	0,0
76,7	16,7	4,2	1,7	0,8

PŘÍLOHA G – tabulka hematokrit level 7

XE-5000 [%]					
level- pořadí	NEU	LYM	MONO	EO	BAZO
L7-1	57,5	31,3	8,2	2,8	0,2
L7-2	87,3	6,6	5,9	0,1	0,1
L7-3	55,1	32,8	9,4	2,4	0,3
L7-4	58,7	32,4	6,6	1,9	0,4
L7-5	77,1	16,6	5,1	1,0	0,2
L7-6	61,5	28,0	7,7	2,3	0,5
L7-7	51,7	38,6	7,2	1,8	0,7
L7-8	44,9	38,8	10,6	5,5	0,2
L7-9	75,5	18,5	5,6	0,3	0,1
L7-10	56,3	32,1	9,4	1,9	0,3
L7-11	72,0	16,7	8,9	2,1	0,3
L7-12	76,6	12,9	9,6	0,7	0,2
L7-13	59,2	30,7	7,2	2,6	0,3
L7-14	58,6	29,6	10,3	1,2	0,3
L7-15	56,7	29,4	11,4	1,9	0,6
L7-16	60,2	26,9	8,7	4,0	0,2
L7-17	56,7	26,9	10,6	5,6	0,2
L7-18	70,5	16,3	11,8	1,1	0,3
L7-19	58,5	24,8	12,1	4,2	0,4
L7-20	55,1	34,3	8,2	1,9	0,5
L7-21	57,6	25,1	13,5	3,4	0,4
L7-22	63,6	24,0	8,6	3,5	0,3
L7-23	53,9	37,6	7,1	1,3	0,1
L7-24	41,2	46,4	11,5	0,9	0,0
L7-25	79,8	12,4	7,1	0,6	0,1
L7-26	67,0	20,7	9,4	1,9	1,0
L7-27	76,5	16,3	6,1	0,8	0,3
L7-28	56,0	33,6	9,1	1,1	0,2
L7-29	77,3	12,7	9,5	0,3	0,2
L7-30	59,9	28,8	7,8	3,3	0,2
L7-31	70,8	17,1	11,0	1,0	0,1
L7-32	64,2	21,4	5,6	7,8	1,0
L7-33	60,2	23,9	13,9	1,5	0,5
L7-34	54,7	31,0	9,9	3,8	0,6
L7-35	51,0	36,8	8,8	3,1	0,3
L7-36	50,7	33,7	9,1	6,0	0,5
L7-37	51,7	36,8	9,7	0,9	0,9
L7-38	50,6	41,1	7,1	0,6	0,6
L7-39	71,8	18,5	5,7	3,3	0,7
L7-40	63,1	26,1	8,7	1,8	0,3
L7-41	49,6	39,2	9,3	1,4	0,5
L7-42	50,1	36,1	10,0	3,6	0,2
L7-43	52,3	31,1	13,4	2,9	0,3
L7-44	60,6	25,9	8,3	4,9	0,3
L7-45	50,5	39,5	8,7	1,1	0,2
L7-46	58,0	33,1	6,7	2,1	0,1
L7-47	57,3	30,6	7,9	3,8	0,4
L7-48	40,2	47,1	9,4	2,6	0,7
L7-49	59,9	28,3	7,5	3,8	0,5
L7-50	72,8	15,7	9,7	1,6	0,2

DM96 BK [%]				
NEU	LYM	MONO	EO	BAZO
47,5	48,3	1,7	1,7	0,8
83,3	12,5	2,5	0,8	0,8
44,2	42,5	8,3	1,7	1,7
50,8	40	5	3,3	0
65	24,2	9,2	0,8	0,8
46,7	46,7	3,3	2,5	0,8
51,7	35	6,7	3,3	0,8
32,5	55	5	3,3	1,7
85	12,5	1,7	0	0
62,5	30	2,5	0	1,7
63,3	26,7	4,2	4,2	0,8
67,5	22,5	9,2	0,8	0
44,2	49,2	3,3	2,5	0
55	30,8	2,5	0,8	2,5
45,8	40	5,8	1,7	0
64,2	23,3	3,3	4,2	0,8
55	28,3	10,8	1,7	1,7
60	24,2	10	0	0,8
49,2	38,3	5,8	4,2	0,8
55,8	31,7	4,2	1,7	2,5
75	6,3	11,3	3,8	1,3
57,5	31,7	6,7	3,3	0,8
44,2	50,8	0,8	3,3	0
37,5	50	7,5	1,7	0
66,7	20,8	8,3	2,5	1,7
64,2	26,7	7,5	0	0
72,5	22,5	3,3	1,7	0
60	29,2	6,7	1,7	0
75,8	15,3	4,2	0	0,8
44,2	45	8,3	0,8	0
73,3	20	3,3	0,8	0
49,2	34,2	7,5	6,7	0
60	30	5	2,5	1,7
40,8	48,3	3,3	5	0,8
50,8	40,8	3,3	3,3	0
45	43,3	4,2	5,8	1,7
36,7	50	6,7	1,7	1,7
40	51,7	3,3	0	0,8
55	39,2	1,7	2,5	0,8
55	38,3	4,2	0,8	0
40	55	3,3	0	0,8
49,2	41,7	4,2	0	0
33	50,4	9,6	3,5	0
55	23,3	9,2	5	1,7
35	60,8	1,7	0	0
52,5	38,3	1,7	1,7	1,7
45,8	43,3	7,5	0,8	1,7
41,7	35,8	8,3	5	1,7
57,5	31,7	4,2	3,3	1,7
70,8	19,2	8,3	0	0,8

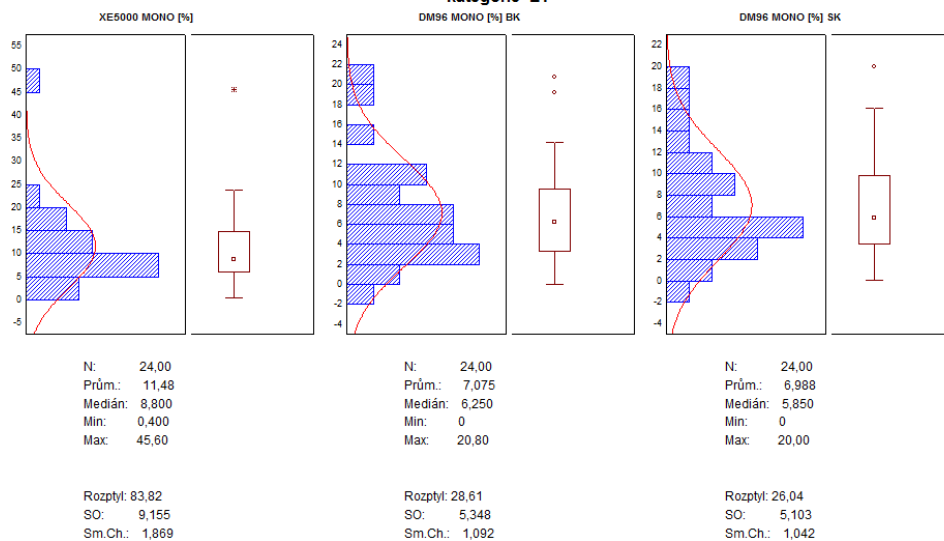
DM96-SK [%]				
NEU	LYM	MONO	EO	BAZO
46,2	48,7	2,5	1,7	0,0
83,3	12,5	2,5	0,8	0,8
44,9	44,9	6,8	1,7	1,7
50,0	41,5	5,1	3,4	0,0
64,4	26,3	7,6	0,8	0,8
46,2	47,1	3,4	2,5	0,8
51,7	38,3	5,0	3,3	1,7
33,3	58,1	3,4	3,4	1,7
85,8	12,5	1,7	0,0	0,0
66,4	30,1	2,7	0,0	0,9
65,0	28,2	2,6	3,4	0,9
66,4	22,1	9,0	0,0	2,5
44,2	50,8	2,5	2,5	0,0
54,7	39,3	2,6	0,9	2,6
46,7	46,7	5,0	1,7	0,0
63,6	26,3	2,5	4,2	2,5
55,9	30,5	10,2	1,7	1,7
60,5	28,6	10,1	0,0	0,8
50,0	39,2	5,8	4,2	0,8
57,6	33,1	4,2	1,7	3,4
75,9	7,6	10,1	2,5	2,5
58,5	30,5	6,8	3,4	0,8
43,3	51,7	1,7	3,3	0,0
38,1	53,4	6,8	1,7	0,0
68,1	21,0	8,4	1,7	0,8
64,2	27,5	8,3	0,0	0,0
72,3	23,5	2,5	1,7	0,0
60,0	32,5	5,8	1,7	0,0
76,7	18,3	5,0	0,0	0,0
45,4	46,2	7,6	0,8	0,0
74,6	21,2	3,4	0,8	0,0
48,7	37,8	5,0	6,7	0,8
60,3	30,6	5,0	2,5	1,7
41,2	49,6	3,4	4,2	0,8
50,4	41,2	3,4	3,4	1,7
45,0	43,3	3,3	5,8	2,5
37,4	51,3	7,8	1,7	1,7
39,7	56,9	1,7	0,9	0,9
53,8	41,0	1,7	2,6	0,9
54,6	41,2	3,4	0,8	0,0
40,3	55,5	3,4	0,0	0,8
49,2	46,7	2,5	0,8	0,0
32,7	53,1	9,7	2,7	1,8
54,7	29,2	9,4	5,7	0,9
35,0	63,3	1,7	0,0	0,0
52,9	41,2	2,5	1,7	1,7
45,4	44,5	7,6	0,8	1,7
41,1	42,0	9,8	4,6	2,7
58,1	34,2	2,6	3,4	1,7
71,7	19,2	8,3	0,0	0,8

PŘÍLOHA H – tabulka hematokrit level 8

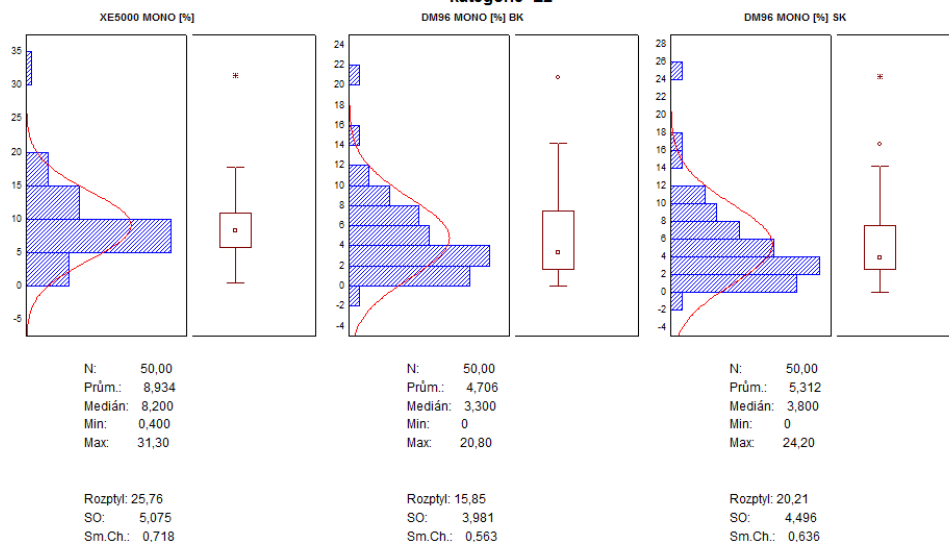
XE-5000 [%]						DM96 BK [%]					DM96-SK [%]				
level- pořadí	NEU	LYM	MONO	EO	BAZO	NEU	LYM	MONO	EO	BAZO	NEU	LYM	MONO	EO	BAZO
L8-1	71,1	16,8	7,1	3,7	1,3	65	20	2,5	4,2	0,8	67,6	24,3	2,7	3,6	1,8
L8-2	65,7	18,8	10,1	4,4	1,0	65	15	5,8	6,7	2,5	72,6	14,2	4,7	6,6	1,9
L8-3	68,1	17,4	9,4	4,3	0,8	60,8	14,2	6,7	15,8	0	73,9	10,9	3,3	10,9	1,1
L8-4	69,0	17,3	8,5	4,4	0,8	74,2	16,7	0,8	4,2	2,5	76,5	17,4	0,9	3,5	1,7
L8-5	66,7	23,3	8,6	1,2	0,2	64,2	22,5	12,5	0	0,8	65,5	21,6	12,9	0,0	0,0
L8-6	84,9	7,1	7,1	0,8	0,1	81,7	11,7	5,8	0	0	81,5	12,6	5,9	0,0	0,0
L8-7	82,6	10,6	2,7	2,7	1,4	86,7	6,7	3,3	2,5	0,8	86,7	6,7	3,3	2,5	0,8
L8-8	61,7	28,0	7,0	3,2	0,1	61,7	29,2	4,2	2,5	0	60,8	30,8	4,2	3,3	0,8
L8-9	83,5	8,8	7,7	0,0	0,0	85,8	10	3,3	0	0	85,8	10,0	3,3	0,0	0,0
L8-10	79,2	11,8	5,9	2,4	0,7	79,2	5,8	2,5	6,7	0	85,6	6,7	1,1	5,6	1,1
L8-11	48,3	35,5	13,6	2,2	0,4	52,5	30,8	8,3	1,7	0,8	55,2	35,3	7,8	0,9	0,9
L8-12	37,9	44,6	13,4	3,6	0,5	33,3	40	12,5	6,7	1,7	39,4	43,4	8,1	7,1	2,0
L8-13	52,8	30,2	10,1	6,6	0,3	54,2	17,5	15	5,8	1,7	56,0	20,7	15,5	6,0	1,7
L8-14	59,3	23,1	12,0	5,0	0,6	71,7	14,2	9,2	3,3	0	72,9	14,4	9,3	3,4	0,0
L8-15	50,6	33,9	12,3	2,6	0,6	52,5	34,2	7,5	0,8	0,8	52,2	36,5	7,8	0,9	2,6

PŘÍLOHA I – popisné statistiky – monocyty L1 – L3

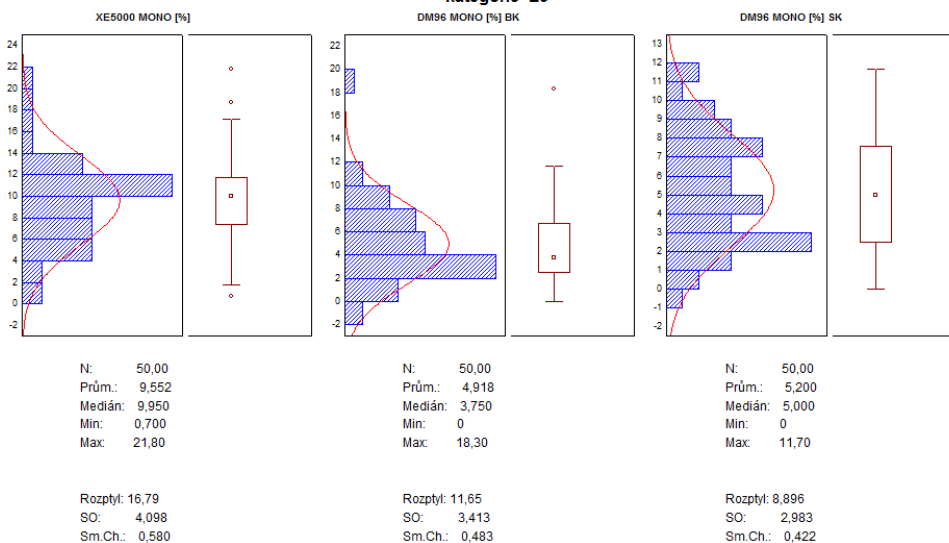
kategorie=L1



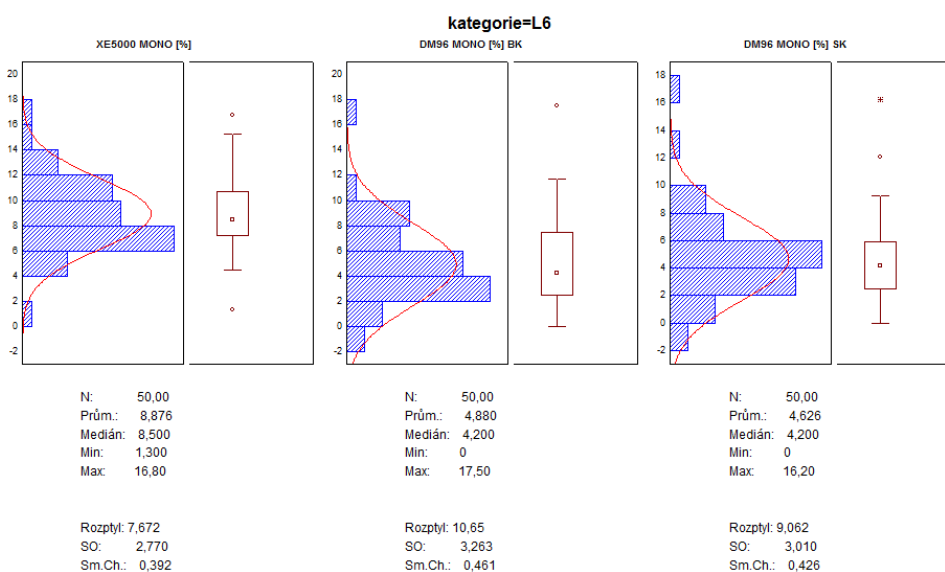
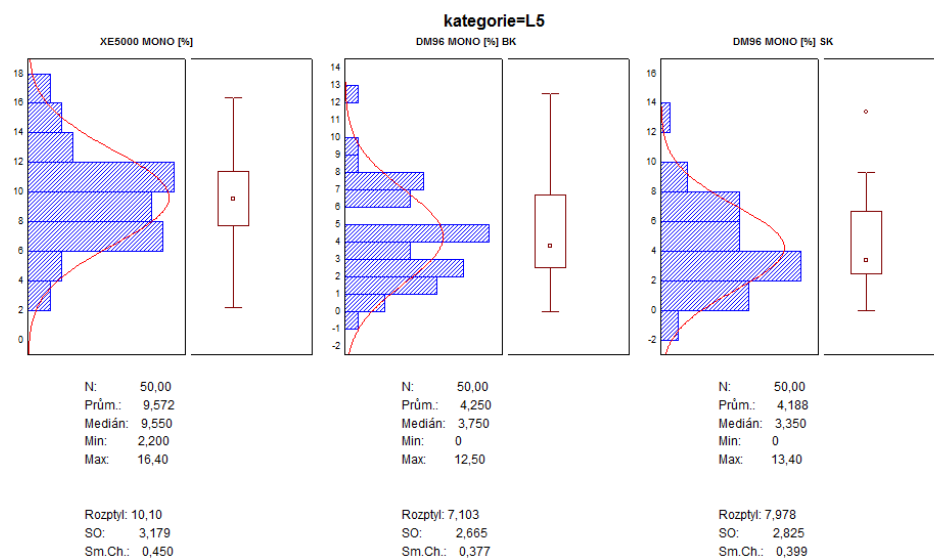
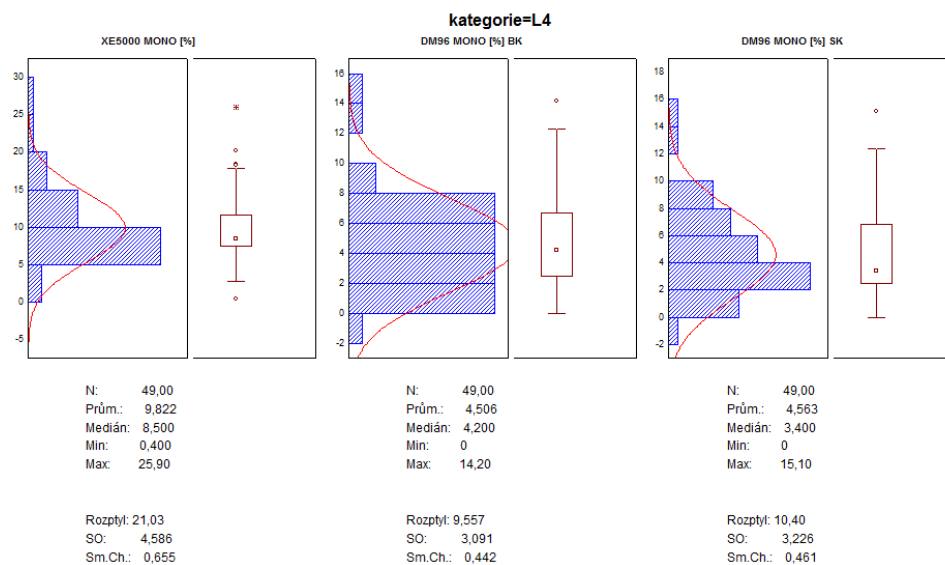
kategorie=L2



kategorie=L3

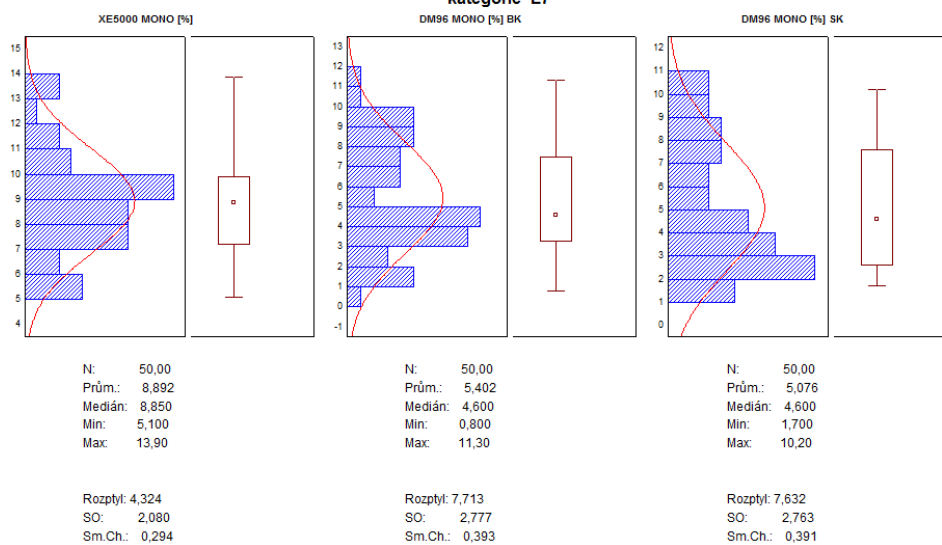


PŘÍLOHA J – popisné statistiky – monocyty L4 – L6

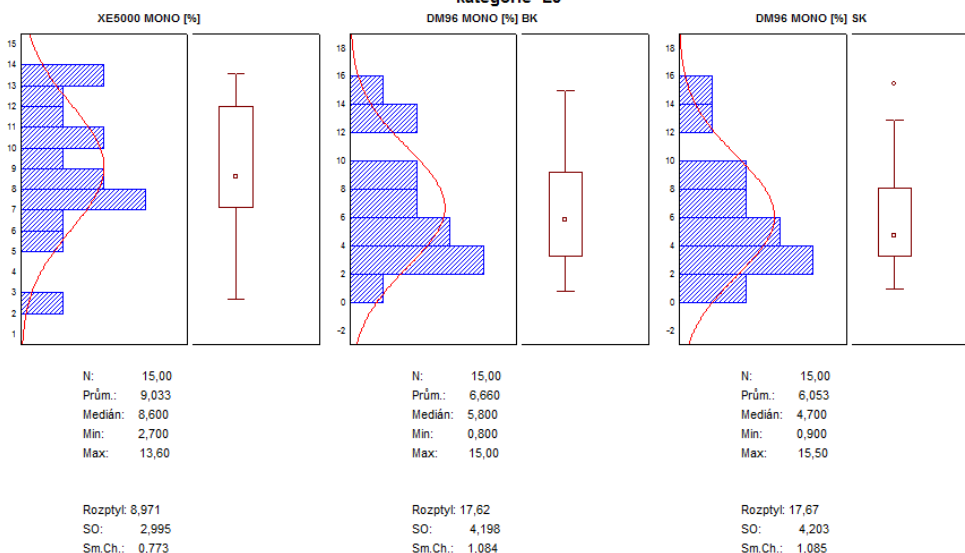


PŘÍLOHA K – popisné statistiky – monocyty L7 – L8

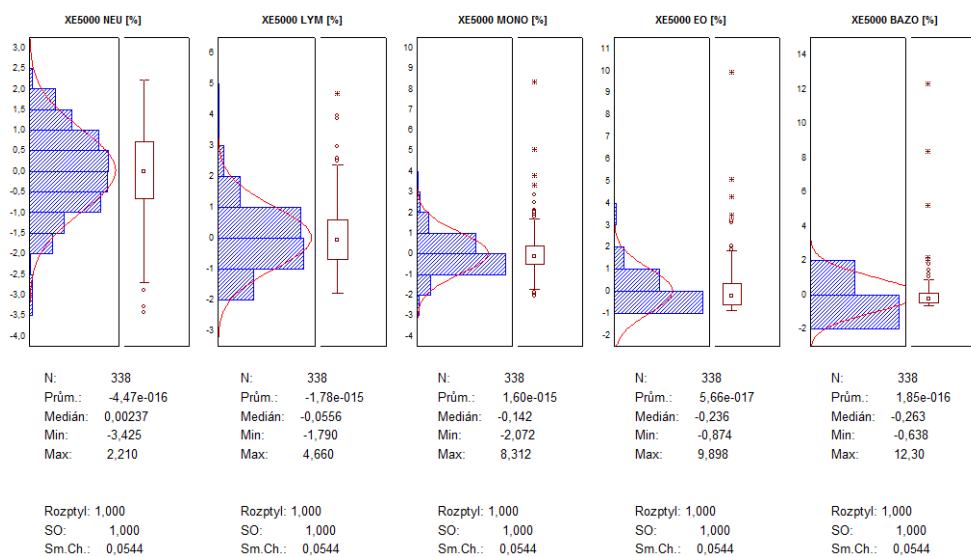
kategorie=L7



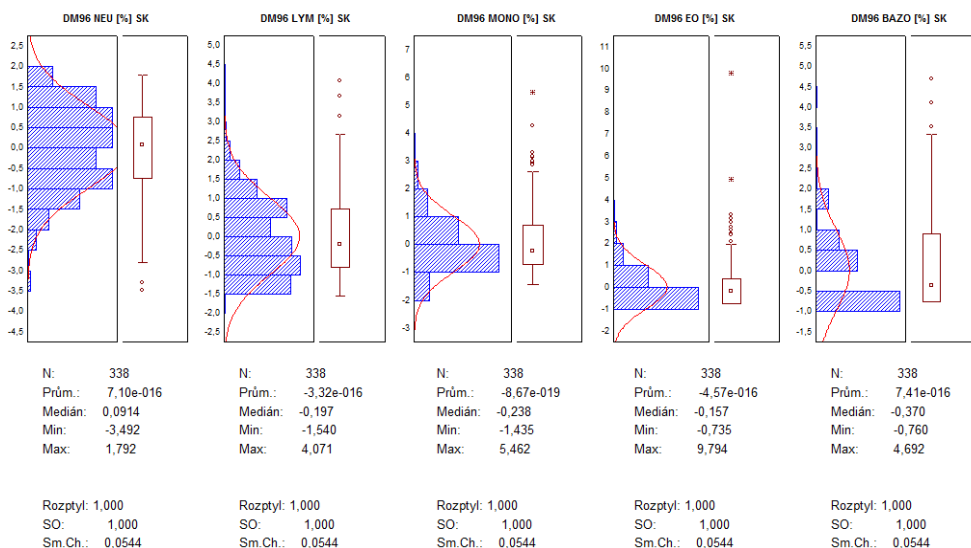
kategorie=L8



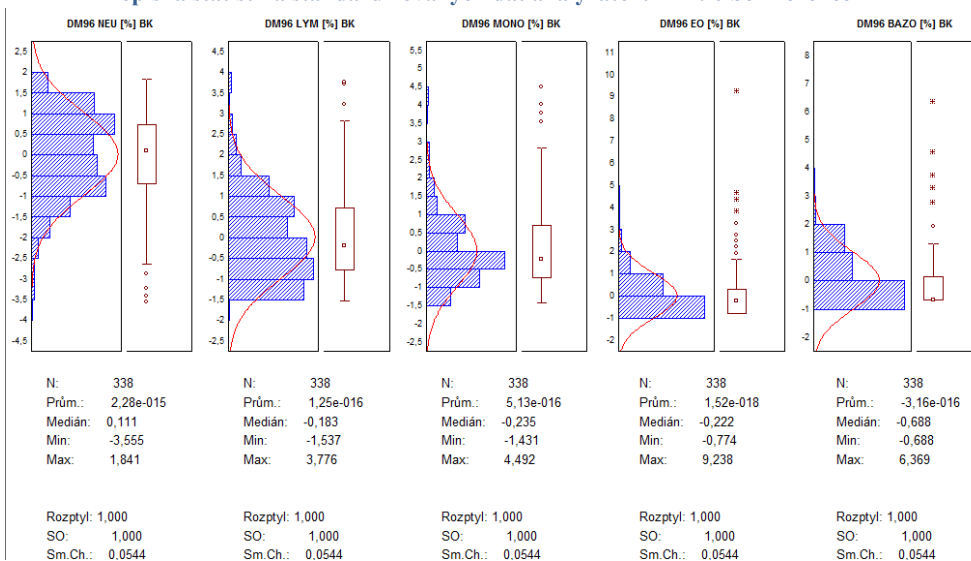
PŘÍLOHA L – popisné statistiky standardizovaných dat



Popisná statistika standardizovaných dat analyzátoru XE-5000



Popisná statistika standardizovaných dat analyzátoru DM96 bez korekce



Popisná statistika standardizovaných dat analyzátoru DM96 s korekcí

PŘÍLOHA M – hodnocení práce s telehematologií

„Byla jsem oslovena pro spolupráci na bakalářské práci, která využívá rozsáhlý projekt telehematologie. Z pohodlí naší domovské laboratoře jsem hodnotila asi 400 nátěrů periferní krve, které byly v naší laboratoři zhotoveny a poskytnuty pro tuto studii. Aby nebyl zatížen chod oddělení klinické hematologie, byla využita pro záznam výsledků skenovací jednotka DM96 v sídle firmy Sysmex. Tato skenovací jednotka je stejně jako naše napojena na společný server telehematologie. Až byly nátěry naskenovány, dala jsem se do hodnocení, které probíhalo pomocí internetového připojení, jako bych hodnotila vzorky naměřené u nás. S připojením na vzdálený server nebyly žádné závažnější problémy. Při přihlašování docházelo k menší časové prodlevě (asi 2min.), ale pak už samostatná práce nebyla ničím ovlivněna. Co závěrem, snad jen že projekt telehematologie pracoval bez potíží a potvrdil i to, že práce s DM96 je rychlejší než práce s klasickým mikroskopem. S DM96 se dostává do laboratoří určitý komfort a urychluje práci.“