

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



**Jaroslava Špurková**

Porovnání varovných hlášení hematologického analyzátoru Sysmex XS 1000i a  
mikroskopicky zjištěných anomálií v nátěrech periferní krve

A Comparison of Flags Generated by a Hematology Analyzer Sysmex XS 1000i and a  
Microscopically Discovered Abnormalities in a Peripheral Blood Smears

Bakalářská práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Filip Vrbacký, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Renata Halamková

Hradec Králové, 2022

Prohlášení

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové

## Abstrakt

Tato bakalářská práce je zaměřena na stanovení krevních obrazů s pětipopulačním diferenciálním počtem leukocytů, zejména na patologické hlášky (flagy), které vyhodnocuje automatický analyzátor krevních buněk na základě naměřených parametrů a limitů nastavených výrobcem, popř. přímo na pracovišti. Náplní této práce je porovnání, jak nastavení těchto limitů odpovídá nálezů relevantních anomálií při mikroskopické analýze nátěrů krevních buněk. Práce je též zaměřena na správnou preanalytickou fázi stanovení krevního obrazu.

Pro práci je využit analyzátor Sysmex XS 1000i. Ke stanovení jednotlivých typů buněk využívá kombinaci impedanční metody pro stanovení červených krvinek a krevních destiček, průtokové fluorescenční metody pro bílé krvinky a jejich diferenciální počet a spektrofotometrii pro stanovení koncentrace hemoglobinu. Krevní nátěr se provádí ručně a jako barvicí metoda je zde využito Pappenheimovo panoptické barvení. Mikroskopický nátěr se odečítá na mikroskopu Olympus BX41.

V praktické části byla hodnocena závislost přítomnosti jednotlivých patologických hlášení a odpovídajících mikroskopických anomálií. Konkrétně se jedná o hlášky „Imm gran, Atyp lymfo / Abn lymfo, Left sift, NRBC a Blasts“ Výsledky jsou vyhodnoceny pomocí Fisherova exaktního testu. Ve výsledku bylo potvrzeno, že výrobcem nastavená hodnota cutoff pro jednotlivé hlášky odpovídá příslušným mikroskopickým nálezům. Tato práce tudíž ověřila, že není nutné měnit stávající nastavení hodnot cutoff jednotlivých hlášek pro provedení manuálního krevního nátěru. V laboratoři bude i nadále hodnota cutoff rovna 100.

## Abstract

This bachelor thesis is focused on the determination of blood count with a five-population differential leukocyte count, especially on pathological messages (flags), which are evaluated by an automatic blood cell analyzer based on measured parameters and limits set by the manufacturer or right at the workplace. The purpose of this work is to compare how the setting of these limits corresponds to the finding of relevant anomalies in the microscopic analysis of blood cell smears. The work is also focused on the correct pre-analytical phase of blood counting.

The Sysmex XS 1000i analyzer is used for the work. To determine individual cell types, it uses a combination of impedance methods for the determination of red blood cells and platelets, fluorescence flow cytometry for white blood cells and their differential count, and spectrophotometry to determine hemoglobin concentration. The blood smear is handmade and Pappenheim's panoptic staining is used as the staining method. The microscopic smear is read on an Olympus BX41 microscope.

In the practical part, the dependence of the presence of individual pathological flags and corresponding microscopic anomalies was evaluated. Specifically, these are the flags: "Imm gran, Atyp lympho / Abn lympho, Left sift, NRBC and Blasts". The results are evaluated using Fisher's exact test. As a result, it was confirmed that the cutoff value set by the manufacturer for each flags corresponds to the relevant microscopic findings. Therefore, this work verified that it is not necessary to change the current setting of cutoff values of individual flags for the implementation of manual blood smear. In the lab, the cutoff value will continue to be 100.

Klíčová slova

Varovná hlášení

Abnormality v nátěru

Hematologie

Krevní nátěr

Mikroskopie

Key words

Warning flags

Abnormalities in smears

Hematology

Blood smear

Microscopy

Ráda bych poděkovala RNDr. Filipovi Vrbackému Ph.D. za odborné vedení, věcné rady a připomínky, také za čas a odbornou pomoc při vypracování mé bakalářské práce. Také děkuji Mgr. Renatě Halamkové za konzultace praktického měření a poskytnutí odborných materiálů. Ráda bych také poděkovala své rodině a příteli za plnou podporu během studia.

# Obsah

1	Zadání – cíl práce.....	10
2	Preanalytická fáze.....	11
2.1	Odběr krve .....	11
2.1.1	Příprava pacienta před odběrem.....	11
2.1.2	Zásady a pravidla správného odběru krve.....	11
2.1.3	Antikoagulanty používané pro odběrové systémy .....	12
2.1.4	Poloha vyšetřované osoby při odběru.....	13
2.1.5	Typy odběrů .....	14
2.1.6	Nejčastější chyby při odběrech.....	16
2.1.7	Identifikace biologického materiálu, přiřazení požadavkového listu.....	16
2.2	Transport materiálu .....	17
2.3	Příprava a zpracování biologického materiálu před vyšetřením .....	17
2.3.1	Příprava séra a plazmy.....	18
3	Analytická fáze.....	19
3.1	Stanovení RBC a PLT.....	20
3.2	Stanovení WBC.....	21
3.3	Stanovení koncentrace hemoglobinu v krvi .....	24
3.4	Analyzátorové hlášky (flagy) .....	24
3.5	Stanovení leukocytů mikroskopicky.....	25
4	Postanalytická fáze .....	26
5	Praktická část.....	27
5.1	Zhotovení nátěru.....	27
5.2	Pappenheimovo barvení .....	28
5.3	Hodnocení nátěru periferní krve .....	28
5.4	Výsledky a hodnocení .....	30

6	Závěr .....	35
7	Seznam použité literatury .....	36



## Seznam zkratk

PT	Protrombinový test
INR	Mezinárodní normalizovaný poměr
EDTA	Etylendiamintetraoctová kyselina
K <sub>3</sub> EDTA	Trojdraselná sůl kyseliny etylendiamintetraoctové
K <sub>2</sub> EDTA	Dvojdraselná sůl kyseliny etylendiamintetraoctové
Na <sup>+</sup>	Sodný kation
K <sup>+</sup>	Draselný kation
F...	Koagulační faktory (např. FVIII – koagulační faktor VIII)
KO	Krevní obraz
LIS	Laboratorní informační systém
RBC	Červené krvinky
PLT	Krevní destičky
WBC	Bílé krvinky
NIS	Nemocniční informační systém
IG	Nezralé granulocyty

# 1 Zadání – cíl práce

Krevní obraz patří mezi základní hematologická vyšetření, proto je nezbytné znát jeho preanalytickou, analytickou a postanalytickou fázi. Zahrnuje mnoho vyšetření jednotlivých složek periferní krve, základními jsou červené krvinky – erytrocyty, bílé krvinky – leukocyty a krevní destičky – trombocyty. V laboratoři Nemocnice Slaný stanovujeme krevní obraz a krevní obraz s pětipopulačním diferenciatním počtem leukocytů.

Dříve se jednotlivé krevní elementy počítaly v komůrkách, dnes již využíváme plně automatizované analyzátory, jenž usnadní práci a zkvalitní výsledky. Součástí činnosti analyzátorů je kromě vyhodnocení počtu jednotlivých buněk také zachycení jejich morfologie. K tomu využívají různé metody, v našem případě průtokovou fluorescenční cytometrii. V momentě, kdy se měřené popisné charakteristiky některých elementů nevejdou do předem definovaných intervalů, vydá nám analyzátor varovné hlášení. Tyto varovné hlášky nás informují o tom, že něco není v pořádku, může to být např. suspektní přítomnost nezralých forem myeloidní řady nebo přítomnost atypických lymfocytů, v horším případě pak suspektní přítomnost blastů aj.

Pokud analyzátor zobrazí varovné hlášky, je nutné zhotovit manuální krevní nátěr a přítomnost dané změny ověřit mikroskopicky. Při prohlížení manuálního nátěru pečlivě hodnotíme nejen počet leukocytů, ale i jejich morfologii. Na základě výsledků mikroskopie můžeme potvrdit nebo vyvrátit kvalitativní přítomnost určitého varovného hlášení. Cílem práce je ověřit, jak hlášky odpovídají relevantním změnám, případně ulehčit laborantkám práci formou zvýšení hodnoty cutoff jednotlivých hlášek.

## 2 Preamalytická fáze

### 2.1 Odběr krve

Odběr krve může někdy zásadně zkreslit výsledek vyšetření, proto se snažíme zajistit určité standartní podmínky, které nám zajistí objektivitu vlastního odběru. [1]

#### 2.1.1 Příprava pacienta před odběrem

Komplexní odběr krve pro hematologická, biochemická a jiná vyšetření se provádí zpravidla ráno na lačno, protože se mnoho látek a počet krvinek v krevní plazmě během dne mění. [2]

Den před odběrem by měl pacient vynechat tučná jídla, 12 hodin před odběrem pak nejíst, nepít slazené nebo jinak upravené nápoje, alkoholické nápoje a také vynechat kouření. Jedna až dvě hodiny před odběrem je doporučeno pití obyčejné vody či hořkého čaje.

#### 2.1.2 Zásady a pravidla správného odběru krve

Pro některá vyšetření je důležité, aby lékař, případně příslušné zdravotnické pracoviště uvedlo údaj o léčbě pacienta (antikoagulační léčba, protidestičková léčba apod.), protože výsledek u léčeného a neléčeného pacienta lze vyjadřovat v rozdílných hodnotách (např. hodnotu PT u léčeného warfarinem vyjádříme v INR, u neléčeného jako poměr). Určitá hematologická vyšetření provádíme přímo na pacientech (krvácivost, doba srážlivosti aj.). Je tedy potřebná přítomnost vyšetřované osoby v odběrové místnosti laboratoře, odběr je zakázán provádět v místnostech s možným zdrojem infekčního aerosolu jako jsou centrifugy nebo vývěvy. Bezpečnost pacienta i pracovníků laboratoře zajišťují jednorázové prostředky a doporučené dezinfekční prostředky. Abychom předešli hemolýze odebrané krve či znehodnocení musíme nechat dezinfekční přípravek na kůži zaschnout. U nesrážlivé krve je

důležité jemné promíslení krve s antikoagulační látkou – 5-10krát otočit zkumavku dnem vzhůru, dále správné pořadí odběru zkumavek. [3]

### 2.1.3 Antikoagulanty používané pro odběrové systémy

Nejčastěji používaným antikoagulantem pro stanovení krevních parametrů je  $K_3EDTA$ , pro hemokoagulační stanovení je to citrát sodný, kde využíváme jeho schopnosti vyvazovat kalciové ionty. Fyziologické vlastnosti krvinek lépe ošetří antikoagulanty s pufracími schopnostmi obsahující nejčastěji jako základní balanční látku kyselinu citrónovou a citráty. Dalším antikoagulačním činidlem je heparin – nefrakcionovaný heparin, který používáme pro vyšetření, kde předpokládáme zvýšenou citlivost erytrocytů nebo sníženou odolnost membrány erytrocytů.

$K_3EDTA$  a  $K_2EDTA$  jsou látky s vysokou afinitou k iontům kovů, které vyvazují z plazmy. Udrží krev nebo plazmu v nesrážlivém stavu díky vyvážení vápenatých kationtů. Rozdíly mezi těmito dvěma látkami jsou v pH, rozpustnosti a také ve fyziologickém působení na krvinku. [3,4]

Nevýhodou solí EDTA je možnost ovlivnění počtu krevních destiček. V některých případech mohou vyvolat přímou agregaci krevních destiček díky působení na jejich membránové glykoproteiny – tzv. EDTA fenomén nebo ovlivní membránu neutrofilů, která pak může vázat krevní destičky na svém povrchu – tzv. destičkový satelitismus. [5] Soli EDTA nelze využít jako antikoagulant pro většinu koagulačních stanovení pro přítomnost výrazné afinity k vápenatým iontům. Díky velmi nízké koncentraci vápenatých iontů v těchto systémech dochází k ovlivnění jak koagulačního stanovení, tak i funkce krevní destičky zejména agregaci.

Sodná sůl kyseliny citrónové neboli citrát sodný je další možné antikoagulační činidlo vhodné zejména pro vyšetření hemokoagulace. Používá se několik koncentrací citrátu sodného, je však vhodné zvolit jen jednu z nich v závislosti na odběrovém systému a doporučení pro laboratorní metody, které budou z materiálu provedeny. [6]

Antikoagulační činidlo heparin se nejčastěji používá ve formě nesespecifického (nefrakcionovaného) heparinu, který je buď lyofilizovaný nebo v roztoku, též můžeme využít

jeho solí (heparinát sodný nebo lithný). Sám o sobě se heparin chová jako kyselina, a to díky navázaným sulfátovým skupinám. Váže ionty většiny lehčích kovů jako je sodík, draslík, lithium, vápník nebo hořčík, kdy efekt se významně projeví při jeho vysokých koncentracích.



**Obr. 1** Zkumavky s antikoagulačními činidly

#### 2.1.4 Poloha vyšetřované osoby při odběru

Poloha při odběru významně mění koncentrace určitých analytů v krvi. Tyto změny vyvolá několik mechanismů např. změna tlaku v kapilárním systému nebo osmotického tlaku v plazmě, přesun vody z intravaskulárního prostoru do mezibuněčného prostoru, zadržení větších částic buněčnými membránami atd. [3]

Pro standartní odběr žilní (venózní) krve zajistíme pacientovi polohu v sedě, a to po dobu 10–15 minut před odběrem.

## 2.1.5 Typy odběrů

Odebírat můžeme arteriální, venózní nebo kapilární krev. Při odběru arteriální krve používáme různé typy kanyl, které se zavádí přímo do arterie. Je důležité dávat si pozor na fyziologický roztok s přídavkem heparinu, kterým bývá ošetřeno ústí kanyly. Fyziologický roztok by mohl způsobit značné naředění odebrané krve a heparin ovlivnit některé koagulační testy (APTT, Trombinový čas aj.). Z těchto důvodů je nutné vždy nejprve odpustit určité množství krve, přibližně 2-4 ml a teprve potom nasát krev do zkumavek.

Odběr žilní krve se provádí nejčastěji z loketní jamky. K nalezení nejvhodnější žíly provedeme co nejkratší zatažení paže. Při dlouhodobém stažení nebo po dlouhém cvičení se staženou paží dochází k falešně zvýšeným hodnotám určitých analytů (draslík, z hematologických parametrů se může zvýšit hemoglobin a hematokrit). Samotných vpich jehly do žíly by měl být hladký, přímý, pod úhlem 15° a bez zbytečné manipulace ve tkáních. Pokud provádíme odběr z nitrožilních katétrů, dodržujeme stejná pravidla jako u arteriálních katétrů. K odběru můžeme použít otevřený nebo uzavřený systém. Uzavřený systém se dnes preferuje z důvodu bezpečné práce a celkově snazší manipulace, přičemž máme dva druhy tohoto systému – pístové využívající k naplnění krve pohyblivý píst a vakuové, které využívají odčerpání vzduchu ze zkumavky a po spojení zkumavky s jehlou dochází vlivem vakua k naplnění. Oba systémy mají speciálně uzpůsobené jehly, kdy vnější část je určena pro vpich do žíly a vnitřní část je potažena gumovou čepičkou, která zamezuje výtoku krve ze žíly po rozpojení systému.



**Obr. 2** Vakuový a pístový odběrový systém

Pokud odebíráme větší množství zkumavek, tak k hematologickému vyšetření použijeme zpravidla druhou odebranou, případně další zkumavku v pořadí. Nikdy nepoužijeme první odebranou zkumavku, protože odběrový systém není zcela fyziologicky neúčinný ke krvinkám a plazmě – může dojít k vychytávání krevních destiček a k aktivaci koagulačních faktorů. Doporučené pořadí zkumavek při odběru z jednoho vpichu je následující:

- zkumavka pro hemokultury
- zkumavky bez protisrážlivých činidel
- zkumavky pro hemokoagulaci
- ostatní zkumavky s protisrážlivými činidly

Doporučené pořadí odběru zkumavek s různými protisrážlivými činidly:

- K<sub>3</sub>EDTA zkumavky
- citrátové zkumavky
- heparinové zkumavky

Pokud provádíme odběr pouze na krevní obraz nebo hemokoagulaci do citrátu, je nutné odpustit cca 2-3 ml krve. [3]

Dalším typem je odběr kapilární krve. Zde se používají různé druhy lancet nebo jiné pomůcky, které pomáhají zajistit standartní vpich. Jsou to buď hrotové systémy, kdy je mechanismus zakončen ostrým hrotem nebo jehlou, anebo řezné systémy, kdy je mechanismus zakončen ostrým řezným nožičkem. Odběrové místo se před odběrem řádně sterilně ošetří. Vytékající krev je zachycena v kapiláře, případně v nádobce, jejíž okraj má lem ve tvaru jazýčku. U dospělých a starších dětí se odběr standartně provádí ze strany bříška prstu, popř. z ušního boltce, u novorozenců a batolat z patičky. Obecně je nutné zajistit dobré prokrvení čili zahřátí končetiny.

V hematologické laboratoři se dále můžeme setkat se speciálními odběry jako je odběr kostní dřeně a její nátěr na podložní sklíčko, odběr mozkomíšního moku do sterilní zkumavky nebo odběr jiné tělní tekutiny do zkumavky s citrátem sodným.

### 2.1.6 Nejčastější chyby při odběrech

Mezi nejčastější chyby patří např. neúplné zaschnutí dezinfekčního přípravku v místě vpichu, použití nevhodného průměru jehly, jenž způsobí hemolýzu či oxidaci buněk a aktivaci koagulace, mechanické dráždění(třepání) krve ve zkumavce nebo v průběhu transportu, špatné uskladnění (v lednici, mrazáku), příliš dlouhý interval mezi odběrem a dodáním do laboratoře nebo také použití nestandardní nebo prošlé odběrové soupravy. Všechny výše zmíněné vlivy mohou způsobit hemolýzu – rozpad červených krvinek, který interferuje s valnou většinou hematologických vyšetření. Dalším problémem může být doba mezi odběrem a oddělením krevních elementů od plazmy. Zde nastává změna v metabolismu buněk v podobě snížené tvorby makroenergetických látek, které zajišťují správnou funkci a tvar buněk. Do plazmy může z krvinek přejít řada látek včetně enzymů a tím dojde k předčasnému narušení krvinky. Tyto změny se mohou odrazit ve výsledku vyšetření. [7,8] Při odběru kapilární krve by se neměla používat první kapka krve (na okraji rány se vychytává určité množství trombocytů – falešně snížené hodnoty) a krev by měla vytékat volně, nikoli násilným vytlačováním (vytlačení tkáňového moku způsobí naředění vzorku což vede k falešně nižším hodnotám krevních parametrů).

### 2.1.7 Identifikace biologického materiálu, přiřazení požadavkového listu

Každý materiál musí být správně označen a musí mít odpovídající požadavkový list. Údaje týkající se nemocného musí být na požadavkovém listě uvedeny kompletní a čitelné, jelikož laboratoř má právo odmítnout špatně označený nebo nekompletně označený vzorek či požadavkový list. Biologický materiál identifikujeme pomocí rodného čísla, jména a příjmení pacienta. Požadavkový list musí obsahovat minimálně tyto údaje: unikátní identifikátor (např. rodné číslo), jméno a příjmení pacienta, pohlaví, zdravotní pojišťovnu pacienta, kód požadujícího zařízení včetně telefonního čísla, kód základní diagnózy, požadovaná vyšetření, datum a čas odběru biologického materiálu, jmenovka a podpis lékaře. Pokud lékař zná skutečnost týkající se infekčnosti, je povinen na tento fakt upozornit zaměstnance laboratoře.



## 2.2 Transport materiálu

Biologický materiál, který je potenciálně infekční, by se měl transportovat v uzavřených boxech nebo kontejnerech. Jedná se o speciálně upravené plastové nádoby, jenž musí splňovat určité požadavky (odolnost proti otřesům, těsnost, ...). V průběhu transportu by se mělo zamezit výrazným otřesům nebo nenadálým změnám polohy odběrové soupravy. Standardní teplota pro přepravu materiálu a skladování před vlastní analýzou, pokud není uvedeno jinak, je 20-25°C. Případné vychýlení nebo prudké změny teploty mohou způsobit traumatizaci buněk, čímž znehodnotí odebraný biologický materiál. Doba doručení do laboratoře by měla být co nejkratší. Krevní obraz má být optimálně zpracován do 6 hodin po odběru. Plazma pro koagulační vyšetření by měla být separována od krevních elementů do 1 - 2 hodin od odběru a následně do 6 hodin od odběru zpracována (mimo výjimky jako je např. FVIII). Pokud nelze zpracovat do 6 hodin od odběru, je nutné plazmu úplně oddělit od krevních buněk a přenést ji do jiné zkumavky, popř. u některých metod zamrazit. [3]

Způsoby transportu biologického materiálu do laboratoře jsou:

- přímou donáškou (zdravotnický pracovník, pacient)
- potrubní poštou v rámci nemocnice
- vlastním svozem

## 2.3 Příprava a zpracování biologického materiálu před vyšetřením

Do laboratoře by měl být doručen řádně označený materiál společně s požadavkovým listem. Pracovníci laboratoře následně zaznamenají požadovaná vyšetření do LIS a opatří vzorek i požadavkový list identifikačním štítkem (číslo, čárový kód). Pokud jsou z biologického materiálu vytvořeny alikvotní vzorky, musí být také identifikovány v návaznosti na primární vzorek.

Před samotnou analýzou se doporučuje vzorky zkontrolovat a vyřadit ty, které nelze z určitých důvodů vyšetřit (sražený vzorek, málo materiálu, silně chylózní vzorek aj.). Do komentáře k vyšetření je nutné zaznamenávat případné změny vzorku jako je hemolýza,

ikterický a chylózní vzorek. [9] Také je potřeba zhodnotit vzhled a viskozitu vzorku, to můžou ovlivnit plazmatické složky (kryoglobuliny, chladové protilátky, paraproteiny), kdy dojde ke změně vazkosti materiálu nebo shlukování buněk.

Vzorek uchováváme před analýzou při laboratorní teplotě, aby nedošlo ke snížené funkci  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pumpy. Dále vzorkem zbytečně nemícháme, netřeseeme, snažíme se vzorek co nejméně traumatizovat. Je nutné také respektovat stabilitu vzorku.

### 2.3.1 Příprava séra a plazmy

Pro přípravu plazmy nebo séra využíváme centrifugaci. Sérum odebíráme do zkumavky bez protisrážlivého činidla a krev necháme volně srazit při pokojové teplotě. Centrifugujeme standartním způsobem při 20°C, 2500 g, 15 minut, kdy se sérum oddělí od krevních elementů.

Plazmu odebíráme do plastových zkumavek s přidavkem antikoagulačního činidla. Citrátová krev se standartně centrifuguje při 20-25°C, 2000-2500 g, 15 minut, kdy se plazma oddělí od usazených krvinek. Pokud plazmu nemůžeme do určitého času zpracovat, je možné ji zamrazit při teplotě -60 až -80°C. Zmraženou plazmu je nutné před analýzou temperovat minimálně 15 minut při laboratorní teplotě.

### 3 Analytická fáze

Pokud jsme biologický materiál správně odebrali, dopravili do laboratoře a připravili ho pro analýzu, následuje samotná analytická fáze. V této práci se zaměřuji na stanovení KO s pětipopulačním diferenciálním počtem leukocytů na analyzátoru Sysmex XS 1000i.



**Obr. 3** Analyzátor Sysmex XS 1000i [10]

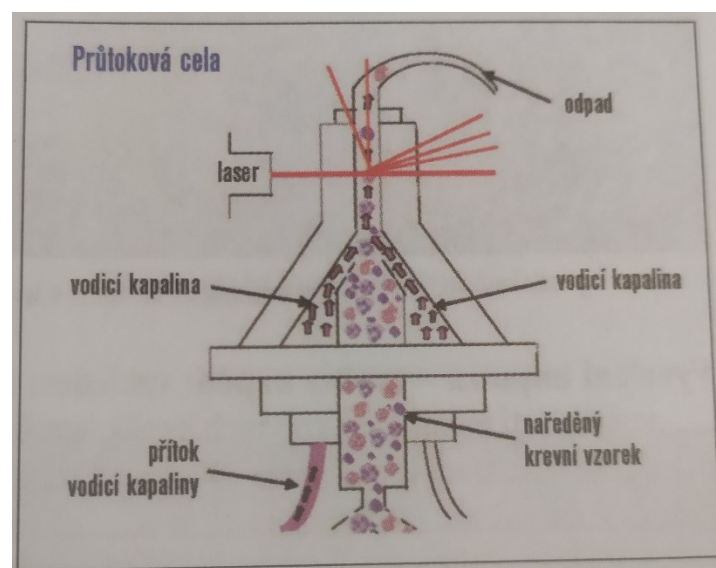
Tento analyzátor patří mezi plně automatické, což znamená, že využívá vlastní ředící systémy potřebné k naředění vzorku. Disponuje uzavřeným aspiračním systémem, takže aspiruje krev z uzavřené zkumavky, nedochází tedy k přímému kontaktu se vzorkem a práce je mnohem bezpečnější pro personál. Dokáže zpracovat až 60 vzorků/hod. Jeho výhodou je malé množství vzorku potřebné k analýze, aspiruje 20  $\mu\text{L}$ , což oceníme hlavně u dětských vzorků. Je též velice jednoduchý na provádění údržby. [10]

Pro měření KO s pětipopulačním diferenciálním počtem leukocytů využívá kombinaci různých detekčních principů.

### 3.1 Stanovení RBC a PLT

Pro stanovení počtu červených krvinek a krevních destiček používá metodu detekce na základě impedanční metody s usměrněním částic hydrodynamickou fokusací. Po aspiraci dojde ke zředění vzorku speciálním izotonickým roztokem, který izovolumetricky sféruje krvinky tak, že je zvýrazní a dodá jim pravidelný sférický tvar. Roztok také obsahuje stabilizační látky, které jsou důležité pro udržení fyziologických vlastností a fyzikálních parametrů krvinky. [11]

Naředěná suspenze krevních elementů je pomocí vakua nasávána do otvoru měřící kyvety, který je 10-15krát větší než samotná měřená částice. Vně i uvnitř kyvety je polarizované stejnosměrné elektrické pole. Aby nedocházelo k neuspořádanému nebo souběžnému vstupu několika částic najednou tzv. koincidence, využívá analyzátor hydrodynamické fokusace. Hydrodynamická fokusace je založena na toku vodící kapaliny po obvodu měřící kyvety. Díky různým rychlostem a typickému tvarování kyvety nenastane vzájemné promíchání obou kapalin, laminární proud nosné tekutiny transportuje buňky jednu za druhou. Částice jsou tedy usměrněny do tenkého proudu a vstupují do měřícího systému jednotlivě.

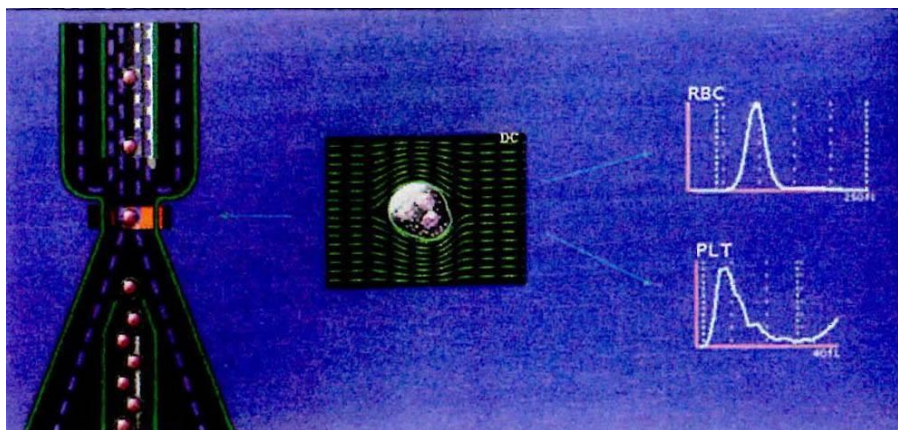


**Obr. 4** Hydrodynamická fokusace [Převzato z 3, s. 75]

Impedanční metoda je založená na průchodu buněk mezi elektrodami, které jsou na obou stranách systému. Vytvoří se impedanční impuls, který nám dá kvantitativní (počet impulsů) a kvalitativní (velikost impulsů) informace o procházejících částicích.

Díky zápornému náboji na vnější straně buněčné membrány nemůže proud pronikat do buňky, buňka je stejnosměrným proudem obtékána. Po průchodu dojde ke zvýšení elektrického odporu prostředí a ke změně napětí mezi elektrodami, které se měří voltmetrem. Změna napětí vybudí impuls, jehož velikost odpovídá objemu částice. [4]

Nevýhodou impedančního systému je, že měří všechny mikročástice, které mohou ovlivnit měrný odpor prostředí jako jsou částičky prachu, vzduchové bubliny, buněčné fragmenty nebo fibrinová depozita. [12]



**Obr. 5** Impedanční metoda s hydrodynamickou fokusací [Převzato z 3, s. 76]

### 3.2 Stanovení WBC

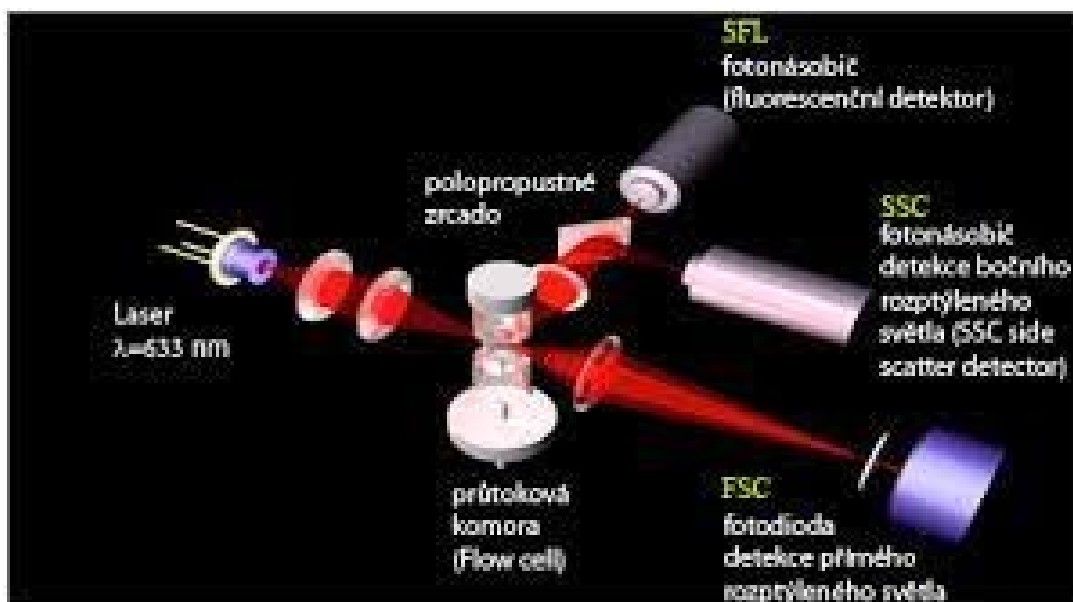
Využíváme optickou metodu, konkrétně fluorescenční průtokovou cytometrii. Tato metoda umožňuje zachytit vyzávající nebo jinak aktivované buňky, dále hodnotí velikost buněk, granula a obsah nukleových kyselin v WBC, hustotu jádra a cytoplasmy.

Poté, co je vzorek aspirován, zředěn v určitém poměru izotonickým roztokem a lyzační činidlo způsobilo destrukci trombocytů, erytrocytů a perforaci membrány leukocytů dochází k přidavku fluorescenčního barviva, látky Stromatolyser 4DS, které se specificky váže na

nukleové kyseliny (DNA a RNA) v jádře, cytoplasmě i ostatních organelách. Vzorek je transportován do průtokové komůrky, kde je ozářen polovodičovým laserovým paprskem. Laserový paprsek vyniká svojí dlouhou životností, malou energetickou náročností a minimálním zdrojem odpadního tepla, dle paprsku můžeme krvinky oddělit pomocí tří různých signálů:

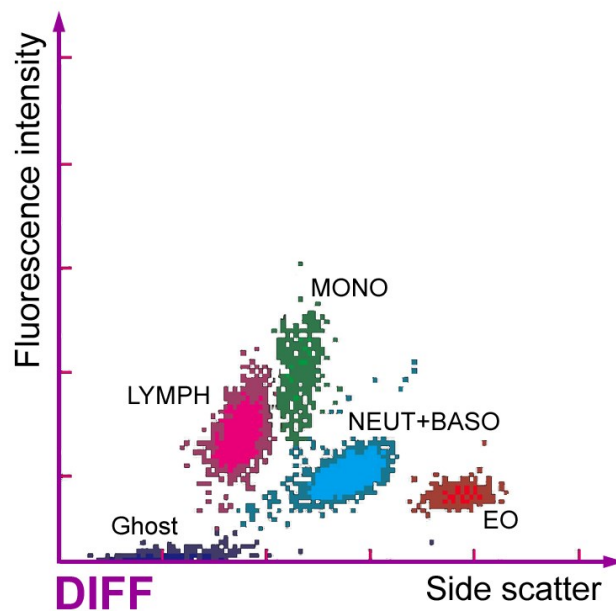
- Rozptyl přímého laserového paprsku (přední rozptyl neboli FSC = forward scatter)
- Rozptyl bočního laserového paprsku (boční rozptyl neboli SSC = side scatter)
- Intenzita fluorescenčního záření (boční fluorescence neboli SFL = side fluorescence light)

FSC nám dává informaci o velikosti buňky, platí zde přímá úměra. Intenzita bočního rozptylu nás informuje o vnitřní struktuře buňky, tzn. členitosti jádra a přítomnosti granulí v cytoplasmě. Poslední parametr, intenzita fluorescence, odpovídá množství nukleových kyselin v buňce. [3] Výstupem jsou číselné hodnoty jednotlivých typů leukocytů a jejich grafické zobrazení v rozptylových grafech – scattergramech (viz obr. 7). Během analýzy probíhá detekce několika tisíc buněk (až 10000).



**Obr. 6** Schéma přístroje (laserová projekce a boční fluorescence) [13]

Neutrofilny, monocyty, lymfocyty a eozinofily jsou rozděleny podle intenzity fluorescence, jenž udává poměr jádra a cytoplasmy každé buňky – osa y a dle bočního rozptylu laserového paprsku, který informuje o vnitřním vybavení buňky – osa x. Monocyty jsou elementy bohaté na organely, což znamená, že po aplikaci lyzačního činidla zůstane velká část vnitřních struktur v samotném monocytu. Na grafu tedy vidíme monocyty položené o něco dále než lymfocyty, jelikož mají vyšší intenzitu bočního rozptylu. Také fluorescenční činidlo zvýrazní více organel, tudíž opět monocyty vykazují vyšší fluorescenci než lymfocyty. Lyzační činidlo také způsobí degranulaci bazofilů, což způsobí nízkou hodnotu bočního rozptylu. V lyzačním činidle jsou přítomny organické kyseliny, které se specificky váží ke granulím eozinofilů, zvyšují intenzitu fluorescence a díky tomu jsou eozinofilní granulocyty odlišitelné od neutrofilních. [14] Neutrofilní segmenty mají řadu organel, které taktéž lyzační činidlo lyzuje, ale přítomná sekundární granule v neutrofilech zůstávají. V grafu je vidíme mezi bazofily a eozinofily.



**Obr. 7** Scattergram populace WBC [15]

### 3.3 Stanovení koncentrace hemoglobinu v krvi

Udává nám množství hemoglobinu v 1 litru krve. Metoda je založená na spektrofotometrickém stanovení, kdy principem je hemolýza erytrocytů a uvolnění hemoglobinu, následné převedení na opticky stálý barevný komplex a jeho spektrofotometrické změření.

Průběh metody je následující: nejprve lyzační činidlo, látka Stromatolyser 4DL, způsobí rozpad WBC, RBC a PLT, z erytrocytů se uvolní hemoglobin. Na začátku chemické reakce dochází k oxidaci dvojmocné formy železa ( $\text{Fe}^{2+}$ ) na trojmocnou ( $\text{Fe}^{3+}$ ), čímž vznikne methemoglobin. [16] Přídavné činidlo, naše metoda využívá sodiumlaurylsulfát (SLS) - Sulfolyser, reaguje s methemoglobinem a vzniká opticky stabilní zabarvený komplex, který se analyzuje fotometrickou metodou. LED dioda vyzařuje monochromatické záření, které při průchodu směsí absorbuje barevné komplexy. Zánik komplexů zaznamenává fotosenzor a je nepřímo úměrný koncentraci hemoglobinu ve vzorku. [17]

### 3.4 Analyzátorové hlášky (flagy)

Pokud se buňky nevejdou do předem definovaných rozmezí analyzátoru, objeví se varovné hlášky, které nás upozorňují na možnou patologii nebo interferenci měření. Tyto hlášky je vždy nutné zkontrolovat a posoudit jejich intenzitu v závislosti na komplexním výsledku krevního obrazu. Pokud je intenzita hlášek nad hodnotou cutoff, provádíme vždy manuální krevní nátěr a jednotlivé buňky posoudíme mikroskopicky. Hlášky, kterým se v práci věnuji jsou následující:

- Blasts – suspektní přítomnost blastů
- Imm Gran – suspektní přítomnost nezralých forem myeloidní řady (promyelocytů, metamyelocytů nebo myelocytů)
- Left Shift – posun doleva (přítomnost tyčí)
- Atypical lymfo / Abn lymfo – přítomnost atypických lymfocytů (aktivované lymfocyty, plazmatické buňky, virocyty, vlasaté buňky, ...)
- NRBC – přítomnost normoblastů



Všechny zmíněné hlášky se týkají leukocytů, analyzátor samozřejmě hodnotí i erytrocyty a trombocyty a vydává k nim příslušná varovná hlášení, ty ale nejsou předmětem této práce.

### 3.5 Stanovení leukocytů mikroskopicky

Mikroskopické hodnocení provádíme při podezření na hematologické či hematoonkologické onemocnění a při patologickém analyzátorovém diferenciálním rozpočtu. Nátěr periferní krve nám mnohdy pomůže určit diagnózu, při které je důležité včasné rozhodnutí lékaře o dalším možném postupu. V indikovaných případech patologického nálezu by měl následovat odběr a vyšetření kostní dřeně. Postup stanovení leukocytů mikroskopicky je uveden v praktické části.

## 4 Postanalytická fáze

V této fázi zapisujeme napočítané výsledky manuálních diferenciálních počtů leukocytů KO do laboratorního informačního systému (LIS). Nejdříve je nutné zkontrolovat veškeré identifikační údaje pacienta, aby nedošlo k zapsání výsledku jinému pacientovi, velkou výhodou jsou zde automatické přenosy, které eliminují možné chyby. Po kontrole zapisujeme počet jednotlivých vývojových stádií WBC, kontrolou je nám automatický součet napočítaných elementů, který musí být 100. Následuje zápis patologických změn WBC, RBC i PLT do příslušných kolonek LIS. Závěrem se provede kontrola výsledku a pokud je vše v pořádku, uvolňujeme výsledek z LIS do NIS, kde je k dispozici žádajícímu lékaři.

## 5 Praktická část

V laboratoři Nemocnice Slaný jsem pomocí výše zmíněného analyzátoru (Sysmex XS 1000i) naměřila 110 na sobě nezávislých pacientů, jenž měli v požadavku KO s diferenciálním počtem leukocytů, z toho prvních 100 pacientů mělo patologické hlášky (flagy) nad limit (cutoff), který je stanoven na hodnotu 100. Pacienti byli z různých oddělení napříč celou nemocnicí s různými diagnózami. Posledních 10 pacientů bylo bez patologických hlášek, jsou to většinou pacienti z hematologické ambulance, kterým se dělá manuální nátěr pro kontrolu. U všech vzorků byl proveden manuální nátěr a následně byli obarveni Pappenheimovou barvicí technikou. Prohlížela jsem na mikroskopu Olympus BX 41 s použitím imerzního oleje.

### 5.1 Zhotovení nátěru

Nátěr periferní krve provádíme v ochranných rukavicích a po pečlivém zamíchání vzorku nejdéle 5 hodin po odběru. Pomocí Pasteurovy pipety si kápneme malou kapku krve na okraj podložního sklíčka, asi 1,5 cm od jeho užší hrany. Následně jemně položíme roztěrové sklo před kapku krve a od středu ho posunujeme směrem ke kapce, která se po dotyku rozprostře po celé délce jeho hrany. Pod úhlem 30-40° (dle hematokritu a potřebné hustoty nátěru) provedeme rovnoměrný tah roztíracího skla po podložním skle, čímž rozetřeme veškerou krev. Správný nátěr by se neměl dotýkat v žádném místě hrany skla. [18]

Určitě bychom se měli vyvarovat nejčastějších chyb jako je silný nátěr po celé délce skla, nátěr nepřechází "do ztracena" nebo použití mastných, špinavých sklíček.

## 5.2 Pappenheimovo barvení

Pro barvení nátěrů KO využíváme panoptickou barvicí techniku – Pappenheimovo barvení. Základem jsou dva roztoky:

- Roztok May-Grünwald, který se skládá z eozinu Y, metylenové modři, metylalkoholu a glycerolu. Je to kyselé barvivo, takže se váže na kationtové části proteinů a barví oranžovočerveně hemoglobin a eozinofilní granula.
- Roztok Giemsa-Romanovsky, který se skládá z metylenové modři, azur-eozinu, azur II, metylalkoholu a glycerolu. Je to zásadité barvivo, takže se váže na aniontové části molekul a barví modrošedě nukleové kyseliny, nukleoproteiny, granula bazofilů a sekundární granula neutrofilů.

Postup při barvení KO v laboratoři Nemocnice Slaný je následující: používáme tři lázně, nejprve dávkujeme sklíčka na 5 minut do koncentrovaného roztoku May-Grünwald, poté na dalších 5 minut do druhé lázně, kde je zředěný roztok May-Grünwald v poměru 1:1 deionizovanou vodou a poslední třetí lázeň je roztok Giemsa-Romanovsky zředěný 1:39 také deionizovanou vodou, kde necháváme sklíčka 15 minut. Po dokončení řádně opláchneme vodou a necháme zaschnout.

## 5.3 Hodnocení nátěru periferní krve

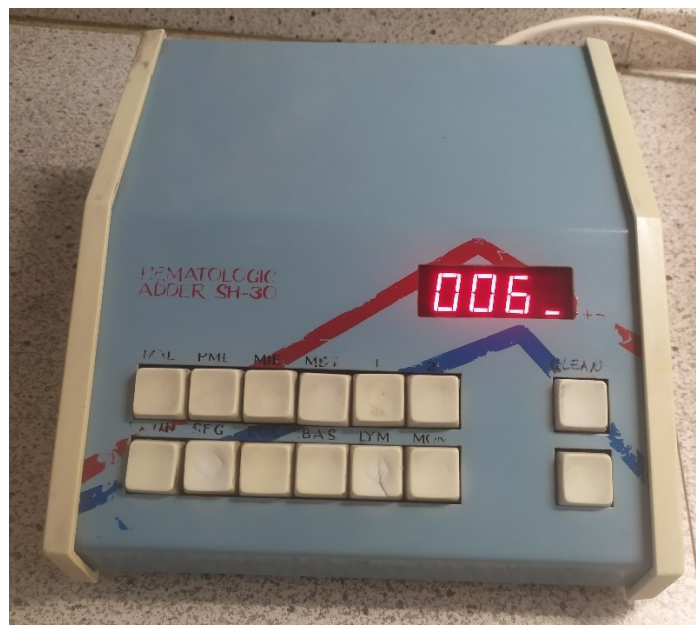
Vlastní hodnocení obarveného preparátu začínáme zhodnocením při menším zvětšení, následuje zhodnocení při zvětšení 1000x. Menší zvětšení (200-400x) slouží pro posouzení kvality nátěru, jeho obarvení, rozložení jaderných buněk a taky pro nalezení optimálního místa k počítání leukocytů. Vybíráme si takovou část preparátu, kde jsou buňky rovnoměrně rozprostřeny a erytrocyty se nepřekrývají. Většinou je toto místo přibližně 1 cm od konce nátěru. Na podložní sklo kápneme kapku imerzního oleje a preparát hodnotíme meandrovitým pohybem objektivu nad podložním sklem. Při kvantitativním hodnocení

diferenciálního rozpočtu leukocytů hodnotíme 100 za sebou jdoucích buněk. U patologických nálezů nebo při hodnocení kontroly kvality pak 200 buněk. Elementy zaznamenáváme na speciální přístroje → leukomaty (viz obr. 8). Erytroblasty (NRBC) vyčíslujeme na 100 erytrocytů a pokud jich zaznamenáme více jak 5%, provádíme korekci leukocytů příslušným výpočtem, čímž předejdeme falešně zvýšenému počtu leukocytů.

Vzorec pro korekci počtu leukocytů v případě přítomnosti více než 5% erytroblastů:

$$\text{Korigovaný počet WBC (} \times 10^9/l \text{)} = \frac{\text{Nekorigovaný počet WBC (} \times 10^9/l \text{)} \times 100}{\text{Relativní počet NRBC (} \% \text{)} + 100}$$

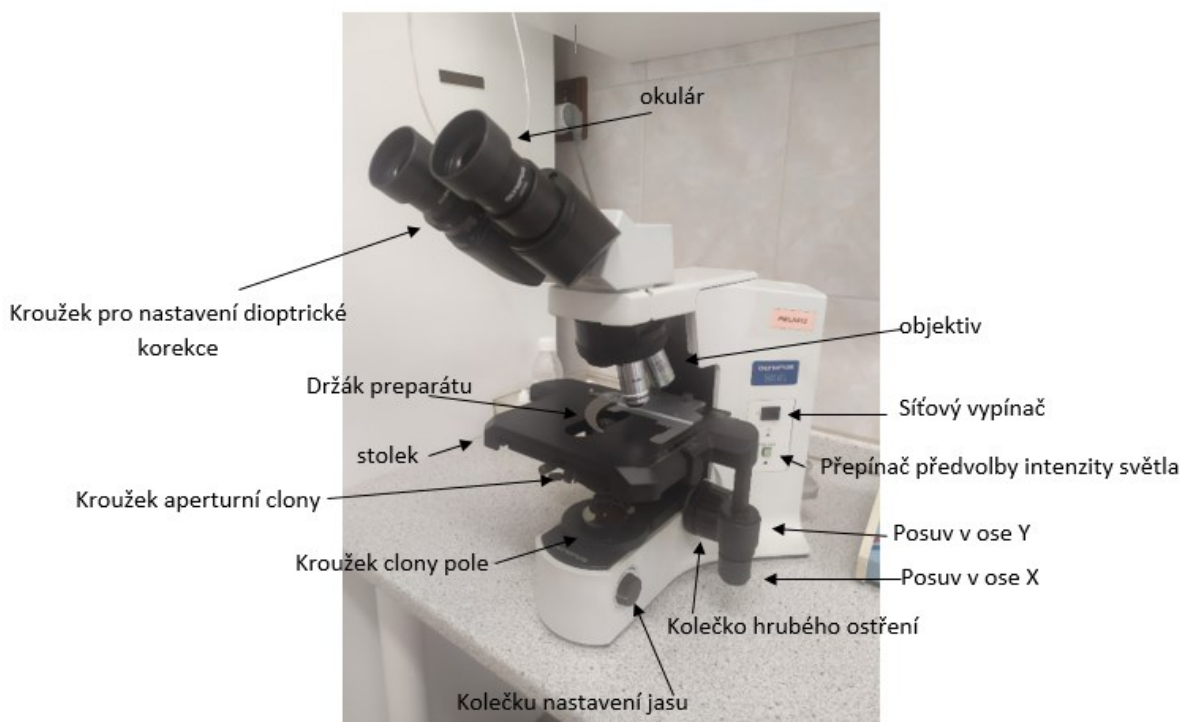
Dále popisujeme veškeré morfologické změny RBC, PLT i WBC, patří sem např.: velikost a tvar buněk, velikost, tvar či uložení jádra, přítomnost jadérek, struktura chromatinu, přítomnost inkluzí a vakuolizace cytoplasmy.



**Obr. 8** Leukomat – přístroj pro zaznamenávání počtu jednotlivých vývojových stádií leukocytů

Fyziologicky nalézáme tyto elementy WBC: neutrofilní segmenty a tyče, eozinofilní segmenty, bazofilní segmenty, lymfocyty a monocyty. Patologicky potom všechna ostatní vývojová stádia krevních elementů, vzácně krevní parazity. [19]

Pro svou práci jsem měla k dispozici mikroskop Olympus BX41. Jako zdroj světla využívá halogenovou žárovku a umožňuje upevnění jednoho preparátu. Následné zaostření provedeme velkým kolečkem hrubého ostření a doostřujeme malým kolečkem jemného ostření. [20]



**Obr. 9** Popis a ovládací prvky mikroskopu Olympus BX41

## 5.4 Výsledky a hodnocení

V následujících tabulkách jsou zaznamenány jednotlivé patologické hlášky týkající se leukocytů a k nim příslušný mikroskopický nález. Jedná se o kvalitativní hodnocení pomocí ANO, NE. Pro statistické vyhodnocení jsem použila Fisherův exaktní test, jelikož se jedná o klasické čtyřpolní tabulky. Fisherův exaktní test je založen na výpočtu pravděpodobnosti, se kterou bychom při platnosti nulové hypotézy o nezávislosti jednotlivých hlášek získali naši

konkrétní realizaci čtyřpolní tabulky. Hodnota pravděpodobnosti je zapsána pod příslušnou hláškou jako hodnota p a je vypočítána ze vzorce:

$$p = \frac{\binom{a+c}{a} \binom{b+d}{b}}{\binom{n}{a+b}} = \frac{(a+b)!(a+c)!(c+d)!(b+d)!}{n!a!b!c!d!} \quad [21]$$

**Tabulka 1** Přítomnost pozitivní hlášky „Imm gran“ a mikroskopického nálezu nezralých granulocytů

Imm gran p = <0,0001	Mikroskopický nálezn nezralých granulocytů	
	ANO	NE
ANO	39	22
NE	7	42

První tabulka je zaměřena na pozitivní hlášku „Imm Gran“ a mikroskopický nálezn nezralých granulocytů. Z celkových 110 pacientů mělo 61 z nich pozitivní hlášku „Imm Gran“, u 39 jsem hlášku potvrdila mikroskopicky, naopak u 22 byla hláška vyvrácena. Hodnota pravděpodobnosti je <0,0001, což je méně než 5%, tudíž zamítám nulovou hypotézu a prokazují statisticky významný mikroskopický výskyt nezralých granulocytů při hlášce „Imm Gran“.

**Tabulka 2** Přítomnost IG > 1 % a mikroskopický nálezn nezralých granulocytů

IG > 1 % p = 0.0037	Mikroskopický nálezn nezralých granulocytů	
	ANO	NE
ANO	11	3
NE	35	61

Při sledování IG > 1% jsem dospěla k hodnotě pravděpodobnosti opět menší než 5%, takže také existuje statisticky významný mikroskopický výskyt nezralých granulocytů.

**Tabulka 3** Přítomnost hlášky „Atyp lymfo / Abn lymfo“ a mikroskopický nález aktivovaných lymfocytů

Atyp lymfo / Abn lymfo p = 0,0012	Mikroskopický nález aktivovaných lymfocytů	
	ANO	NE
ANO	27	31
NE	9	43

Pro hlášku „Atyp lymfo / Abn lymfo“ platí také statisticky významná souvislost s mikroskopickým nálezem aktivovaných lymfocytů.

**Tabulka 4** Přítomnost hlášky „Atyp lymfo / Abn lymfo“ a mikroskopický nález velkých granulovaných lymfocytů (LGL)

Atyp lymfo / Abn lymfo p = 0,5436	Mikroskopický nález LGL	
	ANO	NE
ANO	5	53
NE	7	45

V případě sledování hlášky „Atyp lymfo / Abn lymfo“ nemůžu tvrdit, že existuje statisticky významný mikroskopický nález velkých granulovaných lymfocytů, jelikož hodnota  $p = 0,5436$  je větší než 5%, což znamená, že nemohu zamítnout nulovou hypotézu. Totéž platí pro mikroskopický výskyt lymfocytů s jadérky (viz tabulka 5), zde však bylo málo mikroskopických nálezů (6), což může ovlivnit výpovědní hodnotu testování. Hláška je tedy většinou způsobená něčím jiným.

**Tabulka 5** Přítomnost hlášky „Atyp lymfo / Abn lymfo“ a mikroskopický nález lymfocytů s jadérky

Atyp lymfo / Abn lymfo p = 1	Mikroskopický nález lymfocytů s jadérky	
	ANO	NE
ANO	3	55
NE	3	49



**Tabulka 6** Přítomnost hlášky „Left Shift“ a mikroskopického nálezu posunu doleva

Left Shift p = 0,0002	Mikroskopický nálezu posunu doleva	
	ANO	NE
ANO	14	34
NE	2	60

V tabulce číslo 6 je zaznamenána hláška „Left Shift“ společně s mikroskopickým nálezem posunu doleva, zde jsem dospěla k hodnotě pravděpodobnosti 0,0002, což je menší než 5%. Prokazují tedy statisticky významnou souvislost mezi zmíněnou hláškou a mikroskopickým nálezem.

**Tabulka 7** Přítomnost hlášky „Blasts“ a mikroskopického nálezu blastů

Blasts p = 27,5	Mikroskopický nálezu blastů	
	ANO	NE
ANO	1	3
NE	0	106

Blasty jsou celkem specifické, jelikož se hláška vyskytla pouze u 4 případů a z toho jsem ji jednou potvrdila, tak je obtížné ji hodnotit. Zbylé tři případy, kdy jsem hlášku vyvrátila bylo díky atypickým velkým lymfocytům, které analyzátor do hlášky suspektní přítomnosti blastů zařadí. Dle čísla pravděpodobnosti bych řekla, že neexistuje statisticky významná souvislost mezi hláškou „Blasts“ a mikroskopickou přítomností blastů, nicméně díky nízkému výskytu této hlášky mám málo dat na opodstatněné hodnocení.

Tabulka 8 Přítomnost hlášky „NRBC“ a mikroskopického nálezu erytroblastů > 5%

NRBC p = 0,0037	Mikroskopický nález erytroblastů > 5%	
	ANO	NE
ANO	11	3
NE	35	61

Pro hlášku „NRBC“ platí také statisticky významná závislost s mikroskopickým nálezem erytroblastů > 5%.

## 6 Závěr

Z výsledků vyplývá, že varovné hlášky jsou velice důležité a je třeba na ně dávat velký pozor. Z celkově osmi pozorovaných varovných hlášení jsem v pěti případech potvrdila statistickou závislost mikroskopického nálezu na příslušné hlášce. Dle výsledků je patrná největší shoda hlášky „Imm gran“ a mikroskopické přítomnosti nezralých granulocytů, hodnota p-value je  $<0,0001$ , čímž je potvrzena statistická závislost. Stejně i u hlášky „Left shift“, kde hodnota  $p = 0,0002$  a u přítomnosti  $IG > 1\%$  s hodnotou  $p = 0,0037$  byla potvrzena statistická závislost s příslušnou mikroskopickou anomálií. Statistická závislost byla potvrzena i u patologického hlášení „NRBC“, kde sice bylo k dispozici o něco méně dat, ale i to stačilo pro opodstatněné hodnocení. Hodnota  $p$  dosáhla  $0,0037$ . Hlášku „Atyp lymfo / Abn lymfo“ jsem porovnávala se třemi možnými mikroskopickými anomáliemi – aktivovanými lymfocyty, kde jsem na základě  $p = 0,0012$  potvrdila statistickou závislost, dále s LGL ( $p = 0,5436$ ) a lymfocyty s jadérky ( $p = 1$ ), kde nebylo možné hypotézu nezávislosti vyloučit. Poslední specifickou hláškou je „Blasts“, zde jsem měla k dispozici velmi málo dat, respektive hláška se vyskytla jen 4krát ze 110 možných vzorků, na základě těchto získaných dat nelze spolehlivě potvrdit nebo vyvrátit statistickou závislost hlášky a mikroskopického nálezu.

U většiny varovných hlášení se mi nepodařilo vyvrátit statistickou závislost mikroskopického nálezu, což velice slušně odpovídá zavedeným postupům laboratoře, není tedy nutné provádět změny ve vyšetřovacím postupu práce laborantek. Výjimkou je „Atyp lymfo / Abn lymfo“, kde v případě mikroskopického nálezu LGL a lymfocytů s jadérky statisticky významná závislost není. Může to být způsobeno malým množstvím získaných dat, proto bych ráda zaměřila svou následující kvalifikační práci právě na toto téma.

Práce potvrdila, že výrobcem nastavené limity cutoff odpovídají mikroskopickým nálezům, shoda však není 100 %. Mikroskopické hodnocení je stále nenahraditelné, neboť ve všech případech se vyskytly situace, kdy mikroskopicky zachycené anomálie nebyly hlášeny analyzátořem. Navíc v některých případech i jedna nalezená buňka může vypovědět o velmi závažné diagnóze. V laboratoři i nadále zachováme stejné postupy a budeme pečlivě prohlížet každou hlášku nad stávající hodnotu cutoff.

## 7 Seznam použité literatury

- [1] BERMES E. W., YOUNG D. S. Specimen collection and processing; sources of biological variation. In: Tietz NW. Fundamentals of Clinical Chemistry. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1996: 33-52.
- [2] GUDER W. C., NARAYANAN S., WISSER H., ZAWTA B. Samples: from the patient to the laboratory. Darmstadt: Wiley WCH, 2003: 106.
- [3] PECKA M. a kol. Praktická hematologie, Laboratorní metody. Český Těšín, Finidr, 2010, str. 43-58
- [4] PECKA M. Laboratorní hematologie v přehledu, Fyziologie a patofyziologie krevní buňky. Český Těšín, Finidr, 2006, stran 304
- [5] International Council for standardization in haematology. Recommendations for EDTA anticoagulation of bod for hematology testing. Amer. J. Clin. Pathol., 1993, roč. 100, s. 371-372.
- [6] ADCOCK D. M., KRESSIN D. C., MARLAR R. A. Effect of 3,2% vs 3,8% sodium concentration on routine coagulation testing. Am J Clin Pathol 1997; 107: 105-10
- [7] YOUNG D. S. Effects of preanalytical variables on clinical laboratory tests. 2nd ed. Washington: AACC Press, 1977
- [8] STATLAND B. E., WINKEL P. Selected pre-analytical sources of variation. In: Gräsbeck R., Alström T., editors. Reference Values in Laboratory Medicine. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 1981: 127-37
- [9] BÜTTNER J. Unspecificity and interference in analytical systems: concepts and theoretical aspects. Klin Chem Mitt 1991; 22: 3-12
- [10] Sysmex. Průduky. [online]. [cit. 15-04-2022]. Dostupné z: <https://www.sysmex-europe.com/products/products-detail/xs-1000i.html>
- [11] CORNBLEET J. Spurious result from automated haematology cell counters. Lab Med 1983; 14: 509-14.

- [12] AULT K. A. Platelet counting: Is there room for improvement. *Laboratory Haematology* 1996; 2: 265-9
- [13] Measurement principles, [PDF document] německo : Sysmex, 2008 firemní materiál
- [14] LINSSEN J., ADERHOLD S., NIERHAUS A., ET AL. Automation and validation of a rapid method to assess neutrophil and monocyte activation by routine fluorescence flow cytometry in vitro. *Cytometry, part B, Clin Cytometry* 2008; 74: 295-309
- [15] ONKODIN image bank. Reference scattergrams - Calendar 2008 special sheet. [online] Německo [cit. 15-04-2022] Dostupné z: [https://www.hemato-images.eu/content/e7421/e10373/e10374/e10529/index\\_eng.html](https://www.hemato-images.eu/content/e7421/e10373/e10374/e10529/index_eng.html)
- [16] DACIE J., LEWIS S. J. *Practical haematology*. Ninth edition. London: Churchill Livingstone, 2001: 633.
- [17] Sysmex. SLS Detekční metoda. [online]. [cit. 15-04-2022]. Dostupné z: <https://www.sysmex.cz/vzdelavani/technologie/technologie-mereni/sls-detekcni-metoda.html>
- [18] MIKULENKOVÁ D., MATÝŠKOVÁ M., BOURKOVÁ L. Doporučení ČHS ČLS JEP. Příprava a barvení nátěru periferní krve a aspirátu kostní dřeně. 2013. Stran: 10
- [19] MATÝŠKOVÁ M., BULIKOVÁ A., KAČÍRKOVÁ P., BOURKOVÁ L. Doporučení ČHS ČLS JEP. Postup při hodnocení nátěru periferní krve. 2014. Stran: 8
- [20] Laboratorní mikroskop Olympus BX41 – Návod k obsluze. ELSYST Engineering. Vyškov 2000. Stran: 32
- [21] *Matematická biologie. Analýza a management dat pro zdravotnické obory, Analýza klinických dat.* [online]. [cit. 09.05.2022]. Dostupné z: <https://portal.matematickabiologie.cz/index.php?pg=aplikovana-analyza-klinickyh-a-biologickyh-dat--analyza-a-management-dat-pro-zdravotnicke-obory--testovani-hypotez-o-kvalitativnich-promennych--fisheruv-exaktni-test>