

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Gašper JANČIGAJ

**PRIMERJAVA SISTEMOV UMERJANJA
INŠTRUMENTOV ZA DOLOČANJE ŠTEVILA
SOMATSKIH CELIC V MLEKU**

MAGISTRSKO DELO

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Gašper JANČIGAJ

**PRIMERJAVA SISTEMOV UMERJANJA INŠTRUMENTOV ZA
DOLOČANJE ŠTEVILA SOMATSKIH CELIC V MLEKU**

MAGISTRSKO DELO

**A COMPARISON OF THE CALIBRATION SYSTEMS FOR
INSTRUMENTS DETERMINING THE NUMBER OF SOMATIC
CELLS IN MILK**

MASTER OF SCIENCE THESIS

Ljubljana, 2016

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete z dne 15. 12. 2014 in dopolnitvi z dne 28. 9. 2015 je bilo potrjeno, da kandidat izpolnjuje pogoje za magistrski Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti ter opravljanje magisterija znanosti s področja živilstva. Za mentorico je bila imenovana prof. dr. Irena Rogelj in za somentorico prof. dr. Katarina Košmelj.

Magistrsko delo je zaključek Podiplomskega študija bioloških in biotehniških znanosti s področja živilstva. Delo je bilo opravljeno na Inštitutu za mlekarstvo in probiotike na Oddelku za zootehniko, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani. Podatke smo pridobili v sodelovanju s Kmetijsko gozdarsko zbornico Slovenije in sicer z Zavodom Ljubljana, Zavodom Nova Gorica, Zavodom Ptuj in Zavodom Murska Sobota ter z Nacionalnim veterinarskim inštitutom, enota Kranj, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani.

Mentorica: prof. dr. Irena Rogelj

Somentorica: prof. dr. Katarina Košmelj

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Barbara JERŠEK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: doc. dr. Andreja ČANŽEK MAJHENIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: prof. dr. Veronika KRALJ-IGLIČ
Univerza v Ljubljani, Zdravstvena fakulteta, Oddelek za protetiko

Datum zagovora:

Podpisani izjavljam, da je magistrsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Gašper Jančigaj

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Md
DK	UDK 637.1:542.089.6:57.086(043)=163.6
KG	mleko/število somatskih celic/referenčna metoda/fluoro-opto-elektronska metoda/referenčna vrednost/umeritvena enačba/umerjanje inštrumentov/koefficient variacije
AV	JANČIGAJ, Gašper, univ. dipl. inž. živ. tehnol.
SA	ROGELJ, Irena (mentorica)/KOŠMELJ, Katarina (somentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti, področje živilstva
LI	2016
IN	PRIMERJAVA SISTEMOV UMERJANJA INŠTRUMENTOV ZA DOLOČANJE ŠTEVILA SOMATSKIH CELIC V MLEKU
TD	Magistrsko delo
OP	XVI, 121 str., 26 pregl., 16 sl., 88 pril., 120 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	<p>Povečano število somatskih celic (ŠSC) je primarni kazalnik vnetja mlečne žleze, zato služi kot kazalnik zdravstvenega stanja mlečnih žlez molznic. ŠSC v mleku se najpogosteje določa s fluoro-opto-elektronskimi inštrumenti oz. števci. Ti inštrumenti morajo biti umerjeni glede na uradno referenčno metodo, to je mikroskopsko štetje. Običajno laboratoriji izvajajo umerjanje inštrumentov z lokalnimi referenčnimi materiali, ki jih okarakterizira eden ali pa omejeno število lokalnih laboratorijev. Preizkusili smo pet sistemov (A₁, A₂, B, C in D) umerjanja inštrumentov, ki se razlikujejo glede na način določanja referenčnih vrednosti oz. način izračuna umeritvene enačbe, in jih primerjali s trenutnim stanjem (sistem T). V primerjavo sistemov umerjanja je bilo vključenih 6 laboratorijev in je temeljila na primerjavi koefficientov variacije (KV%). Izračuni koefficientov variacije so pokazali le majhne razlike med sistemi A₁, A₂, B in C, ki so odstopali od sistema T in sistema D, pri katerem so bile pri umeritvenih enačbah vrednosti odseka na ordinati 0. Kot najboljši se je pokazal sistem T, z najmanjšo vrednostjo za KV% pri 15 od 23 vzorcev in najslabši sistem D z najmanjšo vrednostjo za KV% pri 3 od 23 vzorcev. Pri primerjavi sistemov umerjanja brez upoštevanja sistema T pa se je kot najboljši izkazal sistem A₂ (najmanjša vrednost za KV% pri 19 od 23 vzorcev), pri katerem so referenčne vrednosti za umerjanje inštrumentov predstavljala povprečja sodelujočih laboratorijev v medlaboratorijski primerjavi z upoštevanjem uteži za referenčno metodo (k_{ref}) 0,5.</p>

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Md
DC UDC 637.1:542.089.6:57.086(043)=163.6
CX milk/somatic cell count/reference method/fluoro-opto-electronic method/reference value/calibration equation/calibration of instruments/coefficient of variation
AU JANČIGAJ, Gašper
AA ROGELJ, Irena (supervisor)/KOŠMELJ, Katarina (co-advisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate Study of Biological and Biotechnical Sciences, Field: Food Science and Technology
PY 2016
TI A COMPARISON OF THE CALIBRATION SYSTEMS FOR INSTRUMENTS DETERMINING THE NUMBER OF SOMATIC CELLS IN MILK
DT M.Sc. thesis
NO XVI, 121 p., 26 tab., 16 fig., 88 ann., 120 ref.
LA sl
AL sl/en
AB An increased somatic cell count (SCC) is the primary indicator of the mammary gland inflammation and serves as an indicator of the mammary gland health status. SCC in milk is widely determined by fluoro-opto-electronic instruments/counters which must be calibrated according to the official reference method i.e. the direct microscopic somatic cell counting. Typically, the calibration of the instruments is performed with local reference materials which are characterised by one or by a limited number of local laboratories. We tested five calibration systems (A₁, A₂, B, C and D), varying in the method of determining the reference values or calculating the calibration equations and compared them with the current situation (system T). The comparison included six laboratories and it based on comparison of coefficients of variation (CV%). The calculations of the CV% showed only small differences between the systems A₁, A₂, B and C. The CV% of the systems T and D (in calibration equations the intercept was 0) deviated from other systems. The system T showed the smallest variation between laboratories (minimum CV% value) in 15 out of 23 samples. The system D showed the smallest variation between laboratories only in 3 out of 23 samples. The comparison of the systems excluding the system T proved that the system A₂ showed the smallest variation between laboratories (in 19 out of 23 samples). The system A₂ reference values were averages of the laboratories participating in the interlaboratory comparison taking into account the weight of the reference method (k_{ref}) 0.5.

KAZALO VSEBINE

	Ključna dokumentacijska informacija	III
	Key words documentation	IV
	Kazalo vsebine	V
	Kazalo preglednic	VIII
	Kazalo slik	X
	Kazalo prilog	XI
	Okrajšave in simboli	XV
1	UVOD	1
1.1	NAMEN	2
1.2	HIPOTEZE	2
2	PREGLED OBJAV	3
2.1	MASTITIS IN SOMATSKE CELICE	3
2.1.1	Mastitis	3
2.1.2	Somatske celice	4
2.1.2.1	Pomen določanja ŠSC v mleku	5
2.1.2.2	ŠSC v mleku kot merilo vnetja mlečne žleze	6
2.1.2.3	Dejavniki, ki vplivajo na dvig števila somatskih celic v mleku	7
2.1.2.4	ŠSC kot kazalnik kakovosti mleka za predelavo	8
2.2	METODE DOLOČANJA ŠTEVILA SOMATSKIH CELIC V MLEKU	10
2.2.1	Referenčna metoda za določanje ŠSC v mleku	11
2.2.2	Fluoro-opto-elektronska (F-O-E) metoda za določanje ŠSC v mleku	14
2.2.3	Primerjava referenčne in F-O-E metode za določanje ŠSC v mleku	17
2.3	REFERENČNI SISTEM ZA DOLOČANJE ŠTEVILA SOMATSKIH CELIC V MLEKU	20
2.3.1	Namen referenčnega sistema za določanje ŠSC	20
2.3.2	Tradicionalne sheme umerjanja inštrumentov	21
2.3.3	Naloge in vpeljava referenčnega sistema	22
2.3.4	Trenutno stanje na področju sistemov umerjanja, ponudnikov in uporabnikov referenčnih materialov	30
2.3.5	Zahteve za referenčne materiale za umerjanje inštrumentov za določanje ŠSC v mleku	37
2.3.6	Postopki priprave referenčnih vzorcev za umerjanje	40
2.3.7	Načini določanja referenčnih vrednosti za umeritvene vzorce	44
2.3.8	Postopek umerjanja F-O-E inštrumentov za določanje ŠSC	46
3	MATERIALI IN METODE	48
3.1	MATERIALI	49
3.1.1	Vzorci	49
3.1.1.1	Vzorci v medlaboratorijski primerjavi APRIL 2014	49
3.1.1.2	Vzorci v medlaboratorijski primerjavi OKTOBER 2014	50
3.1.1.3	Vzorci v poskusu	52
3.1.2	Inštrumenti	53
3.1.3	Kemikalije	54
3.1.4	Laboratorijska oprema in material	54

3.2	METODE.....	55
3.2.1	Metode določanja števila somatskih celic v mleku	55
3.2.1.1	Direktna mikroskopska metoda	55
3.2.1.2	Inštrumentalna F-O-E metoda	55
3.2.1.3	Metoda z obarvanimi lističi	56
3.2.2	Metodi ugotavljanja osamelcev	56
3.2.2.1	Ugotavljanje osamelcev z metodo po Grubbs-u.....	56
3.2.2.2	Ugotavljanje osamelcev z metodo kvartilov	56
3.2.3	Metode za ugotavljanje kakovosti vzorcev	57
3.2.3.1	Ustrezno razlivanje v podvzorce: test homogenosti	57
3.2.3.2	Ugotavljanje roka uporabnosti vzorcev: test stabilnosti.....	57
3.3	POTEK DELA.....	58
3.3.1	Posnetek trenutnega stanja – anketa	58
3.3.2	Medlaboratorijska primerjava APRIL 2014	58
3.3.3	Medlaboratorijska primerjava OKTOBER 2014	59
3.3.4	Upoštevanje začetnih umeritvenih enačb iz MP APRIL 2014 v MP OKTOBER 2014	60
3.3.5	Izračun referenčnih vrednosti za primerjavo različnih sistemov umerjanja	61
3.3.5.1	Izračun referenčnih vrednosti za sisteme A_1 , A_2 in D	62
3.3.5.2	Izračun referenčnih vrednosti za sistem B.....	62
3.3.5.3	Izračun referenčnih vrednosti za sistem C.....	63
3.3.5.4	Sistem T.....	63
3.3.6	Izračun umeritvenih enačb	63
3.3.7	Poskus: primerjava sistemov umerjanja	64
3.3.8	Analiza podatkov	64
3.3.8.1	Izračun podatkov za sisteme A_1 , A_2 , B, C in D na osnovi podatkov S	64
3.3.8.2	Statistična analiza	65
4	REZULTATI	66
4.1	POSNETEK TRENUTNEGA STANJA	66
4.2	UPOŠTEVANJE ZAČETNIH UMERITVENIH ENAČB IZ MP APRIL 2014 V MP OKTOBER 2014.....	67
4.3	IZRAČUN REFERENČNIH VREDNOSTI IN UMERITVENIH ENAČB V POSKUSU	68
4.3.1	Izračun referenčnih vrednosti v poskusu	68
4.3.2	Izračun umeritvenih enačb v poskusu	69
4.4	UGOTAVLJANJE KAKOVOSTI VZORCEV	70
4.4.1	Ustrezno razlivanje v podvzorce (test homogenosti)	70
4.4.2	Ugotavljanje roka uporabe vzorcev (test stabilnosti)	70
4.5	PRIMERJAVA SISTEMOV UMERJANJA.....	72
4.5.1	Statistična analiza podatkov za šest ponovitev poskusa	72
4.5.2	Povzetek statistične analize podatkov za vse ponovitve poskusa skupaj ... 88	
4.5.2.1	Primerjava sistemov A_1 , A_2 , B, C, D in T	88
4.5.2.2	Primerjava sistemov A_1 , A_2 , B, C in D brez sistema T	90

5	RAZPRAVA IN SKLEPI	91
5.1	RAZPRAVA.....	91
5.1.1	Posnetek trenutnega stanja	91
5.1.2	Upoštevanje začetnih umeritvenih enačb iz MP APRIL 2014 v MP OKTOBER 2014	92
5.1.3	Vrednosti umeritvenih enačb za različne sisteme	92
5.1.4	Razlike med metodami ugotavljanja osamelcev	93
5.1.5	Ugotavljanje kakovosti vzorcev	94
5.1.5.1	Ustrezno razlivanje v podvzorci (test homogenosti).....	94
5.1.5.2	Ugotavljanje roka uporabe vzorcev (test stabilnosti).....	95
5.1.6	Primerjava sistemov umerjanja	98
5.1.7	Aplikacija sistemov umerjanja na primeru »Master instrument«-a	100
5.2	SKLEPI.....	101
6	POVZETEK	103
6.1	POVZETEK.....	103
6.2	SUMMARY.....	105
7	VIRI	109
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Osnovni parametri za napoved mastitisa (povzeto po Pengov, 2001: 11)	4
Preglednica 2:	Pozitivne (+) in negativne (-) značilnosti referenčne metode za določanje ŠSC v mleku (Orlandini in van den Bijgaart, 2011: 416)	13
Preglednica 3:	Pozitivne (+) in negativne (-) značilnosti fluoro-opto-elektronske metode za določanje ŠSC v mleku (Orlandini in van den Bijgaart, 2011: 416)	16
Preglednica 4:	Vrednosti za ponovljivost in obnovljivost za referenčno metodo (ISO 13366-1/IDF 148-1, 2008: 12)	18
Preglednica 5:	Vrednosti za ponovljivost in obnovljivost za F-O-E metodo (ISO 13366-2/IDF 148-2, 2006: 11, 12)	18
Preglednica 6:	Podatki za natančnost referenčne metode in F-O-E metode za ŠSC v mleku, interpolirani iz podatkov v standardih ISO 13366-1/IDF 148-1 (2008) in ISO 13366-2/IDF 148-2 (2006) (Orlandini in van den Bijgaart, 2011: 417).....	19
Preglednica 7:	Karakteristike referenčnih materialov za določanje ŠSC v mleku različnih ponudnikov (Orlandini, 2012: 29).....	31
Preglednica 8:	Ustrezen razpon ŠSC v vzorcih, pripravljenih za umerjanje (ISO 13366-2/IDF 148-2, 2006: 7)	39
Preglednica 9:	Lastnosti vzorcev uporabljenih v MP APRIL 2014	50
Preglednica 10:	Lastnosti mleka za pripravo vzorcev v MP OKTOBER 2014	51
Preglednica 11:	Lastnosti vzorcev uporabljenih v MP OKTOBER 2014.....	51
Preglednica 12:	Lastnosti vzorcev uporabljenih v posamezni ponovitvi poskusa	52
Preglednica 13:	Proizvajalci in tipi inštrumentov ter metode v poskusu	53
Preglednica 14:	Sistemi umerjanja in načini izračunavanja referenčnih vrednosti za izračun umeritvenih enačb	61
Preglednica 15:	Odgovori na anketna vprašanja o načinu umerjanja inštrumentov za določanje ŠSC v slovenskih laboratorijih.....	66
Preglednica 16:	Referenčna vrednost za ŠSC (1000/ml) za posamezen sistem umerjanja A ₁ , A ₂ , B, C in D in posamezen vzorec	68
Preglednica 17:	Vrednosti naklona (<i>b</i>) in odseka na ordinati (<i>a</i>) za umeritvene enačbe laboratorijev za sisteme umerjanja A ₁ , A ₂ , B, C in D.....	69
Preglednica 18:	Vrednosti naklona (<i>b</i>) in odseka na ordinati (<i>a</i>) za laboratorije za sistem T za ponovitve poskusa.....	70
Preglednica 19:	Neustrezno stabilni (obarvano sivo) in neustrezno homogeni (krepko, ležeče in podčrtano) vzorci v MP OKTOBER 2014 in pri ponovitvah poskusa, glede na način priprave vzorcev	71
Preglednica 20:	Povprečje, standardni odklon (Sd) in koeficient variacije (KV%) za ŠSC (1000/ml) za sisteme umerjanja A ₁ , A ₂ , B, C, D in T glede na posamezen vzorec za 2. ponovitev poskusa	74
Preglednica 21:	Povprečje, standardni odklon (Sd) in koeficient variacije (KV%) za ŠSC (1000/ml) za sisteme umerjanja A ₁ , A ₂ , B, C, D in T glede na posamezen vzorec za 3. ponovitev poskusa	77

Preglednica 22:	Povprečje, standardni odklon (Sd) in koeficient variacije (KV%) za ŠSC (1000/ml) za sisteme umerjanja A ₁ , A ₂ , B, C, D in T glede na posamezen vzorec za 4. ponovitev poskusa	80
Preglednica 23:	Povprečje, standardni odklon (Sd) in koeficient variacije (KV%) za ŠSC (1000/ml) za sisteme umerjanja A ₁ , A ₂ , B, C, D in T glede na posamezen vzorec za 5. ponovitev poskusa	83
Preglednica 24:	Povprečje, standardni odklon (Sd) in koeficient variacije (KV%) za ŠSC (1000/ml) za sisteme umerjanja A ₁ , A ₂ , B, C, D in T glede na posamezen vzorec za 6. ponovitev poskusa	86
Preglednica 25:	Koeficient variacije (%) za ŠSC za posamezen sistem umerjanja glede na ponovitev poskusa in vzorec. Obarvane vrednosti predstavljajo minimalno vrednost pri posameznem vzorcu.....	88
Preglednica 26:	Koeficient variacije (%) za ŠSC za posamezen sistem umerjanja brez sistema T glede na ponovitev poskusa in vzorec. Obarvane vrednosti predstavljajo minimalno vrednost pri posameznem vzorcu.....	90

KAZALO SLIK

Slika 1:	Princip delovanja fluoro-opto-elektronskih inštrumentov za določanje ŠSC na principu pretočne citometrije (angl. » <i>flow cytometry</i> «); oblika pretočne celice zagotavlja, da se zazna le po ena celica naenkrat (Bentley Instruments, 2015)	15
Slika 2:	Podatki za natančnost referenčne metode in F-O-E metode za ŠSC v mleku, interpolirani iz podatkov v standardih ISO 13366-1/IDF 148-1 (2008) in ISO 13366-2/IDF 148-2 (2006) (povzeto po Orlandini in van den Bijgaart, 2011).	19
Slika 3:	Časovni načrt dela projektne skupine IDF/ICAR za vzpostavitev referenčnega sistema za določanje števila somatskih celic v mleku (povzeto po Baumgartner in van den Bijgaart, 2010: 274)	25
Slika 4:	Shema predlaganega referenčnega sistema za določanje števila somatskih celic v mleku (prirejeno po Baumgartner in van den Bijgaart, 2010: 273).....	27
Slika 5:	Uporaba pristopa » <i>bottom-up</i> « s povezovanjem obstoječih »zasidranih« sistemov (Orlandini in van den Bijgaart, 2011: 418)	28
Slika 6:	Potek dela	48
Slika 7:	Število somatskih celic (1000/ml) glede na posamezen sistem umerjanja in vzorec za 2. ponovitev poskusa	73
Slika 8:	Koeficient variacije za ŠSC (1000/ml) za posamezen sistem umerjanja glede na povprečje ŠSC vseh sistemov umerjanja za 2. ponovitev poskusa	75
Slika 9:	Število somatskih celic (1000/ml) glede na posamezen sistem umerjanja in vzorec za 3. ponovitev poskusa	76
Slika 10:	Koeficient variacije za ŠSC (1000/ml) za posamezen sistem umerjanja glede na povprečje ŠSC vseh sistemov umerjanja za 3. ponovitev poskusa	78
Slika 11:	Število somatskih celic (1000/ml) glede na posamezen sistem umerjanja in vzorec za 4. ponovitev poskusa	79
Slika 12:	Koeficient variacije za ŠSC (1000/ml) za posamezen sistem umerjanja glede na povprečje ŠSC vseh sistemov umerjanja za 4. ponovitev poskusa	81
Slika 13:	Število somatskih celic (1000/ml) glede na posamezen sistem umerjanja in vzorec za 5. ponovitev poskusa	82
Slika 14:	Koeficient variacije za ŠSC (1000/ml) za posamezen sistem umerjanja glede na povprečje ŠSC vseh sistemov umerjanja za 5. ponovitev poskusa	84
Slika 15:	Število somatskih celic (1000/ml) glede na posamezen sistem umerjanja in vzorec za 6. ponovitev poskusa	85
Slika 16:	Koeficient variacije za ŠSC (1000/ml) za posamezen sistem umerjanja glede na povprečje ŠSC vseh sistemov umerjanja za 6. ponovitev poskusa	87

KAZALO PRILOG

- Priloga A: **Izračuni in podatki v medlaboratorijski primerjavi APRIL 2014**
- Priloga A1: Vrnjeni rezultati laboratorijev v medlaboratorijski primerjavi APRIL 2014
- Priloga A2: Ugotavljanje homogenosti vzorcev v medlaboratorijski primerjavi APRIL 2014
- Priloga A3: Referenčne vrednosti v medlaboratorijski primerjavi APRIL 2014
- Priloga A4: Vrednosti za umeritvene enačbe ($b = \text{naklon}$, $a = \text{odsek na ordinati}$) za posamezen laboratorij v medlaboratorijski primerjavi APRIL 2014
- Priloga B: **Izračuni in podatki v medlaboratorijski primerjavi OKTOBER 2014**
- Priloga B1: Vrnjeni rezultati laboratorijev v medlaboratorijski primerjavi OKTOBER 2014
- Priloga B2: Ugotavljanje osamelcev z metodo po Grubbs-u ($\alpha = 0,05$) v medlaboratorijski primerjavi OKTOBER 2014
- Priloga B3: Ugotavljanje homogenosti vzorca 1 v medlaboratorijski primerjavi OKTOBER 2014 ($\text{SSC} \times 1000/\text{ml}$)
- Priloga B4: Ugotavljanje homogenosti vzorca 2 v medlaboratorijski primerjavi OKTOBER 2014 ($\text{SSC} \times 1000/\text{ml}$)
- Priloga B5: Ugotavljanje homogenosti vzorca 3 v medlaboratorijski primerjavi OKTOBER 2014 ($\text{SSC} \times 1000/\text{ml}$)
- Priloga B6: Ugotavljanje homogenosti vzorca 4 v medlaboratorijski primerjavi OKTOBER 2014 ($\text{SSC} \times 1000/\text{ml}$)
- Priloga B7: Ugotavljanje homogenosti vzorca 5 v medlaboratorijski primerjavi OKTOBER 2014 ($\text{SSC} \times 1000/\text{ml}$)
- Priloga B8: Ugotavljanje homogenosti vzorca 6 v medlaboratorijski primerjavi OKTOBER 2014 ($\text{SSC} \times 1000/\text{ml}$)
- Priloga B9: Ugotavljanje homogenosti vzorca 7 v medlaboratorijski primerjavi OKTOBER 2014 ($\text{SSC} \times 1000/\text{ml}$)
- Priloga B10: Ugotavljanje homogenosti vzorca 8 v medlaboratorijski primerjavi OKTOBER 2014 ($\text{SSC} \times 1000/\text{ml}$)
- Priloga B11: Ugotavljanje homogenosti vzorca 9 v medlaboratorijski primerjavi OKTOBER 2014 ($\text{SSC} \times 1000/\text{ml}$)
- Priloga B12: Ugotavljanje stabilnosti vzorcev v medlaboratorijski primerjavi OKTOBER 2014 ($\text{SSC} \times 1000/\text{ml}$)
- Priloga B13: Povzetek ugotavljanja stabilnosti vzorcev v MP OKTOBER 2014 (dan priprave vzorcev $t = 0$) pri upoštevanju kriterija iz standarda ISO 13528:2005
- Priloga B14: Ugotavljanje osamelcev z metodo po Grubbs-u ($\alpha = 0,05$) v medlaboratorijski primerjavi OKTOBER 2014 po upoštevanju začetnih umeritvenih enačb iz MP APRIL 2014
- Priloga C: **Preverjanje, ali umeritvene enačbe iz medlaboratorijske primerjave APRIL 2014 v medlaboratorijski primerjavi OKTOBER 2014 upoštevamo, ali ne**
- Priloga C1: Oznake laboratorijev v celotni raziskavi

- Priloga C2: Vrednosti kriterijev za preverjanje, ali umeritvene enačbe iz medlaboratorijske primerjave APRIL 2014 v medlaboratorijski primerjavi OKTOBER 2014 upoštevamo, ali ne
- Priloga C3: Izračun razlik med referenčno metodo in F-O-E metodo v MP OKTOBER 2014 z upoštevanjem (D_z) in brez upoštevanja (D_{brez}) začetnih umeritvenih enačb iz MP APRIL 2014, ter primerjava razlik s kritičnimi razlikami (CD)
- Priloga D: **Vrednosti koeficientov determinacije (R^2) pri izračunih umeritvenih enačb za posamezen laboratorij pri sistemih umerjanja A₁, A₂, B, C in D**
- Priloga E: **Vrnjeni rezultati laboratorijev v poskusu**
- Priloga E1: Vrnjeni rezultati laboratorijev za 1. ponovitev poskusa, izmerjeni z inštrumenti z nastavitvami za naklon 1 in odsek na ordinati 0 (podatki S)
- Priloga E2: Vrnjeni rezultati laboratorija 1 za 1. ponovitev poskusa, izmerjeni z inštrumentom z nastavitvami za naklon in odsek na ordinati glede na sistem T
- Priloga E3: Vrnjeni rezultati laboratorijev za 2. ponovitev poskusa, izmerjeni z inštrumenti z nastavitvami za naklon 1 in odsek na ordinati 0 (podatki S)
- Priloga E4: Vrnjeni rezultati laboratorija 1 za 2. ponovitev poskusa, izmerjeni z inštrumentom z nastavitvami za naklon in odsek na ordinati glede na sistem T
- Priloga E5: Vrnjeni rezultati laboratorijev za 3. ponovitev poskusa, izmerjeni z inštrumenti z nastavitvami za naklon 1 in odsek na ordinati 0 (podatki S)
- Priloga E6: Vrnjeni rezultati laboratorijev 1, 3 in 4 za 3. ponovitev poskusa, izmerjeni z inštrumentom z nastavitvami za naklon in odsek na ordinati glede na sistem T
- Priloga E7: Vrnjeni rezultati laboratorijev za 4. ponovitev poskusa, izmerjeni z inštrumenti z nastavitvami za naklon 1 in odsek na ordinati 0 (podatki S)
- Priloga E8: Vrnjeni rezultati laboratorijev 3 in 4 za 4. ponovitev poskusa, izmerjeni z inštrumentom z nastavitvami za naklon in odsek na ordinati glede na sistem T
- Priloga E9: Vrnjeni rezultati laboratorijev za 5. ponovitev poskusa, izmerjeni z inštrumenti z nastavitvami za naklon 1 in odsek na ordinati 0 (podatki S)
- Priloga E10: Vrnjeni rezultati laboratorijev 3 in 4 za 5. ponovitev poskusa, izmerjeni z inštrumentom z nastavitvami za naklon in odsek na ordinati glede na sistem T
- Priloga E11: Vrnjeni rezultati laboratorijev za 6. ponovitev poskusa, izmerjeni z inštrumenti z nastavitvami za naklon 1 in odsek na ordinati 0 (podatki S)
- Priloga E12: Vrnjeni rezultati laboratorijev 3 in 4 za 6. ponovitev poskusa, izmerjeni z inštrumentom z nastavitvami za naklon in odsek na ordinati glede na sistem T
- Priloga F: **Ugotavljanje osamelcev z metodo po Grubbs-u za posamezno ponovitev poskusa**
- Priloga F1: Ugotavljanje osamelcev z metodo po Grubbs-u ($\alpha = 0,05$) za podatke S za 1. ponovitev poskusa
- Priloga F2: Ugotavljanje osamelcev z metodo po Grubbs-u ($\alpha = 0,05$) za podatke S za 2. ponovitev poskusa

- Priloga F3: Ugotavljanje osamelcev z metodo po Grubbs-u ($\alpha = 0,05$) za podatke S za 3. ponovitev poskusa
- Priloga F4: Ugotavljanje osamelcev z metodo po Grubbs-u ($\alpha = 0,05$) za podatke S za 4. ponovitev poskusa
- Priloga F5: Ugotavljanje osamelcev z metodo po Grubbs-u ($\alpha = 0,05$) za podatke S za 5. ponovitev poskusa
- Priloga F6: Ugotavljanje osamelcev z metodo po Grubbs-u ($\alpha = 0,05$) za podatke S za 6. ponovitev poskusa
- Priloga F7: Ugotavljanje osamelcev z metodo po Grubbs-u ($\alpha = 0,05$) za podatke sistema T
- Priloga F8: Primerjava ugotavljanja osamelcev z metodo po Grubbs-u ($\alpha = 0,05$) in metodo kvartilov za podatke S
- Priloga G: **Ugotavljanje homogenosti in stabilnosti vzorcev pri posamezni ponovitvi poskusa**
- Priloga G1: Homogenost za vzorec 1; 1. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$)
- Priloga G2: Homogenost za vzorec 2; 1. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$)
- Priloga G3: Homogenost za vzorec 3; 1. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$)
- Priloga G4: Homogenost za vzorec 4; 1. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$)
- Priloga G5: Homogenost za vzorec 5; 1. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$)
- Priloga G6: Ugotavljanje stabilnosti vzorcev za 1. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$)
- Priloga G7: Homogenost za vzorec 1; 2. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$)
- Priloga G8: Homogenost za vzorec 2; 2. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$)
- Priloga G9: Homogenost za vzorec 3; 2. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$)
- Priloga G10: Homogenost za vzorec 4; 2. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$)
- Priloga G11: Homogenost za vzorec 5; 2. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$)
- Priloga G12: Ugotavljanje stabilnosti vzorcev za 2. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$)
- Priloga G13: Homogenost za vzorec 1; 3. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$)
- Priloga G14: Homogenost za vzorec 2; 3. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$)
- Priloga G15: Homogenost za vzorec 3; 3. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$)
- Priloga G16: Homogenost za vzorec 4; 3. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$)
- Priloga G17: Homogenost za vzorec 5; 3. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$)
- Priloga G18: Ugotavljanje stabilnosti vzorcev za 3. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$)
- Priloga G19: Homogenost za vzorec 1; 4. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$)
- Priloga G20: Homogenost za vzorec 2; 4. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$)
- Priloga G21: Homogenost za vzorec 3; 4. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$)
- Priloga G22: Homogenost za vzorec 4; 4. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$)
- Priloga G23: Homogenost za vzorec 5; 4. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$)
- Priloga G24: Ugotavljanje stabilnosti vzorcev za 4. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$)
- Priloga G25: Homogenost za vzorec 1; 5. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$)
- Priloga G26: Homogenost za vzorec 2; 5. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$)
- Priloga G27: Homogenost za vzorec 3; 5. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$)
- Priloga G28: Homogenost za vzorec 4; 5. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$)
- Priloga G29: Homogenost za vzorec 5; 5. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$)
- Priloga G30: Ugotavljanje stabilnosti vzorcev za 5. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$)
- Priloga G31: Homogenost za vzorec 1; 6. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$)
- Priloga G32: Homogenost za vzorec 2; 6. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$)
- Priloga G33: Homogenost za vzorec 3; 6. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$)

- Priloga G34: Homogenost za vzorec 4; 6. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$)
- Priloga G35: Homogenost za vzorec 5; 6. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$)
- Priloga G36: Ugotavljanje stabilnosti vzorcev za 6. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$)
- Priloga G37: Povzetek ugotavljanja stabilnosti vzorcev pri ponovitvah poskusa (dan priprave vzorcev $t = 0$) pri upoštevanju kriterija iz standarda ISO 13528 (2005)
- Priloga G38: Ugotavljanje homogenosti in stabilnosti zamrznjenjih ($-20\text{ }^{\circ}C$) vzorcev (april 2015)
- Priloga H: **Podatki za statistično analizo: Povprečja za sisteme umerjanja A_1 , A_2 , B, C in D, izračunana iz vrnjenih podatkov S z upoštevanjem umeritvenih enačb, ter povprečja sistema T**
- Priloga H1: Povprečja za posamezen vzorec po laboratorijih za posamezne sisteme umerjanj A_1 , A_2 , B, C, D in T ter podatki S za 1. ponovitev poskusa
- Priloga H2: Povprečja za posamezen vzorec po laboratorijih za posamezne sisteme umerjanj A_1 , A_2 , B, C, D in T ter podatki S za 2. ponovitev poskusa
- Priloga H3: Povprečja za posamezen vzorec po laboratorijih za posamezne sisteme umerjanj A_1 , A_2 , B, C, D in T ter podatki S za 3. ponovitev poskusa
- Priloga H4: Povprečja za posamezen vzorec po laboratorijih za posamezne sisteme umerjanj A_1 , A_2 , B, C, D in T ter podatki S za 4. ponovitev poskusa
- Priloga H5: Povprečja za posamezen vzorec po laboratorijih za posamezne sisteme umerjanj A_1 , A_2 , B, C, D in T ter podatki S za 5. ponovitev poskusa
- Priloga H6: Povprečja za posamezen vzorec po laboratorijih za posamezne sisteme umerjanj A_1 , A_2 , B, C, D in T ter podatki S za 6. ponovitev poskusa
- Priloga I: **Aplikacija sistemov umerjanja na primeru »Master instrument«-a**
- Priloga I1: Primerjava sistemov umerjanja za »Master instrument« in njihov vpliv na uspešnost v medlaboratorijski primerjavi »MIH Hűfner Oktober 2014« (MIH, 2014)
- Priloga I2: Primerjava sistemov umerjanja za »Master instrument« in njihov vpliv na uspešnost v medlaboratorijski primerjavi »MIH Hűfner Marec 2015« (MIH, 2015)

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

<i>a</i>	odsek na ordinati
A.I.A.	italijanski ponudnik referenčnih materialov in organizator medlaboratorijskih primerjav; Italijansko združenje vzrediteljev (ital. » <i>Associazione Italiana Allevatori</i> «)
ANSES	francoska agencija za hrano, okolje ter zdravje in varnost pri delu (fran. » <i>Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail</i> «)
<i>b</i>	naklon
BF	Biotehniška fakulteta
CD	kritična razlika – kriterij za D
CRM	certificiran referenčni material
D	absolutna razlika med povprečjema referenčne in rutinske metode
DHI	vzrejni program za izboljševanje črede molznic (angl. » <i>Dairy Herd Improvement</i> «)
DMSCC	neposredno štetje somatskih celic pod mikroskopom (angl. » <i>Direct microscopic somatic cell counting</i> «)
DNK	deoksiribonukleinska kislina
FALSE	ni v redu/ni zadovoljivo
FC	pretočna citometrija (angl. » <i>Flow Citometry</i> «)
F-O-E	fluoro-opto-elektronsko
<i>G</i>	kritična vrednost pri Grubbs-ovem testu za ugotavljanje osamelcev
<i>G_i</i>	izračunana vrednost pri Grubbs-ovem testu za ugotavljanje osamelcev
HDPE	polietilen visoke gostote (angl. » <i>High Density Poly Ethylene</i> «)
ICAR	Mednarodni komite za kontrolo proizvodnosti živali (angl. » <i>International Committee for Animal Recording</i> «)
IDF	Mednarodno mlekarско združenje (angl. » <i>International Dairy Federation</i> «)
IML-PRO	Inštitut za mlekarstvo in probiotike
ISO	Mednarodna organizacija za standardizacijo (ang. » <i>International Organization for Standardization</i> «)
<i>k_{ref}</i>	utež referenčne metode
<i>k_{FOE}</i>	utež F-O-E metode
KE/ml	kolonijske enote na mililiter
KGZS	Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije
KV%	koeficient variacije izražen v %
MA	izbrani inštrument (angl. » <i>Master instrument</i> «)
MIH	nemški ponudnik referenčnih materialov in organizator medlaboratorijskih primerjav » <i>Milchwirtschaftliches Institut Dr. J. Huefner</i> «
MP	medlaboratorijska primerjava
NRL	Nacionalni referenčni laboratorij
ok	v redu/zadovoljivo
PMN	polimorfonuklearni (levkociti)
PP	polipropilen
PYMG	barvilo » <i>pyronin Y-methyl green</i> «

r	ponovljivost
R	obnovljivost
R^2	koeficient determinacije
REF	referenčna metoda
RM	referenčni material
RSSCC	referenčni sistem za določanje somatskih celic v mleku (angl. »Reference system for somatic cell counting in milk«)
SC	somatske celice
Sd, STD	standardni odklon
s_r	standardni odklon ponovljivosti
s_R	standardni odklon obnovljivosti
SRM	sekundarni referenčni material
SŠMO	skupno število mikroorganizmov
ŠSC	število somatskih celic
UHT	ultra visoka temperatura (angl. »Ultra High Temperature«)
x	posamezen podatek
\bar{x}, \bar{y}	povprečje
$ x $	absolutna vrednost parametra x
$ \bar{x}-\bar{y} $	absolutna razlika med povprečji
Y	referenčna vrednost
\bar{y}_{ref}	povprečje za referenčno metodo
\bar{y}_{FOE}	povprečje za F-O-E metodo
α	stopnja značilnosti
$\hat{\sigma}$	standardni odklon iz medlaboratorijske primerjave

1 UVOD

Število somatskih celic (ŠSC) v mleku služi kot kazalnik zdravstvenega stanja mlečnih žlez molznic. Somatske celice v mleku vključujejo različne tipe belih krvnih celic in nekaj epitelnih celic. Povečano ŠSC je primarni kazalnik vnetja mlečne žleze, vrstna sestava teh celic in njihova koncentracija (število) pa se med vnetjem močno spreminjata (Orlandini in van den Bijgaart, 2011; Bulletin IDF 448, 2011).

Ugotavljanje ŠSC je pomembno tudi z vidika higiene (Regulation (EC) No 853/2004) in plačevanja mleka, saj je podatek o ŠSC eden izmed parametrov kakovosti mleka. Poleg tega imajo podatki o ŠSC v mleku posameznih živali pomembno vlogo pri vodenju in poslovanju farm ter v vzrejnih programih. Rezultati raziskave, ki so jo izvedli Green in sodelavci (2004) nakazujejo, da merjenje sprememb v ŠSC in maksimalnega ŠSC ter primerjava z geometričnim povprečjem ŠSC, povečajo točnost napovedi kliničnega mastitisa. S tem ŠSC lahko služi tudi kot orodje v vzrejnih programih pri selekciji na večjo odpornost proti kliničnemu mastitisu.

Število somatskih celic v mleku se najpogosteje določa s fluoro-opto-elektronskimi inštrumenti oz. števeci, metodo na tem principu pa opisuje standard ISO 13366-2/IDF 148-2. Ti inštrumenti morajo biti točno nastavljeni oz. umerjeni glede na uradno referenčno metodo (Commission Regulation (EC) No 1664/2006), to je mikroskopsko štetje, ki je opisano v standardu ISO 13366-1/IDF 148-1. Ker certificiranega referenčnega materiala (CRM), ki bi ga lahko uporabili kot »zlati standard« (angl. »golden standard«) za umerjanje ni (Baumgartner, 2008), si laboratoriji za umerjanje sami iščejo rešitve, kako priti do referenčnega materiala in referenčnih vrednosti. Umerjanje inštrumentov izvajajo laboratoriji z lokalnimi referenčnimi materiali, ki jih okarakterizira eden ali pa omejeno število lokalnih laboratorijev. Dodatno težavo predstavlja tudi ustrezna izvedba referenčne metode, saj je odvisna od natančnega dela oz. ocene posameznega analitika (tveganje subjektivne napake), je izredno zamudna in zahteva dobro usposobljene ljudi. Naštete pomanjkljivosti referenčne metode se kažejo predvsem v slabi primerljivosti rezultatov v medlaboratorijskih primerjavah in slabi ponovljivosti rezultatov v posameznem laboratoriju oz. pri posameznem analitiku. Poleg tega se referenčni materiali razlikujejo po tipu celic in matriksu. Omenjene pomanjkljivosti kličejo po razvoju boljšega sistema za umerjanje inštrumentov za štetje somatskih celic v mleku.

Kljub temu, da je v svetovnem prostoru na lokalnih, regijskih oz. državnih ravneh že vzpostavljenih nekaj sistemov umerjanja inštrumentov, so v okviru organizacij IDF (International Dairy Federation) in ICAR (International Committee for Animal Recording) oblikovali projektno skupino za vzpostavitev novega sistema na globalni ravni, ki naj bi izboljšal delo in učinkovitost laboratorijev. Izbrali so primer somatskih

celic, ker se po ocenah izvede na svetovni ravni letno več kot 500 milijonov testov (Orlandini in van den Bijgaart, 2011).

1.1 NAMEN

V Sloveniji trenutno deluje osem laboratorijev za določanje števila somatskih celic v mleku. Sedem jih ŠSC določa z rutinskimi (inštrumentalnimi) metodami, en laboratorij, pa izvaja referenčno metodo, nimamo pa vpeljanega sistema umerjanja inštrumentov. Zato smo se odločili, da proučimo načine, ki bi bili primerni za države z relativno majhnim številom laboratorijev in vzorcev, kot je naša. Ker je projektna skupina, ki sta jo imenovali IDF in ICAR že podala osnovne zahteve in postopke, kako naj bi sistem deloval (Bulletin IDF 469, 2013), je namen tega dela, da na osnovi novih priporočil in smernic oblikujemo možne modele sistema umerjanja in jih preizkusimo na primeru uvedbe takega sistema v naš prostor.

Preizkusili smo pet sistemov (označili smo jih z A_1 , A_2 , B, C in D) umerjanja inštrumentov, ki se razlikujejo glede na način določanja referenčnih vrednosti oziroma v načinu izračuna umeritvene enačbe, in jih primerjali s trenutnim stanjem (sistem T). Načini umerjanja inštrumentov A_1 , A_2 in B so se razlikovali med seboj po postopku izračuna referenčnih vrednosti iz rezultatov medlaboratorijske primerjave. Pri načinu C smo kot referenčne vrednosti oz. vrednosti za umerjanje uporabili rezultate meritev z izbranim inštrumentom (t.i. »*Master instrument*«), vključenim v mednarodno kontrolo. Pri načinu umerjanja D so bile referenčne vrednosti iste kot pri A_1 , vendar smo kasneje za izračun umeritvene enačbe predpostavili, da je vrednost za odsek na ordinati enaka nič ($a = 0$). Trenutno stanje (T) je vključevalo sprotne (mesečne) nastavitve (umerjanja) inštrumentov posameznih laboratorijev ali pa tovarniške nastavitve pri tistih laboratorijih, ki lastnih nastavitve inštrumentov niso izvajali.

1.2 HIPOTEZE

Na osnovi zbranih literaturnih podatkov smo postavili naslednji hipotezi:

Hipoteza 1: Sistemi umerjanja A_1 , A_2 , B, C in D bodo dali natančnejše rezultate od trenutnega stanja T.

Hipoteza 2: Sistem umerjanja C bo dal natančnejše rezultate od sistemov A_1 , A_2 , B in D.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MASTITIS IN SOMATSKE CELICE

2.1.1 Mastitis

V živinoreji bi težko našli bolezen, ki so jo v zadnjih desetletjih intenzivneje raziskovali in vložili več truda in sredstev za njeno zdravljenje in preprečevanje, kot za mastitis pri kravah molznicah. Navkljub vsem naporom pa opažamo tako v Sloveniji kot tudi v drugih državah kjer se ukvarjajo z intenzivno proizvodnjo mleka, da je pogostost okužb vimen še vedno velika in da povzroča mastitis velike izgube rejcem in mlekarški industriji. Težave, povezane z mastitisom, pa nikakor niso samo finančne narave, saj je mastitis kužna bolezen, ki se v čredi prenaša z živali na žival, najpogostejši povzročitelji vimenskih vnetij pa so patogene bakterije, nevarne tudi zdravju ljudi (Pengov, 2001).

Neposredni vzrok za nastanek mastitisa je okužba vimena s povzročitelji, ki sprožijo vnetni proces. Mikrobní povzročitelji (najpogosteje stafilokoki, streptokoki in *E. coli*, redkeje pa tudi kvasovke, plesni in mikoplazme) vdrejo v mlečno žlezo praviloma skozi ustje seskovega kanala (Pengov, 2001; Le Maréchal in sod., 2011). Mikrobi nato prek mlečne cisterne in mlečnih kanalov prodrejo globoko v žlezno tkivo vimena, kjer se namnožijo in povzročijo vnetje mlečne žleze. Manj pogoste so okužbe skozi poškodbe na vimenu in po krvi. Pri okužbah po krvi (hematogena okužba) prispejo mikrobní povzročitelji v vime iz kakšnega drugega vnetnega žarišča v telesu. V tem primeru so pogosto prizadete vse štiri vimenske četrti (Pengov, 2001).

Ob vdoru patogenih bakterij v notranjost mlečne žleze se sproži vnetni proces – mastitis, ki praviloma povzroči tudi dvig števila somatskih celic v mleku, predvsem polimorfonuklearnih (PMN) levkocitov. Vnetni proces je v bistvu obrambni odgovor na škodljive vplive, ki jim je telo izpostavljeno. Ti vplivi so lahko posledica delovanja bakterij in/ali njihovih toksinov, mehanskih učinkov (udarci, pritiski), lahko pa je vnetje tudi posledica čezmerne vročine, mraza ipd. Čeprav bolezenske spremembe, ki se pojavijo ob vnetju, začasno pomenijo dodatno breme za obolelo žival, pa je celoten potek naravnan tako, da se odstranijo povzročitelji in da se ob koncu vnetnega procesa vzpostavi normalno delovanje prizadetega področja (Pengov, 2005).

IDF (Bulletin IDF 448, 2011) je podal naslednjo definicijo mastitisa: mastitis je vnetje ene ali več četrti mlečne žleze, ki je skoraj vedno povzročeno z okužbo s strani mikroorganizmov.

Preglednica 1: Osnovni parametri za napoved mastitisa (povzeto po Pengov, 2001: 11).

Table 1: Basic parameters for predicting mastitis (according to Pengov, 2001: 11).

Diagnoza	Bakteriološka analiza na prisotnost povzročiteljev mastitisa	Število somatskih celic/ml mleka
Zdrava vimenska četrt	negativna	<500.000
Motnje v sekreciji	negativna	>500.000
Latentna (prikrita) okužba	pozitivna	<500.000
Mastitis	pozitivna	>500.000

Mastitis je dandanes najdražja bolezen na farmah živali za proizvodnjo mleka (Ferrero in sod., 2014) in predstavlja največje ekonomske izgube (Sharma in sod., 2011).

Klinični mastitis poveča stroške predvsem na račun zavrnitve mleka, povečanih stroškov zdravstvene oskrbe in nižje kakovosti mleka. Prizadeto zdravstveno stanje živali, uporaba antibiotikov za zdravljenje živali ter možnost razvoja bakterij odpornih proti antibiotikom pa so dejavniki, ki vodijo v zaskrbljenost in negativen odnos potrošnikov do mleka (de Haas in sod., 2005).

Mastitis povzroči tudi spremembe sestave in kakovosti mleka za predelavo, saj se zaradi prizadete mlečne žleze povečata količina in aktivnost nativnih encimov in encimov mikrobnega izvora. Posledice spremenjene sestave mleka so manjši izkoristek pri izdelavi sirov in masla, neustrezen potek fermentacij pri fermentiranih izdelkih in številne napake v okusu in teksturi vseh mlečnih izdelkov, narejenih iz takšnega mleka. Mnoge mlekarnе zato z višjimi odkupnimi cenami nagrajujejo proizvajalce za mleko zdravih živali in po nižjih cenah odkupujejo mleko slabše kakovosti (Ferrero in sod., 2014).

Pravočasno odkrivanje mastitisa je ključnega pomena, zato potrebujemo dovolj zanesljive, predvsem pa hitre metode, saj se lahko subklinični mastitis, če ga ne opazimo dovolj hitro, razvije v klinično obolenje. Med takšne spadajo metode, ki temeljijo na določanju števila somatskih celic (Sandgren in sod., 2008).

2.1.2 Somatske celice

Pri presoji prisotnosti in oblike mastitisa je pomemben podatek število somatskih celic (ŠSC) v mleku. Štetje somatskih celic (SC) v mleku je namreč preprosta in relativno zanesljiva metoda za ugotavljanje zdravstvenega stanja mlečne žleze, saj je povečano

število somatskih celic primarni kazalnik vnetja mlečne žleze (Smith, 1999; Pengov, 2005; Baumgartner, 2008; Muir, 2011; Bulletin IDF 448, 2011).

Somatske celice v mleku predstavljajo v 75 % levkociti (nevtrofilci, makrofagi, limfociti), ostalih 25 % somatskih celic pa so epitelne celice (Bulletin IDF 448, 2011; Sharma in sod., 2011).

Velikost somatskih celic se giblje od 5 μm do 30 μm , saj so makrofagi veliki od 8 μm do 30 μm , polimorfonuklearni levkociti od 10 μm do 14 μm , limfociti od 5 μm do 10 μm in epitelne celice od 10 μm do 14 μm (ISO 13366-1/IDF 148-1, 2008).

Sestava in število somatskih celic se med vnetjem spreminjata (Orlandini in van den Bijgaart, 2011; Bulletin IDF 448, 2011). Pri zdravi, neprizadeti živali, so v mleku prisotni predvsem makrofagi (Pelvan in Unluturk, 2015), največji porast ŠSC pa povzroči porast števila nevtrofilcev, ki med vnetjem prehajajo v mleko (Sharma in sod., 2011; Pelvan in Unluturk, 2015).

2.1.2.1 Pomen določanja ŠSC v mleku

Število somatskih celic (ŠSC) je definirano kot koncentracija somatskih celic v mleku, določena skladno z metodama ISO 13366/IDF 148 del 1 in 2, ter se podaja v enotah »celic/ml« (Bulletin IDF 448, 2011).

Somatske celice so kazalnik odpornosti oz. občutljivosti krav za mastitis, zato lahko njihovo število uporabimo za spremljanje stanja oz. pojave subkliničnega mastitisa v čredi ali pri posamezni živali. ŠSC je torej uporaben kazalnik okužb v mlečni žlezi, poleg tega pa tudi pomemben parameter higienske kakovosti mleka in kontrole mastitisa (Sharma in sod., 2011; Le Maréchal in sod., 2011).

ŠSC lahko določamo v mleku posameznih četrti mlečne žleze, vendar tovrstne analize opravljajo predvsem v raziskovalne namene. V kontroli zdravstvenega stanja živali in higienske kakovosti mleka pa najpogosteje določajo ŠSC v mleku posamezne živali ali pa vzorcu skupnega mleka črede (bazensko mleko). Interpretacija vrednosti za ŠSC je tako odvisna ali je to vrednost za posamezno četrt, kravo ali pa bazenski vzorec. Prav tako je interpretacija odvisna od tega ali je namenjena ugotavljanju ustreznosti higienske kakovosti mleka, torej izpolnjevanju zakonsko predpisanih vrednosti, ali pa ugotavljanju stanja okužbe in izvajanju nadaljnjih ukrepov, vključno z zdravljenjem.

ŠSC kot merilo za higiensko ustreznost mleka (Regulation (EC) No 853/2004) posledično narekuje tudi trgovanje z mlekom in plačevanje mleka, kjer služi kot eden izmed parametrov kakovosti mleka. V okviru shem kontrole kakovosti mleka pa ŠSC

omogoča izločitev ali ugotovitev okuženosti vimen pri posameznih živalih. Vse to pa nesporno prispeva k boljšemu vodenju in nadzoru poslovanja proizvajalcev mleka v vzrejnih programih (meritve ŠSC pri posameznih živalih).

Določanje ŠSC v mleku posameznih krav je zelo razširjena metoda za ugotavljanje subkliničnih oblik mastitisa. Povečano število v mleku je največkrat dejansko povezano z vnetnim procesom v vimenu, ki pa ga lahko povzroči vrsta različnih mikroorganizmov. Metoda določanja ŠSC je ključna za spremljenje pojava okužb oz. vnetnih sprememb, ni pa moč s to metodo določiti tudi povzročitelja okužbe, kar pa je za nadaljnje zdravljenje velikega pomena (Pengov, 2001).

Po ocenah opravijo na svetovni ravni v laboratorijih letno več kot 500 milijonov testov ŠSC (Orlandini in van den Bijgaart, 2011).

2.1.2.2 ŠSC v mleku kot merilo vnetja mlečne žleze

Glede na evropsko zakonodajo (Regulation (EC) No 853/2004) morajo nosilci živilske dejavnosti zagotoviti, da surovo kravje mleko izpolnjuje naslednji dve higijenski merili:

- število kolonijских enot (KE)/ml pri 30 °C mora biti ≤ 100.000 (geometrijsko povprečje v obdobju dveh mesecev, z vsaj dvema vzorcema mesečno) in
- število somatskih celic/ml ≤ 400.000 (geometrijsko povprečje v obdobju treh mesecev, z vsaj enim vzorcem mesečno, razen v primeru velikih razlik v proizvodnji mleka glede na sezono).

Podobno kot v Evropi so tudi drugod po svetu predpisane meje za ŠSC v mleku in sucer na Novi Zelandiji in Avstraliji kot mejo predpisujejo 400.000 celic/ml za surovo kravje mleko, v ZDA je ta meja 750.000 celic/ml, v Kanadi pa 500.000 celic/ml (Sharma in sod., 2011).

Kravje mleko, pridobljeno iz neokužene mlečne žleze, praviloma vsebuje manj kot 100.000 SC/ml (Sharma in sod., 2011; Leitner in sod., 2012), predvsem epitelne celice in levkocite (Leitner in sod., 2012). Enako velja na ravni četrti, kadar je ŠSC nižje od 100.000 celic/ml (Brolund, 1985; Whist in Østerås, 2006), je malo verjetno, da okužba obstaja.

Ko okužbo v telesu živali zazna imunski sistem, hiter dotok levkocitov poveča ŠSC visoko nad osnovno raven (Sharma in sod., 2011). Koncentracija celic (predvsem levkocitov) lahko v primeru okužb že v kratkem času, včasih že v nekaj urah, z vrednosti pod 50.000 celic/ml mleka naraste preko milijona celic/ml mleka (Sharma in sod., 2011), ali pa celo na nekaj milijonov (Persson in Sandgren, 1992). Odvisno od

vzroka povečanja ŠSC pa lahko ŠSC v 24 urah pade na normalno raven ali pa ostane visoko dalj časa in žleza postane kronično vneta (Bulletin IDF 466, 2013).

Že dolgo poskušajo raziskovalci ugotoviti povezavo med vnetjem mlečne žleze in ŠSC v mleku ter podati število, ki bi pokazalo mejo med zdravo in okuženo mlečno žlezo. Zaradi številnih dejavnikov, ki poleg okužbe vplivajo na ŠSC, na osnovi rezultatov ni mogoče govoriti o zanesljivi meji, saj se rezultati pogosto razlikujejo. Tako je na primer Reneau (1986) že leta 1986 predlagal, da bi bilo število 283.000 SC/ml primerna meja za namen kontrole mastitisa, Smith in sodelavci (2001) navajajo, da je, skladno s priporočili IDF iz leta 1987 (Bulletin IDF 211, 1987), 250.000 SC/ml tisto število, ki ločuje normalno mleko od mleka obolele žleze. Kasneje se je ta vrednost nekoliko znižala, saj so mejo za mleko ene krave (vse četrti skupaj), ki naj bi zagotavljala minimalno napako pri razlikovanju med okuženimi in zdravimi mlečnimi žlezami, spustili na 200.000 SC/ml mleka (Smith in sod., 2001; Bulletin IDF 466, 2013). Za kravje mleko torej okvirno velja, da več kot 200.000 SC/ml mleka že namiguje na mastitis (IDF Bulletin 321, 1997), medtem ko so vrednosti nad 300.000 SC/ml mleka večinoma že pokazatelj prisotnosti vnetja (Smith, 1996).

Hamann (2005) zato meni, da bi bilo v sisteme plačevanja mleka potrebno postopno vključiti nižje meje ŠSC od dosedanje zakonsko predpisane meje 400.000 SC/ml (Regulation (EC) No 853/2004), saj bi s tem prispevali k dvigu splošnega zdravstvenega stanja vimen krav molznic. S takšnim pristopom bi bilo boljše zdravstveno stanje vimen v čredi krav molznic nagrajeno s še višjo ceno mleka. Še več, od takšnega pristopa bi imeli koristi tako proizvajalci kot predelovalci mleka, saj samo kakovostno mleko zdravih živali, z nizkim številom SC, omogoča izdelavo dobrih in stabilnih mlečnih izdelkov, z ohranjenimi naravnimi lastnostmi, po katerih najraje posegajo sodobni, vse bolj osveščeni potrošniki.

2.1.2.3 Dejavniki, ki vplivajo na dvig števila somatskih celic v mleku

Povečano ŠSC v mleku se pojavi samo v pogojih, kadar so tesni stiki med epitelnimi (sekretornimi) celicami alveole prekinjeni. Največkrat se to zgodi (Muir, 2011):

- v zelo zgodnji laktaciji – večja prepustnost omogoči prehod imunoglobulinov in drugih celic imunskega sistema s krave na doječega telička,
- ob okužbah, ki povzročijo vnetje mlečne žleze in
- v pozni laktaciji, ko se količina mleka zmanjšuje pred presušitvijo med dvema laktacijama, mlečna žleza pa je utrujena.

Glavni vzrok porasta ŠSC v mleku je največkrat mastitis (Reneau, 1986; Pengov 2001, 2005; Smith, 1999; Bulletin 448, 2011; Bulletin 466, 2013), poleg tega pa kot vzrok

povečanega ŠSC literatura navaja še vrsto drugih dejavnikov, kot so (Pengov, 2001; Sharma in sod., 2011; Bulletin IDF 466, 2013):

- vrsta živali,
- obdobje laktacije,
- starost živali,
- prehrana,
- stres in travma,
- pasma živali,
- rodnost (število telitev),
- sezona,
- variacije med dnevi,
- način in rutina molže,
- genetske variacije,
- organiziranost reje (hlevi, stelja, sistemi molže, ravnanje z gnojem).

Povečano število somatskih celic v bazenskih vzorcih mleka pa lahko kaže tudi na neustrezno vodenje oz. nadzor celotne črede na farmah (Ninane in sod., 2010a).

Poleg naštetih dejavnikov pa vplivajo na rezultat ŠSC tudi postopki vzorčenja in shranjevanja vzorcev, ki morajo biti standardizirani (ISO 707:2008/IDF 50, 2008).

2.1.2.4 ŠSC kot kazalnik kakovosti mleka za predelavo

Mleko s povečanim ŠSC uvrščamo v kategorijo mleka slabše kakovosti. Vnetje mlečne žleze povzroči poškodbe tkiva, vključno s celicami, v katerih poteka sinteza mleka. Večja prepustnost celic za sestavine krvi in zmanjšana zmožnost sinteze mleka vplivata tako na sestavo kot količino mleka. Posledice spremenjene in neustrezne sestave mleka so poleg slabše kakovosti mleka za predelavo tudi slabša obstojnost in številne napake senzoričnih lastnosti izdelkov, narejenih iz takega mleka (Leitner in sod., 2011, Le Maréchal in sod., 2011; Barbano in sod., 2011).

Zaradi obolelega vimena in s tem poškodb epitelnih celic za sintezo mleka sta sinteza in zmožnost izločanja mleka manjši (Auldin in Hubble, 1998; Le Maréchal in sod., 2011). Mnogo raziskovalcev je prišlo do zaključka, da je med logaritmom ŠSC in zmanjšano količino mleka linearna povezava (Sharma in sod., 2011).

Vnetje mlečne žleze pa ne povzroči samo manjše sinteze mleka, temveč vpliva tudi na sestavo in kakovost sestavin mleka. Poškodba epitelnih celic ima za posledico povečan prehod krvnih sestavin, zato se poveča vsebnost serumskih proteinov. Zaradi manjše zmožnosti sinteze v epitelnih celicah pade vsebnost kazeinov, ki so zaradi povečanega

delovanja encimov tudi delno razgrajeni (Auldist in Hubble, 1998; Sharma in sod., 2011; Le Maréchal in sod., 2011; Bulletin IDF 466, 2013). Proteolizo kazeina povzročijo povečane koncentracije in aktivnost plazmina ter proteaze levkocitov. Zmanjša se vsebnost β - in α -kazeina, vsebnost γ -kazeinov, razgradnih produktov β -kazeina, pa se poveča. Ker je plazmin toplotno stabilen, ga s postopki toplotne obdelave ne uničimo, njegovo delovanje pa tako zmanjšuje obstojnost mlečnih izdelkov. V določeni meri pa se poveča tudi vsebnost encimov iz poškodovanih epitelnih celic (Le Maréchal in sod., 2011).

V mastičnem mleku je manjša tudi vsebnost maščobe, ki je logična z vidika zmanjšane sinteze in zmožnosti izločanja mleka zaradi poškodba tkiva. Vsebnost prostih maščobnih kislin se poveča, kar lahko pojasnimo z delovanjem lipaz levkocitov in večjo aktivnostjo lipoproteinlipaze, ki razgrajuje lipoproteine membrane maščobnih kroglic in povzroči lipolizo mlečne maščobe (Auldist in Hubble, 1998; Le Maréchal in sod., 2011). Število levkocitov je sicer povezano s povečano lipolizo, vendar mehanizem delovanja še ni pojasnjen (Le Maréchal in sod., 2011).

Najbolj očitna posledica mastitisa je padec vsebnosti laktoze na račun manjše sinteze in izgube laktoze iz poškodovanih celic v kri, kar avtorji povezujejo tudi z zmanjšano zmožnostjo sinteze in izločanja mleka iz sekretornih celic. Spremeni se tudi mineralna sestava. Podatki za kalcij so različni, vsebnost kalija se zmanjša, zvečata pa se koncentraciji natrija in klora (Auldist in Hubble, 1998; Le Maréchal in sod., 2011).

Povečano ŠSC (mastitis) se pri predelavi mleka odraža predvsem v nastanku nezaželenih (pri)okusov, manjšega izkoristka in krajših rokov uporabnosti izdelkov (Auldist in Hubble, 1998; Le Maréchal in sod., 2011; Barbano in sod., 2011; Bulletin IDF 466, 2013).

Pasterizirano mleko in UHT mleko, izdelano iz mastičnega mleka, ki praviloma vsebuje več proteaz in lipaz, je bolj podvrženo nastanku neželenih (pri)okusov kot pasterizirano oz. UHT mleko izdelano iz normalnega mleka. Pride do hidrolize kazeina, pri čemer nastanejo majhni hidrofobni peptidi, ki dajejo trpek, grenak okus. Povečanje vsebnosti prostih maščobnih kislin zaradi lipolize pa daje okus po žarkem (Le Maréchal in sod., 2011).

Čeprav se podatki pogosto razlikujejo in so odvisni od vrste sira, lahko pri izdelavi sirov iz mleka z večjim ŠSC pride do številnih tehnoloških težav in organoleptičnih napak izdelkov. Mastično mleko ima slabše zmožnosti koagulacije, poveča se vsebnost vlage v sirih, med zorenjem sirov pa nastanejo različni neželeni (pri)okusi. V večini študij navajajo, da se čas sirjenja podaljša, zmanjša se čvrstost koaguluma in upočasni se nastanek koaguluma. V začetnih fazah sirjenja mleka z višjim ŠSC prihaja do proteolize

kazeinov, predvsem β -kazeina in α_{S1} -kazeina. Posledica tega je izguba kazeinov v sirotko, kar vodi k slabemu izkoristku in slabi kakovosti sira (Auldin in Hubble, 1998; Le Maréchal in sod., 2011; Barbano in sod., 2011; Bulletin IDF 466, 2013).

Do sprememb v količini in sestavi mastičnega mleka pa prihaja tudi zaradi delovanja encimov, ki jih sproščajo patogeni mikroorganizmi kot povzročitelji mastitisa. Še več, te spremembe se razlikujejo tudi glede na vrsto mikroorganizma (Auldin in Hubble, 1998; Le Maréchal in sod., 2011).

Mleko s povečanim ŠSC lahko, zaradi poteka zdravljenja živali, vsebuje tudi ostanke zdravil (antibiotikov), ki lahko povzročajo dodatne težave pri predelavi mleka (Ruegg in Tabone, 2000).

2.2 METODE DOLOČANJA ŠTEVILA SOMATSKIH CELIC V MLEKU

Metode za določanje števila somatskih celic v mleku lahko razvrstimo v naslednje skupine (Bulletin IDF 466, 2013):

- referenčna metoda: neposredno štetje somatskih celic pod mikroskopom (angl. »*Direct Microscopic Somatic Cell Counting, DMSCC*«),
- rutinske metode: »*Coulter Milk Counter*« (prvi avtomatizirani inštrument, ki so ga uporabili v praksi), fluoro-opto-elektronski inštrumenti, »*Charge coupled device (CCD)*« kamera,
- metode namenjene predvsem raziskovalnemu delu: poleg prejšnjih dveh še štetje različnih vrst somatskih celic pri vnetju (angl. »*Differential inflammatory cell counting*«), neposredna epifluorescenčna tehnika z uporabo filtra (angl. »*Direct epifluorescence filter technique (DEFT)*«),
- hitre posredne metode za odkrivanje mastitisa s pomočjo reagentov: »*California Mastitis Test (CMT)*« in »*Wisconsin Mastitis Test (WMT)*«,
- posredne metode, ki temeljijo na določanju kemijskih sprememb mleka ali merjenju električne prevodnosti.

Število somatskih celic v mleku se najpogosteje določa z robustnimi fluoro-opto-elektronskimi inštrumenti, princip metode pa opisuje standard ISO 13366-2/IDF 148-2. Ti inštrumenti morajo biti točno nastavljeni oz. umerjeni glede na uradno (Commission Regulation (EC) No 1664/2006) referenčno metodo, to je mikroskopsko štetje, ki je opisana v standardu ISO 13366-1/IDF 148-1.

2.2.1 Referenčna metoda za določanje ŠSC v mleku

Orlandini in van den Bijgaart (2011) navajata, da sta osnovno metodo, ki temelji na neposrednem mikroskopiranju (DMSCC) opisala Prescott in Breed že leta 1910, kasneje pa so jo modificirali Newman in Lampret ter Levowitz in Weber (Levowitz in Weber, 1956; IDF 148A, 1995). Metoda temelji na štetju celičnih jeder s pomočjo mikroskopa oz. fluorescentnega mikroskopa na razmazu vzorca mleka po obarvanju z barvilom. Število celic na mililiter mleka dobimo s štetjem celic na točno določenem območju, ob upoštevanju količine mleka (faktorja), ki jo odvezamemo za pripravo razmaza za štetje somatskih celic. Ta metoda je še vedno predpisana referenčna metoda za umerjanje in kontrolo (Commission Regulation (EC) No 1664/2006; Orlandini in van den Bijgaart, 2011). Metoda je standardizirana in natančno opisana ter določena s standardom ISO 13366-1/IDF 148-1 (2008).

Kot barvilo se lahko uporabljajo (ISO 13366-1/IDF 148-1, 2008):

- raztopina barvila modificirana po Newman in Lampert ter Levowitz in Weber (etanol, tetra-kloro-etan, metilensko modrilo, očetna kislina),
- raztopina etidijevega bromida v vodi,
- za kozje mleko pa Carnoy fiksator (kloroform, brezvodna očetna kislina, etilni alkohol) ali raztopina barvila »pyronin Y-methyl green«.

Kljub temu, da je metoda sprejeta kot referenčna metoda, prvotni standard IDF 148A (1995) oz. ISO 13366-1 (1997) ne podajata vrednosti za natančnost (ponovljivost in obnovljivost).

Možne napake pri izvedbi metode so lahko posledica neenakomerne porazdelitve celic pri pripravi razmaza, subjektivne napake pri štetju ali nepravilne identifikacije obarvanih struktur (Bulletin IDF 466, 2013).

Pomanjkljivosti referenčne metode (DMSCC) so privedle k ustanovitvi projektne skupine »IDF/ISO Joint Action Team on Automated Methods«, ki naj bi ponovno pregledala in ocenila referenčno metodo (Orlandini in sod., 2008). Na osnovi rezultatov dela projektne skupine so februarja leta 2008 izdali nov združen standard ISO 13366-1/IDF 148-1 (2008). Standard podaja podrobnejše opise za postopek štetja, v pomoč pa vsebuje tudi slike celic, ki jih je potrebno šteti (Baumgartner in van den Bijgaart, 2010).

Ugotovili so, da je poleg postopka barvanja in tehnike štetja, odločitev kaj šteti kot celico, dodatna pomanjkljivost te metode v praksi. Poudarili pa so tudi, da glavnega vira razlik med štetjem (variabilnosti), to je človeške subjektivnosti, ni mogoče izključiti (Baumgartner, 2008).

Orlandini in sodelavci (2008) so v medlaboratorijski primerjavi, ki so jo izvedli oktobra 2005 in v kateri je bilo v končne izračune vključenih 12 od 18 sodelujočih laboratorijev, primerjali rezultate referenčne metode. Primerjava je služila za izračun parametrov natančnosti; ponovljivosti in obnovljivosti, in še to samo za kravje mleko. Primerjavo so izvedli na 16 vzorcih mleka s ŠSC od 200.000 do 800.000 celic/ml. Na osnovi primerjave rezultatov so podali omejitve referenčne metode. Ugotovili so, da imata na točnost rezultata največji vpliv analitik in laboratorij, kljub temu, da so analize opravljali usposobljeni in izkušeni analitiki, ki so imeli na voljo natančen opis in slike »kaj šteti in kaj ne«. Dokazali so, da je razlika, ki nastane kot posledica načina priprave vzorca oz. razmazov na ploščah, zanemarljiva v primerjavi z razlikami, ki so posledica štetja in interpretacije rezultatov. Vrednosti za ponovljivost (angl. »repeatability«) so bile največkrat enake vrednostim za obnovljivost (angl. »reproducibility«). To dokazuje, da je glavni vzrok razlike v rezultatih ŠSC ponovljivost štetja posameznega analitika. Zaključili so, da ima subjektivna ocena analitika odločilen vpliv na oceno točnosti te metode. Kot glavne pomanjkljivosti oz. kritične točke referenčne metode (DMSCC) za konec navajajo:

- izbira območij, na katerih se štejejo celice,
- razlikovanje med somatskimi celicami in drugimi trdnimi delci ali tujki,
- subjektivna ocena in odločitev analitika.

Neposredno štetje somatskih celic pod mikroskopom, ki je predpisana referenčna metoda v EU, je še posebno subjektivno v naslednjih primerih (Ninane, 2014):

- kadar se moramo odločiti, ali moramo majhno celico, ki jo vidimo, šteti ali ne - minimalna velikost je sicer predpisana s standardom, vendar kljub namestitvi najbolj primerne mrežice, včasih ni mogoče oceniti velikosti celice, ki jo opazujemo;
- kadar moramo določiti število celic v gručici celic, ki jih opazujemo - tudi, ko pravilno nastavimo osvetlitev, včasih ni mogoče dobro videti, ali sta dve jedri povezani ali vsako zase;
- kadar se moramo odločiti, ali celico, ki je na meji območja štetja, štejemo ali ne.

Tudi Orlandini in van den Bijgaart (2011) poudarjata, da sta izurjenost in strokovnost laboranta glavna kritična dejavnika, ki vplivata na pravilno izvedbo in s tem na kakovost in natančnost referenčne metode. Zato priporočata, da referenčno metodo izvede več analitikov, po možnosti v več laboratorijih, kar naj bi zagotovilo doseganje optimalne točnosti (angl. »accuracy«) končnih referenčnih vrednosti. Pogosta izvedba referenčne metode in udeležba v medlaboratorijskih primerjavah sta nujni za zagotavljanje primerljivih rezultatov.

Baumgartner (2008) poudarja, da lahko k večji natančnosti prispeva uporaba sekundarnih referenčnih materialov (SRM) za notranjo kontrolo v referenčnih

laboratorijih in ponavljanje analiz v več kot enem referenčnem laboratoriju na istih vzorcih ter kontinuirano izobraževanje in s tem »umerjanje« analitikov. Ninane (2014) navaja, da si analitik z izkušnjami lahko ustvari lastna merila za presojo, kar mu omogoča, da dosega relativno dobro ponovljivost štetja. Dodaja pa, da ni nujno, da so ta merila enaka merilom drugega analitika.

Orlandini in van den Bijgaart (2011) sta povzela glavne pozitivne in negativne značilnosti referenčne metode, ki so prikazane v Preglednici 2.

Preglednica 2. Pozitivne (+) in negativne (-) značilnosti referenčne metode za določanje ŠSC v mleku (Orlandini in van den Bijgaart, 2011: 416).

Table 2: Positive (+) and negative (-) characteristics of the reference method for enumeration of somatic cells in milk (Orlandini and van den Bijgaart, 2011: 416).

Referenčna metoda	
Standardizirana (ISO 13366-1/IDF 148-1)	(+)
Stara/zastarela	(-)
Različne vizualne oblike merjenja	(-)
Človeška subjektivnost	(-)
Zahteva veliko časa	(-)
Obširna analiza	(-)
Nezadovoljiva natančnost	(-)

Gonzalo in sodelavci (2004) navajajo, da je pomanjkljivost referenčne metode pri določanju ŠSC v ovčjem mleku, ki temelji na barvanju razmaza mleka z metilenskim modrilom, težko razlikovanje med celicami in citoplazemskimi delci (angl. »particles«), ki so, sicer v manjšem številu, prisotni v ovčjem mleku (Schalm in sod., 1971; Gonzalo in sod., 2003). Uporaba za DNK-specifičnih barvil (npr. pyronin Y-methyl green) izboljša izvedbo DMSCC metode (Gonzalo in sod., 2004; Zeng in sod., 1999). Podobno velja za kozje mleko (Zeng, 1996). Uporaba tega barvila omogoča ločevanje med levkociti in citoplazemskimi delci in s tem natančnejše štetje somatskih celic (Dulin in sod., 1982; Packard in sod., 1992).

Kljub pomanjkljivostim referenčne metode pa Zeng in sodelavci (1999) navajajo, da statistično značilnih razlik ($p > 0,05$) med dvema laboratorijema, ki sta izvajala mikroskopsko metodo, ni bilo. Podobno ugotavlja Deperrois (2014), ki povzema rezultate dveh medlaboratorijskih primerjav Nacionalnih referenčnih laboratorijev (NRL), ki so sodelovali z referenčno metodo ISO 13366-1/IDF148-1. Primerjavi so

izvajali v letih 2008 in 2010, na sedmih vzorcih (štiri ravni ŠSC), z razponom ŠSC od 0 do 1.000.000 celic/ml. Vsi laboratoriji so dosegli dobre rezultate tako glede parametra standardni odklon ponovljivosti (s_r : 6-13 % v 2008 in 4-8 % v 2010) kot glede parametra standardni odklon obnovljivosti (s_R : 18-21 % v 2008 in 15 % v 2010). Oba parametra sta se v kasnejši primerjavi tudi izboljšala, kar pomeni, da so bile dosežene manjše vrednosti s_r in s_R . Prav tako pa je večina udeležencev (79 % v 2008 in 85 % v 2010) v drugi primerjavi opravila analize natančnejše (angl. »precision«) in bolj pravilno (angl. »trueness«).

Po navedbah standarda ISO 13366-1/IDF 148-1 (2008) je referenčna metoda primerna za pripravo standardnih testnih vzorcev in določanje referenčnih vrednosti, ki so potrebne za umerjanje mehanskih in avtomatiziranih metod štetja somatskih celic, medtem ko je v biltenu mednarodnega mlekarkega združenja IDF še vedno zapisano, da metoda zahteva veliko časa in ne daje dovolj natančnih rezultatov, zato ni primerna za redna umerjanja in kontrolo kakovosti analiz (Bulletin IDF 469, 2013).

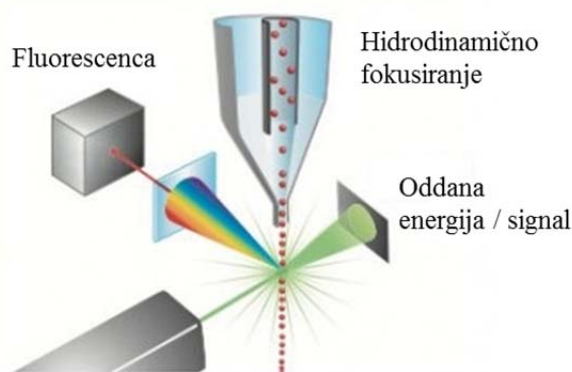
2.2.2 Fluoro-opto-elektronska (F-O-E) metoda za določanje ŠSC v mleku

V zadnjih desetletjih so se zelo razširili avtomatizirani inštrumenti, ki omogočajo analiziranje večjega števila vzorcev mleka z zelo nizkimi stroški (Orlandini in sod., 2008). Inštrumenti proizvajalcev FOSS (Danska) in Bentley (ZDA) omogočajo analizo do 600 vzorcev na uro (FOSS, 2013; Bentley Instruments, 2015).

Fluoro-opto-elektronsko (F-O-E) metodo za določanje števila somatskih celic v mleku opisuje standard ISO 13366-2/IDF 148-2 (2006), ki podaja navodila za delovne pogoje ter postopek določanja ŠSC v surovem in surovem konzerviranem mleku. Metoda predvideva uporabo tako principa pretočne citometrije (angl. »flow cytometry«) kot štetja na disku (»disc cytometry«). Metoda je primerna tudi za mleko drugih vrst živali (koze, ovce, bivolice), če so doseženi predpisani pogoji. Je edina standardizirana avtomatizirana metoda za štetje somatskih celic v mleku in jo v praksi uporabljajo najpogosteje, saj ocenjujejo, da s to metodo analizirajo kar 85 % vzorcev mleka (Bulletin IDF 466, 2013).

Delovanje fluoro-opto-elektronskih inštrumentov temelji na istem principu, standardizacija in avtomatizacija štetja pa sta pripomogli k bolj prijaznemu, a »robustnemu« postopku štetja (Orlandini in van den Bijgaart, 2011). Pri avtomatiziranih inštrumentih se točno določena količina vzorca zmeša s pufrom in raztopino barvila, mešanica pa se nato nanese na ravno površino rotirajočega diska (citometrija na disku – angl. »disc cytometry«) ali pa teče v kapilarnem toku skozi posebno celico (pretočna citometrija – angl. »flow cytometry«). Vsak obarvan delec (somatska celica), ki ga zazna vgrajeni fluorescentni mikroskop, sproži električni signal, ki gre preko posebnega filtra,

se pomnoži in zabeleži. Višina signala se elektronsko obdela; izračuna se razlika med šumom signala in impulzi, ki pripadajo obarvanim somatskim celicam (Orlandini in van den Bijgaart, 2011). Princip delovanja temelji torej na barvanju jeder somatskih celic z barvilom. Barvilo etidijev bromid (angl. »*ethidium bromide*«) prehaja v celico in tvori fluorescentni kompleks z jedro DNK. Vzorec je nato izpostavljen modri svetlobi, ki vzbudi obarvane celice, da emitirajo rdečo svetlobo (Gonzalo in sod., 2004). Raven razlike med šumom signala in impulzi je lahko fiksna ali dinamična. Pri nekaterih inštrumentih se lahko samodejno nastavi trajanje štetja glede na koncentracijo celic; npr. daljše štetje pri nižjem številu somatskih celic. To je koristno pri točnosti metode v spodnjem območju štetja (Orlandini in van den Bijgaart, 2011).



Slika 1: Princip delovanja fluoro-opto-elektronskih inštrumentov za določanje ŠSC na principu pretočne citometrije (angl. »*flow cytometry*«); oblika pretočne celice zagotavlja, da se zazna le po ena celica naenkrat (Bentley Instruments, 2015).

Figure 1: The principle of the fluoro-opto-electronic instruments for the enumeration of somatic cells in milk based on the flow cytometry. The shape of the flow cell allows to pass a single cell at a time (Bentley Instruments, 2015).

Modelov oz. proizvajalcev inštrumentov za ugotavljanje ŠSC je kar nekaj, ne delujejo pa vsi po opisanem principu. Na principu citometrije delujejo Somascope™ (Delta Instruments B.V., Nizozemska), Somacount™ (Bentley Instruments Inc., ZDA) in Fossomatic™ (FOSS, Danska), medtem ko Nucleocounter™ (ChemoMetec A/S, Danska) in DDC Counter™ (DeLaval International AB, Švedska) delujeta na principu zajemanja slike obarvanih somatskih celic.

DDC Counter™ uporablja kot barvilo propidijev jodid (angl. »*propidium iodide*«), ki se nahaja v kaseti za zajem vzorca mleka (Gonzalo in sod., 2006). Bat potiska vzorec proti okencu za štetje, kjer je nato izpostavljen LED svetlobi. Celična jedra oddajo fluorescentno svetlobo, ki se zabeleži kot slika in se nato s pomočjo računalniškega programa preračuna v ŠSC v mleku (Bulletin IDF 466, 2013). Rezultat dobimo v manj

kot minuti (približno 40 s/vzorec). Aparat uporabljajo za določanje ŠSC v surovem kravjem mleku (DeLaval, 2003).

Prednosti F-O-E metode sta visoka zmogljivost (analiziranje večjega števila vzorcev) in večja natančnost rezultatov. Vsekakor pa se metoda lahko še izboljša z razvojem in uporabo standardiziranih referenčnih materialov (Bulletin IDF 469, 2013).

Metode in inštrumenti za določanje ŠSC morajo biti umerjeni in preverjeni, da dajejo točne, natančne (ponovljivost in obnovljivost) in primerljive rezultate (Bulletin IDF 466, 2013). Prav tako standard ISO 13366-2/IDF 148-2 (2006) navaja, da morajo biti elektronski števci umerjeni, in sicer glede na vrednosti, dobljene z referenčno metodo oz. s kombinacijo vrednosti, dobljenih z referenčno metodo in inštrumentalno F-O-E metodo/števcem.

Razlike med rezultati, dobljenimi s F-O-E metodo, so v glavnem posledica nastavitve inštrumentov na »lokalne« referenčne vrednosti (Baumgartner, 2008).

Orlandini in van den Bijgaart (2011) opisujeta pozitivne in kritične negativne značilnosti rutinskih F-O-E metod, ki so prikazane v Preglednici 3.

Preglednica 3: Pozitivne (+) in negativne (-) značilnosti fluoro-opto-elektronske metode za določanje ŠSC v mleku (Orlandini in van den Bijgaart, 2011: 416).

Table 3: Positive (+) and negative (-) characteristics of the fluoro-opto-electronic method for enumeration of somatic cells in milk (Orlandini and van den Bijgaart, 2011: 416).

Fluoro-opto-elektronska metoda	
Standardizirana (ISO 13366-2/IDF 148-2)	(+)
Visoka zmogljivost	(+)
Hitrost (do 500 vzorcev/uro)	(+)
Uporabniku prijazna	(+)
Nizki stroški pri večjem številu vzorcev	(+)
Dobra natančnost	(+)
Ni razpoložljivih certificiranih referenčnih materialov	(-)

2.2.3 Primerjava referenčne in F-O-E metode za določanje ŠSC v mleku

Read in sodelavci so že leta 1967 objavili primerjavo med referenčno mikroskopsko metodo za določanje ŠSC in štetjem z elektronskim števcem. Navajajo, da so bile razlike v ŠSC, določenih z referenčno in F-O-E metodo, pri vzorcih mleka s ŠSC 300.000 celic/ml in več, statistično neznačilne (pri $\alpha = 0,05$). Korelacijski koeficient je bil 0,997. Ko pa so vzorci vsebovali manj kot 300.000 celic/ml, pa je elektronska metoda dala statistično značilno višje rezultate kot mikroskopska metoda.

Orlandini in sodelavci (2008) poudarjajo, da je inštrumentalno določanje ŠSC natančnejše kot direktno štetje pod mikroskopom (referenčna metoda). Ker sta obe metodi standardizirani (ISO 13366-1/IDF 148-1, 2008; ISO 13366-2/IDF 148-2, 2006), so v standardih predpisane točno določene mejne vrednosti za natančnost (ponovljivost in obnovljivost) posamezne metode.

Ponovljivost označujemo z »r« (angl. »repeatability«) in pomeni natančnost pri ponovljivih pogojih. Ponovljivi pogoji so pogoji, kjer so neodvisni rezultati dobljeni z isto metodo, na identičnih testnih materialih, v istem laboratoriju, s strani istega analitika, z uporabo iste opreme, v kratkem časovnem obdobju (ISO 3534-1, 1993). Pri standardiziranih metodah, kjer so vrednosti za ponovljivost, ki jih moramo doseči, tudi predpisane, je dikcija malo drugačna: absolutna razlika med dvema neodvisnima, enkratnima meritvama, dobljenima z isto metodo, na identičnem testnem materialu, v istem laboratoriju, s strani iste osebe, z uporabo iste opreme, v kratkem časovnem obdobju ne sme biti v več kot 5 % primerov večja od predpisane/ih vrednosti. Vrednosti so navedene v takem stavku ali pa so, kot je to v primeru ŠSC, podane v preglednici (ISO 13366-1/IDF 148-1, 2008; ISO 13366-2/IDF 148-2, 2006).

Obnovljivost označujemo z »R« (angl. »reproducibility«) in pomeni natančnost pri obnovljivih pogojih. Obnovljivi pogoji so pogoji, kjer so rezultati dobljeni z isto metodo, na identičnih testnih materialih, v različnih laboratorijih, s strani različnih analitikov, z uporabo različne opreme (ISO 3534-1, 1993). Pri standardiziranih metodah, kjer so vrednosti za obnovljivost, ki jih moramo doseči tudi predpisane, je dikcija malo drugačna: absolutna razlika med dvema neodvisnima, enkratnima meritvama, dobljenima z isto metodo, na identičnem testnem materialu, v različnih laboratorijih, v kratkem časovnem obdobju ne sme biti v več kot 5 % primerov večja od predpisane/ih vrednosti. Vrednosti so navedene v takem stavku ali pa so, kot je to v primeru ŠSC, podane v preglednici (ISO 13366-1/IDF 148-1, 2008; ISO 13366-2/IDF 148-2, 2006).

V Preglednicah 4 in 5 so podane vrednosti za oceno natančnosti (ponovljivost in obnovljivost) referenčne in F-O-E metode (ISO 13366-1/IDF 148-1, 2008; ISO 13366-

2/IDF 148-2, 2006). Te vrednosti so dobljene iz medlaboratorijskih primerjav za kravje mleko.

Preglednica 4: Vrednosti za ponovljivost in obnovljivost za referenčno metodo (ISO 13366-1/IDF 148-1, 2008: 12).

Table 4: Repeatability and reproducibility values of the reference method (ISO 13366-1/IDF 148-1, 2008: 12).

	Raven ŠSC (1000/ml)			
	245	455	679	791
Ponovljivost (<i>r</i>) ŠSC (1000/ml)	107	121	192	308
Obnovljivost (<i>R</i>) ŠSC (1000/ml)	114	174	218	308

r - natančnost pri ponovljivih pogojih
R - natančnost pri obnovljivih pogojih

Preglednica 5: Vrednosti za ponovljivost in obnovljivost za F-O-E metodo (ISO 13366-2/IDF 148-2, 2006: 11, 12).

Table 5: Repeatability and reproducibility values of the fluoro-opto-electronic method (ISO 13366-2/IDF 148-2, 2006: 11, 12).

	Raven ŠSC (1000/ml)				
	150	300	450	750	1.500
Ponovljivost (<i>r</i>) ŠSC (1000/ml)	25	42	50	63	126
Obnovljivost (<i>R</i>) ŠSC (1000/ml)	38	67	88	126	252

r - natančnost pri ponovljivih pogojih
R - natančnost pri obnovljivih pogojih

Orlandini in van den Bijgaart (2011) navajata podatke (Preglednica 6) z interpoliranimi vrednostmi za ponovljivost in obnovljivost glede na podatke iz standardov ISO 13366-1/IDF 148-1 (2008) in ISO 13366-2/IDF 148-2 (2006).

Preglednica 6: Podatki za natančnost referenčne metode in F-O-E metode za ŠSC v mleku, interpolirani iz podatkov v standardih ISO 13366-1/IDF 148-1 (2008) in ISO 13366-2/IDF 148-2 (2006) (Orlandini in van den Bijgaart, 2011: 417).

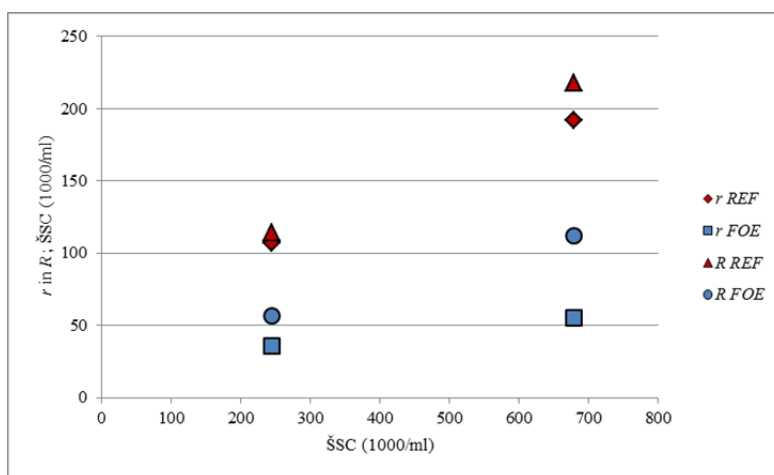
Table 6: Precision data on the reference method and fluoro-opto-electronic (F-O-E) method for somatic cell count in milk as interpolated from standards ISO 13366-1/IDF 148-1 (2008) and ISO 13366-2/IDF 148-2 (2006) (Orlandini and van den Bijgaart, 2011: 417).

	Raven ŠSC (1000/ml)	r ŠSC (1000/ml)	R ŠSC (1000/ml)
Referenčna metoda	245	107	114
	679	192	218
F-O-E metoda	245	36	57
	679	55	112

r - natančnost pri ponovljivih pogojih

R - natančnost pri obnovljivih pogojih

Za lažjo predstavo so vrednosti iz Preglednice 6 prikazane še na Sliki 2. Tu se dobro vidi, da je za referenčno metodo pri nizkem ŠSC (245.000 celic/ml) meja za merilo ponovljivosti (r) skoraj enaka meji za merilo obnovljivosti (R).



Legenda: r_{REF} – ponovljivost za referenčno metodo, r_{FOE} – ponovljivost za F-O-E metodo, R_{REF} – obnovljivost za referenčno metodo, R_{FOE} – obnovljivost za F-O-E metodo.

Slika 2: Podatki za natančnost referenčne metode in F-O-E metode za ŠSC v mleku, interpolirani iz podatkov v standardih ISO 13366-1/IDF 148-1 (2008) in ISO 13366-2/IDF 148-2 (2006) (povzeto po Orlandini in van den Bijgaart, 2011).

Figure 2: Precision data on the reference method and fluoro-opto-electronic (F-O-E) method for somatic cell count in milk as interpolated from standards ISO 13366-1/IDF 148-1 (2008) and ISO 13366-2/IDF 148-2 (2006) (according to Orlandini and van den Bijgaart, 2011).

Primerjava po standardu dovoljenih odstopanj kaže na to, da je inštrumentalna F-O-E metoda natančnejša - ponovljiva (r) in obnovljiva (R), razlike med ponovljivostjo in obnovljivostjo pa so tudi večje kot pri referenčni metodi.

Rezultati raziskave, ki so jo izvedli Silveira in sodelavci (2005) so pokazali, da razlike med rezultati, dobljenimi z referenčno metodo (povprečje 382.000 celic/ml) in z elektronskim števcem (povprečje 329.000 celic/ml), pri bazenskih vzorcih mleka niso bile statistično značilno različne ($p > 0,05$). Orlandini in van den Bijgaart (2011) pa celo trdita, da so sodobne F-O-E rutinske metode natančnejše kot referenčna metoda, ki temelji na mikroskopiji.

Še večje težave predstavlja določanje ŠSC v mleku drugih vrst živali in v humanem mleku, saj je na voljo precej manj podatkov, aparati pa so največkrat umerjeni s kravjim mlekom. Hanuš in sodelavci (2011) so primerjali F-O-E metodo (Fossomatic 90) in referenčno metodo za določanje ŠSC v kravjem, kozjem, ovčjem in humanem mleku. Inštrument je bil predhodno umerjen s kravjim mlekom. Povprečne razlike med metodama so bile majhne pri kravjem mleku, večje pri ovčjem in humanem mleku, največje pa pri kozjem mleku.

Vse naštetje pomanjkljivosti, tako referenčne kot F-O-E metode, se odražajo in pogosto stopnjujejo v rutinskih laboratorijih, kar se kaže v slabem ujemanju rezultatov v medlaboratorijskih primerjavah. Omenjene pomanjkljivosti kličejo po razvoju boljšega sistema za umerjanje inštrumentov za določanje somatskih celic v mleku, poudarja Baumgartner (2008).

2.3 REFERENČNI SISTEM ZA DOLOČANJE ŠTEVILA SOMATSKIH CELIC V MLEKU

2.3.1 Namen referenčnega sistema za določanje ŠSC

Pravično trgovanje z mlekom zahteva, da so rezultati analiz med laboratoriji, med državami in med različnimi uporabljenimi metodami primerljivi v daljšem časovnem obdobju (Orlandini, 2012; Baumgartner, 2008). Primerljivost analitskih rezultatov v svetovnem merilu pa ne more biti zagotovljena le s standardiziranimi analiznimi metodami (Baumgartner in van den Bijgaart, 2010). Za nekatere parametre primanjkuje standardiziranih referenčnih materialov, poleg tega pa imajo referenčne metode določene omejitve v izvedbi. Zato Ninane in sodelavci (2010a) poudarjajo, da določanje ŠSC v mleku, prav zaradi doseganja boljše primerljivosti rezultatov med laboratoriji v svetovnem merilu, zahteva mednarodni referenčni sistem.

Referenčni sistem je sistematično razvit »zasidran« sistem (angl. »*anchoring system*«), ki vzpostavljeno mrežo laboratorijev neprekinjeno informira in oskrbuje z (Baumgartner in van den Bijgaart, 2010; Orlandini in van den Bijgaart, 2011):

- referenčnimi materiali,
- rezultati referenčnih metod,
- rezultati rutinskih metod,
- rezultati iz medlaboratorijskih primerjav.

Za uspešno delovanje takšnega sistema pa je potrebno, da ga priznajo tako organi zakonodajne in izvršilne oblasti kot vsi ostali udeleženci (Baumgartner in van den Bijgaart, 2010).

2.3.2 Tradicionalne sheme umerjanja inštrumentov

Tradicionalne sheme umerjanja inštrumentov, ki jih lahko opišemo kot enosmerne, običajno z enostransko določenimi referenčnimi vrednostmi za določen material za umerjanje rutinskih metod, imajo razne omejitve. To lahko vodi k slabi natančnosti in veliki variabilnosti sistema, kar pa je pogosto nesprejemljivo za uporabnike. Omejitve so lahko povezane z referenčnimi metodami in laboratoriji, ki te metode izvajajo, z referenčnimi materiali, ki so bili analizirani in nenazadnje tudi s sposobnostjo rutinskih laboratorijev, da vpeljejo metodo. Da bi premagali omenjene omejitve, so strokovnjaki načrtali nove pristope. Kot enega možnih načinov predlagajo, da bi referenčne metode kot zasidrane metode (angl. »*anchor methods*«), ponovno ovrednotili in jih modificirali glede na potrebe in sposobnosti metode. Take modificirane referenčne metode bi nato lahko postale del referenčnega sistema. Na ta način bi dodatno vpeljali določene elemente oz. postopke, ki bi zmanjšali izvore razlik. Pri določanju ŠSC bi lahko na primer prispeval k izboljšanju izvedbe referenčne metode in s tem k njeni natančnosti sistem samodejnega zajemanja slike (angl. »*automated imaging systems*«) (Baumgartner, 2008).

Tradicionalne sheme umerjanja inštrumentov za določanje ŠSC so še posebno problematične (Baumgartner in van den Bijgaart, 2010). Za doseganje dovolj natančnih in točnih referenčnih vrednosti je referenčno metodo treba večkrat ponoviti v več laboratorijih, poleg tega je metoda dolgotrajna, okorna, zahteva izkušnje in pogoste izvedbe, da lahko zanesljivo zagotovimo primernost in pristojnost analitika ter pravilne rezultate štetja. Tarčni merjenec, ki se prešteje pri izvedbi referenčne metode pa pri izvedbi rutinskih F-O-E metod ni splošno sprejet kot »referenčna osnova« oz. »referenčna vrednost«. Tako pravzaprav manjka že prava skupna osnova za umerjanje rutinskih inštrumentov. Posledično se dogaja, da nekaj rutinskih laboratorijev tako ustanavlja svoje referenčne sisteme, da bi zasidrali ravni štetja. Zaradi vseh teh razlogov

določanje ŠSC dobro ilustrira tipično težavo in je »pravi kandidat« za izvedbo svetovno sprejetega pristopa k referenčnemu sistemu (Baumgartner in van den Bijgaart, 2010).

Baumgartner (2008) takole povzema omejitve tradicionalne sheme umerjanja inštrumentov za določanje ŠSC:

- pomanjkljiva definicija merjenega parametra ŠSC, predvsem z vidika kaj je referenčna ciljna populacija oz. kaj šteti, poleg tega pa kaj šteti že vnaprej določimo z metodo, ki jo bomo uporabili,
- negotovost (angl. »*uncertainty*«) referenčne metode je prevelika za uporabo v linearni shemi umerjanja,
- ni certificiranih referenčnih materialov (CRM), ki bi jih lahko uporabili kot »zlati standard«,
- sekundarni referenčni materiali (SRM) niso preverjeni ali certificirani, da ohranjajo vrednosti (rok uporabe, homogenost znotraj serije),
- opis SRM je pomanjkljiv, zato ne zagotavlja doseganja sprejemljive natančnosti za rutinsko merjenje,
- v praksi skoraj ne najdemo povezav med posameznimi sistemi umerjanj.

2.3.3 Naloge in vpeljava referenčnega sistema

Večjo natančnost v tradicionalnih linearnih modelih umerjanja lahko dosežemo samo z izboljšavo v smislu prečiščenjema in sistematično uporabo vseh informacij, dobljenih iz vseh virov analitske verige. Tak pristop lahko označimo z izrazom »referenčni sistem« (angl. »*reference system*«) in pomeni globalni analitski sistem, ki uporablja vse tipe dostopnih informacij za kontrolo vseh izvorov variabilnosti v celotnem analitskem procesu. V principu mora referenčni sistem izpolniti dve glavni nalogi (Baumgartner, 2008):

- zagotoviti primerljive rezultate meritev v svetovnem merilu in
- zagotoviti »prave« rezultate glede na referenčno metodo.

Izraz »referenčno« vključuje dva vidika. Eden se nanaša na priznavanje (angl. »*testimonial*«), odobritev oz. potrditev (angl. »*endorsement*«) ali certificiranje (angl. »*certification*«), drugi pa na poizvedovanje oz. poznavanje (angl. »*information*«), očitnost oz. razvidnost (angl. »*evidence*«) ali izvor oz. poreklo (angl. »*source*«). Ti pojmi dobro opisujejo namen referenčnih sistemov, ki naj bi dopolnili in izboljšali tradicionalne načine umerjanj rutinskih metod. Tradicionalno se uporabljajo linearni umeritveni modeli, ki rutinsko metodo povezujejo preko uporabe umeritvenih vzorcev z referenčno metodo, ki pa jo izvaja referenčni laboratorij. Taka tradicionalna shema pa ima lahko za posamezne parametre različne omejitve: nezadostno definiran merjenec, slaba natančnost referenčnih metod glede na rutinske metode, velika variabilnost med referenčnimi laboratoriji, ki izvajajo referenčne metode, nezadostna stabilnost in homogenost umeritvenih materialov (Baumgartner, 2008).

Za vzpostavitev referenčnega sistema mora biti vzpostavljeno centralizirano zbiranje podatkov rutinskih inštrumentov. Vsekakor je za uspeh takega sistema poročanje rutinskih laboratorijev enako odločilno kot poročanje in sodelovanje referenčnih laboratorijev. Če so vključeni parametri, ki so zakonsko predpisani, in ŠSC je tak parameter, morajo sodelovati v referenčnem sistemu tudi kompetentne uradne službe in uradni referenčni laboratoriji, da se zagotovi mednarodno sprejet referenčni nivo oz. referenčna vrednost za določen parameter, ki je lahko posamezna komponenta oz. analit (Baumgartner, 2008).

V zadnjih letih strokovnjaki veliko pozornosti posvečajo optimizaciji analitskih sistemov, ki bi zagotavljali čim večjo natančnost. Sistemi običajno vključujejo (Baumgartner, 2008):

- referenčno metodo izvedeno v referenčnem laboratoriju,
- SRM, okarakterizirane za določen parameter z referenčno metodo v referenčnem laboratoriju,
- umerjanje rutinske metode oz. inštrumenta v rutinskem laboratoriju s temi SRM,
- poročilo in oceno postopka z vsemi potrebnimi dejstvi za naročnika in primerno interpretacijo dobljenih rezultatov.

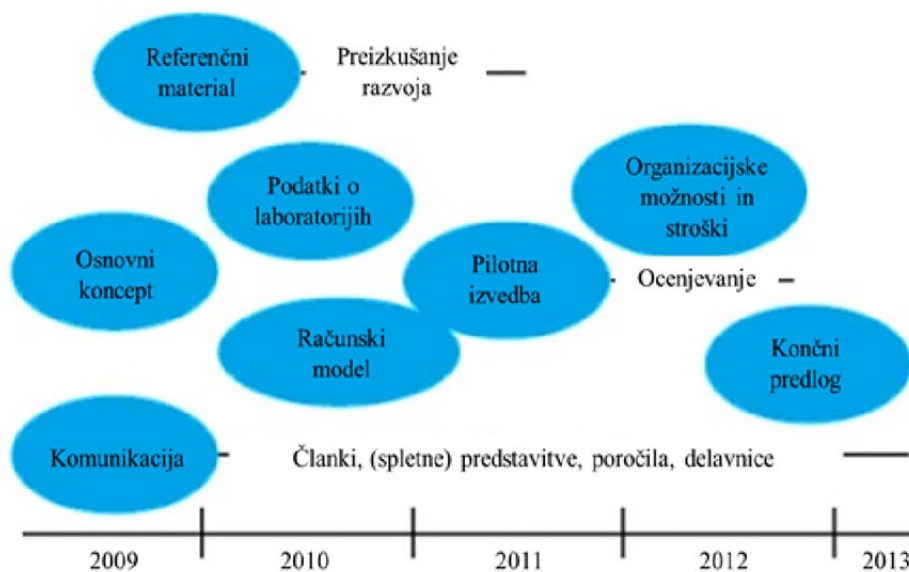
Z referenčnimi sistemi lahko premostimo vrzel med referenčnimi metodami na eni strani, ki jih moramo jemati kot zasidrane metode, čeprav so pomanjkljive in drage za rutinsko delo, in rutinskimi metodami na drugi strani, ki so hitrejše, »natančnejše« in imajo ugodnejše razmerje med izvedbo in ceno analize (Baumgartner, 2008).

Referenčne sisteme je treba načrtovati in vzpostaviti sistematično in skrbno. Gledati jih moramo kot večdimenzionalna sidrišča, ki s povratnimi informacijami in obiljem elementov vzpostavijo popoln sistem interakcij med referenčnimi in rutinskimi metodami, kot tudi povezave med uporabljenimi referenčnimi in umeritvenimi materiali z njihovo vzporedno in zaporedno uporabo v enem in/ali v različnih laboratorijih (Baumgartner, 2008).

Referenčni sistemi so tesno povezani s sistemi medlaboratorijskih primerjav (MP) in s tem z zahtevami akreditacijskih organov. MP so orodja dokazovanja usposobljenosti laboratorija, da dosega verodostojne in zaupanja vredne rezultate. Referenčni laboratoriji, ki so dokazano zmožni, da lahko ovrednotijo referenčne vrednosti za določen parameter, morajo biti del mreže referenčnih laboratorijev v referenčnem sistemu, kar zagotavlja kakovost rezultatov. Poleg tega pa skoraj ni MP, ki bi preiskala učinke oz. posledice neustreznih rezultatov oz. izračunov referenčnih vrednosti za umerjanje inštrumentov (Baumgartner, 2008).

Ker CRM, ki bi služil kot »zlati standard« (angl. »golden standard«) za umerjanje, ni, so laboratoriji prepuščeni lastni iznajdljivosti kako priti do referenčnega materiala in s tem seveda referenčnih vrednosti. Umerjanje inštrumentov se najpogosteje izvaja z lokalnimi referenčnimi materiali, ki so analizirani s strani enega ali pa omejenega števila lokalnih laboratorijev. Tako večina regijskih rutinskih laboratorijev deluje kot izoliran laboratorij za analitiko v okviru vzrejnih programov (angl. »Dairy Herd Improvement, DHI«) oz. politiki plačevanja mleka (Baumgartner, 2008).

Čeprav je v svetovnem merilu tako na lokalnih kot področnih oz. državnih ravneh že vzpostavljenih nekaj sistemov umerjanja, je bila v okviru organizacij IDF in ICAR oblikovana projektna skupina za vzpostavitev novega sistema na globalni ravni, ki naj bi izboljšal delo in učinkovitost laboratorijev. Prav zaradi globalne pomembnosti tematike, ki kliče po odpravi pomanjkljivosti in vzpostavitvi referenčnega sistema, kakor tudi obsežnosti, saj se po ocenah na letni ravni na svetu opravi več kot 500 milijonov analiz, je bil kot študijski model izbran primer SC (Baumgartner in van den Bijgaart, 2010; Orlandini in van den Bijgaart, 2011). Projektno skupino IDF/ICAR, ki deluje od leta 2008, sestavlja 28 članov iz 19 držav s 4 kontinentov (Orlandini, 2012). Skupina je že sprejela zasnovo postopnega pristopa »od spodaj navzgor« (angl. »bottom-up«) skozi povezavo že obstoječih sistemov (Orlandini in van den Bijgaart, 2011). Uradni naziv projekta je »IDF/ICAR Project on Reference System for Somatic Cell Counting (RSSCC) in Milk«. V letu 2009 so predstavili časovni načrt postopkov in del za vzpostavitev referenčnega sistema za štetje somatskih celic v mleku, ki je prikazan na Sliki 3 (Baumgartner in van den Bijgaart, 2010). Ta mednarodna skupina obvešča o vseh novostih na tem področju preko spletne strani IDF (Ninane in sod., 2010a).



Slika 3: Časovni načrt dela projektne skupine IDF/ICAR za vzpostavitev referenčnega sistema za določanje števila somatskih celic v mleku (povzeto po Baumgartner in van den Bijgaart, 2010: 274).

Figure 3: Time plan of the IDF/ICAR project group on Reference system for somatic cell counting in milk (according to Baumgartner and van den Bijgaart, 2010: 274).

Kaj je referenčni sistem in zakaj ga potrebujemo, pojasnjuje tudi van den Bijgaart (2014b). Sledljivost (angl. »*traceability*«) je ključna za veljavnost rezultata analize. To lahko zagotovimo na več načinov (van den Bijgaart, 2014b):

- z uporabo določene metode (angl. »*defining method*«); to je, da je merjenec določen z natančno metodo, za katero je postopek izvedbe podrobno opisan;
- z uporabo (certificiranih) referenčnih materialov za umerjanje;
- z uporabo referenčne metode za umerjanje rutinske metode oz. inštrumenta; pri tem je lahko referenčna metoda določena metoda (angl. »*defining method*«) ali pa druga standardizirana metoda, ki je zasnovana kot referenčna.

Ovrednotenje enega ali več referenčnih materialov naj bi temeljilo na zbiranju rezultatov referenčnih in rutinskih laboratorijev, obdelavi podatkov in nato določitvi »prave« vrednosti ŠSC vsakega materiala. Dobro zasnovan in zasidran sistem pomeni, da se izognemo negotovostim med različnimi serijami referenčnih materialov in kasneje neustreznim umerjanjem inštrumentov (Baumgartner in van den Bijgaart, 2010).

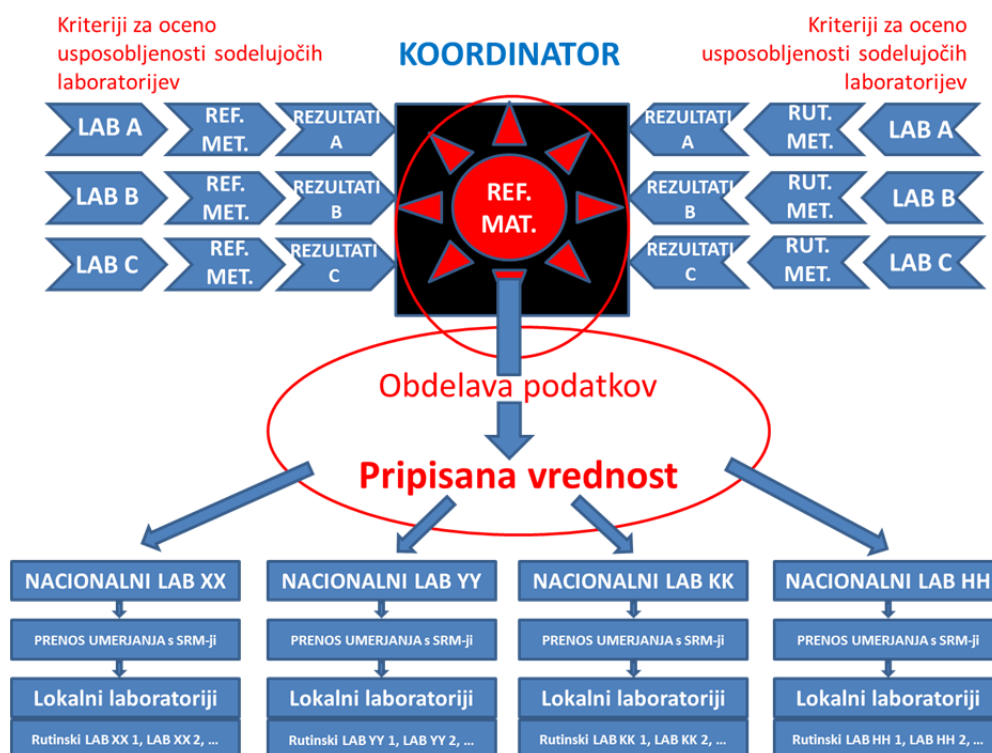
Za zagotovitev kakovostnih rezultatov referenčnih in rutinskih analiz, s katerimi laboratoriji ovrednotijo referenčne materiale, moramo neprekinjeno spremljati uspešnost laboratorijev, ki sodelujejo v medlaboratorijskih primerjavah. Raven kakovosti rezultatov oz. sposobnosti vključenih laboratorijev moramo upoštevati pri izračunih referenčnih vrednosti. Zato je projektna skupina IDF/ICAR začela razvijati tudi model

za analizo podatkov, ki bi omogočil ocenjevanje primernosti sodelujočih laboratorijev. Naslednji korak pa je preizkus take zasnove v pilotni študiji, za oceno robustnosti in delovanja celotnega sistema (Ninane in sod., 2010a).

Zgradba predlaganega referenčnega sistema je predstavljena na Sliki 4, njegovi ključni vidiki pa so (Orlandini in van den Bijgaart, 2011):

- primeren material za izdelavo CRM
Tip in lastnosti referenčnega materiala morajo biti optimizirani, po možnosti na osnovi informacij obstoječih ponudnikov in izkušnjah pri uporabi teh materialov v smislu reprezentativnosti, stabilnosti in roka uporabe.
- standardizirane metode
To je že doseženo s standardizacijo referenčne in rutinske metode s standardom ISO 13366/IDF 148 del 1 in 2.
- postopek za zbiranje rezultatov analiz referenčnega materiala, dobljenih z referenčno in rutinsko metodo
Omejeno natančnost referenčne metode lahko ublažimo z upoštevanjem rezultatov pravilno umerjenih in dobro kontroliranih avtomatiziranih inštrumentov. Mehanizem povratnih informacij bo pomagal ublažiti razlike pri naslednjih serijah referenčnih materialov, ki bi se lahko pojavile zaradi omejene natančnosti referenčne metode.
- sistem točkovanja usposobljenosti laboratorijev
Potrebna je objektivna ocena ali točkovanje usposobljenosti laboratorijev, ki z referenčno ali rutinsko metodo sodelujejo pri določanju referenčnih vrednosti. Ta ocena lahko temelji na rezultatih dotičnih laboratorijev v medlaboratorijskih primerjavah.
- sistem točkovanja kakovosti MP
Vse MP niso enake in se lahko razlikujejo v številu vzorcev, v obsegu vrednosti ŠSC, v matriksu, v uporabljenih metodah in številu sodelujočih laboratorijev. Vsi ti vidiki morajo biti prevedeni v objektivno oceno ali točke.
- model obdelave rezultatov za izračun in določitev referenčnih vrednosti referenčnega materiala
Ta model bo temeljil na verjetnosti (angl. »*probabilistic approach*«). Pristop bo omogočal točkovanje različnih MP in kakovost dela sodelujočih laboratorijev. Tako bodo pri določitvi referenčnih vrednosti referenčnega materiala upoštevane tudi določene relativne teže rezultatov sodelujočih laboratorijev.
- sekundarni referenčni materiali (neobvezno/dodatno)
Kadar je količina zgoraj omenjenega CRM omejena, je potreben SRM, ki ga laboratoriji, vključeni v MP, posredujejo lokalnim rutinskim laboratorijem (prenos mednarodnega »nivoja enakovrednosti«; angl. »*level of equivalence*«). Tudi za pripravo SRM in določitev referenčnih vrednosti bi morali vpeljati standardizirani postopek na mednarodni ravni.

- koordinator
Koordinator je ključnega pomena za delovanje referenčnega sistema za določanje ŠSC. Bistvo je, da deluje kot neodvisen nadzornik in podpira primerno uporabo principov in postopkov.



Slika 4: Shema predlaganega referenčnega sistema za določanje števila somatskih celic v mleku (prirejeno po Baumgartner in van den Bijgaart, 2010: 273).

Figure 4: Scheme of Reference system for somatic cell counting in milk (according to Baumgartner and van den Bijgaart, 2010: 273).

Predlagana zgradba referenčnega sistema je seveda končni cilj, pristop »od spodaj navzgor« pa naj bi bil najbolj praktična pot za doseg tega cilja (Orlandini in van den Bijgaart, 2011). To pomeni zbiranje in uporaba podatkov in informacij s katerimi razpolagajo že obstoječi sistemi (Baumgartner in van den Bijgaart, 2010) in njihovo povezovanje (Slika 5). V prvi fazi se povezave med obstoječimi sistemi lahko ustvarijo z analiziranjem istega materiala v različnih časovnih obdobjih in doseganjem sledljivih izravnjav v manjšem merilu (manjše število udeležencev). Povezave med obstoječimi sistemi lahko torej služijo za izvedbo pilotne študije, v kateri lahko delovanje sistema točkovanja in modele obdelave podatkov preizkusimo in prikažemo, preden se nato predlagani referenčni sistem dejansko uporabi (Orlandini in van den Bijgaart, 2011). Cilj projektne skupine IDF/ICAR je prav uskladitev različnih sistemov (Orlandini, 2012).

Povratni mehanizmi lahko omogočijo optimizacijo in zmanjšanje razlik v izvedbi referenčnih metod, kot tudi dokažejo veljavnost uporabljenih sekundarnih referenčnih materialov (SRM). Z upoštevanjem velikega števila podatkov o umerjanjih rutinskih inštrumentov, lahko pridobimo veliko več informacij o kakovosti uporabljenih SRM-jev in njihovih vrednostih, pridobimo pa tudi informacije o uspešnosti izvedenih umerjanj (Baumgartner, 2008).



Slika 5: Uporaba pristopa »bottom-up« s povezovanjem obstoječih »zasidranih« sistemov (Orlandini in van den Bijgaart, 2011: 418).

Figure 5: Applying a bottom-up approach through interlinkage of existing anchoring systems (Orlandini and van den Bijgaart, 2011: 418).

Projektna skupina je že identificirala ključne naloge za vzpostavitev sistema in izdeluje pilotni sistem, ki naj bi ga preizkusili v praksi (Baumgartner in van den Bijgaart, 2010). Med drugim so najbolj kritični dejavniki:

- ustrezen referenčni material, ki mora biti reprezentativen in stabilen,
- zbirnik podatkov laboratorijev s sistemom točkovanja ustreznosti oz. usposobljenosti laboratorijev,
- računski model za določanje optimalnih pripisanih (angl. »assigned«) vrednosti.

Tako naj bi idealen referenčni sistem za umerjanje inštrumentov, ki zagotavlja natančne, »prave« in zanesljive vrednosti ŠSC, vključeval (Baumgartner, 2008):

- jasno definicijo referenčne ciljne populacije celic, ki opredeli kaj vključuje »število somatskih celic« oz. katera populacija celic ali »mikroskopskih delcev« naj se šteje,
- natančen, z visoko ponovljivostjo in obnovljivostjo merjenja, standard ali referenčno metodo, ki temelji na jasnih in natančnih podatkih, pridobljenih iz vrednotenja metode in njene uporabe v praksi,
- dobro opisan CRM in nekaj SRM z različnimi tipi celičnih populacij iz mleka z dolgim rokom uporabe,
- mrežo laboratorijev, ki bi izvajali referenčno metodo, da bi točno določili mednarodno sprejemljivo raven ŠSC,
- sistem za poročanje o rezultatih umerjanj za vse rutinske inštrumente,

- sistem za zbiranje podatkov in zagotavljanje povratnih informacij za rutinske in referenčne laboratorije,
- mrežo »varoval«, ki bi zagotovila vnos vseh potrebnih informacij vseh udeležencev v sistemu (kompetentne vladne organizacije, referenčni laboratoriji, rutinski laboratoriji, znanstveni sodelavci in proizvajalci ter predelovalci mleka) in razvoj sistema do njegovega optimalnega delovanja.

Da bi se zagotovila ustrezna kakovost rezultatov ŠSC, dobljenih z referenčnimi metodami (t.i. »referenčna stran« sistema), bi morali vpeljati in vzdrževati sheme MP, ki bi vključevale vse laboratorije, ki proizvajajo SRM ali pa ovrednotijo umeritvene materiale za rutinske laboratorije. Take sheme MP morajo vključevati jasna merila za laboratorije, ki ne dosegajo predpisanih vrednosti za natančnost referenčne metode. Izbor laboratorijev, ki bi predstavljali skupino »ekspertnih« laboratorijev, bi moral temeljiti na rezultatih shem MP. Taka skupina ekspertnih laboratorijev mora zajemati tako zakonsko kot analitsko kompetentne laboratorije (Baumgartner, 2008).

Z vidika »rutinske strani« sistema pa bi moral sistem vključevati način poročanja o umerjanjih in informacije o natančnosti rutinskih laboratorijev pri vsakdanjem delovanju. Za pridobitev povratnih informacij o kakovosti SRM ter o kakovosti in uspešnosti umerjanj v praksi, pa je nujno zbiranje podatkov o analizi SRM in drugih umeritvenih materialov. Povzetki teh rezultatov bi dali uporabne informacije o dejanskem stanju pri določanju ŠSC in zmožnosti referenčnega sistema (Baumgartner, 2008).

Poleg tega je treba razviti postopke za povezovanje vseh elementov v referenčnem sistemu, ugotoviti, kako posamezni elementi vplivajo drug na drugega, kako bi kontinuirano izboljševali sistem in seveda kdo naj bi ga izboljševal. Za zaupanje v referenčni sistem v svetovnem merilu je treba vključiti mrežo varoval državne izvršilne oblasti in njihove nacionalne referenčne laboratorije, ekspertne laboratorije, rutinske laboratorije, znanstvenike in seveda končne uporabnike meritev kot so vzrejne službe, proizvajalci ter predelovalci mleka (Baumgartner, 2008).

Referenčni sistem za ŠSC bi pomenil opustitev tradicionalnega enosmernega pristopa k umerjanju inštrumentov, s tem pa bi povečal obseg dela na novih umeritvenih shemah. Uporabljali bi več informacij za doseganje natančnejših vrednosti SRM vzorcev, poleg tega pa bi spremljali uspešnost referenčnih laboratorijev pri izvedbi referenčne metode. Da pa se vzpostavi referenčni sistem, ki bi zagotovil enotne in primerljive rezultate analiz, kar je pomembno v mednarodni trgovini in seveda zaščiti potrošnika, pa je stvar mednarodnih sporazumov in politične volje (Baumgartner, 2008).

2.3.4 Trenutno stanje na področju sistemov umerjanja, ponudnikov in uporabnikov referenčnih materialov

Informacije o dostopnosti referenčnih materialov s strani ponudnikov v nekaterih državah in kako se ti materiali v več kot 15-ih državah uporabljajo, so strokovnjaki projektne skupine pridobili z dvema anketama (Orlandini, 2012):

- prva anketa je bila naslovljena na ponudnike referenčnih materialov,
- druga anketa pa rutinskim laboratorijem.

Pridobljene informacije so strokovnjakom omogočile vpogled v povezave različnih, že obstoječih lokalnih analitskih sistemov, uporabili pa so jih tudi pri oblikovanju osnutka navodil za pripravo referenčnih materialov. Skupina strokovnjakov za statistiko pa razvija prve računske modele za oceno shem MP in dela laboratorijev, vključenih v določanje referenčnih vrednosti (Baumgartner in van den Bijgaart, 2010).

Na podlagi izsledkov te ankete naj bi projektna skupina nato predlagala shemo mednarodne analitike, z usklajeno povezavo med vsemi udeleženci. Sistem bi tako zagotavljal sledljivost meritev in bolj enakovredne analitske rezultate po celem svetu (Orlandini, 2012).

Vsak laboratorij je del neke skupine laboratorijev, ki uporablja enaka orodja za zagotavljanje kakovosti; to je uporabo istih SRM ali sodelovanje v istih MP ali pa sledijo istim vodilom (Orlandini, 2012).

Prva anketa, opravljena z 21 ponudniki referenčnih materialov za ŠSC (14 iz Evrope, 4 iz ZDA, 1 iz Južne Afrike in 2 iz Azije), je dala podatke o karakteristikah referenčnih materialov (Preglednica 7). Rezultati ankete so pokazali, da so referenčni materiali pripravljene iz surovega ali toplotno obdelanega mleka, z naravno prisotnimi somatskimi celicami, v nekaterih primerih pa so dodane še celice iz drugih virov. Tudi območja, v katerih se giblje ŠSC za kravje mleko, so različna. Prav tako se RM razlikujejo v številu vzorcev v posameznem kompletu vzorcev in v deklariranem času uporabe, ki pa je odvisen od toplotne obdelave in/ali uporabe sredstva za konzerviranje oz. postopka konzerviranja. Opis postopka priprave teh referenčnih materialov ni poenoten. Pripisana vrednost je lahko določena z referenčno metodo, z rutinskimi analizami s fluoro-opto-elektronskimi števci ali pa s kombinacijo obeh metod, pa tudi na osnovi rezultatov medlaboratorijskih primerjav (Orlandini in van den Bijgaart, 2011; Orlandini, 2012).

Preglednica 7: Karakteristike referenčnih materialov za določanje ŠSC v mleku različnih ponudnikov (Orlandini, 2012: 29).

Table 7: Characteristics of reference materials for somatic cell counting in milk from different suppliers (Orlandini, 2012: 29).

Lastnosti	surovo mleko, UHT mleko naravno prisotne celice dodane celice še iz drugih matriksov
Obseg ŠSC	80.000 – 1.000.000 celic/ml 200.000 – 500.000 celic/ml 150.000 – 1.300.000 celic/ml
Število vzorcev v kompletu z različnim ŠSC	2, 4, 5, 10
Način določanja referenčnih vrednosti	medlaboratorijska primerjava z referenčno in rutinsko metodo referenčna metoda referenčna metoda in rutinska metoda
Rok uporabnosti RM	5 – 180 dni

Barbano in sodelavci (2011) navajajo, da za umerjanje laboratorij običajno zbere mleko z različnih farm, izmeri ŠSC vsakega vzorca z referenčno metodo (DMSCC) in nato uporabi te vzorce kot referenčno izhodišče za nastavitve naklona (angl. »*slope*«) elektronskih števecv oz. inštrumentov. Običajno tak komplet vzorcev ne obsega dovolj velikega razpona ŠSC in tudi ne zagotavlja enakomerne porazdelitve ŠSC v tem razponu. Velikokrat so v takem kompletu le štirje vzorci, kar poveča negotovost (angl. »*uncertainty*«) nastavitve oz. umeritve elektronskih števecv oz. inštrumentov.

Zanimivo je, da nekateri ponudniki RM med seboj primerjajo različne tipe RM, prav tako pa sodelujejo v različnih medlaboratorijskih primerjavah. Tako se že ustvarjajo povezave med različnimi ponudniki (Orlandini, 2012).

V drugi anketi je sodelovalo 210 rutinskih laboratorijev (skupaj uporabljajo 225 inštrumentov) iz 36 držav s celega sveta (26 iz Evrope, 5 severne in južne Amerike, 2 iz Azije, 2 iz Afrike in 1 iz Oceanije). Večina (90 %) inštrumentov deluje na principu pretočne citometrije, 7 % jih deluje na principu štetja na disku, 3 % pa uporablja drug

princip (»*Charge coupled device; CCD*«). Zasnova umerjanja in nastavitvev inštrumenta nista popolnoma jasna vsem vprašanim. 90 % jih uporablja RM za umerjanje, to pomeni, da primerjajo referenčne vrednosti z meritvami inštrumenta, vendar jih od teh le nekaj dejansko umeri inštrumente, tako da spremeni vrednosti za naklon in odsek na ordinati. 7 % laboratorijev ne uporablja nikakršnih RM, vendar preverjajo svojo usposobljenost v nacionalnih in mednarodnih MP (Orlandini, 2012).

Orlandini (2012) ugotavlja, da laboratoriji v večini uporabljajo tri različne tipe RM: surovo mleko (64,25 %), toplotno obdelano mleko (21,72 %) in posneto/polposneto mleko (3,16 %), po en laboratorij pa uporablja liofilizirano mleko oz. zamrznjeno mleko. Zanimiv podatek je tudi, da 9 % laboratorijev uporablja oba tipa RM, tako RM z naravnimi celicami kot RM z dodatkom sintetičnih delcev. 12 % laboratorijev je odgovorilo, da uporablja RM različnih ponudnikov.

Nadalje se je izkazalo, da uporablja 78 % laboratorijev RM, ki ga pripravljajo zunanji proizvajalci, 3 % laboratorijev ne uporablja RM, 10 % pa uporablja več kot samo en RM. Nekateri laboratoriji, ki ne uporabljajo RM, preverjajo inštrumente mesečno z referenčno metodo z enim vzorcem s približno 400.000 celic/ml. Prav tako 73 % laboratorijev inštrumente umerja mesečno, kot je to navedeno v standardu ISO 13366-2/IDF 148-2 (2006), 20 % laboratorijev pa inštrumente preverja vsakih 3 oz. 12 mesecev (Orlandini, 2012).

Orlandini (2012) zaključuje, da 44 % laboratorijev uporablja RM z razponom ŠSC med 100.000 do 1.000.000 celic/ml, 44 % pa med 100.000 in 1.600.000 celic/ml. Nekaj laboratorijev kljub temu, da uporablja RM s širokim razponom, optimizira točnost v območju okrog 400.000 celic/ml. Le 64 od skupaj 210 laboratorijev je v anketi odgovorilo na vprašanje glede toleranc o morebitnih prilagoditvah oz. nastavitvah inštrumentov. Od teh 64 laboratorijev jih 86 % umeri inštrument, če ne dosežejo vrednosti za naklon med 0,95 in 1,05. Na vprašanje glede povprečnega odstopanja od referenčnih vrednosti (angl. »*bias*«) je odgovorilo le 27 % vprašanih, od tega jih polovico navaja, da uporabljajo za dovoljeno odstopanje vrednost 5 %.

IDF/ICAR projektna skupina je, v sodelovanju z ANSES (»*Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail*«), v aprilu 2013 izvedla podobno anketo (ANSES, 2013). Prejeli so 141 odgovorov (122 iz Evrope, 13 iz Amerike, 1 iz Azije, 3 iz Afrike in 2 iz Oceanije) in sicer prav tako iz 36 držav. Pokazalo se je, da je bilo s projektom RSSCC seznanjeno 69 % vprašanih. V anketi se je opredelilo 69 % vprašanih kot rutinski laboratorij, 12 % je bilo ponudnikov referenčnih materialov, 18 % jih izvaja referenčno metodo, dva pa sta bila proizvajalca inštrumentov. Velika večina (86 %) bi referenčne materiale neposredno uporabila za umerjanje rutinskih inštrumentov, medtem ko jih je kar 89 % zmerno ali pa močno

zainteresiranih za koriščenje le teh. Za 141 uporabnikov bi tako morali pripraviti 1500 kompletov vzorcev na letni ravni. 86 % vprašanih bi na letni ravni za to namenilo od 500 € do 2000 €. Vsi vprašani pa se zavedajo, da bi uporaba primarnih referenčnih materialov izboljšala primerljivost med laboratoriji na globalni ravni in zagotovila sledljivost z lokalnega na globalni nivo (ANSES, 2013).

V praksi se veliko rutinskih laboratorijev zanaša na referenčne materiale in njihove pripisane vrednosti. Drugi umerjajo inštrumente na osnovi sodelovanja oz. uspešnosti v MP, tretji pa se zanašajo na osnovne nastavitve proizvajalcev inštrumentov (Orlandini in van den Bijgaart, 2011).

Glede na to, da nekateri laboratoriji sodelujejo v več shemah MP različnih organizatorjev oz. ponudnikov, lahko prihaja do različnih odstopanj glede na pripisane referenčne vrednosti (Orlandini, 2012). Včasih ni lahko pojasniti in razumeti vzroke odstopanj, nekaj pa jih vseeno navaja Orlandini (2012):

- različne skupine laboratorijev uporabljajo različne RM za umerjanje inštrumentov, zato so inštrumenti lahko različno točni v posameznem območju; npr. pri 400.000 celic/ml so zelo točni, pri 1.000.000 celic/ml pa niso več dovolj točni;
- obseg in število vzorcev ponudnikov oz. organizatorjev MP je različno, prav tako se razlikuje delo laboratorijev, statistični izračuni in zaključki;
- zaradi različnih matrikov (surovo mleko, UHT mleko,...) in celic v vzorcih (naravno prisotne celice, dodane celice) se lahko meritve inštrumentov razlikujejo.

V Koreji so, za zagotavljanje primerljivosti med laboratoriji, že od leta 1999 komercialno dostopni materiali, ki jih mesečno uporabljajo za umerjanje približno 95 inštrumentov različnih proizvajalcev. Z umerjanji inštrumentov je tak program izboljšal točnost in ponovljivost rezultatov dobljenih z elektronskimi števci/inštrumenti (Moon in sod., 2012).

V okviru IDF/ICAR projektne skupine, v sodelovanju z Evropskim referenčnim laboratorijem za mleko in mlečne izdelke (*»EU Reference Laboratory for Milk and Milk Products«*) ter Evropskim inštitutom za referenčne materiale in merjenja (*»EU JRC/Institute for Reference Materials and Measurements«*), se pripravlja pilotna serija primarnega referenčnega materiala za ŠSC v mleku. Naslednji izziv pa je statistični model za določitev referenčnih vrednosti (van den Bijgaart, 2014a).

Berger (2014) je tako predstavil in preizkuša (opomba: v teku od leta 2014) statistični pristop za preoblikovanje podatkov iz MP, ki lahko zelo variirajo, v primerljivo vrednost oz. indeks. Uporablja *»verjetnost laboratorija«*, da doseže pripisano vrednost v

določeni MP, skupaj z verjetnostjo za doseganje parametrov natančnosti, navedenih v vodilih ISO oz. IDF (angl. »*ISO/IDF guidance*«), za izračun indeksa kakovosti (angl. »*quality index*«) za vsak laboratorij in MP. Rezultati pa bodo pokazali zmožnost laboratorijev in uporabnost shem MP (Berger, 2014).

Ponudniki RM, SRM oz. umeritvenih vzorcev tako ponujajo vzorce, ki se razlikujejo v matriksu, pripravi, razponu ŠSC, številu vzorcev v kompletu, uporabljenem konzervansu, roku uporabe vzorcev in načinu določitve referenčnih vrednosti. V našem prostoru so največji ponudniki A.I.A. (Associazione Italiana Allevatori, Laboratorio Standard Latte) iz Italije, MIH Hübner (Milchwirtschaftliche Institut Dr. Hübner) iz Nemčije in Actalia Cecalait iz Francije.

Karakteristike vzorcev ponudnika A.I.A., Italija (A.I.A., 2013, 2014a, 2014b):

- matriks: kravje mleko; toplotno obdelano ali zamrznjeno
- priprava: ni podatka
- razpon: 80.000 – 1.000.000 celic/ml
- število vzorcev v kompletu: 5
- konzervans: bronopol v koncentraciji 0,03 %
- rok uporabe: 4 meseci za toplotno obdelano mleko, 6 mesecev za zamrznjeno mleko
- referenčna vrednost: ni podatka

Karakteristike vzorcev ponudnika MIH Hübner, Nemčija (MIH, 2011):

- matriks: surovo kravje in kozje mleko
- priprava: ni podatka
- razpon: 100.000 – 650.000 celic/ml (krave), 1.000.000 – 2.000.000 celic/ml (koze)
- število vzorcev v kompletu: 3 kravje mleko, 3 kozje mleko
- konzervans: bronopol, koncentracija ni podana
- rok uporabe: pri 4 °C rok uporabe 4 tedne; zamrznjeni (-15 °C do -35 °C) uporabni do 9 mesecev
- referenčna vrednost: izračunana iz rezultatov F-O-E inštrumentov iz MP.

Karakteristike vzorcev ponudnika Actalia Cecalait, Francija (Actalia Cecalait, 2015a):

- matriks: kravje, kozje mleko
- priprava: mešanje bazenskih vzorcev mleka z visokim, nizkim številom in mleka brez somatskih celic
- razpon: 0 – 1.600.000 (krave) oz. 1.800.000 (koze) celic/ml
- število vzorcev v kompletu: 5 – 10
- konzervans: bronopol v koncentraciji 0,1 %

- rok uporabe: 2 – 5 tednov (splošen podatek za vse Actalia Cecalait SRM vzorce)
- referenčna vrednost: določena z referenčno metodo (ISO 13366-1/IDF 148-1) in potrjena s skupino ekspertnih laboratorijev z uporabo avtomatizirane metode (ISO 13366-2/IDF 148-2).

Actalia Cecalait (2015b) tudi navaja, da referenčne vrednosti za SRM vzorce določijo z analizami v izbranih laboratorijih, ki jih določijo na podlagi njihove uspešnosti v MP.

V nadaljevanju so opisane karakteristike nekaterih drugih, v našem prostoru manj zastopanih ponudnikov referenčnih materialov.

Karakteristike vzorcev ponudnika QSE, Nemčija (QSE, 2014) - vzorce za ponudnika pripravlja drug ponudnik (Berger in sod., 2011):

- matriks: ni podatka
- priprava: ni podatka
- razpon: 150.000 – 450.000 celic/ml
- število vzorcev v kompletu: 5
- konzervans: ni podatka
- rok uporabe: 6 mesecev
- referenčna vrednost: kombinacija referenčne (DMSCC) in rutinske metode

Karakteristike vzorcev ponudnika Dairy Quality Control Institute, ZDA (DQCI, 2015):

- matriks: surovo kravje mleko
- priprava: ni podatka
- razpon: <200.000 – 1.200.000 celic/ml
- število vzorcev v kompletu: 4
- konzervans: bronopol
- rok uporabe: 2 tedna
- referenčna vrednost: referenčna (DMSCC) metoda

Karakteristike vzorcev ponudnika ELSLAB, ZDA (ELSLAB, 2015):

- matriks: ni podatka
- priprava: ni podatka
- razpon: 120.000 – 1.200.000 celic/ml
- število vzorcev v kompletu: 4
- konzervans: ni podatka
- rok uporabe: cca 7 dni
- referenčna vrednost: referenčna (DMSCC) metoda

Nekateri najvidnejši ponudniki RM, kot so A.I.A. (Italija), MIH Hühner (Nemčija) in Actalia Cecalait (Francija), so istočasno tudi organizatorji MP (A.I.A., 2015a, 2015b, 2015c; MIH, 2014, 2015; Actalia Cecalait, 2015c). Lastnosti takih vzorcev se od prej omenjenih RM ne razlikujejo veliko, predvsem gre pri MP za večje število vzorcev v kompletu (do 10 vzorcev). Prav tako se nekoliko razlikuje izračun referenčnih vrednosti (aritmetična sredina - A.I.A.; različni načini pri Actalia Cecalait). Referenčne vrednosti iz MP lahko laboratoriji uporabijo za umerjanje inštrumentov.

Organizator MP Actalia Cecalait (Francija) podaja v svojih poročilih MP tudi predlagane umeritvene enačbe za sodelujoče laboratorije na podlagi referenčnih vrednosti, dobljenih v posamezni MP. Isti organizator izvaja MP tudi za ICAR laboratorije. Način določanja referenčnih vrednosti pa se nekoliko spreminja (ICAR, 2012, 2013, 2014a, 2014b; Actalia Cecalait, 2013, 2014, 2015d):

- MP Actalia Cecalait september 2013: referenčne vrednosti so povprečne vrednosti za posamezen vzorec, izračunane iz rezultatov izbranih laboratorijev od 62 sodelujočih.
- MP ICAR september 2013: referenčne vrednosti so povprečne vrednosti za posamezen vzorec, izračunane iz rezultatov 15-ih od skupno 18-ih laboratorijev, po izločitvi osamelcev z metodo po Grubbs-u pri stopnji značilnosti $\alpha = 0,05$.
- MP ICAR marec 2014: referenčne vrednosti so povprečne vrednosti za posamezen vzorec, izračunane iz rezultatov vseh 16 laboratorijev, po izločitvi osamelcev z metodo po Grubbs-u pri stopnji značilnosti $\alpha = 0,05$.
- MP Actalia Cecalait september 2014 in april 2015: referenčne vrednosti so robustna povprečja za posamezen vzorec, izračunana po standardu ISO 13528. Referenčna skupina laboratorijev za izračun referenčnih vrednosti je bila izbrana na podlagi rezultatov meritve kontrolnega vzorca. Uporabili so rezultate laboratorijev, ki so odstopali manj kot 5 % v obe smeri od referenčne vrednosti kontrolnega vzorca, ki je bila določena z referenčno metodo (ISO 13366-1/IDF 148-1), po izločitvi osamelcev z metodo po Grubbs-u pri stopnji značilnosti $\alpha = 0,05$.
- MP ICAR september 2014: referenčne vrednosti so robustna povprečja za posamezen vzorec, izračunana po standardu ISO 13528, iz rezultatov vseh 13 udeleženih laboratorijev, po izločitvi osamelcev z metodo po Grubbs-u pri stopnji značilnosti $\alpha = 0,05$.

2.3.5 Zahteve za referenčne materiale za umerjanje inštrumentov za določanje ŠSC v mleku

Referenčni materiali so nujno potrebno orodje za umerjanje avtomatskih števecv somatskih celic, ne glede na to, ali opravljajo laboratoriji samo rutinske analize, ali pa s pripravo sekundarnih referenčnih materialov oskrbujejo z referenčnimi vrednostmi druge laboratorije. Referenčni materiali predstavljajo temelj referenčnega sistema, saj usklajujejo umerjanja v mednarodnem smislu (Bulletin IDF 469, 2013).

ISO priznava dva razreda referenčnih materialov, in sicer »certificirane referenčne materiale« (CRM) in »referenčne materiale« (RM). Slovenska akreditacija podaja sledeče definicije (Slovenska Akreditacija, 2005):

- *certificiran referenčni material* je referenčni material s priloženim certifikatom, katerega ena ali več vrednosti določene lastnosti je certificiranih s postopkom, ki vzpostavlja sledljivost do točne realizacije enote, v kateri so vrednosti te lastnosti izražene, in pri kateri vsako certificirano vrednost spremlja negotovost z navedeno stopnjo zaupanja;
- *referenčni material* je material ali snov, ki je dovolj homogena, in katere ena ali več lastnosti je dovolj dobro ugotovljenih, da se lahko uporablja za umerjanje naprave, ocenjevanje merilne metode ali za pripisovanje vrednosti materialom;
- *sledljivost* je lastnost meritvenega rezultata ali vrednosti standarda, ki omogoča navezavo na navedene reference, po navadi nacionalne ali mednarodne standarde, skozi neprekinjeno verigo primerjav, ki imajo opredeljeno negotovost;
- *kalibracija (umerjanje)* je niz operacij za ugotavljanje povezave med vrednostmi veličin, ki jih kaže merilni inštrument ali merilni sistem, oziroma vrednostmi, ki jih predstavlja opredmetena mera ali referenčni material, in pripadajočimi vrednostmi, realiziranimi s standardi, pod določenimi pogoji.

Referenčni materiali za umerjanje inštrumentov za določanje ŠSC morajo zadostiti nekaterim posebnim pogojem. Da se zagotovi ustrezna fizikalno-kemijska kakovost vzorcev, priprava vzorcev in homogenost serije, ustrezna uporaba sredstev za konzerviranje in določitev roka uporabe vzorcev, izbira surovine (mleka), ravnanje in shranjevanje mleka oz. surovine ter ustreznost embalaže, morajo biti podana natančna priporočila za lastnosti, ki jih morajo izpolnjevati referenčni materiali za umerjanje. Prav tako morata biti podana razporeditev posameznih komponent in njihov koncentracijski razpon (Leray, 2009).

Projektna skupina IDF/ICAR je tako leta 2013 izdala zahteve za referenčne materiale za umerjanje avtomatiziranih števecov somatskih celic v referenčnem sistemu štetja somatskih celic in so opisane v Bulletin IDF 469 (2013):

- v vzorcih za umerjanje naj bo razpon števila somatskih celic za kravje mleko od 0 do 1.000.000 celic/ml, za kozje in ovčje pa od 0 do 2.000.000 celic/ml;
- v umeritvenem kompletu naj bo minimalno 9 vzorcev, z različnim ŠSC (različne ravni), ki se jih lahko pripravi z ustreznim mešanjem vzorcev z visokim in nizkim ŠSC, ravni ŠSC pa morajo biti enakomerno porazdeljene po celotnem razponu;
- v vzorcih naj bodo prisotne somatske celice, ki so naravno prisotne v mleku;
- osnovna surovina oz. matriks naj bo skupno oz. bazensko mleko, ustrezne fizikalno-kemijske kakovosti, staro največ 24 ur, z največjim dovoljenim ŠSC 400.000 celic/ml, z ne več kot 25.000 KE/ml, in zmrziščno točko med $-0,512^{\circ}\text{C}$ in $-0,525^{\circ}\text{C}$;
- vzorce pripravimo s koncentriranjem celic iz mleka in/ali točnim mešanjem vzorcev z visokim in nizkim ŠSC;
- vzorce s krajšim rokom uporabe (2 - 5 tednov) konzerviramo z bronopolom (2-bromo-2-nitropropan-1,3-diol, 0,04 % koncentracija v končnem vzorcu) in jih shranjujemo pri 4°C . Vzorce, ki imajo srednje dolg rok uporabe (približno 4 mesece) pasteriziramo in nato konzerviramo z bronopolom ter shranjujemo pri 4°C . Vzorce, ki imajo daljši rok uporabe (6 – 9 mesecev) globoko zamrznemo (-80°C) in hranimo pri -20°C . Liofilizirane vzorce pa lahko v vakuumu hranimo do dve leti, pri temperaturi 25°C ;
- določitev pripisanih referenčnih vrednosti:
 - za primarne referenčne materiale lahko uporabimo MP, kjer mora sodelovati vsaj 11 referenčnih laboratorijev za posamezno metodo, sodelujejo pa lahko z referenčno metodo ali z rutinsko metodo, vendar pa morajo laboratoriji z rutinsko metodo predhodno inštrumente umeriti s kompletom referenčnih materialov;
 - za sekundarne referenčne materiale pa se lahko referenčna vrednost zasidra (oz. je sledljiva) z zunanjo referenco (rutinska metoda - inštrument umerjen z zadnjim mednarodnim kompletom vzorcev za umerjanje) ali z izračunom iz lokalnih rezultatov referenčne metode (najmanj 4 ponovitve v 2 razmazih in 4 štetjih) in rutinskih meritev z inštrumenti, ki so bili umerjeni s predhodnim kompletom vzorcev za umerjanje (minimalno 4 ponovitve merjenja).

Po potrebi lahko vzorce za umerjanje pripravimo tudi z nižjim ŠSC ali pa vzorce pripravimo z vrednostmi, ki jih določa zakonodaja. Čim bolj so referenčni materiali podobni dejanskim vzorcem v praksi, tem bolj so primerni kot referenčni material. Celice referenčnega materiala morajo izkazovati podobne analitske lastnosti kot

somatske celice vzorcev mleka posamezne vrste živali (Bulletin IDF 469, 2013). Standard ISO 13366-2/IDF 148-2 (2006) navaja tipe referenčnih materialov, ki jih lahko uporabljamo za umerjanje inštrumentov. Materiali morajo biti pripravljene pod strogo kontroliranimi pogoji in zadostiti zahtevam, podanim v navodilih ISO (ISO Guide 34, 2009). Kot referenčne materiale oz. vzorce za umerjanje se lahko uporablja:

- CRM, ki jih pripravi uradna organizacija,
- SRM, ki jih pripravi zunanji partner oz. ponudnik,
- referenčne materiale, ki si jih laboratorij pripravi sam, vendar mora biti sledljivost zagotovljena preko uporabe CRM-jev, SRM-jev ali MP.

Ustrezno območje oz. razpon ŠSC (ISO 13366-2/IDF 148-2, 2006) vzorcev za umerjanje je navedeno v Preglednici 8.

Preglednica 8: Ustrezen razpon ŠSC v vzorcih, pripravljenih za umerjanje (ISO 13366-2/IDF 148-2, 2006: 7).

Table 8: Indicative values of somatic cells in milk for relevant calibration ranges of calibration samples (ISO 13366-2/IDF 148-2, 2006: 7).

Vrsta mleka	Razpon ŠSC (celice/ml)
Kravje mleko (bazenski vzorci)	100.000 – 1.000.000
Kravje mleko (posamezne živali)	100.000 – 2.000.000
Kozje mleko	200.000 – 2.000.000
Ovčje mleko	100.000 – 2.000.000
Bivolčje mleko	100.000 – 2.000.000

Pomembna dejavnika, ki vplivata na razlike med meritvami ŠSC, sta stabilnost ter priprava in narava SRM vzorcev, ki so lahko mleko z naravno populacijo somatskih celic v vimenu ali mleko, ki so mu dodani levkociti, izolirani iz krvi (Baumgartner, 2008).

Vzorci, pripravljene za umerjanje, morajo biti shranjeni v ustrezni embalaži, posebno pozornost pa je potrebno posvetiti tudi transportu vzorcev do uporabnikov. Embalaža mora zagotoviti integriteto mleka in merjenja, torej somatskih celic, med hranjenjem in transportom. Zagotovljena mora biti popolna nepropustnost embalaže, tako za pline kot tekočine, embalažni material ne sme reagirati z mlekom ali katero od sestavin mleka ali celo sproščati snovi, ki bi lahko vplivale na štetje somatskih celic. Primerna materiala sta steklo in plastika HDPE (angl. »High Density Poly Ethylene«). Prav tako je pomembno, da so embalažne enote napolnjene do vrha, s samo toliko praznega prostora,

da vzorec pred analizo lahko premešamo do homogenosti. Na ta način preprečimo mehanske poškodbe mleka (Bulletin IDF 469, 2013).

Transport oz. dostava vzorcev morata biti čim krajša. Temperatura med transportom in hranjenjem vzorcev ne sme vplivati na integriteto referenčnega materiala. Za referenčne materiale, pripravljene na osnovi tekočega mleka, je priporočena temperatura med transportom od 2 °C do 10 °C (Bulletin IDF 469, 2013).

2.3.6 Postopki priprave referenčnih vzorcev za umerjanje

Ker ponudniki oz. laboratoriji ne uporabljajo enotnih postopkov priprave vzorcev za umerjanje, v tem poglavju navajamo nekatere primere oz. navodila. To zajema število vzorcev, homogenost in rok uporabe vzorcev, konzerviranje vzorcev ter hranjenje in transport.

Standard za F-O-E metodo (ISO 13366-2/IDF 148-2, 2006) navaja, da lahko, zaradi pomanjkanja CRM-jev za določanje ŠSC, vzorce za umerjanje pripravimo v laboratoriju, in sicer z naslednjimi postopki:

- priprava z dodatkom suspenzije levkocitov (kravjih) v sterilno ali UHT mleko,
- priprava z mikrofiltracijo mleka, kjer dobimo del z nizkim ŠSC in del z visokim ŠSC, ki ju potem med seboj ustrezno mešamo,
- priprava s centrifugiranjem.

Rok uporabe vzorcev za umerjanje mora biti najmanj en mesec (ISO 13366-2/IDF 148-2, 2006).

Za vsa umerjanja je najbolj pomembno, da so umeritveni vzorci podobni oz. reprezentativni glede na rutinske vzorce, kar pomeni isti tip mleka, na primer mleko posameznih krav, črede, bazensko mleko, mleko v proizvodnji, obdelan in konzerviran z enakimi postopki ter da izvira z istega območja iz istega časovnega obdobja (ISO 8196-2/IDF 128-2, 2009). Za umerjanje ne smemo uporabljati kolostruma, mastitičnega mleka in mleka slabe fizikalno-kemijske kakovosti. Odstopanja okoljskih dejavnikov pri transportu, konzerviranju in hranjenju vzorcev morajo biti čim manjša. Večji razpon v koncentraciji določene komponente pri umerjanju pomeni bolj točno določitev umeritvene krivulje (ISO 8196-2/IDF 128-2, 2009).

Število vzorcev za umerjanje je odvisno od cilja laboratorija, če gre denimo za analizo vzorcev posameznih živali, čred ali bazenskih vzorcev, točnosti metode in heterogenosti populacije vzorcev, ki jih laboratorij analizira (ISO 8196-2/IDF 128-2, 2009). Tako se lahko število vzorcev giblje med 100 (mleko posameznih krav) in 6 (bazensko/skupno mleko). Število vzorcev je torej odvisno od namena uporabe. V praksi se najpogosteje umerja inštrumente z alternativnimi umeritvenimi vzorci za kar je potrebno najmanj

devet vzorcev z ustreznim razponom določene sestavine (ISO 8196-2/IDF 128-2, 2009; Bulletin IDF 469, 2013).

Posamezen vzorec za umerjanje se pripravi v večji količini in se ga nato razdeli oz. razlije v več podvzorcev. Razlivanje v podvzorce se izvede vedno, saj se mora umeritvene vzorce poslati več laboratorijem, kjer analize potekajo z različnimi metodami oz. inštrumenti, ter meritve opravijo v različnih časovnih intervalih. Razlivanje mora biti čim bolj homogeno, ob neprekinjenem mešanju. Ustreznost razlivanja oz. homogenost moramo potrditi s standardiziranim (ISO 13528, 2005) postopkom. Med ŠSC pri podvzorcih na vsaki posamezni ravni oz. umeritvenem vzorcu ne sme biti statistično značilnih razlik. V ta namen se za meritve lahko uporabijo avtomatski inštrumenti. Minimalno število podvzorcev za ugotavljanje homogenosti naj bi bilo 5 % od vseh pripravljenih podvzorcev, oziroma minimalno 20 podvzorcev, če je skupno število podvzorcev manjše od 400 (Bulletin IDF 469, 2013), medtem ko standard ISO 13528 (2005) predpisuje najmanj 10 podvzorcev za ugotavljanje homogenosti.

Prav tako je treba preveriti rok uporabe vzorcev s standardiziranim (ISO 13528, 2005) postopkom. To pomeni meritve na koncu roka uporabe. Stabilnost vzorcev je treba preveriti tudi med transportom, in sicer pri najbolj kritičnih pogojih. Med ŠSC pri podvzorcih na koncu roka uporabe oz. transporta in ob pripravi, ki velja za vsako posamezno raven (umeritveni vzorec), ne sme biti statistično značilnih razlik (Bulletin IDF 469, 2013).

Standard ISO 13366-2/IDF 148-2 (2006) navaja, da se kot konzervansi lahko uporabljajo borova kislina (H_3BO_3), natrijev azid (NaN_3), bronopol (2-bromo-2-nitro-1,3-propandiol) in kalijev dikromat ($K_2Cr_2O_7$), seveda v predpisanih maksimalnih koncentracijah v vzorcu.

Najbolj uporaben konzervans, uporablja ga 95 % laboratorijev v svetu, je bronopol in sicer v končnih koncentracijah v mleku od 0,02 % do 0,1 % (Orlandini, 2012).

Da se konzervirane vzorce jasno loči od nekonzerviranih vzorcev je konzervansom lahko dodano barvilo, ki vzorce obarva. Konzervans in indikatorsko barvilo ne smeta pomembno vplivati na rezultate analize referenčnih materialov. Rezultati morajo biti primerljivi z rezultati analiz nekonzerviranih vzorcev (Bulletin IDF 469, 2013). Pri vzorcih, ki se analizirajo z referenčno metodo, koncentracija bronopola ne sme presegati 0,05 g/100 ml vzorca. Konzervirani vzorci se do analize lahko hranijo do 6 dni pri $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ (ISO 13366-1/IDF 148-1, 2008).

O možnem učinku konzervansa bronopola pri določanju ŠSC je razpravljal že Ardö (1982). Menil je, da bronopol verjetno povzroči večjo penetracijo etidijevega bromida v celice, zato dajo močnejši fluorescentni signal pri inštrumentih Fossomatic.

Seškna in Jankevica (2007) navajata, da so za konzerviranje mleka za analize z inštrumentalnimi metodami najbolj primerni konzervansi bronopol, natrijev azid in azidiol. Vzorce so konzervirali z različnimi konzervansi in jih hranili pri 4 °C in 20 °C. Ugotovili so, da se rezultat ŠSC med hranjenjem vzorcev pri 4 °C v obdobju 96 ur ni značilno spremenil, pri vzorcih konzerviranih s H₃BO₃ in C₆H₇KO₂ ter hranjenih pri 20 °C pa se je rezultat ŠSC močno znižal. Kot možen vzrok navajajo zmanjšanje prepustnosti celičnega ovoja, ki ga povzroči konzervans pri 20 °C, kar privede do slabšega obarvanja DNK z barvilom in posledično slabo detekcijo s F-O-E detektorjem.

Gonzalo in sodelavci (2004) so primerjali rezultate določanja ŠSC v ovčjem mleku z inštrumentom Fossomatic 5000 in referenčno metodo (barvilo »pyronin Y-methyl green«). Pri študiji regresije so ugotovili, da se naklon premice in odsek na ordinati statistično značilno razlikujeta od teoretičnih vrednosti 1 in 0 pri nekonzerviranih vzorcih, pri konzerviranih (bronopol, natrijev azid, kalijev dikromat) pa ne. Prav tako so konzervirani vzorci dali tudi optimalne vrednosti za ponovljivost. Navajajo, da je bronopol najbolj optimalen konzervans, kadar določamo ŠSC z inštrumentom Fossomatic, ki deluje na principu F-O-E metode.

Številni raziskovalci so proučevali načine hranjenja vzorcev pri različnih temperaturah. Konzervirane vzorce lahko hranimo do 25 dni pri temperaturi 4 °C, za daljša obdobja (od 25 do 105 dni) pa naj bi se vzorce, konzervirane z bronopolom, zamrznilo (Sanchez in sod., 2005). Vrednosti za ŠSC se med shranjevanjem vzorcev pri 4 °C znižajo (Barbano in sod., 2011; Erdem in sod., 2012; IDF Bulletin 466, 2013), vendar pa Erdem in sodelavci (2012) ugotavljajo, da se rezultati ŠSC po petnajstih dneh niso značilno razlikovali od rezultatov ŠSC v svežem mleku. Marzo in Barbano (2012) podobno opažata pri vzorcih iz posnetega in konzerviranega (bronopol) mleka, in sicer, da dva tedna shranjevanja vzorcev, najprej hranjeni pri -80 °C 24 ur, nato pri -20 °C, ni vplivalo na rezultat povprečnega ŠSC. Vendar pa drugi avtorji navajajo, da se vrednosti za ŠSC med shranjevanjem zamrznjenih vzorcev znižajo (Barkema in sod., 1997; Malinowski in sod., 2008; Marzo in Barbano, 2012; Erdem in sod., 2012). Podobno navaja standard ISO 13366-2/IDF 148-2 (2006), da zamrzovanje vzorcev za določanje ŠSC ni zaželeno, saj se vrednosti pri štetju lahko znižajo kar za 10 % do 20 %. Posledica poškodb somatskih celic je porast števila manjših celičnih fragmentov v vzorcu mleka, ki se med analizo obarvajo. Manjša fluorescenca teh fragmentov spremeni velikost impulza pri F-O-E števcih, kar seveda moti pravilno razlikovanje med šumom in pravimi impulzi SC. To se nato odraža v rezultatu kot nižje ŠSC od dejanskega.

Moon in sodelavci (2012) so razvili postopek priprave vzorcev za umerjanje, ki so stabilni do 5 mesecev. Mleku so dodali 10 % formaldehida in somatske celice ločili s centrifugiranjem. Dobljeno suspenzijo somatskih celic so konzervirali z glicerinom, thimerosalom in dimetil sulfoksidom (angl. »*dimethyl sulfoxide*«) in jo razredčili s posnetim mlekom, da so dobili tri različne nivoje ŠSC v razponu od 200.000 do 650.000 celic/ml. ŠSC so izmerili z referenčno metodo. Po 5 mesecih skladiščenja pri temperaturi od 2 °C do 6 °C ni bilo statistično značilnih razlik v ŠSC.

Na voljo so tudi že novi materiali za umerjanje rutinskih metod, ki imajo zelo dolg rok uporabe zaradi uporabe postopka globokega zamrzovanja. Ker so serije tako hranjenih vzorcev lahko velike in se hranijo tudi po nekaj let, se visoki stroški analiz z referenčno metodo v več laboratorijih lažje krijejo, saj so pri pripravi večjih serij vzorcev za umerjanje stroški analiz z referenčno metodo na vzorec manjši. Referenčne vrednosti materiala so v takem primeru natančnejše in zanesljive, vzorci pa se lahko uporabijo kadarkoli jih potrebujemo (Baumgartner, 2008).

Barbano in sodelavci (2011) so preskušali različne postopke priprave vzorcev za umerjanje fluoro-opto-elektronskih števec, ki so temeljili na gravimetrični separaciji in centrifugiranju mleka, kar je tudi ena izmed možnih priprav umeritvenih vzorcev, omenjena v standardu ISO 13366-2/IDF 148-2 (2006) in v Bulletin IDF 469 (2013). Z omenjenima postopkoma so pridobili vzorce mleka z nizko koncentracijo in visoko koncentracijo somatskih celic. Dobljene osnovne vzorce so konzervirali z bronopolom in jih analizirali v dveh različnih laboratorijih z referenčno metodo. Nato so z natančnim mešanjem osnovnih vzorcev z nizko in visoko koncentracijo SC pripravili umeritvene vzorce, kjer je bilo v posameznem kompletu 12 vzorcev. ŠSC v vzorcih se je gibalo v razponu od 5.000 do 950.000 celic/ml. Vzorce so hranili pri 4 °C. Ugotovili so, da ima tak način priprave umeritvenih standardov za štetje somatskih celic, nekaj prednosti (Barbano in sod., 2011):

- zmanjša število meritev z referenčno metodo; izmeri se npr. samo dva vzorca, nato pa se z njunim natančnim mešanjem pripravi 12 umeritvenih vzorcev,
- pripravimo lahko vzorce s širokim razponom in enakomerno porazdelitvijo ŠSC.

V anketi, izvedeni med ponudniki referenčnih materialov (Ninane in sod., 2010b), jih je 13 vrnilo izpolnjen vprašalnik (11 iz Evrope, 1 iz ZDA in 1 iz južne Amerike). Ponudniki so pripravljali referenčne materiale za laboratorije v okviru vzrejnih programov, laboratorije v sistemih plačevanja mleka in laboratorije za kontrolo zdravstvenega stanja živali. Zaključki ankete so bili, da so referenčni materiali pripravljani iz surovega ali toplotno obdelanega mleka, z naravno prisotnimi somatskimi celicami, le v določenih primerih pa je izvor celic kakšen drug matriks. Razlike so bile tudi v razponu ŠSC in sicer od 200.000 do 500.000 celic/ml ali od 50.000 do 1.000.000 celic/ml, ter deklariranem roku uporabe vzorcev, ki je bil od 7 do

180 dni, odvisno od priprave vzorcev (toplotna obdelava mleka, konzerviranje surovega mleka). Tudi Moon in sodelavci (2012) navajajo, da so za umerjanje elektronskih števec za določanje ŠSC kot referenčni material najpogosteje na voljo vzorci surovega mleka, konzervirani z bronopolom, borovo kislino, natrijevim azidom ali kalijevim dikromatom in z rokom uporabe le do 6 dni pri temperaturi $4\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$.

2.3.7 Načini določanja referenčnih vrednosti za umeritvene vzorce

Laboratoriji oz. ponudniki referenčnih materialov uporabljajo različne načine določanja oz. zasidranja ravni oz. vrednosti vzorcev za umerjanje (Orlandini in van den Bijgaart, 2011).

Težko najdemo sekundarne referenčne materiale, ki so okarakterizirani v večjih MP, to pomeni z udeležbo petih ali več ekspertnih laboratorijev, in ki zagotavljajo visoko kakovostne vrednosti za umerjanje rutinskih inštrumentov. To naj bi bila posledica visokih stroškov takih meritev, pa tudi posledica nerazvite kulture sodelovanja med konkurenčnimi laboratoriji in sistemi ter posledica medsebojnega nezaupanja, ko pride do diskusije o kakovosti rezultatov analiz in skladnih oz. neskladnih analitskih postopkih (Baumgartner, 2008).

Slaba natančnost referenčne metode vodi k visoki stopnji negotovosti pri oceni referenčne vrednosti. To lahko upoštevamo ali pa obidemo z dodatnimi ukrepi (Bulletin IDF 469, 2013):

- stabilizacija pripisane referenčne vrednosti med posameznima zaporednima serijama - rezultate meritev z referenčno in inštrumentalno metodo, dobljene z analizo istega referenčnega materiala, lahko združimo in s tem učvrstimo robustnost pripisane referenčne vrednosti z večjim številom podatkov in omejimo verjetna odstopanja v daljšem časovnem obdobju. Tako združevanje pomembno zniža negotovosti ocenjene referenčne vrednosti. Vsekakor pa morajo biti inštrumenti pri takem združevanju podatkov predhodno že ustrezno umerjeni.
- obvladovanje slučajnih napak (ponovljivost in obnovljivost) - robustne in točne pripisane referenčne vrednosti se običajno dobijo z izračunom povprečja rezultatov več laboratorijev. Večje število laboratorijev in ponovitev analize zmanjša negotovost ocenjene vrednosti in posledično bolj približa k oceni prave oz. nepoznane vrednosti. Priporočeno je izvesti vsaj dve meritvi za posamezno stekleničko oz. embalažno enoto, potrebni sta najmanj dve steklenički za posamezen vzorec, sodelovati pa mora najmanj enajst laboratorijev in sicer z obema metodama, tako z referenčno kot z rutinsko. Najbolj učinkovit način, ki prispeva k manjši negotovosti, je povečanje števila sodelujočih laboratorijev, s čimer se avtomatsko poveča število ponovitev in število vzorcev.

Pripisana vrednost je vrednost, pripisana določeni veličini, ki je včasih z dogovorom sprejeta kot tista vrednost, ki ima za dani namen primerno negotovost (ISO 13528, 2005; Mednarodni slovar ... , 1999).

Standard ISO 13366-2/IDF 148-2 (2006) navaja, da naj bi bile referenčne vrednosti za umerjanje določene s ponavljanjem analiz referenčne metode, ki je opisana s standardom ISO 13366-1/IDF 148-1, po možnosti v najmanj dveh različnih laboratorijih. Paralelno ponavljajoče se določanje ŠSC v umeritvenih vzorcih z inštrumenti, točno umerjenimi s še veljavnimi predhodnimi umeritvenimi vzorci, lahko koristno pripomore k zmanjšanju nihanj pri določanju ŠSC v daljšem časovnem obdobju. Nekako naj bi veljalo, da je pri takem načinu izračuna referenčnih vrednosti lahko razlika med rezultati referenčne metode in inštrumentalnim določanjem ŠSC za posamezen umeritveni vzorec manjša od 10 % (ISO 13366-2/IDF 148-2, 2006) oz. se ta kritična razlika določi z izračunom (Bulletin IDF 469, 2013). V takih primerih lahko vrednosti, dobljene z referenčno metodo in inštrumentalnim določanjem ŠSC združimo z izračunom povprečja oz. upoštevanjem utežnih faktorjev posamezne metode (Bulletin IDF 469, 2013; ISO 13366-2/IDF 148-2, 2006). Standard za F-O-E metodo (ISO 13366-2/IDF 148-2, 2006) pa celo navaja, da morajo biti rezultati referenčne metode pri določanju referenčne vrednosti vključeni z utežnim faktorjem najmanj 0,5.

Ramsahoi (2015) ugotavlja, da če pri umerjanju inštrumentov uporabimo samo rezultate referenčne metode, težko dobimo ustrezno linearnost umeritvene krivulje. Krivulja je imela bolj obliko parabole kot premice, saj so rezultati med referenčno in F-O-E metodo velikokrat odstopali za več kot 10 %. Z upoštevanjem meritev z inštrumenti pa sta se pri izračunih referenčnih vrednosti izboljšali tako linearnost kot tudi točnost meritev.

Za preprečevanje sistematičnega odstopanja, to je ko vsi laboratoriji odstopajo v eno smer, in za pridobitev soglasja vseh laboratorijev ter ostalih udeležencev in strank, pripisane referenčne vrednosti ne sme postaviti en sam laboratorij, temveč vsi laboratoriji v skupini. Če pri umeritvenih vzorcih vpliva matriksa na rutinske metode ni, so tako lastnosti mleka manj pomembne, pomembna pa je fizikalno-kemijska kakovost in koncentracijsko območje merjenih komponent. Referenčne vrednosti se določijo kot povprečje meritev z referenčnimi metodami vseh sodelujočih laboratorijev v MP. Enak pristop se uporabi tudi, kadar je vpliv matriksa prisoten, npr. kadar uporabljamo mleko z določenega področja. Če opazimo odstopanje zaradi vpliva matriksa, se moramo odločiti, ali umerjanje sploh izvedemo. Pripisane vrednosti se v takem primeru uporabi za pred-umerjanje (ocenjevanje naklona, linearnosti,...), medtem ko se umerjanje dopolni z uporabo enega ali pa več reprezentativnih bazenskih vzorcev mleka s tega področja (Leray, 2009). Hanuš in sodelavci (2011) poudarjajo tudi pomembnost specifičnega umerjanja glede na mleko različnih vrst živali (koze, ovce,...).

Iz ankete, izvedene med ponudniki referenčnih materialov, se je pokazalo, da za določanje referenčnih vrednosti ponudniki uporabljajo različne sheme in tehnike. Nekateri se zanašajo na izvedbo referenčne metode v lastnem laboratoriju, drugi združujejo rezultate referenčne in rutinske metode dobljene v manjšem obsegu analiz ali iz obsežnejših MP. Zaradi enakovrednosti je pomembno povezovanje med ponudniki referenčnih materialov. Priporočljivo je, da se ponudniki referenčnih materialov primerjajo med seboj ali pa sodelujejo v MP, ki jih organizirajo različni ponudniki (Ninane in sod., 2010b).

Mnogo MP uporablja izračunana povprečja po izločitvi osamelcev kot oceno za pravo vrednost. Je pa izločitev osamelcev pomemben kritičen postopek pred izračunom povprečij in standardnih odklonov (Linsinger in sod., 1998).

2.3.8 Postopek umerjanja F-O-E inštrumentov za določanje ŠSC

Skladno z navodili standarda ISO 13366-2/IDF 148-2 (2006) mora biti inštrument preverjen, da pravilno deluje in izpolnjuje zahteve, ki jih navaja omenjeni standard za meritve slepega vzorca, preveriti je potrebno učinek morebitnega prenosa iz enega na drug vzorec (angl. »*carry-over effect*«), preveriti je potrebno pravilno doziranje vseh kemikalij in ali se dosegajo vrednosti za ponovljivost pri merjenju vzorcev. Če med rutinsko in referenčno metodo obstaja linearna zveza, se za namene umerjanja uporablja enostavna linearna regresija, ocene parametrov pa se izračuna po metodi najmanjših kvadratov (ISO 8196-2/IDF 128-2, 2009). Za F-O-E metodo se predpostavlja, da se za umerjanje lahko uporabi linearno regresijo (ISO 13366-2/IDF 148-2, 2006). Postopek umerjanja je potrebno izvesti skladno z navodili standarda ISO 8196-2/IDF 128-2 z uporabo najmanj petih umeritvenih vzorcev, tako da se zajame ustrezen razpon ŠSC (ISO 13366-2/IDF 148-2, 2006). Umerjanje naj bi se preverjalo vsak mesec. Razmerje med meritvami inštrumenta in referenčnimi vrednostmi naj bi bilo znotraj ustreznega območja ŠSC linearno (ISO 13366-2/IDF 148-2, 2006). Pri umerjanju je treba posamezen vzorec izmeriti najmanj dvakrat (ISO 8196-2/IDF 128-2, 2009).

Preden se umerjanje izvede, je potrebno preveriti, da (ISO 8196-2/IDF 128-2, 2009):

- inštrument in njegove nastavitve ustrezajo navodilom standarda ali proizvajalca,
- je, če ni drugače navedeno, zveza med inštrumentalnimi meritvami in koncentracijami komponente, ki jo določamo, v določenem koncentracijskem območju linearna,
- vrednosti za ponovljivost in točnost inštrumenta ustrezajo vrednostim, podanim v standardu za določeno metodo.

Za točno oceno umeritvene krivulje morata biti izpolnjena dva pogoja (ISO 8196-2/IDF 128-2, 2009):

- vzorci za umerjanje morajo pokriti celotno območje koncentracije določene komponente,
- standardni odklon ostanka iz regresije mora biti čim manjši.

Izračuni pri umerjanju temeljijo na modelu enostavne linearne regresije, kjer se ocene parametrov izračuna po metodi najmanjših kvadratov, s prednostnim prvim pogojem, da je porazdelitev ostankov preko celotnega obsega umerjanja približno enaka (ISO 8196-2/IDF 128-2, 2009). Izračuna se umeritvena enačba (premica) in sicer tako, da se za vrednosti odvisne spremenljivke upošteva referenčne vrednosti dobljene z referenčno metodo, za vrednosti neodvisne spremenljivke pa rezultate dobljene z inštrumentom (ISO 8196-2/IDF 128-2, 2009).

Glede na dobljeni vrednosti za naklon (b) in odsek na ordinati (a) se te vrednosti v inštrumentu prilagodi skladno z navodili proizvajalca določenega inštrumenta. Vsekakor pa je treba umeritev nato preveriti (ISO 8196-2/IDF 128-2, 2009).

Umerjanje je treba ponoviti oz. izvesti, kadar se razmerje vrednosti med meritvami inštrumenta in referenčne metode spremeni (ISO 8196-2/IDF 128-2, 2009). To se po navadi pojavi:

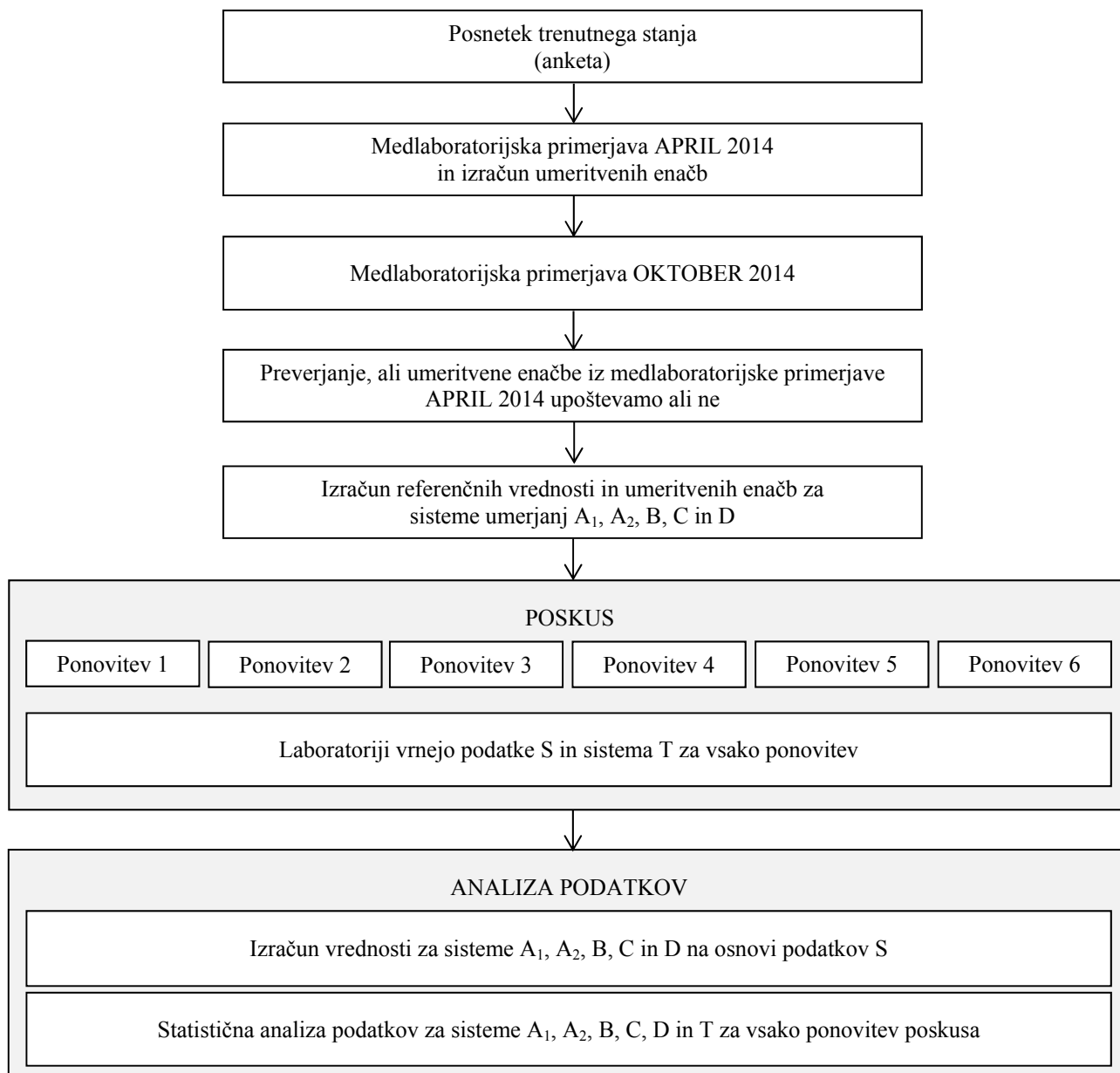
- pri popravilu ali servisiranju glavnih komponent inštrumenta,
- ko se lastnosti ali sestava preiskovanega matriksa spremeni, na primer zaradi vpliva sezone.

Možna je tudi uporaba sistema centraliziranega umerjanja (Leray, 2009; ISO 8196-2/IDF 128-2, 2009). To lahko izvede referenčni laboratorij, ki standardizira in umeri referenčni oz. »*Master instrument*«
glede na specifično metodo. Nato se z uporabo primernih vzorcev umeritev referenčnega inštrumenta prenese na identične inštrumente v drugih laboratorijih (ISO 8196-2/IDF 128-2, 2009). Poleg tega je na tak način možno optimizirati tako kakovost umeritvenih vzorcev kot tudi uskladiti referenčne rezultate na enake vrednosti za vse laboratorije. Tak sistem umerjanja je tudi enostavno povezati z medlaboratorijskimi primerjavami, kar omogoča optimalno določitev pravih referenčnih vrednosti za umerjanje (Leray, 2009).

Nekateri proizvajalci inštrumentov ponujajo za dnevno kontrolo pravilnega delovanja inštrumenta vzorce z umetnimi delci (ISO 13366-2/IDF 148-2, 2006).

3 MATERIALI IN METODE

Glede na postavljene hipoteze smo izdelali potek dela, ki je predstavljen v spodnji sliki.



Opombe: Ponovitev 1 do 6 - poskus smo ponovili šestkrat in sicer enkrat mesečno v obdobju od novembra 2014 do vključno aprila 2015; podatki S - meritve na inštrumentih z nastavitvami za naklon 1 in odsek na ordinati 0; sistem T - meritve na inštrumentih z mesečnimi nastavitvami za naklon in odsek na ordinati.

Slika 6: Potek dela.

Figure 6: Flow chart of the work.

3.1 MATERIALI

3.1.1 Vzorci

Vzorci surovega kravjega mleka z različnim številom somatskih celic (v nadaljevanju vzorci) za medlaboratorijsko primerjavo (MP) APRIL 2014 in MP OKTOBER 2014 ter poskus, ki smo ga izvedli v šestih ponovitvah od novembra 2014 do aprila 2015, smo pripravili v laboratoriju Inštituta za mlekarstvo in probiotike (IML-PRO), Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani.

Splošne značilnosti vzorcev:

- osnovna surovina oz. matriks je bilo bazensko surovo kravje mleko in mleko posameznih krav,
- vzorce smo pripravili z mešanjem vzorcev z visokim in nizkim številom somatskih celic,
- izvor somatskih celic so bile celice, naravno prisotne v surovem kravjem mleku,
- vzorce smo konzervirali z bronopolom v končni koncentraciji do 0,04 %.

Temperaturo v hladilnikih za hranjenje mleka in vzorcev, smo v celotni raziskavi beležili s temperaturnim datalogerjem vsake štiri ure.

3.1.1.1 Vzorci v medlaboratorijski primerjavi APRIL 2014

Osnovna surovina je bilo bazensko surovo kravje mleko (B) in mleko štirih posameznih krav (K) s povečanim številom somatskih celic. Osnovno surovino smo takoj po molži konzervirali z bronopolom in nato shranili v hladilniku do naslednjega dne (< 24 ur), ko smo z njihovim ustreznim mešanjem pripravili pet vzorcev. Za potrebe MP APRIL 2014 smo nato vsak vzorec razlili v podvzorci in jih v kompletu po pet vzorcev v okviru mednarodne MP, ki jo je organiziral IML-PRO, poslali enajstim laboratorijem. V preglednici 9 so navedene lastnosti uporabljenih vzorcev v MP APRIL 2014.

Preglednica 9: Lastnosti vzorcev uporabljenih v MP APRIL 2014.

Table 9: Characteristics of samples used in interlaboratory comparison APRIL 2014.

Lastnost	Vzorec				
	1	2	3	4	5
Način priprave	B+K	K	K	K+K	K
ŠSC (1000/ml)	187	474	579	843	1.355

Opomba: ŠSC izmerjeno z inštrumentom Fossomatic 5000, FOSS, Danska. B je bazensko mleko, K je mleko štirih posameznih krav.

3.1.1.2 Vzorci v medlaboratorijski primerjavi OKTOBER 2014

Osnovna surovina je bilo bazensko surovo kravje mleko in mleko posamezne krave s povišanim številom somatskih celic. Bazensko mleko 1 (B1), ki smo ga odvzeli v količini dvakrat po dvajset litrov za pripravo posnetega mleka (B1.1 in B1.2), in mleko posamezne krave (K) smo odvzeli na Centru za razvoj kmetijstva in podeželja Jable, Loka pri Mengšu. Bazensko mleko 2 (B2) smo odvzeli na Kmetiji Kastelic, Sneberje, Ljubljana. Vse mleko, razen bazenskega mleka 1, smo takoj po molži konzervirali z bronopolom in nato shranili v hladilniku pri temperaturi pod 7 °C do naslednjega dne (< 24 ur), ko smo pripravili vzorce za MP. Bazensko mleko 1 smo shranili v hladilniku pri temperaturi pod 7 °C do naslednjega dne, ko smo posneli na površju izločeno maščobo in ga tudi nato konzervirali. Ker smo s posnemanjem odstranili tudi precejšen del somatskih celic, smo tako dobili mleko z nizkim številom somatskih celic (≈ 50.000 celic/ml). Osnovna sestava in lastnosti mleka, ki smo ga uporabili za pripravo vzorcev v MP OKTOBER 2014 so podani v Preglednici 10.

Preglednica 10: Lastnosti mleka za pripravo vzorcev v MP OKTOBER 2014.

Table 10: Characteristics of milk used for sample preparation in interlaboratory comparison OCTOBER 2014.

Lastnost	Surovina				Zahteve podane v Bulletin IDF 469 (2013)
	Bazensko mleko 1	Bazensko mleko 1 (2×20L) po posnemanju in konzervirano B1.1 / B1.2	Bazensko mleko 2	Mleko posamezne krave	Priporočeno bazensko mleko
Izvor in priprava	neposneto in nekonzervirano		neposneto in konzervirano	neposneto in konzervirano	
ŠSC (1000/ml)	352	59 / 35	195	7.130	<400
SŠMO (KE/ml)	24.000	ni podatka	60.000	ni podatka	25.000
Zmrziščna točka (°C)	-0,518	-0,535 (-0,520*) / -0,534 (-0,519*)	-0,531 (-0,516*)	-0,535 (-0,520*)	med -0,512 in -0,525
Maščoba (g/100 ml)	4,15	2,61 / 2,34	4,59	6,28	ni podatka
Beljakovine (g/100 g)	3,37	3,42 / 3,43	3,46	4,21	ni podatka
Laktoza (g/100 g)	4,64	4,70 / 4,72	4,66	4,40	ni podatka

Opombe: ŠSC izmerjeno z inštrumentom Fossomatic 5000, FOSS, Danska; SŠMO izmerjeno z inštrumentom BactoScan FC 65+, FOSS, Danska; zmrziščna točka, maščoba, beljakovine in laktoza, izmerjeno z inštrumentom MilkoScan FT 6000, FOSS, Danska.

*Preračun na nekonzervirano mleko - pri uporabi bronopola v priporočeni koncentraciji (približno 0,44 mg/ml) se zmrziščna točka mleka zniža za približno 0,015 °C (Williams in sod., 2007; IDF 108B, 1991). B1.1 prvih 20L, B1.2 drugih 20L.

Za potrebe MP OKTOBER 2014 smo iz osnovnih surovin pripravili devet vzorcev, ki smo jih razlili v podvzorce in jih v kompletu po devet vzorcev v okviru mednarodne MP, ki jo je organiziral IML-PRO, poslali enajstim laboratorijem. V preglednici 11 so navedene lastnosti vzorcev, ki smo jih pripravili v MP OKTOBER 2014.

Preglednica 11: Lastnosti vzorcev uporabljenih v MP OKTOBER 2014.

Table 11: Characteristics of samples used in interlaboratory comparison OCTOBER 2014.

Lastnost	Vzorec								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Način priprave	B1.2	B2	B1.2+K	B1.2+K	B1.2+K	B1.1+K	B1.1+K	B1.1+K	B1.1+B2+K
ŠSC (1000/ml)	32	194	365	473	583	680	836	1.107	1.317

Opombe: ŠSC izmerjeno z inštrumentom Fossomatic 5000, FOSS, Danska. B1.1 je bazenski vzorec prvih 20L, B1.2 je bazenski vzorec drugih 20L, B2 je bazenski vzorec 2, K je mleko posamezne krave, ki smo ga dodajali vzorcem bazenskega mleka v različnih količinah.

3.1.1.3 Vzorci v poskusu

Tudi v poskusu je bila osnovna surovina bazensko surovo kravje mleko in mleko posameznih krav z različnim številom somatskih celic, ki smo ga za vsako ponovitev poskusa na novo pridobili z različnih farm. Vse mleko je bilo po molži konzervirano z bronopolom in nato hranjeno v hladilniku pri temperaturi pod 7 °C do priprave vzorcev naslednji dan (< 24 ur). Kadar smo potrebovali mleko z nizkim ŠSC, smo bazenskemu mleku po hranjenju preko noči v hladilniku posneli maščobo, ki se je izločila na površju, s čimer pa smo odstranili tudi precejšen del somatskih celic. Pri pripravi nekaterih vzorcev smo za povišanje števila somatskih celic dodajali smetano, ki smo jo odstranili med posnemanjem.

V ponovitvah poskusa smo iz osnovnih surovin pripravili po pet vzorcev, ki smo jih razlili v podvzorce in jih v kompletu po pet vzorcev pošiljali šestim laboratorijem. Razpon ŠSC je bil prilagojen potrebam slovenskih laboratorijev, ki so sodelovali v poskusu. V preglednici 12 so navedene lastnosti uporabljenih vzorcev v posamezni ponovitvi poskusa.

Preglednica 12: Lastnosti vzorcev uporabljenih v posamezni ponovitvi poskusa.

Table 12: Characteristics of samples used in individual repetition of the experiment.

Ponovitev poskusa	Način priprave in ŠSC (1000/ml)				
	1	2	Vzorec 3	4	5
1	K 37	B 245	B+K+S 575	K 835	PB+S 1.306
2	B 170	K 392	K 675	B+K 263	B+K+S 1.000
3	K+K 112	B 233	K 642	PB+K+K 1.015	PB+K+K 1.392
4	B 129	B 261	PB+K 459	PB+K 770	PB+K 1.729
5	B 155	K 285	K 539	K 777	K+S 1.061
6	B 153	B 297	PB+K 487	K 846	PB+K 1.309

Opombe: ŠSC izmerjeno z inštrumentom Fossomatic 5000 (FOSS, Danska). B je bazensko mleko, PB je posneto bazensko mleko, K je mleko posameznih krav, S je smetana posneta z bazenskega mleka.

3.1.2 Inštrumenti

Zaradi poslovne korektnosti identifikacije laboratorijev, ki so sodelovali v celotni raziskavi, ne navajamo.

V MP APRIL 2014 je sodelovalo enajst laboratorijev in sicer en z referenčno metodo, ki je uporabljal mikroskop, devet laboratorijev s F-O-E metodo, ki so uporabljali inštrumente dveh različnih proizvajalcev in en laboratorij, ki je sodeloval z metodo z obarvanimi lističi in ustreznim števcem, ki pa je bil kasneje izločen iz vseh nadaljnjih izračunov zaradi neustreznih rezultatov.

V MP OKTOBER 2014 je prav tako sodelovalo enajst laboratorijev in sicer dva z referenčno metodo (uporaba mikroskopa), devet pa s F-O-E metodo, ki so uporabljali inštrumente dveh različnih proizvajalcev.

Laboratoriji, ki so sodelovali v poskusu, so uporabljali inštrumente in metode, navedene v Preglednici 13. Navedeni so tudi proizvajalci in tipi inštrumentov, kar smo pridobili z anketo. Vsi inštrumenti delujejo na principu pretočne citometrije.

Preglednica 13: Proizvajalci in tipi inštrumentov ter metode v poskusu.

Table 13: Manufacturers and types of the instruments used in experiment.

Laboratorij	Inštrument	Metoda
1	Fossomatic 5200, FOSS, Danska	F-O-E
2	Fossomatic 5000, FOSS, Danska	F-O-E
3	Fossomatic 5000, FOSS, Danska	F-O-E
4	Somacount FC, Bentley, ZDA	F-O-E
5	Fossomatic FC, FOSS, Danska	F-O-E
6	Fossomatic 5000, FOSS, Danska	F-O-E

Za ugotavljanje lastnosti mleka za pripravo vzorcev v MP OKTOBER 2014 smo uporabili inštrumenta BactoScan FC 65+ in MilkoScan FT 6000 proizvajalca FOSS, Danska.

Sledljivost sodelujočih laboratorijev med celotno raziskavo je podana v Prilogi C1.

3.1.3 Kemikalije

- Bronopol (2-bromo-2-nitropropan-1,3-diol), komercialno dostopen konzervans v obliki tablet, Broad Spectrum Microtabs II, Part# 954, Advanced instruments Inc., ZDA, 1 tabletko na 40 ml mleka
- Komplet kemikalij za določanje števila somatskih celic v mleku z inštrumentom Fossomatic 5000 proizvajalca FOSS, Danska
- Komplet kemikalij za določanje skupnega števila mikroorganizmov v mleku z inštrumentom BactoScan FC 65+ proizvajalca FOSS, Danska
- Komplet kemikalij za določanje vsebnosti maščobe, beljakovin in laktoze v mleku ter določanje zmrziščne točke mleka z inštrumentom MilkoScan FT 6000 proizvajalca FOSS, Danska
- Laboratorijska destilirana in mikrofiltrirana voda tip 1, Milli-Q
- Laboratorijska destilirana voda tip 3, Milli-RO
- Kemikalije, ki so jih uporabili laboratoriji v primerjavah, so originalne kemikalije proizvajalcev inštrumentov

3.1.4 Laboratorijska oprema in material

- Vodna kopel, WB-60E, Kambič d.o.o., Semič, Slovenija
- Vodna kopel, VKNP 603530, Marjan Krokter s.p., Ljubljana-Črnuče, Slovenija
- Hladilnik, HOM 1300, LTH Škofja Loka, Slovenija
- Hladilnik, HO 1300, LTH Škofja Loka, Slovenija
- Temperaturni dataloger model HI140GH in IR-čitalec, Hanna Instruments; ZDA
- Sistem za pripravo laboratorijske destilirane vode, Milli-RO in Milli-Q, EMD Millipore, ZDA
- Plastenka ABC 60 ml s pokrovčkom, plastenka iz HDPE (polietilen visoke gostote), pokrovček iz polipropilena (PP), plomba pokrovčka iz LDPE (polietilen nizke gostote), Lipis d.o.o., artikel GA1051K
- Vzorčna plastenka 50 ml, polipropilen (PP), Žikplast Žitnik Anja s.p.
- Mreže za vzorčne platenke
- Pladnji
- Laboratorijske steklenice
- Merilni valji
- Zajemalka
- Lij, cedilo
- Plastična embalaža 10 L za zbiranje mleka
- Hladilna telesa za transport vzorcev
- Stiropor škatle za transport vzorcev

3.2 METODE

3.2.1 Metode določanja števila somatskih celic v mleku

Tako direktna mikroskopska metoda, ki je referenčna metoda, kot inštrumentalna F-O-E metoda sta standardizirani metodi za določanje števila somatskih celic v mleku. Vsi laboratoriji so izvajali analize po navodilih standardov oziroma po navodilih proizvajalcev inštrumentov.

3.2.1.1 Direktna mikroskopska metoda

Metoda je točno opisana in opredeljena s standardom ISO 13366-1/IDF 148-1 (2008), sam princip metode pa temelji na razmazu vzorca mleka na stekelce. Razmaz nato posušimo. Barvilo, ki je lahko raztopina barvila metilensko modro modificirana po Newman in Lampert ter Levowitz in Weber ali raztopina etidijevega bromida v vodi, se lahko doda vzorcu mleka pred pripravo razmaza ali pa se posušen razmaz potopi v raztopino barvila. Obarvane celice značilnih oblik preštujemo pod mikroskopom. Število prešteti celic na določeni površini pomnožimo z delovnim faktorjem in tako dobimo število somatskih celic na mililiter (ŠSC/ml).

3.2.1.2 Inštrumentalna F-O-E metoda

Metoda je točno opisana in opredeljena s standardom ISO 13366-2/IDF 148-2 (2006). Standard navaja navodila in zahteve za delo s F-O-E števci oz. inštrumenti, ki so v splošnem sestavljeni iz sistema za doziranje testnega vzorca mleka in reagentov, mešalnega dela in dela za štetje skupaj z mikroskopom.

V mešalnem delu inštrumenta se dozirajo natančno določeni volumni testnega vzorca, pufra in raztopine barvila. Mešanje se lahko izvaja v čaši, mešalni komori, centrifugi, vzorčni zanki ali cevki. Del nastale mešanice se prenese v enoto za štetje. V delu za štetje je lahko nameščen disk ali pa pretočna celica. V primeru diska se tanek film mešanice s pomočjo zelo majhnega cevne nastavka nanese na površino vertikalno nameščenega rotirajočega diska. Ta rotirajoča površina deluje kot objektna površina fluorescentnega mikroskopa. V primeru pretočne celice pa se del mešanice prenese v hiter tok raztopine v kapilarni pretočni celici. Pri pospeševanju mešanica oblikuje tanek tok, v katerem se somatske celice razvrstijo v niz po ena in ena. Tak tok nato potuje skozi objektiv fluorescentnega mikroskopa.

Vsak obarvan delček, ki ga zazna fluorescentni mikroskop, proizvede električen impulz, ki se nato filtrira, ojači in zabeleži. Raven električnega impulza se elektronsko obdelava in

loči med šumom in impulzi, ki pripadajo obarvanim somatskim celicam. Raven ločevanja med šumom in impulzi celic je lahko fiksna ali pa dinamična.

Nekateri inštrumenti imajo dva kanala v delu za štetje, kar pomeni, da morata biti oba ustrezno preverjena oz. nastavljena. V takem primeru se vsak kanal obravnava kot svoj inštrument.

3.2.1.3 Metoda z obarvanimi lističi

Metodo z obarvanimi lističi »Porta SCC milk test« (PortaCheck, 2015) je uporabljal en laboratorij v MP APRIL 2014. Vzorec mleka nanese na testni listič in dodamo »aktivacijsko« raztopino. Zaradi kemijske reakcije med barvilom, ki je že prisotno na testnem lističu, in encimom v somatskih celicah v mleku, se po določenem času spremeni barva lističa v modro. Temnejša kot je barva, večje je število somatskih celic. S pomočjo digitalnega čitalca pa se nato odčita vrednost za ŠSC.

3.2.2 Metodi ugotavljanja osamelcev

Osamelec je vrednost, ki bistveno odstopa od večine ostalih vrednosti. Ugotavljanje osamelcev je pomembno z vidika naknadnih obdelav podatkov, saj lahko te vrednosti vplivajo na rezultate statistične analize.

3.2.2.1 Ugotavljanje osamelcev z metodo po Grubbs-u

Za ugotavljanje osamelcev smo uporabili Grubbs-ov test (Grubbs, 1969; Chrominski in Tkacz, 2010; ISO 5725-2, 1994) pri stopnji značilnosti $\alpha = 0,05$. Test temelji na izračunu vrednosti G_i ($G_i = |x_i - \bar{x}| / Sd$) in primerjavo te vrednosti s kritično vrednostjo G , ki jo najdemo v statistični tabeli.

Izračun smo opravili s programom, dostopnim na spletni strani <http://graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm> (GraphPad Software, 2015).

3.2.2.2 Ugotavljanje osamelcev z metodo kvartilov

Želeli smo preizkusiti še drugo možnost ugotavljanja osamelcev. Izbrali smo metodo kvartilov (Košmelj, 2007; Chrominski in Tkacz, 2010). Za to metodo ni potrebna uporaba statističnih tabel.

Izračune smo opravili s statističnim programom SAS (SAS, 2014).

3.2.3 Metode za ugotavljanje kakovosti vzorcev

Za testiranje kakovosti vzorcev smo preverjali ustreznost razlivanja vzorcev v podvzorce (test homogenosti) in njihov rok uporabnosti (test stabilnosti).

3.2.3.1 Ustrezno razlivanje v podvzorce: test homogenosti

V MP APRIL 2014 smo za vsak vzorec opravili analizo na treh podvzorcih. Vsak podvzorec smo izmerili v paralelki z inštrumentom Fossomatic 5000, FOSS, Danska. Maksimalno razliko med šestimi meritvami posameznega vzorca smo primerjali s kriteriji za ponovljivost F-O-E metode, navedenimi v standardu ISO 13366-2/IDF 148-2 (2006).

V MP OKTOBER 2014 in v poskusu smo test homogenosti opravili po postopku opisanem v standardu ISO 13528 (2005). Iz celotnega števila podvzorcev smo izbrali 10 podvzorcev, vsak tak podvzorec smo ustrezno razdelili v dve podenoti in z inštrumentom Fossomatic 5000 določili ŠSC. Za izračun parametrov ustreznega razlivanja v podvzorce oz. ustrezne homogenosti serije podvzorcev smo uporabili predlogo v programu Microsoft® Excel® »*Homogeneity check according to ISO 13528 and International Harmonized Protocol*«, ki smo jo pridobili s spletne strani <http://www.iswa.uni-stuttgart.de/ch/aqs/download/freeware.en.html> (Koch, 2011b).

3.2.3.2 Ugotavljanje roka uporabnosti vzorcev: test stabilnosti

V MP OKTOBER 2014 in v poskusu smo test stabilnosti opravili po postopku, opisanem v standardu ISO 13528 (2005). Iz celotnega števila podvzorcev smo vsakič izbrali po 3 podvzorce, vsak tak podvzorec smo ustrezno razdelili v dve podenoti in izvedli meritve ŠSC. Meritve, opravljene z istim inštrumentom kot pri testu homogenosti, smo izvedli drugi, tretji, šesti in sedmi dan po pripravi vzorcev. Za vsak dan (t) smo za vsak vzorec izračunali povprečje meritev (\bar{y}_t). Za vsak dan in vsak vzorec smo izračunali absolutno razliko med povprečjem posameznega vzorca (\bar{y}_t) in povprečjem, izračunanem pri testu homogenosti (\bar{y}_0 - povprečje ŠSC prvi dan po pripravi vzorcev; $t = 0$). Kot kriterij ustrezne stabilnosti smo upoštevali enake vrednosti kot pri testu homogenosti (ISO 13528, 2005). Poleg tega smo te razlike primerjali tudi z vrednostmi za ponovljivost F-O-E metode (ISO 13366-2/IDF 148-2, 2006).

Vzorce za test stabilnosti v poskusu smo hranili v hladilniku, temperatura v hladilniku je nihala med 2,3 °C in 4,6 °C.

Vzorce smo v ločenem poskusu (april 2015) tudi zamrznili (-20 °C) in po enakem postopku v različnih obdobjih in na koncu hranjenja (45 dni) ugotavljali stabilnost.

3.3 POTEK DELA

3.3.1 Posnetek trenutnega stanja - anketa

Ker smo želeli ugotoviti, ali in kako slovenski laboratoriji umerjajo inštrumente, smo najprej izvedli anketo. S tem smo pridobili podatke o metodah dela in tipih inštrumentov.

Vprašanja v anketi:

1. Ime laboratorija.
2. Inštrument (proizvajalec/model).
3. Princip delovanja inštrumenta (pretočna citometrija/rotirajoči disk/drugo).
4. Ali inštrument umerjate?
5. Če ga umerjate, prosim navedite frekvenco (mesečno/drugo).
6. Kakšne/čigave vzorce uporabljate za umerjanje?
7. Če ga ne umerjate, ali uporabljate tovarniške nastavitve?
8. Navedite nastavitve za naklon (angl. »slope«) in odsek na ordinati (angl. »intercept«).
9. Frekvenca preverjanja inštrumenta (mesečno, drugo).
10. Kakšne/čigave vzorce uporabljate za preverjanje?
11. Metoda določanje števila somatskih celic v mleku (ISO 13366-2/IDF 148-2 oz. drugo).
12. Ali sodelujete v medlaboratorijskih primerjavah še kje drugje kot le v organizaciji BF, IML-PRO?

3.3.2 Medlaboratorijska primerjava APRIL 2014

Inštrumenti, ki sodelujejo v medlaboratorijski primerjavi, na podlagi katere se izračunajo referenčne vrednosti za naknadno umerjanje, morajo biti predhodno umerjeni (Bulletin IDF 469, 2013). Zato smo v mesecu aprilu 2014 izvedli medlaboratorijsko primerjavo, iz katere smo pridobili začetne umeritvene enačbe, ki naj bi jih nato upoštevali pri izračunih umeritvenih enačb v MP OKTOBER 2014.

V ta namen smo za MP APRIL 2014 pripravili pet vzorcev mleka (Preglednica 9), jih razlili v podvzorce in jih v okviru mednarodne MP, ki jo je organiziral IML-PRO, poslali enajstim laboratorijem.

Vseh enajst laboratorijev je vrnilo podatke in sicer za vsak podvzorec po dve meritvi. Laboratorij, ki je sodeloval s hitrim testom z obarvanimi lističi, je bil zaradi neustreznih rezultatov iz obdelave izločen. V nadaljnji obdelavi je tako sodelovalo deset laboratorijev.

Za vsak posamezen vzorec smo po izločitvi osamelcev z metodo po Grubbs-u ($\alpha = 0,05$), izračunali povprečje, ki je predstavljalo referenčno vrednost (Y).

Za devet laboratorijev (en laboratorij je bil izločen, en pa je sodeloval z referenčno metodo) smo izračunali začetne umeritvene enačbe, kar je podrobneje opisano v nadaljevanju. Začetne umeritvene enačbe smo želeli uporabiti v MP OKTOBER 2014, kjer naj bi z njihovo pomočjo vrnjene podatke laboratorijev v MP OKTOBER 2014 preračunali na nove vrednosti, ki bi nam nato služile za izračun referenčnih vrednosti za nove umeritvene enačbe v poskusu.

3.3.3 Medlaboratorijska primerjava OKTOBER 2014

V MP OKTOBER 2014 smo pripravili devet vzorcev mleka (Preglednica 11), ki smo jih razlili v podvzorce in jih v okviru mednarodne MP, ki jo je organiziral IML-PRO, poslali enajstim laboratorijem. Ustrezno pripravo podvorcev oz. ustreznost razlivanja smo preverili s testom homogenosti. Stabilnost oz. rok uporabnosti vzorcev smo preverjali v obdobju devetih dni s testom stabilnosti.

Laboratoriji so te podvzorce analizirali: dva laboratorija z referenčno metodo, devet s F-O-E metodo, in nam vrnili podatke in sicer za vsak podvzorec po dve meritvi.

Vrnjene podatke meritev smo testirali na prisotnost osamelcev z metodo po Grubbs-u ($\alpha = 0,05$).

Vrnjene podatke posamezne meritve ŠSC z inštrumentom smo preračunali tudi na nove vrednosti z upoštevanjem začetnih umeritvenih enačb za posamezen laboratorij iz MP APRIL 2014. Za vsak vzorec smo te nove vrednosti testirali na prisotnost osamelcev z metodo po Grubbs-u ($\alpha = 0,05$). Sledljivost laboratorijev med obema MP je podana v Prilogi C1.

3.3.4 Upoštevanje začetnih umeritvenih enačb iz MP APRIL 2014 v MP OKTOBER 2014

V MP OKTOBER 2014 smo izračunali absolutno razliko (D) med povprečjem referenčne metode in povprečjem F-O-E metode (Bulletin IDF 469, 2013). Razliko (D) smo izračunali z upoštevanjem začetnih umeritvenih enačb iz MP APRIL 2014 in brez upoštevanja le-teh.

$$D = \left| \bar{y}_{FOE} - \bar{y}_{ref} \right| \quad \dots(1)$$

Razlika (D) med povprečjem rezultatov referenčne metode (\bar{y}_{ref}) in povprečjem rezultatov F-O-E metode (\bar{y}_{FOE}) mora biti manjša od kritične razlike (angl. »Critical Difference«, CD). Za izračun kriterija CD smo uporabili tri različne načine:

- $CD_{Bulletin}$; kritična razlika izračunana po enačbi navedeni v Bulletin IDF 469/2013 (Bulletin IDF 469, 2013, str. 11; enačba 4),
- CD_{ISO} ; kritična razlika predstavlja 10 % od skupnega povprečja obeh metod (ISO 13366-2/IDF 148-2, 2006),
- CD_R ; kritična razlika predstavlja vrednost za obnovljivost (R) F-O-E metode (ISO 13366-2/IDF 148-2, 2006).

Kot CD_R smo upoštevali meje za dovoljeno odstopanje za obnovljivost (R) za F-O-E metodo (ISO 13366-2/IDF 148-2, 2006), saj so kriteriji za obnovljivost strožji kot pri referenčni metodi (ISO 13366-1/IDF 148-1, 2008). Vrednosti za CD_R so dobljene s preračunom iz podanih kriterijev za standardni odklon obnovljivosti (s_R) v standardu ISO 13366-2/IDF 148-2 (2006) glede na število somatskih celic ($CD_R = R = 2,8s_R$). Faktor 2,8 je povzet po standardu ISO 5725-6 (1994).

3.3.5 Izračun referenčnih vrednosti za primerjavo različnih sistemov umerjanja

V preglednici 14 so prikazani načini izračuna referenčnih vrednosti (Y) za izračun umeritvenih enačb za posamezne sisteme umerjanj, ki smo jih uporabili v naši raziskavi.

Preglednica 14: Sistemi umerjanja in načini izračunavanja referenčnih vrednosti za izračun umeritvenih enačb.

Table 14: Systems of calibration and determination of reference values for the calculation of calibration equations.

Sistem umerjanja	Izračun referenčne vrednosti (Y)	Vir
A ₁	$Y = k_{ref}\bar{y}_{ref} + k_{FOE}\bar{y}_{FOE}; k_{ref} = \frac{2}{11}; k_{FOE} = \frac{9}{11}$	Bulletin IDF 469 (2013)
A ₂	$Y = k_{ref}\bar{y}_{ref} + k_{FOE}\bar{y}_{FOE}; k_{ref} = 0,5; k_{FOE} = 0,5$	ISO 13366-2/IDF 148-2 (2006)
B	$Y = \text{"robustno"povprečje}$	ISO 13528 (2005)
C	$Y = Y_{Master\ instrument};$	Inštrument laboratorija IML-PRO, predhodno umerjen po sistemu A ₁ . Bulletin IDF 469 (2013)
D*	$Y = k_{ref}\bar{y}_{ref} + k_{FOE}\bar{y}_{FOE}; k_{ref} = \frac{2}{11}; k_{FOE} = \frac{9}{11}$	Bulletin IDF 469 (2013)
T	Podatki, ki so jih vrnilo laboratoriji, glede na njihove trenutne (mesečne) nastavitve inštrumentov.	Trenutno stanje v Sloveniji.

*Pri kasnejšem izračunu umeritvenih enačb sistema D smo predpostavili, da je vrednost za odsek na ordinati enaka nič ($a = 0$).

3.3.5.1 Izračun referenčnih vrednosti za sisteme A₁, A₂ in D

Iz vrnjenih podatkov laboratorijev v MP OKTOBER 2014 smo po izločitvi osamelcev z Grubbs-ovim testom ($\alpha = 0,05$) izračunali referenčno vrednost za posamezen vzorec po enačbi:

$$Y = k_{ref}\bar{y}_{ref} + k_{FOE}\bar{y}_{FOE} \ ; \ k_{ref} + k_{FOE} = 1 \quad \dots(2)$$

kjer je:

Y ...referenčna vrednost

k_{ref} ...utež referenčne metode

\bar{y}_{ref} ...povprečje vseh rezultatov dobljenih z referenčno metodo

k_{FOE} ...utež F-O-E metode

\bar{y}_{FOE} ...povprečje vseh rezultatov dobljenih s F-O-E metodo

Pri sistemu A₁ smo za utež sodelujočih laboratorijev z referenčno ($k_{ref} = \frac{2}{11} = 0,18$) oz. F-O-E ($k_{FOE} = \frac{9}{11} = 0,82$) metodo upoštevali dejansko število sodelujočih laboratorijev (Bulletin IDF 469, 2013).

Pri sistemu A₂ smo za utež sodelujočih laboratorijev z referenčno metodo (k_{ref}) upoštevali vrednost 0,5, ki jo navaja standard ISO 13366-2/IDF 148-2 (2006). Tako je bil tudi k_{FOE} enak 0,5.

Pri sistemu D je bil izračun referenčnih vrednosti enak kot pri sistemu A₁, vendar smo kasneje pri izračunu umeritvenih enačb sistema D predpostavili, da je vrednost za odsek na ordinati enak nič ($a = 0$).

3.3.5.2 Izračun referenčnih vrednosti za sistem B

Iz vrnjenih podatkov laboratorijev v MP OKTOBER 2014 smo po izločitvi osamelcev z Grubbs-ovim testom ($\alpha = 0,05$), izračunali referenčno vrednost za posamezen vzorec po postopku, opisanem v standardu ISO 13528 (2005). Referenčno vrednost za posamezen vzorec je tako predstavljalo »robustno« povprečje (angl. »robust average«) vseh vrnjenih podatkov laboratorijev. Izračun smo izvedli s predlogo v programu Microsoft® Excel® »Calculation of a robust mean according to algorithm A (ISO 5725-5 and ISO 13528 resp.)«, ki smo jo pridobili s spletne strani <http://www.iswa.uni-stuttgart.de/ch/aqs/download/freeware.en.html> (Koch, 2011a).

3.3.5.3 Izračun referenčnih vrednosti za sistem C

Izbrali smo inštrument (*»Master instrument«*) laboratorija IML-PRO, ki je že vključen v mednarodno mrežo preverjanj. Ta inštrument bi bil v prihodnje umerjen v okviru rednih mednarodnih umerjanj v t.i. »referenčnem sistemu« in bi skrbel za prenos referenčnih vrednosti iz mednarodnega na nacionalni nivo. Poleg tega IML-PRO sam organizira MP, z inštrumentom laboratorija IML-PRO pa se določa referenčne vrednosti za SRM za kontrolo oz. umerjanje drugih inštrumentov. Preračunane vrednosti tega inštrumenta po sistemu A_1 so tako predstavljale referenčne vrednosti sistema C.

3.3.5.4 Sistem T

Pri sistemu T v poskusu nismo preračunavali vrnjenih podatkov z umeritvenimi enačbami, ampak so podatke predstavljale meritve laboratorijev z inštrumenti z dejanskimi mesečnimi nastavitvami za naklon in odsek na ordinati. Sistem T je predstavljal trenutno oz. dejansko stanje.

3.3.6 Izračun umeritvenih enačb

Standard ISO 13366-2/IDF 148-2 (2006) predpisuje, da se za namen umerjanja uporabi model linearne regresije. Neodvisna spremenljivka so bili podatki posameznega laboratorija, odvisna spremenljivka pa referenčna vrednost (Y).

$$Y = bx + a \quad \dots(3)$$

kjer je:

Y ...referenčna vrednost

b ...naklon premice

x ...meritev laboratorija

a ...odsek na ordinati

Za vsak laboratorij smo za vsak sistem (A_1 , A_2 , B, C in D) izračunali umeritvene enačbe in tako pridobili vrednosti za naklon (b) in odsek na ordinati (a). Za sistem D smo predpostavili, da gre premica skozi presečišče, zato smo za odsek na ordinati izbrali konstanto nič ($a = 0$).

Izračun umeritvenih enačb smo izvedli s pomočjo programa Microsoft® Excel®. Na grafikonih smo izrisali premico linearne regresije in izpisali njeno enačbo.

3.3.7 Poskus: primerjava sistemov umerjanja

V poskus je bilo vključenih 6 laboratorijev: 2 iz osrednje Slovenije, 1 z gorenjske regije, 1 s primorske regije, 1 s štajerske regije in 1 s prekmurske regije. Število somatskih celic smo določali s F-O-E metodo z inštrumenti dveh različnih proizvajalcev.

V poskusu smo opravili 6 ponovitev primerjave sistemov umerjanja in sicer enkrat mesečno v obdobju od novembra 2014 do vključno aprila 2015.

Za vsako ponovitev smo pripravili po pet kontrolnih vzorcev z različnim številom somatskih celic, s katerimi smo preverjali različne sisteme umerjanj. Način priprave teh vzorcev je opisan v Preglednici 12.

Vzorci smo razlili v podvzorci in jih pošiljali šestim slovenskim laboratorijem. Ustrezno kakovost podvzorcev smo preverjali s testom homogenosti in testom stabilnosti.

Laboratoriji so pri vsaki ponovitvi vrnil:

- podatke S: 10 meritev posameznega podvzorca na inštrumentih z nastavitvami za naklon ena ($b = 1$) in odsek na ordinati nič ($a = 0$); podatki S so torej bili dobljeni z meritvami na tovarniško nastavljenih inštrumentih,
- podatke za sistem T: 10 meritev posameznega podvzorca na inštrumentih z mesečnimi nastavitvami za naklon (b) in odsek na ordinati (a).

3.3.8 Analiza podatkov

3.3.8.1 Izračun podatkov za sisteme A₁, A₂, B, C in D na osnovi podatkov S

Na osnovi podatkov S in umeritvenih enačb posameznega laboratorija (naklona in odseka na ordinati), smo za sisteme A₁, A₂, B, C in D izračunali nove vrednosti. Povprečja novih izračunanih vrednosti so predstavljala podatke sistemov A₁, A₂, B, C in D v uporabljenem statističnem modelu.

Povprečja sistema T pa so predstavljala podatke sistema T v uporabljenem statističnem modelu.

Izračune smo opravili s programom Microsoft® Excel®.

3.3.8.2 Statistična analiza

Statistično analizo smo izvedli za vsako ponovitev poskusa posebej. ŠSC glede na posamezen sistem umerjanja in vzorec smo za vsako posamezno ponovitev prikazali grafično. Za vsak vzorec in sistem umerjanja v posamezni ponovitvi smo izračunali povprečje ŠSC, standardni odklon (Sd) in koeficient variacije (KV%). Za vsako ponovitev smo koeficiente variacije za ŠSC glede na povprečno ŠSC vseh sistemov umerjanja prikazali grafično. Primerjava sistemov je temeljila na primerjavi koeficientov variacije. Izračune smo opravili s statističnim programom R (R Core Team, 2014).

4 REZULTATI

4.1 POSNETEK TRENUTNEGA STANJA

V Preglednici 15 so prikazani odgovori na anketna vprašanja za ugotavljanje trenutnega stanja na področju določanja števila somatskih celic v mleku v slovenskih laboratorijih.

Preglednica 15: Odgovori na anketna vprašanja o načinu umerjanja inštrumentov za določanje ŠSC v slovenskih laboratorijih.

Table 15: Answers regarding calibration of the instruments for somatic cell count in milk in Slovenian laboratories.

Vprašanje	Laboratorij						
	1	2	3	4	5	6	7*
Inštrument (proizvajalec/model).	FOSS / Fossomatic 5200	FOSS / Fossomatic 5000	FOSS / Fossomatic 5000	Bentley / Somacount FC	FOSS / Fossomatic FC	FOSS / Fossomatic 5000	FOSS / Fossomatic 5000
Princip delovanja inštrumenta.	pretočna citometrija	pretočna citometrija	pretočna citometrija	pretočna citometrija	pretočna citometrija	pretočna citometrija	pretočna citometrija
Ali inštrument umerjate?	NE	NE	DA	DA	NE	NE	NE
Frekvenca umerjanja.	-	-	mesečno	mesečno	-	-	-
Kakšne/čigave vzorce uporabljate za umerjanje?	ročni popravki glede na vrednosti »FMA sample« in SRM IML-PRO	-	SRM IML-PRO	SRM IML-PRO	-	-	-
Ali uporabljate tovarniške nastavitve?	NE	DA	-	-	DA	DA	NE
Navedite vrednosti za: naklon odsek na ordinati	1,08/umerjanje 0	1 0	umerjanje umerjanje	umerjanje umerjanje	1 0	1 0	ni odgovora
Frekvenca preverjanja inštrumenta.	mesečno	mesečno	ni odgovora	mesečno	mesečno	mesečno	mesečno
Kakšne/čigave vzorce uporabljate za preverjanje?	IML-PRO, »FMA sample«	IML-PRO	ni odgovora	IML-PRO	MIH, IML-PRO	A.I.A.	MIH
Metoda določanja ŠSC ISO 13366-2/IDF 148-2/drugo.	NE	DA	DA	DA	DA	DA	DA
Ali sodelujete v MP še kje drugje kot le v organizaciji BF, IML-PRO?	NE	NE	DA/ A.I.A.	NE	DA	DA/ A.I.A., MIH, Actalia	DA/ Ne sodeluje v MP IML- PRO

Opomba: * Laboratorij 7 v raziskavi ni sodeloval, poslal je le odgovore na anketna vprašanja; - odgovor ni mogoč.

Legenda: »FMA sample«: kontrolni vzorec proizvajalca FOSS (Danska); SRM: sekundarni referenčni material; IML-PRO: Inštitut za mlekarstvo in probiotike (Slovenija); MIH: Milchwirtschaftliche Institut Dr. Hüfner (Nemčija); A.I.A.: Associazione Italiana Allevatori - Laboratorio Standard Latte (Italija); Actalia: Actalia Cecalait (Francija).

V Sloveniji vseh sedem laboratorijev uporablja F-O-E inštrumente, ki delujejo na principu pretočne citometrije, in sicer dveh različnih proizvajalcev. Šest laboratorijev uporablja inštrumente proizvajalca Foss z Danske, en laboratorij pa inštrument proizvajalca Bentley iz ZDA. Trije laboratoriji mesečno spreminjajo nastavitve

inštrumenta in sicer spreminjajo le naklon premice, en laboratorij je sicer odgovoril na to vprašanje z ne, vendar navaja ročne popravke oz. prilagoditve inštrumenta. Za to uporabljajo vzorce, ki jih pripravlja IML-PRO Biotehniške fakultete iz Ljubljane, poleg tega pa izmed teh treh laboratorijev en upošteva še rezultate meritev »FMA« kontrolnega vzorca proizvajalca inštrumenta Foss. Drugi trije laboratoriji uporabljajo le tovarniške nastavitve, kjer so vrednosti za naklon 1 in odsek na ordinati 0, en laboratorij pa navaja, da inštrumenta ne umerja in obenem ne uporablja tovarniških nastavitvev. Šest laboratorijev preverja inštrumente mesečno in sicer z vzorci treh različnih ponudnikov referenčnih materialov (RM), en laboratorij pa odgovora ni podal. Prav tako šest laboratorijev izvaja analize glede po navodilih standarda ISO 13366-2/IDF 148-2, en laboratorij pa upošteva le navodila proizvajalca inštrumenta. Vseh sedem laboratorijev sodeluje v MP, šest jih sodeluje v MP, ki jih organizira IML-PRO, od teh pa trije laboratoriji sodelujejo tudi v MP drugih ponudnikov.

4.2 UPOŠTEVANJE ZAČETNIH UMERITVENIH ENAČB IZ MP APRIL 2014 V MP OKTOBER 2014

Prejete rezultate meritev z inštrumenti v MP OKTOBER 2014 (Priloga B1) smo najprej preračunali na nove vrednosti z upoštevanjem začetnih umeritvenih enačb za posamezen laboratorij iz MP APRIL 2014 (Priloga A4), izračunanih glede na vrnjene rezultate (Priloga A1) in referenčne vrednosti (Priloga A3). Za nekatere laboratorije smo z upoštevanjem začetnih umeritvenih enačb dobili negativne vrednosti za ŠSC. Negativne vrednosti smo izključili iz nadaljnjih izračunov. Za vsak vzorec smo nato nove vrednosti testirali na prisotnost osamelcev z metodo po Grubbs-u ($\alpha = 0,05$) (Priloga B14). Sledljivost laboratorijev v celotni raziskavi je razvidna iz Priloge C1.

Izračunane razlike med povprečjem referenčne metode in povprečjem F-O-E metode z upoštevanjem začetnih umeritvenih enačb (D_z) ter brez upoštevanja začetnih umeritvenih enačb (D_{brez}) smo primerjali s kritično razliko, izračunano na tri različne načine ($CD_{Bulletin}$, CD_{ISO} in CD_R). Vrednosti izračunanih razlik in kriterijev (kritičnih razlik) so prikazane v Prilogi C.

Vrednosti kriterija $CD_{Bulletin}$ so bile praviloma manjše, se pravi bolj stroge, kot vrednosti kriterija CD_{ISO} , vrednosti kriterija CD_R pa so bile kar približno dva-krat večje kot $CD_{Bulletin}$ oz. CD_{ISO} (Priloga C2).

Ne glede na to, ali smo začetne umeritvene enačbe upoštevali (D_z) ali ne (D_{brez}), je bila razlika v obeh primerih manjša od $CD_{Bulletin}$ pri istih treh vzorcih (2, 3 in 8) od skupno devetih vzorcev (Priloga C3).

Ne glede na to, ali smo začetne umeritvene enačbe upoštevali (D_z) ali ne (D_{brez}), je bila razlika v obeh primerih manjša od CD_{ISO} pri istih petih vzorcih (2, 3, 5, 8 in 9) od skupno devetih vzorcev (Priloga C3).

Razlika pri upoštevanju začetnih umeritvenih enačb (D_z) je bila pri osmih vzorcih (vzorci 2 do 9) manjša od CD_R . Če pa začetnih umeritvenih enačb nismo upoštevali, pa je bila razlika (D_{brez}) manjša od CD_R pri vseh devetih vzorcih (Priloga C3).

Inštrumenti, ki sodelujejo v MP, iz katere se izračunavajo nove referenčne vrednosti za umerjanje, morajo biti predhodno umerjeni (Bulletin IDF 469, 2013; ISO 13366-2/IDF 148-2, 2006). Ker so bile razlike med povprečjem rezultatov referenčne metode in povprečjem rezultatov F-O-E metode v MP OKTOBER 2014 manjše, če začetnih umeritvenih enačb iz MP APRIL 2014 nismo upoštevali, smo zato v MP OKTOBER 2014 upoštevali dejanske vrnjene rezultate laboratorijev in jih nismo preračunavali. Poleg tega smo za nekatere laboratorije dobili z upoštevanjem začetnih umeritvenih enačb negativne vrednosti za ŠSC, kar je tudi kazalnik, da upoštevanje začetnih umeritvenih enačb ne bi bilo ustrezno.

4.3 IZRAČUN REFERENČNIH VREDNOSTI IN UMERITVENIH ENAČB V POSKUSU

4.3.1 Izračun referenčnih vrednosti v poskusu

V Preglednici 16 navajamo izračunane referenčne vrednosti za ŠSC (1000/ml) v MP OKTOBER 2014 za posamezen sistem umerjanja (A_1 , A_2 , B, C in D) in posamezen vzorec.

Preglednica 16: Referenčna vrednost za ŠSC (1000/ml) za posamezen sistem umerjanja A_1 , A_2 , B, C in D in posamezen vzorec.

Table 16: Reference values for somatic cells count (SCC) (1000/ml) for individual system of calibration A_1 , A_2 , B, C and D and for individual sample.

Vzorec	Sistem umerjanja				
	A_1	A_2	B	C	D
1	30,27	28,13	31,00	32,68	30,27
2	190,77	190,96	194,00	198,72	190,77
3	369,86	375,07	364,00	375,04	369,86
4	483,77	503,21	476,50	485,56	483,77
5	595,73	612,65	579,00	598,65	595,73
6	736,64	765,17	723,00	698,89	736,64
7	863,14	899,35	847,50	858,76	863,14
8	1111,23	1119,21	1111,50	1137,89	1111,23
9	1357,96	1390,06	1346,00	1353,27	1357,96

4.3.2 Izračun umeritvenih enačb v poskusu

Na podlagi referenčnih vrednosti smo izračunali umeritvene enačbe oz. vrednosti za naklon in odsek na ordinati za posamezen laboratorij za vsak sistem umerjanja, kar je prikazano v Preglednici 17.

Preglednica 17: Vrednosti naklona (b) in odseka na ordinati (a) za umeritvene enačbe laboratorijev za sisteme umerjanja A_1 , A_2 , B, C in D.

Table 17: Slope (b) and intercept (a) values for laboratory calibration equations for calibration systems A_1 , A_2 , B, C and D.

Laboratorij	Sistem umerjanja									
	A_1		A_2		B		C		D	
	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a
1	0,9099	13,2470	0,9306	15,1260	0,9027	10,7520	0,9089	13,9650	0,9235	0
2	1,1220	-7,6438	1,1481	-6,5831	1,1129	-9,8359	1,1201	-6,5371	1,1125	0
3	1,0381	2,1423	1,0623	3,4056	1,0297	-0,1353	1,0363	3,2964	1,0406	0
4	0,8469	11,6750	0,8664	13,3090	0,8401	9,3018	0,8458	12,5090	0,8581	0
5	1,0065	2,8488	1,0292	4,5778	0,9988	0,2458	1,0059	3,2398	1,0097	0
6	1,0281	-0,2204	1,0512	1,5040	1,0202	-2,7521	MA	MA	1,0278	0

Legenda: MA = *Master instrument*; najmanjša in največja vrednost za naklon sta za inštrumente proizvajalca Foss (Danska) senčeni, pri inštrumentu proizvajalca Bentley (ZDA) pa poudarjeni.

Iz dobljenih vrednosti za naklon in odsek na ordinati ugotavljamo, da je bila za inštrumente proizvajalca Foss najnižja vrednost za naklon 0,9027 in najvišja 1,1481. Za inštrument proizvajalca Bentley (Laboratorij 4) pa je bila najnižja vrednost za naklon 0,8401 in najvišja 0,8664. Za posamezen laboratorij vrednosti za naklon med posameznimi sistemi umerjanja niso variirale veliko. Tudi vrednosti za odsek na ordinati so se gibale v relativno ozkem območju. Za sistem D je bila ta vrednost postavljena na nič.

Koeficienti determinacije (R^2) pri izračunih umeritvenih enačb za vse sisteme umerjanja in za vse laboratorije so bili večji od 0,99 (rezultati so prikazani v Prilogi D).

Za sistem T (Preglednica 18), ki je predstavljal trenutno stanje mesečnih nastavitvev inštrumentov šestih sodelujočih laboratorijev, so trije laboratoriji (vsi inštrumenti FOSS) upoštevali nastavitve za naklon 1 in odsek na ordinati 0. Preostali trije laboratoriji so nastavitve prilagajali, vendar so za vrednosti za odsek na ordinati vedno imeli 0, naklon pa med 1,04 in 1,08 (inštrumenti FOSS) ter med 0,86 in 0,90 (inštrument Bentley).

Preglednica 18: Vrednosti naklona (b) in odseka na ordinati (a) za laboratorije za sistem T za ponovitve poskusa.

Table 18: Values for slope (b) and intercept (a) for laboratories for system T for repetitions of the experiment.

Laboratorij	Ponovitev poskusa											
	1		2		3		4		5		6	
	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a
1	1,08	0	1,04	0	1,04	0	1	0	1	0	1	0
2	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
3	1	0	1	0	1,05	0	1,05	0	1,05	0	1,05	0
4	0,88625	0	0,9009	0	0,9009	0	0,865823	0	0,8987	0	0,8987	0
5	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
6	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0

4.4 UGOTAVLJANJE KAKOVOSTI VZORCEV

4.4.1 Ustrezno razlivanje v podvzorce (test homogenosti)

V MP APRIL 2014 in v MP OKTOBER 2014 so vsi vzorci izkazovali ustrezno homogenost.

Pri ponovitvah poskusa smo za vzorec 1 pri tretji ponovitvi in za vzorec 2 pri četrti ponovitvi ugotovili neustrezno homogenost oz. pripravo. Vzorca smo iz nadaljnje obdelave izključili.

Izračuni in rezultati za teste homogenosti za MP APRIL 2014 so prikazani v Prilogi A3, za MP OKTOBER 2014 v Prilogah B3 do B11, za ponovitve poskusa pa v Prilogi G.

4.4.2 Ugotavljanje roka uporabe vzorcev (test stabilnosti)

Ugotavljanja stabilnosti vzorcev v MP APRIL 2014 nismo izvedli.

Če smo za kriterij stabilnosti oz. rok uporabe upoštevali kriterij za ponovljivost za F-O-E metodo (ISO 13366-2/IDF 148-2, 2006), so vsi vzorci, tako v MP OKTOBER 2014 kot tudi pri vseh ponovitvah poskusa, izkazovali ustrezno stabilnost v obdobju sedmih dni. To pomeni, da so bile razlike med povprečji meritev za prvi dan ter vse naslednje dni, z vključno sedmim dnevom, manjše od mej za ponovljivost F-O-E metode. Pri upoštevanju kriterija za ustrezno stabilnost iz standarda ISO 13528 (2005) pa vzorci niso vedno izkazovali ustrezne stabilnosti v obdobju sedmih dni. Izračuni in rezultati za

teste stabilnosti za MP OKTOBER 2014 so prikazani v Prilogah B12 in B13, za ponovitve poskusa pa v Prilogi G.

Ustrezno razlivanje v podvzorce (test homogenosti) in ugotavljanje stabilnosti vzorcev v MP OKTOBER 2014 in v poskusu, je v Preglednici 19 prikazano tudi glede na način priprave vzorcev. Vzorci, ki so označeni kot »neustrezna stabilnost«, v večini primerov (16 vzorcev od 18) neustrezne stabilnosti niso izkazovali vsak dan meritev (2., 3., 6. in 7. dan). Le pri vzorcu 2 v MP OKTOBER 2014 in vzorcu 2 v 3. ponovitvi poskusa, smo neustrezno stabilnost (ISO 13528, 2005) ugotovili pri vseh meritvah med shranjevanjem vzorcev.

Preglednica 19: Neustrezno stabilni (obarvano sivo) in neustrezno homogeni (krepko, ležeče in podčrtano) vzorci v MP OKTOBER 2014 in pri ponovitvah poskusa, glede na način priprave vzorcev.
Table 19: Inadequately stable (coloured grey) and inadequately homogeneous (bold, italic, underlined) samples in interlaboratory comparison OCTOBER 2014 and in experiment (6 repetitions), according to sample preparation.

	Vzorec								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
MP OKTOBER 2014	B1.2	B2	B1.2+K	B1.2+K	B1.2+K	B1.1+K	B1.1+K	B1.1+K	B1.1+B2+K
Ponovitev poskusa									
1	K	B	B+K+S	K	PB+S				
2	B	K	K	B+K	B+K+S				
3	<u>K+K</u>	B	K	PB+K+K	<u>PB+K+K</u>				
4	B	<u>B</u>	PB+K	PB+K	PB+K				
5	B	<u>K</u>	<u>K</u>	K	K+S				
6	B	B	<u>PB+K</u>	K	<u>PB+K</u>				

Legenda: **neustrezna stabilnost**, **neustrezna homogenost**, bazensko mleko (B), posneto bazensko mleko (PB), mleko posamezne krave (K), smetana (S).

Opomba: Vzorci so bili pripravljani in/ali izbrani tako, da smo dobili različne ravni ŠSC. Razmerja osnovnih surovin (B, PB, K in S) pri mešanih vzorcih so bila tako različna.

Za vzorce z zelo nizkim ŠSC (< 40.000 celic/ml) je bil kriteriji, ki smo ga izračunali po predpisanem postopku v standardu ISO 13528 (2005), za ustrezno stabilnost vzorcev 900 celic/ml, kar je manjše od merilnega območja inštrumenta (1000 celic/ml). Pri vzorcih s ŠSC med 110.000 celic/ml in 300.000 celic/ml so bili kriterij (ISO 13528, 2005) dostikrat prestrogi (od 1.300 celic/ml do 6.400 celic/ml). Pri vzorcih okrog 500.000 celic/ml (ponovitev/vzorec: 5/3 in 6/3) je bil ta kriterij približno 12.000 celic/ml, vendar je bilo izmerjeno ŠSC po sedmih dneh pri enem vzorcu (5/3) večje (Priloga G30), pri drugem (6/3) pa manjše (Priloga G36). Pri vzorcih okrog 1.350.000 celic/ml (ponovitev/vzorec: 3/5 in 6/5) je bil kriterij (ISO 13528, 2005) za ustrezno stabilnost 39.400 celic/ml, vendar je bilo zopet izmerjeno ŠSC po sedmih dneh pri enem vzorcu (3/5) večje (Priloga G18), pri drugem (6/5) pa manjše (Priloga G36).

Ponovljivost je dovoljeno odstopanje za isti inštrument v zelo kratkem časovnem obdobju, test stabilnosti pa so meritve med dnevi, kjer so dovoljena večja odstopanja (ISO 13366-2/IDF 148-2, 2006). Glede na to, da so vsi vzorci pri testu stabilnosti ustrezali kriteriju za ponovljivost F-O-E metode (ISO 13366-2/IDF 148-2, 2006), smo pri statistični analizi upoštevali vse vzorce razen dveh, ki nista ustrezala testu homogenosti, in vzorcev iz prve ponovitve poskusa, kot je omenjeno v nadaljevanju.

4.5 PRIMERJAVA SISTEMOV UMERJANJA

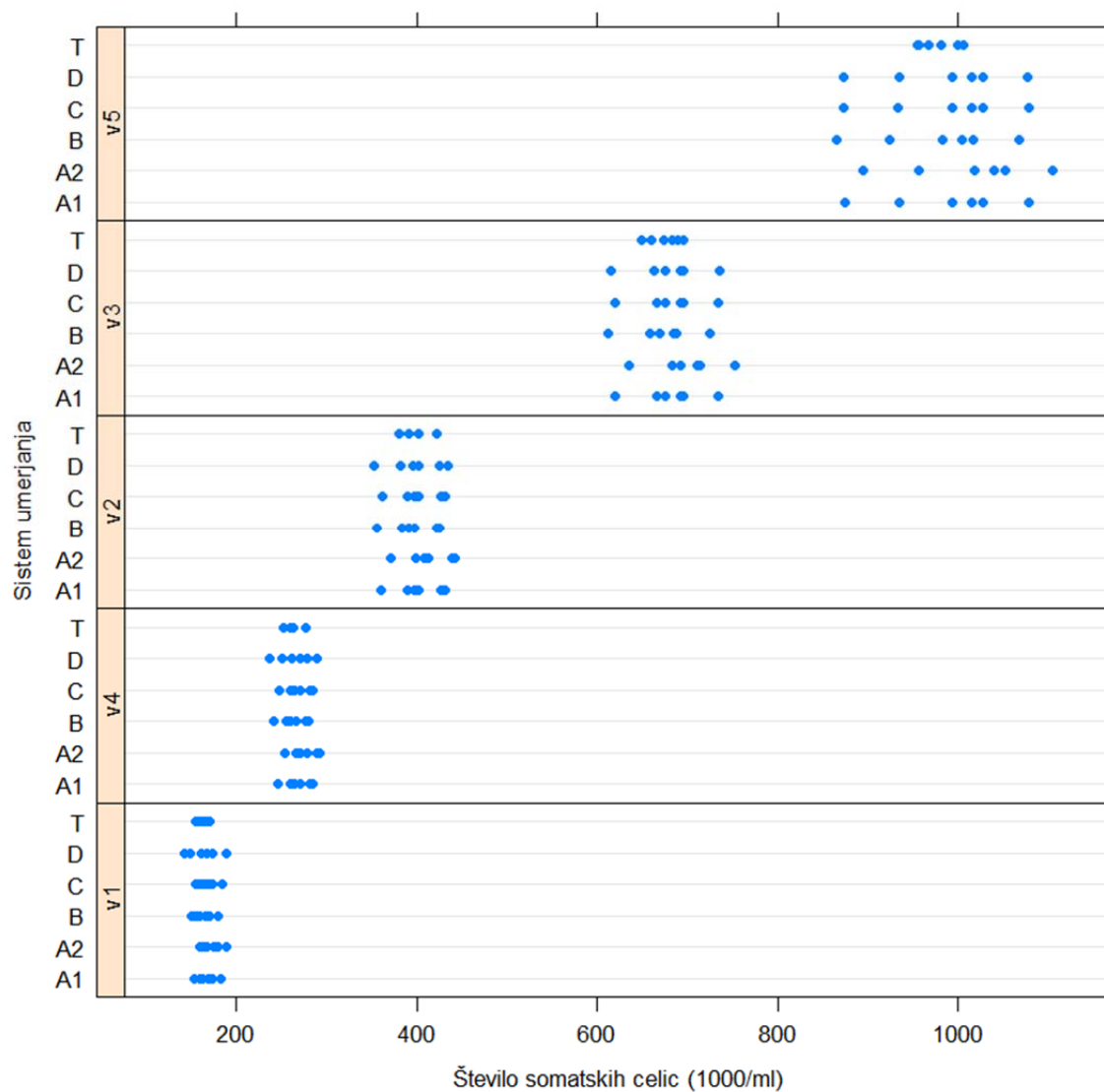
4.5.1 Statistična analiza podatkov za šest ponovitev poskusa

V prvi ponovitvi poskusa je eden izmed laboratorijev, zaradi okvare inštrumenta, opravil meritve tri dni po preteku roka uporabnosti vzorcev. Poleg tega sta za en vzorec dva laboratorija poslala po en napačen rezultat, en laboratorij pa deset napačnih rezultatov za en vzorec (nepravilen prepis rezultatov meritev z inštrumenta). Zaradi omenjenih dejstev smo podatke, dobljene v prvi ponovitvi poskusa, izključili iz statistične analize.

Za ostalih pet ponovitev poskusa je število somatskih celic glede na posamezen sistem umerjanja in vzorec za posamezno ponovitev prikazano grafično (Slike 7, 9, 11, 13 in 15). Posamezna točka predstavlja vrednost ŠSC posameznega laboratorija. Vrnjeni rezultati laboratorijev so prikazani v Prilogi E.

V Preglednicah 20 do 24 so prikazane vrednosti za povprečje ŠSC (1000/ml), standardni odklon (Sd; 1000/ml) in koeficient variacije (KV%) za sisteme umerjanja A₁, A₂, B, C, D in T za posamezen vzorec pri posamezni ponovitvi poskusa. Koeficienti variacije za posamezen sistem umerjanja so prikazani še grafično glede na povprečje ŠSC vseh sistemov umerjanja (Slike 8, 10, 12, 14 in 16).

Podatki za statistično analizo so prikazani v Prilogi H.



Slika 7: Število somatskih celic (1000/ml) glede na posamezen sistem umerjanja in vzorec za 2. ponovitev poskusa.

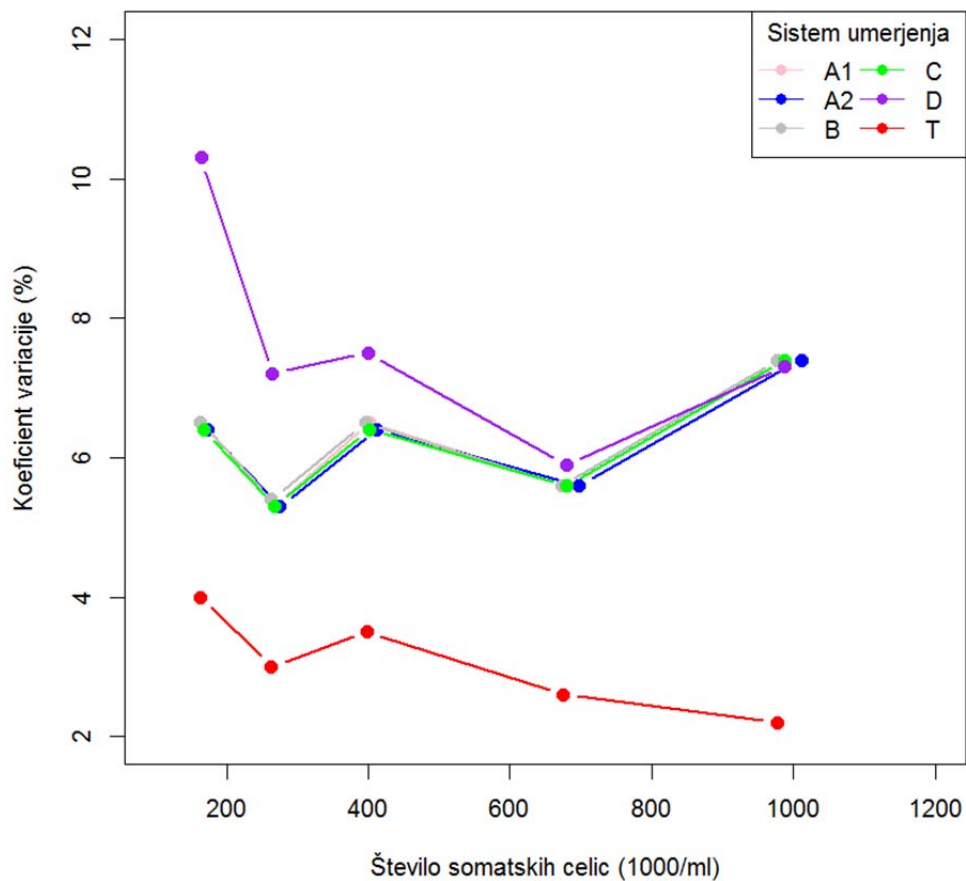
Figure 7: Somatic cell count (1000/ml) according to individual system of calibration and sample for 2nd repetition of the experiment.

Razpršenost oz. variabilnost je pri večjem številu somatskih celic večja in to velja tudi za vse ponovitve poskusa v nadaljevanju.

Preglednica 20: Povprečje, standardni odklon (Sd) in koeficient variacije (KV%) za ŠSC (1000/ml) za sisteme umerjanja A₁, A₂, B, C, D in T glede na posamezen vzorec za 2. ponovitev poskusa.

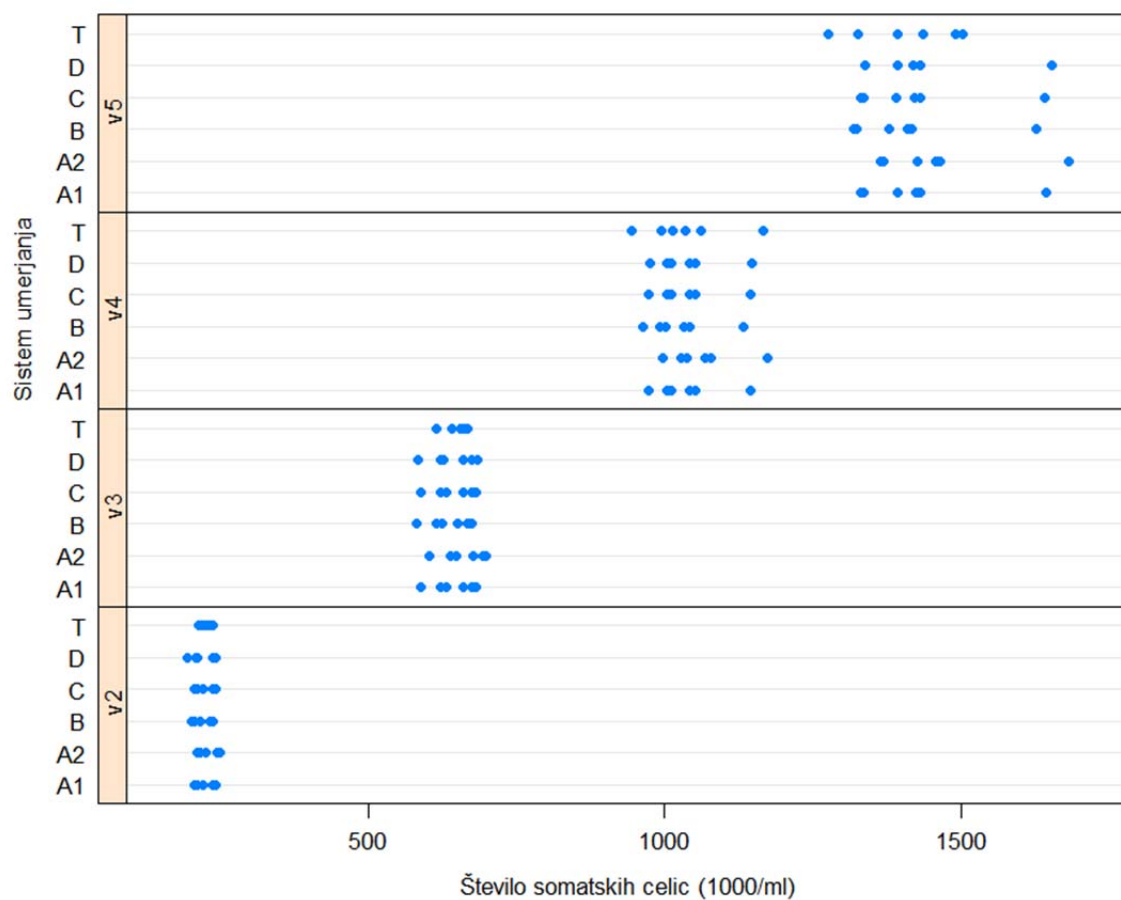
Table 20: Average, standard deviation (Sd) and coefficient of variation (KV%) for somatic cell count (1000/ml) for systems of calibration A₁, A₂, B, C, D and T according to individual sample for 2nd repetition of the experiment.

Sistem umerjanja		Vzorec				
		1	2	3	4	5
	Povprečje vseh sistemov umerjanja	166,2	401,5	681,4	267,0	988,2
A1	Povprečje	167,1	401,5	681,0	267,7	987,5
	Sd	10,7	26,0	37,9	14,2	72,7
	KV%	6,4	6,5	5,6	5,3	7,4
A2	Povprečje	172,4	412,1	698,0	275,3	1011,6
	Sd	11,0	26,5	38,8	14,5	74,4
	KV%	6,4	6,4	5,6	5,3	7,4
B	Povprečje	163,4	395,9	673,2	263,2	977,3
	Sd	10,6	25,7	37,6	14,1	72,1
	KV%	6,5	6,5	5,6	5,4	7,4
C	Povprečje	167,6	401,8	680,9	268,2	987,2
	Sd	10,7	25,9	37,8	14,2	72,6
	KV%	6,4	6,4	5,6	5,3	7,4
D	Povprečje	163,9	399,3	679,8	265,0	987,4
	Sd	16,9	29,8	39,9	19,2	72,4
	KV%	10,3	7,5	5,9	7,2	7,3
T	Povprečje	162,9	398,3	675,7	262,9	978,1
	Sd	6,5	14,1	17,7	7,9	21,6
	KV%	4,0	3,5	2,6	3,0	2,2



Slika 8: Koeficient variacije za ŠSC (1000/ml) za posamezen sistem umerjanja glede na povprečje ŠSC vseh sistemov umerjanja za 2. ponovitev poskusa.

Figure 8: Coefficient of variation for somatic cell count (1000/ml) for individual system of calibration according to average of somatic cell count for all systems of calibration for 2nd repetition of the experiment.



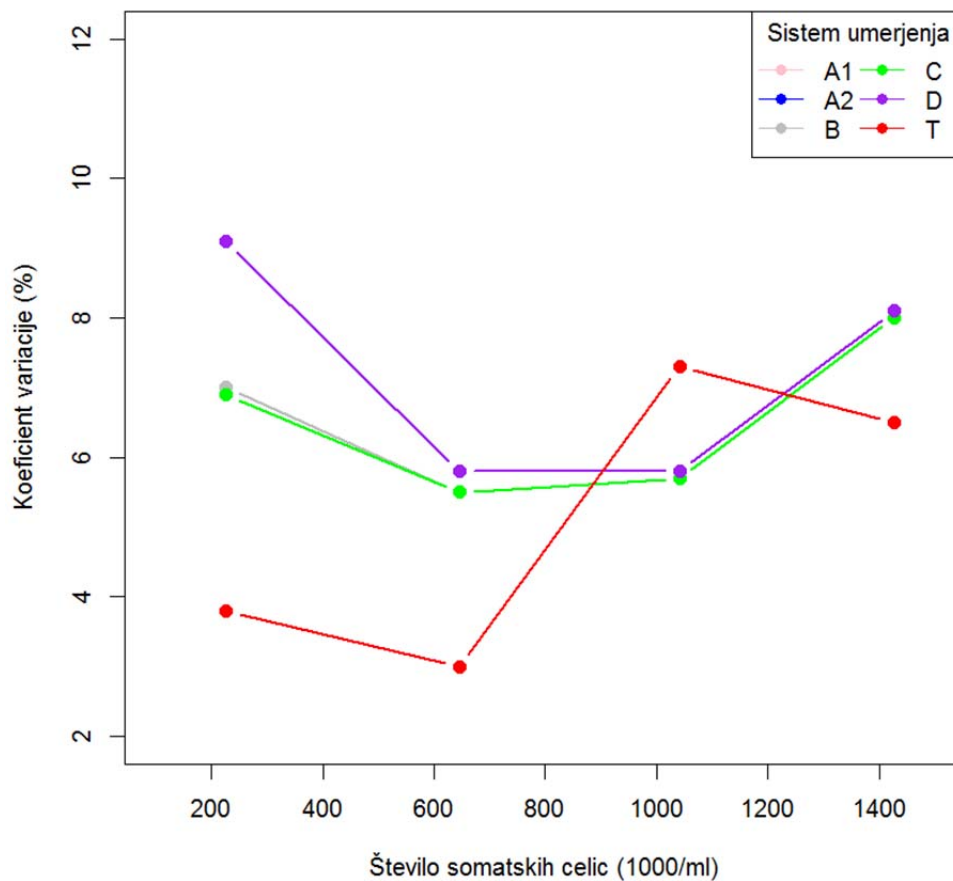
Slika 9: Število somatskih celic (1000/ml) glede na posamezen sistem umerjanja in vzorec za 3. ponovitev poskusa.

Figure 9: Somatic cell count (1000/ml) according to individual system of calibration and sample for 3rd repetition of the experiment.

Preglednica 21: Povprečje, standardni odklon (Sd) in koeficient variacije (KV%) za ŠSC (1000/ml) za sisteme umerjanja A₁, A₂, B, C, D in T glede na posamezen vzorec za 3. ponovitev poskusa.

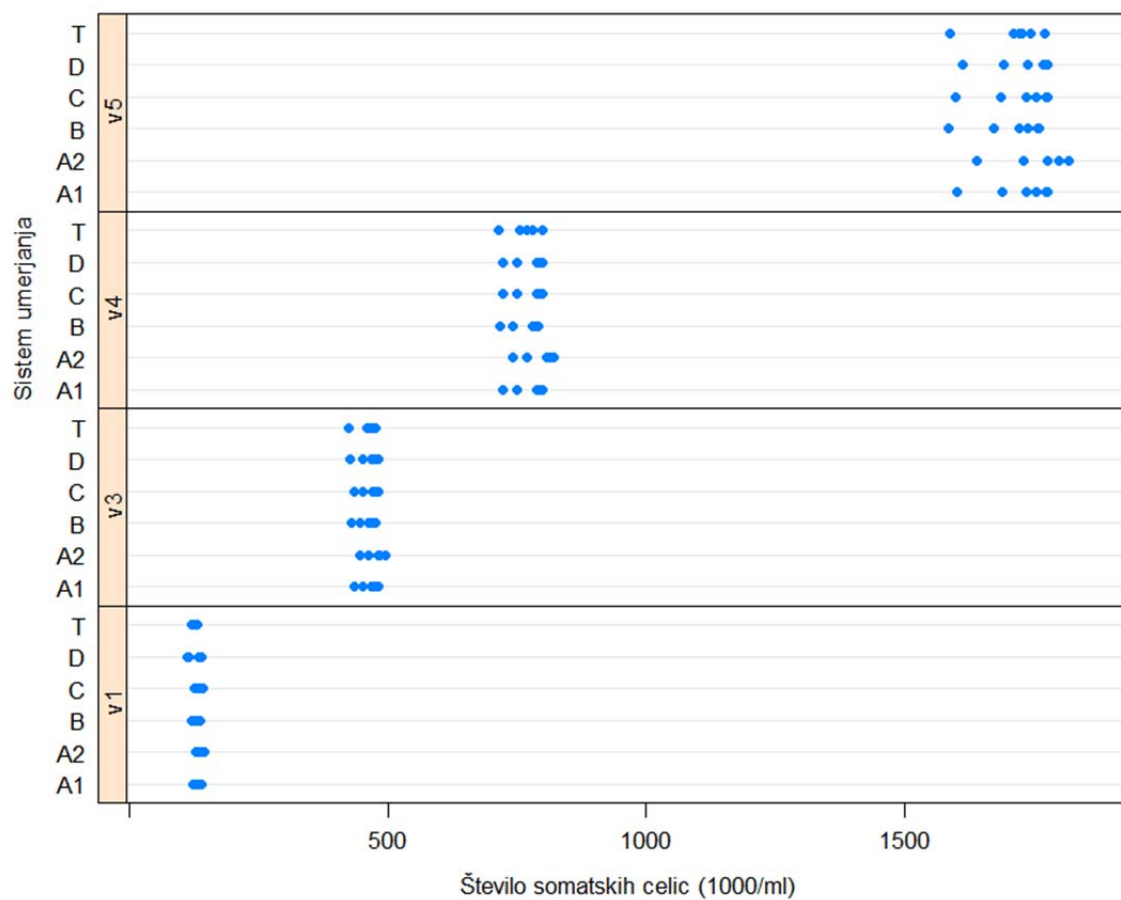
Table 21: Average, standard deviation (Sd) and coefficient of variation (KV%) for somatic cell count (1000/ml) for systems of calibration A₁, A₂, B, C, D and T according to individual sample for 3rd repetition of the experiment.

		Vzorec			
		2	3	4	5
Sistem umerjanja	Povprečje vseh sistemov umerjanja	226,6	645,6	1040,7	1426,9
A1	Povprečje	226,6	643,8	1038,6	1427,0
	Sd	15,8	35,6	59,4	113,9
	KV%	7,0	5,5	5,7	8,0
A2	Povprečje	233,3	660,0	1063,9	1461,1
	Sd	16,2	36,3	60,8	116,5
	KV%	6,9	5,5	5,7	8,0
B	Povprečje	222,4	636,4	1028,0	1413,3
	Sd	15,6	35,2	59,0	112,9
	KV%	7,0	5,5	5,7	8,0
C	Povprečje	227,1	643,9	1038,2	1426,2
	Sd	15,6	35,5	59,3	113,6
	KV%	6,9	5,5	5,7	8,0
D	Povprečje	223,7	642,6	1039,2	1429,4
	Sd	20,3	37,5	60,3	116,4
	KV%	9,1	5,8	5,8	8,1
T	Povprečje	226,4	647,2	1036,5	1404,2
	Sd	8,7	19,2	75,2	90,9
	KV%	3,8	3,0	7,3	6,5



Slika 10: Koeficient variacije za ŠSC (1000/ml) za posamezen sistem umerjanja glede na povprečje ŠSC vseh sistemov umerjanja za 3. ponovitev poskusa.

Figure 10: Coefficient of variation for somatic cell count (1000/ml) for individual system of calibration according to average of somatic cell count for all systems of calibration for 3rd repetition of the experiment.



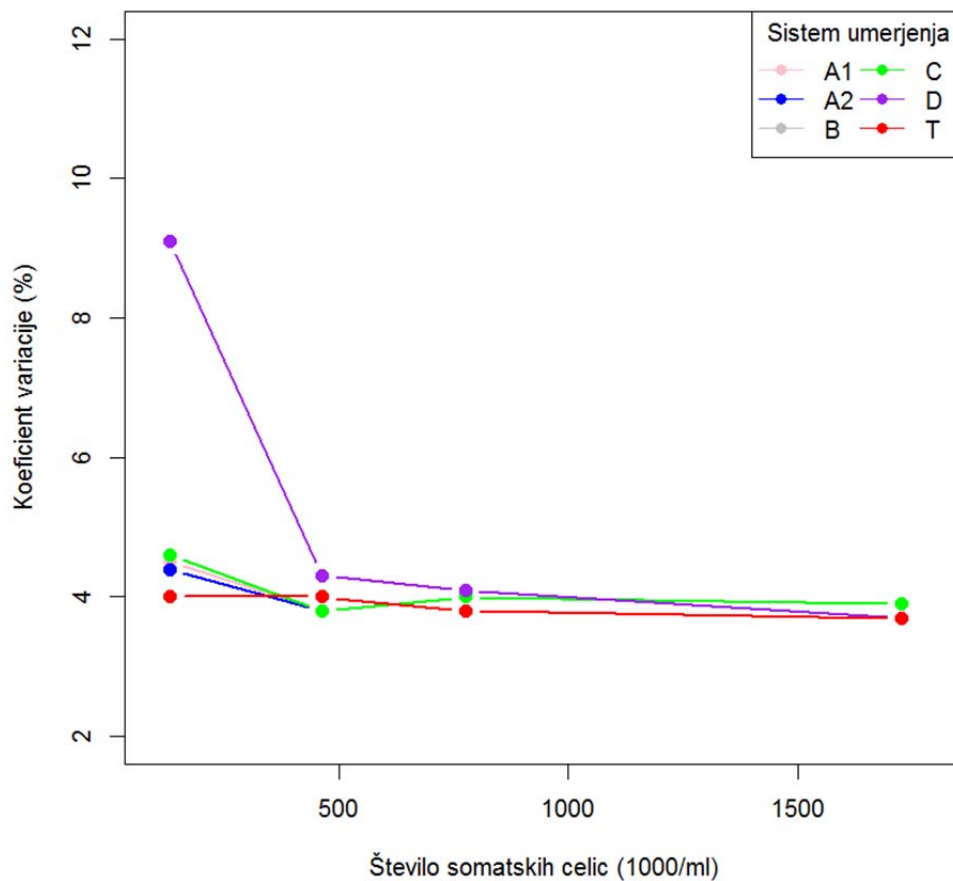
Slika 11: Število somatskih celic (1000/ml) glede na posamezen sistem umerjanja in vzorec za 4. ponovitev poskusa.

Figure 11: Somatic cell count (1000/ml) according to individual system of calibration and sample for 4th repetition of the experiment.

Preglednica 22: Povprečje, standardni odklon (Sd) in koeficient variacije (KV%) za ŠSC (1000/ml) za sisteme umerjanja A₁, A₂, B, C, D in T glede na posamezen vzorec za 4. ponovitev poskusa.

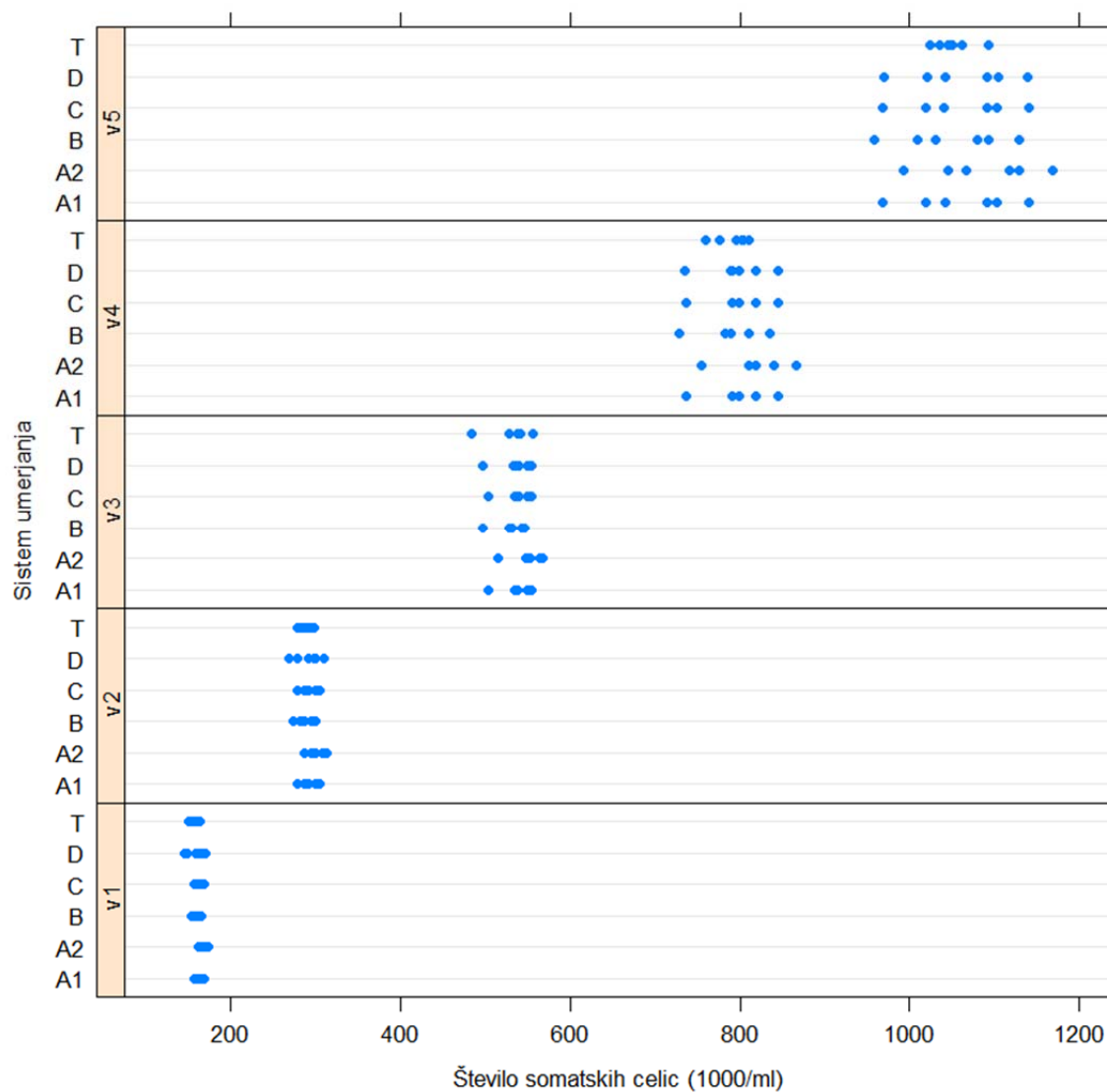
Table 22: Average, standard deviation (Sd) and coefficient of variation (KV%) for somatic cell count (1000/ml) for systems of calibration A₁, A₂, B, C, D and T according to individual sample for 4th repetition of the experiment.

Sistem umerjanja		Vzorec			
		1	3	4	5
	Povprečje vseh sistemov umerjanja	130,1	463,6	774,7	1725,8
A1	Povprečje	131,2	463,6	774,4	1723,2
	Sd	5,9	17,5	30,7	67,7
	KV%	4,5	3,8	4,0	3,9
A2	Povprečje	135,7	475,6	793,6	1764,2
	Sd	6,0	17,9	31,4	69,2
	KV%	4,4	3,8	4,0	3,9
B	Povprečje	127,8	457,5	765,9	1707,2
	Sd	5,9	17,4	30,5	67,2
	KV%	4,6	3,8	4,0	3,9
C	Povprečje	131,8	463,8	774,2	1722,1
	Sd	6,0	17,5	30,7	67,8
	KV%	4,6	3,8	4,0	3,9
D	Povprečje	128,0	461,7	773,8	1726,4
	Sd	11,6	19,7	31,5	64,0
	KV%	9,1	4,3	4,1	3,7
T	Povprečje	126,2	459,4	766,5	1712,0
	Sd	5,0	18,2	29,5	63,3
	KV%	4,0	4,0	3,8	3,7



Slika 12: Koeficient variacije za ŠSC (1000/ml) za posamezen sistem umerjanja glede na povprečje ŠSC vseh sistemov umerjanja za 4. ponovitev poskusa.

Figure 12: Coefficient of variation for somatic cell count (1000/ml) for individual system of calibration according to average of somatic cell count for all systems of calibration for 4th repetition of the experiment.



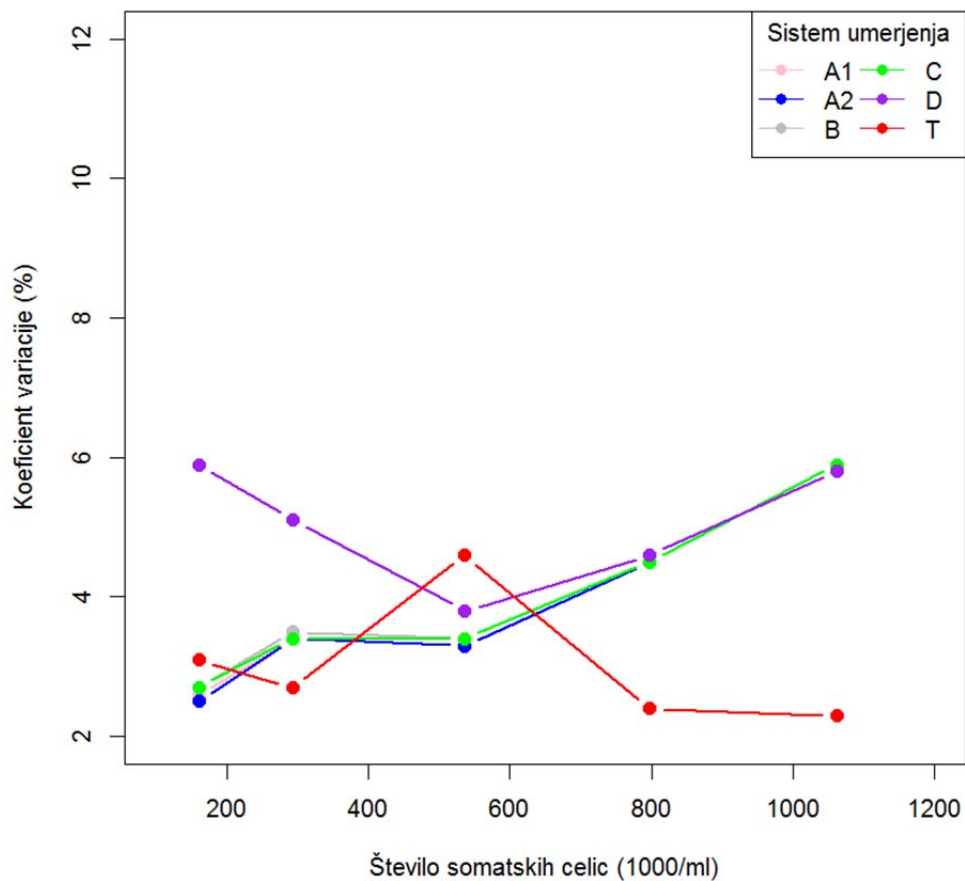
Slika 13: Število somatskih celic (1000/ml) glede na posamezen sistem umerjanja in vzorec za 5. ponovitev poskusa.

Figure 13: Somatic cell count (1000/ml) according to individual system of calibration and sample for 5th repetition of the experiment.

Preglednica 23: Povprečje, standardni odklon (Sd) in koeficient variacije (KV%) za ŠSC (1000/ml) za sisteme umerjanja A₁, A₂, B, C, D in T glede na posamezen vzorec za 5. ponovitev poskusa.

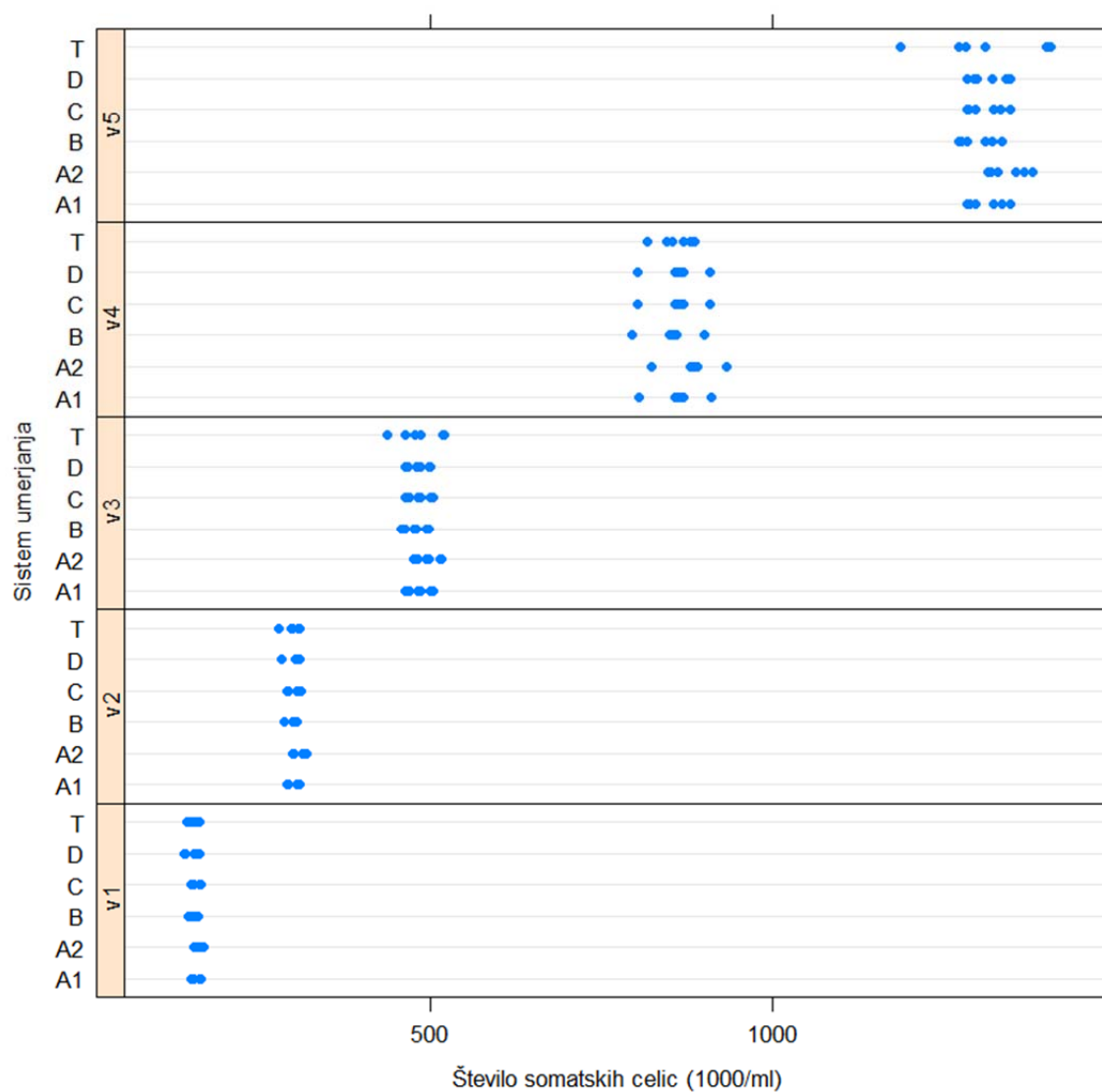
Table 23: Average, standard deviation (Sd) and coefficient of variation (KV%) for somatic cell count (1000/ml) for systems of calibration A₁, A₂, B, C, D and T according to individual sample for 5th repetition of the experiment.

Sistem umerjanja		Vzorec				
		1	2	3	4	5
	Povprečje vseh sistemov umerjanja	160,6	293,3	535,9	797,6	1061,7
A1	Povprečje	161,6	293,9	535,8	796,8	1060,8
	Sd	4,2	10,0	18,0	36,0	62,6
	KV%	2,6	3,4	3,4	4,5	5,9
A2	Povprečje	166,8	302,0	549,5	816,5	1086,5
	Sd	4,2	10,2	18,4	36,8	64,1
	KV%	2,5	3,4	3,3	4,5	5,9
B	Povprečje	158,0	289,1	529,1	788,1	1050,0
	Sd	4,2	10,0	17,9	35,7	62,1
	KV%	2,7	3,5	3,4	4,5	5,9
C	Povprečje	162,2	294,2	535,9	796,6	1060,3
	Sd	4,4	10,1	18,0	35,9	62,6
	KV%	2,7	3,4	3,4	4,5	5,9
D	Povprečje	158,5	291,2	534,2	796,1	1061,0
	Sd	9,4	14,9	20,1	36,9	61,6
	KV%	5,9	5,1	3,8	4,6	5,8
T	Povprečje	156,3	289,5	530,9	791,4	1051,6
	Sd	4,8	7,7	24,5	19,3	24,2
	KV%	3,1	2,7	4,6	2,4	2,3



Slika 14: Koeficient variacije za ŠSC (1000/ml) za posamezen sistem umerjanja glede na povprečje ŠSC vseh sistemov umerjanja za 5. ponovitev poskusa.

Figure 14: Coefficient of variation for somatic cell count (1000/ml) for individual system of calibration according to average of somatic cell count for all systems of calibration for 5th repetition of the experiment.



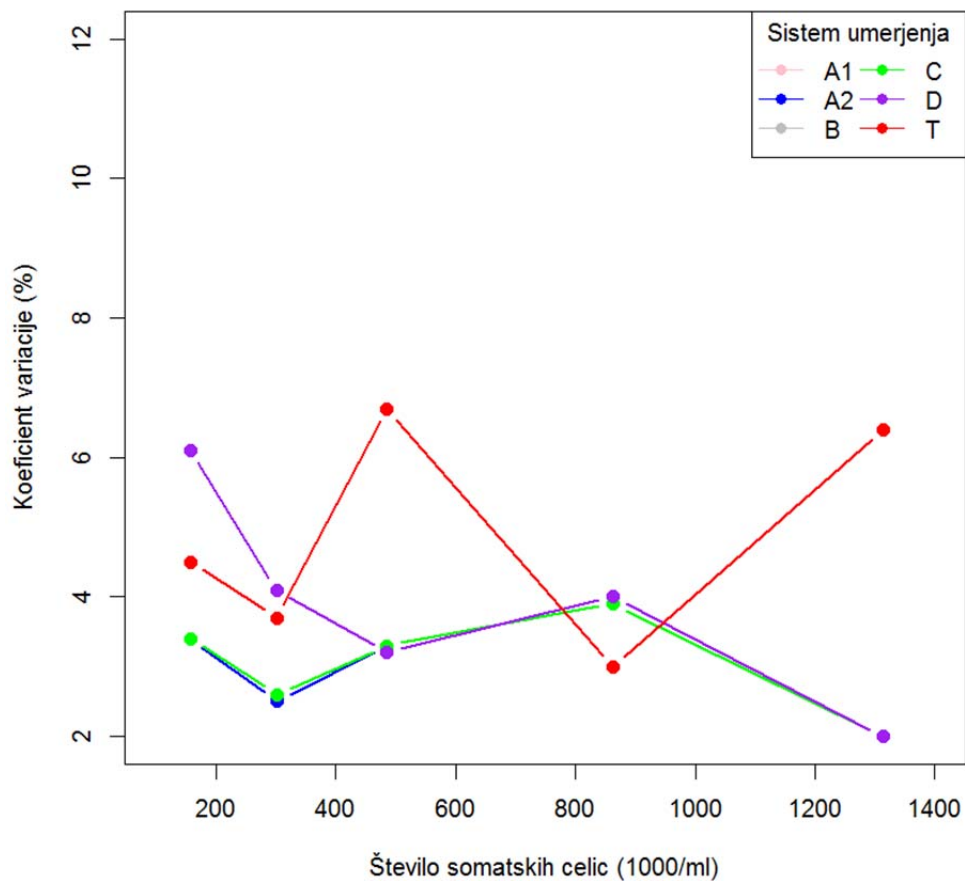
Slika 15: Število somatskih celic (1000/ml) glede na posamezen sistem umerjanja in vzorec za 6. ponovitev poskusa.

Figure 15: Somatic cell count (1000/ml) according to individual system of calibration and sample for 6th repetition of the experiment.

Preglednica 24: Povprečje, standardni odklon (Sd) in koeficient variacije (KV%) za ŠSC (1000/ml) za sisteme umerjanja A₁, A₂, B, C, D in T glede na posamezen vzorec za 6. ponovitev poskusa.

Table 24: Average, standard deviation (Sd) and coefficient of variation (KV%) for somatic cell count (1000/ml) for systems of calibration A₁, A₂, B, C, D and T according to individual sample for 6th repetition of the experiment.

Sistem umerjanja	Povprečje vseh sistemov umerjanja	Vzorec				
		1	2	3	4	5
	Povprečje	157,3	301,7	485,4	862,5	1313,6
A1	Povprečje	158,1	301,9	484,6	861,1	1310,8
	Sd	5,4	7,8	16,1	33,8	26,3
	KV%	3,4	2,6	3,3	3,9	2,0
A2	Povprečje	163,2	310,3	497,2	882,3	1342,2
	Sd	5,5	7,9	16,5	34,6	26,9
	KV%	3,4	2,5	3,3	3,9	2,0
B	Povprečje	154,5	297,2	478,4	851,9	1298,0
	Sd	5,3	7,7	16,0	33,5	26,1
	KV%	3,4	2,6	3,3	3,9	2,0
C	Povprečje	158,7	302,3	484,8	860,9	1310,1
	Sd	5,4	7,8	16,1	33,7	26,4
	KV%	3,4	2,6	3,3	3,9	2,0
D	Povprečje	155,0	299,4	483,0	860,8	1312,4
	Sd	9,5	12,4	15,5	34,2	25,7
	KV%	6,1	4,1	3,2	4,0	2,0
T	Povprečje	154,7	299,0	484,4	858,1	1308,2
	Sd	7,0	11,1	32,4	25,4	83,3
	KV%	4,5	3,7	6,7	3,0	6,4



Slika 16: Koeficient variacije za ŠSC (1000/ml) za posamezen sistem umerjanja glede na povprečje ŠSC vseh sistemov umerjanja za 6. ponovitev poskusa.

Figure 16: Coefficient of variation for somatic cell count (1000/ml) for individual system of calibration according to average of somatic cell count for all systems of calibration for 6th repetition of the experiment.

4.5.2 Povzetek statistične analize podatkov za vse ponovitve poskusa skupaj

Glede na postavljeni hipotezi povzemamo še primerjavo rezultatov za vse ponovitve poskusa skupaj in sicer najprej primerjavo vseh sistemov (A_1 , A_2 , B, C, D in T), nato pa še primerjavo sistemov brez sistema T. V Preglednicah 25 in 26 so podani koeficienti variacije za ŠSC za vsak posamezen sistem umerjanja in sicer za vsako posamezno ponovitev in vzorec. Obarvane vrednosti predstavljajo minimalno vrednost pri posameznem vzorcu.

4.5.2.1 Primerjava sistemov A_1 , A_2 , B, C, D in T

Preglednica 25: Koeficient variacije (%) za ŠSC za posamezen sistem umerjanja glede na ponovitev poskusa in vzorec. Obarvane vrednosti predstavljajo minimalno vrednost pri posameznem vzorcu.

Table 25: Coefficient of variation (%) for SCC for individual system of calibration according to individual repetition of the experiment and sample. Marked values represent minimum value for individual sample.

Ponovitev poskusa/ Vzorec	Sistem umerjanja					
	A_1	A_2	B	C	D	T
2/1	6,4	6,4	6,5	6,4	10,3	4,0
2/2	6,5	6,4	6,5	6,4	7,5	3,5
2/3	5,6	5,6	5,6	5,6	5,9	2,6
2/4	5,3	5,3	5,4	5,3	7,2	3,0
2/5	7,4	7,4	7,4	7,4	7,3	2,2
3/2	7,0	6,9	7,0	6,9	9,1	3,8
3/3	5,5	5,5	5,5	5,5	5,8	3,0
3/4	5,7	5,7	5,7	5,7	5,8	7,3
3/5	8,0	8,0	8,0	8,0	8,1	6,5
4/1	4,5	4,4	4,6	4,6	9,1	4,0
4/3	3,8	3,8	3,8	3,8	4,3	4,0
4/4	4,0	4,0	4,0	4,0	4,1	3,8
4/5	3,9	3,9	3,9	3,9	3,7	3,7
5/1	2,6	2,5	2,7	2,7	5,9	3,1
5/2	3,4	3,4	3,5	3,4	5,1	2,7
5/3	3,4	3,3	3,4	3,4	3,8	4,6
5/4	4,5	4,5	4,5	4,5	4,6	2,4
5/5	5,9	5,9	5,9	5,9	5,8	2,3
6/1	3,4	3,4	3,4	3,4	6,1	4,5
6/2	2,6	2,5	2,6	2,6	4,1	3,7
6/3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,2	6,7
6/4	3,9	3,9	3,9	3,9	4,0	3,0
6/5	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	6,4

Glede na predstavljene rezultate povzemamo nekatere ugotovitve.

V vseh ponovitvah poskusa so izračuni koeficientov variacije pokazali le majhne razlike med sistemi A₁, A₂, B in C. Večja odstopanja smo opazili le pri sistemu T, ki je imel največkrat najnižjo vrednost za KV% (15 od 23 vzorcev) in sistemu D, ki je imel najnižjo vrednost za KV% le pri 3 od 23 vzorcev. V štirih od petih ponovitev je bila pri večini vzorcev najmanjša razpršenost pri sistemu T, največja pa pri sistemu D. V poskusu so najbolj odstopali rezultati 6. ponovitve, v kateri se je kot najslabši izkazal sistem T (samo pri enem vzorcu najmanjša vrednost za KV%).

4.5.2.2 Primerjava sistemov A₁, A₂, B, C in D brez sistema T

Preglednica 26: Koeficient variacije (%) za ŠSC za posamezen sistem umerjanja brez sistema T glede na ponovitev poskusa in vzorec. Obarvane vrednosti predstavljajo minimalno vrednost pri posameznem vzorcu.

Table 26: Coefficient of variation (%) for SCC for individual system of calibration without system T according to individual repetition of the experiment and sample. Marked values represent minimum value for individual sample.

Ponovitev poskusa/ Vzorec	Sistem umerjanja				
	A ₁	A ₂	B	C	D
2/1	6,4	6,4	6,5	6,4	10,3
2/2	6,5	6,4	6,5	6,4	7,5
2/3	5,6	5,6	5,6	5,6	5,9
2/4	5,3	5,3	5,4	5,3	7,2
2/5	7,4	7,4	7,4	7,4	7,3
3/2	7,0	6,9	7,0	6,9	9,1
3/3	5,5	5,5	5,5	5,5	5,8
3/4	5,7	5,7	5,7	5,7	5,8
3/5	8,0	8,0	8,0	8,0	8,1
4/1	4,5	4,4	4,6	4,6	9,1
4/3	3,8	3,8	3,8	3,8	4,3
4/4	4,0	4,0	4,0	4,0	4,1
4/5	3,9	3,9	3,9	3,9	3,7
5/1	2,6	2,5	2,7	2,7	5,9
5/2	3,4	3,4	3,5	3,4	5,1
5/3	3,4	3,3	3,4	3,4	3,8
5/4	4,5	4,5	4,5	4,5	4,6
5/5	5,9	5,9	5,9	5,9	5,8
6/1	3,4	3,4	3,4	3,4	6,1
6/2	2,6	2,5	2,6	2,6	4,1
6/3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,2
6/4	3,9	3,9	3,9	3,9	4,0
6/5	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0

Če primerjamo sisteme umerjanja brez sistema T, ugotavljamo, da so bili koeficienti variacije dostikrat (pri 15 od 23 vzorcev) skoraj enaki oz. so se med seboj zelo malo razlikovali, kar smo že omenili. Največkrat je imel najmanjši (lahko je bil tudi enak kot še pri kakem drugem sistemu) koeficient variacije sistem A₂ (19 od 23 vzorcev), sledili so mu sistemi C (15 od 23), A₁ (13 od 23), B (10 od 23) in D (5 od 23).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Na podlagi analize rezultatov in glede na postavljeni hipotezi predstavljamo nekaj glavnih ugotovitev in sklepe.

5.1 RAZPRAVA

Dandanes primerljivost rezultatov analiz določanja somatskih celic v mleku po celem svetu temelji na dobrem delovanju in pravilnem vodenju fluoro-opto-elektronskih inštrumentov, pravočasni pripravi referenčnih materialov s pripisanimi vrednostmi (referenčne vrednosti) in sodelovanju rutinskih laboratorijev v medlaboratorijskih primerjavah (MP). Poenotenega sistema za določitev pripisanih vrednosti ni. Samo nekateri ponudniki upoštevajo rezultate, dobljene na svojih materialih, skupaj z rezultati, dobljenimi na materialih drugih ponudnikov, ki jih pridobijo v medsebojni primerjavi in/ali MP (Orlandini in van den Bijgaart, 2011). Glavni namen raziskave je bil preveriti različne sisteme umerjanja inštrumentov, ki temeljijo na različnih določitvah pripisanih oz. referenčnih vrednosti in izračunih umeritvenih enačb. Glede na pobudo za vpeljavo »svetovnega referenčnega sistema« za umerjanje inštrumentov za določanje somatskih celic v mleku nas je zanimalo, ali bi kateri od sistemov dal natančnejše rezultate v smislu manjših razlik med laboratoriji glede na trenutno stanje. V raziskavo smo vključili slovenske laboratorije, čeprav gre za majhno število laboratorijev in s tem posledično inštrumentov, saj smo kljub vsemu želeli ugotoviti, kateri od teh sistemov bi najbolje deloval tudi v slovenskem prostoru.

5.1.1 Posnetek trenutnega stanja

V Sloveniji vseh sedem laboratorijev uporablja F-O-E inštrumente, ki delujejo na principu pretočne citometrije, in sicer dveh različnih proizvajalcev. Trije laboratoriji mesečno spreminjajo nastavitve inštrumenta in sicer spreminjajo le naklon premice, drugi trije laboratoriji uporabljajo le tovarniške nastavitve, en laboratorij pa navaja, da inštrumenta ne umerja, istočasno pa ne uporablja tovarniških nastavitvev. Poenotenega sistema tudi pri nas tako ni. Trenutno velja, da je odločitev o načinu umerjanja individualna odločitev posameznega laboratorija (Hanus in sod., 2011). Takšno stanje lahko pričakujemo toliko časa, dokler se ne vzpostavi referenčni sistem, ki bi zagotovil enotne in primerljive rezultate analiz, kar pa je stvar mednarodnih sporazumov in politične volje (Baumgartner, 2008).

5.1.2 Upoštevanje začetnih umeritvenih enačb iz MP APRIL 2014 v MP OKTOBER 2014

V Bulletin IDF 469 (2013) in standardu ISO 13366-2/IDF 148-2 (2006) je navedeno, da lahko vrednosti za ŠSC, dobljene s F-O-E metodo in vrednosti, dobljene z referenčno metodo, skupaj uporabimo za izračun referenčnih vrednosti za umerjanje inštrumentov. Inštrumenti, ki sodelujejo pri takem izračunu, morajo biti predhodno umerjeni s predhodnimi vzorci za umerjanje. Za tak izračun referenčnih vrednosti se rezultati med referenčno in F-O-E metodo ne smejo preveč razlikovati. Razlika med povprečjem rezultatov referenčne metode in povprečjem rezultatov F-O-E metode mora biti manjša od kritične razlike (angl. »Critical Difference«; CD) (ISO 13366-2/IDF 148-2, 2006; Bulletin IDF 469, 2013). V naši raziskavi smo izračun kriterijev CD izvedli po navodilih iz dveh različnih virov (Bulletin IDF 469, 2013 - $CD_{Bulletin}$; ISO 13366-2/IDF 148-2, 2006 - CD_{ISO}), in kot tretjo možnost upoštevali mejo za obnovljivost F-O-E metode (ISO 13366-2/IDF 148-2, 2006 - CD_R).

Izračunane razlike med povprečjem referenčne metode in povprečjem F-O-E metode, z in brez upoštevanja začetnih umeritvenih enačb, smo tako primerjali s kritično razliko (CD), izračunano na prej omenjene tri različne načine. Izračunane vrednosti kriterija $CD_{Bulletin}$ so bile praviloma manjše, se pravi bolj stroge kot vrednosti kriterija CD_{ISO} , vrednosti kriterija CD_R pa so bile približno dva-krat večje od $CD_{Bulletin}$ oz. CD_{ISO} (Priloga C2). Zaradi tega so bile razlike manjše od kriterija $CD_{Bulletin}$ le pri treh vzorcih, od kriterija CD_{ISO} pri petih vzorcih, od kriterija CD_R pa pri osmih (z upoštevanjem začetnih umeritvenih enačb) oz. devetih vzorcih (brez upoštevanja začetnih umeritvenih enačb) od skupno devetih vzorcev (Priloga C3).

Razlike med povprečjem rezultatov referenčne metode in povprečjem rezultatov F-O-E metode v MP OKTOBER 2014 so bile manjše, če začetnih umeritvenih enačb iz MP APRIL 2014 nismo upoštevali (Priloga C3). Zato smo, kljub zahtevam (Bulletin IDF 469, 2013; ISO 13366-2/IDF 148-2, 2006), da morajo biti inštrumenti, ki sodelujejo v primerjavi, iz katere se izračunavajo nove referenčne vrednosti za umerjanje, predhodno že umerjeni, v MP OKTOBER 2014 upoštevali dejanske vrnjene rezultate laboratorijev in jih nismo preračunavali.

5.1.3 Vrednosti umeritvenih enačb za različne sisteme

Za trenutno stanje (sistem T) mesečnih nastavitvev inštrumentov šestih sodelujočih laboratorijev, so trije laboratoriji (inštrumenti Fossomatic) upoštevali nastavitve za naklon 1 in odsek na ordinati 0 (Preglednica 18). Preostali trije laboratoriji so nastavitve prilagajali, vendar so za vrednosti za odsek na ordinati vedno imeli 0, naklon pa med 1,04 in 1,08 (inštrumenta Fossomatic) ter med 0,86 in 0,90 (inštrument Somacount).

Podatki dveh MP organizatorja MIH Hübner (MIH, 2014; MIH, 2015), kjer je sodelovalo 64 (Fossomatic 58, Somacount 2, Somascope 1 in DCC 3) oz. 83 laboratorijev (Fossomatic 68, Somacount 9, Somascope 1 in DCC 2, drugo 3), kažejo podobno sliko kot smo jo opazili v naši raziskavi. Vsi laboratoriji, razen enega v obeh primerjavah, so za odsek na ordinati navedli vrednost 0. Za inštrumente Fossomatic je večina laboratorijev (81 % oz. 73,5 %) navedla vrednost za naklon 1, 17 % oz. 19 % laboratorijev je navedlo vrednosti za naklon med 1,01 do 1,08, en oz. pet laboratorijev pa ni podalo vrednosti. Laboratoriji, ki so uporabljali inštrumente Somacount, v prvi primerjavi (MIH, 2014) niso podali podatkov za naklon in odsek na ordinati, v drugi primerjavi (MIH, 2015) pa so samo trije navedli vrednosti za naklon in sicer 1. Da se vrednosti za naklon v praksi gibljejo blizu 1, ugotavlja tudi Orlandini (2012), saj, glede na opravljeno anketo, 86 % od 64-ih laboratorijev prilagodi oz. umeri inštrument, če ne dosežejo vrednosti za naklon med 0,95 in 1,05. Za dovoljeno odstopanje od referenčnih vrednosti pa nekateri laboratoriji upoštevajo 5 % odstopanje od referenčnih vrednosti.

Iz izračunanih vrednosti za naklon in odsek na ordinati za sisteme umerjanja A₁, A₂, B, C in D ugotavljamo (Preglednica 17), da je bila za inštrumente proizvajalca FOSS (Fossomatic) najnižja vrednost za naklon 0,9027 in najvišja 1,1481. Te vrednosti se razlikujejo glede na zgoraj omenjene vrednosti za sistem T, kot tudi vrednosti iz MP MIH Hübner (MIH, 2014; MIH, 2015) in omenjene ankete (Orlandini, 2012). Za inštrument proizvajalca Bentley (Somacount) pa je bila najnižja vrednost za naklon 0,8401 in najvišja 0,8664, kar se ne razlikuje bistveno glede na sistem T. Pri posameznem laboratoriju vrednosti za naklon, izračunane za posamezen sistem umerjanja, niso varirale veliko. Tudi vrednosti za odsek na ordinati so se gibale v relativno ozkem območju. Za sistem D je bila ta vrednost postavljena na nič.

Koeficienti determinacije (R^2) pri izračunih umeritvenih enačb so bili za vse sisteme umerjanj in za vse laboratorije večji od 0,99 (Priloga D). Če upoštevamo matematično zvezo med korelacijo in regresijo (Košmelj, 2007), je vrednost koeficienta korelacije v tem primeru 0,995. Torej je rezultat ustrezen, saj naj bi bil koeficient korelacije pri umerjanju inštrumentov $\geq 0,98$ (ISO 8196-2/IDF 128-2, 2009).

5.1.4 Razlike med metodami ugotavljanja osamelcev

Linsinger in sodelavci (1998) poudarjajo, da izbira metode za ugotavljanje osamelcev vpliva predvsem na izračun standardnega odklona v MP. Podatek za standardni odklon je pomemben tako pri ugotavljanju uspešnosti posameznega laboratorija v MP, saj se ga npr. upošteva pri izračunu kriterija uspešnosti – *z-vrednost* (MUVA, 2015; DRRR, 2015), kot tudi pri ugotavljanju kvalitete vzorcev (ISO 13528, 2005). Vsi rezultati in izračuni za ugotavljanje osamelcev in za primerjavo metod ugotavljanja osamelcev so prikazani v Prilogi A2, Prilogi B2 in Prilogi F.

Pri ugotavljanju osamelcev z metodo kvartilov, smo pri vsakem testiranju zaznali osamelce: pri prvem testu 6 od 198 podatkov (3 %), drugem 12 od 288 (4,2 %), tretjem 16 od 300 (5,3 %), četrtem 21 od 300 (7 %), petem in šestem po 23 od 300 (7,7 %), pri sedmem testu pa 10 od 300 podatkov (3,3 %). Z Grubbs-ovim testom pri $\alpha = 0,05$ nismo ugotovili nobenega osamelca pri nobenem testiranju. Tudi Chrominski in Tkacz (2010) navajata, da je metoda kvartilov zelo občutljiva, bolj kot metoda po Grubbs-u. Ugotovila sta namreč, da je bila metoda kvartilov pri upoštevanju 1,5 kvartilnega razmika 100 % uspešna, saj je zaznala v obeh naborih podatkov vseh osem zmernih osamelcev, metoda po Grubbs-u pri $\alpha = 0,05$ pa je v prvem naboru podatkov zaznala vseh osem osamelcev, v drugem naboru podatkov pa sedem. Študijo zaključujeta z ugotovitvijo, da je »Hampel test« edini odkril vse osamelce. Tudi Linsinger in sodelavci (1998) navajajo, da je »Hampel test« najbolj primerna metoda ugotavljanja osamelcev v MP. Vendar pa metodo po Grubbs-u za ugotavljanje osamelcev uporablja večina večjih organizatorjev MP (Actalia Cecalait, 2015d; MUVA, 2015; DRRR, 2015; AIA, 2015c) in je, skupaj z metodo po Cochran-u, tudi edina, s standardom (ISO 5725-2, 1994) predpisana numerična tehnika.

5.1.5 Ugotavljanje kakovosti vzorcev

5.1.5.1 Ustrezno razlivanje v podvzorce (test homogenosti)

Test homogenosti smo opravili po postopku opisanem v standardu ISO 13528 (2005), in sicer s predlogo v programu Microsoft® Excel® »*Homogeneity check according to ISO 13528 and International Harmonized Protocol*«, ki smo jo pridobili s spletne strani <http://www.iswa.uni-stuttgart.de/ch/aqs/download/freeware.en.html> (Koch, 2011b).

V MP OKTOBER 2014 so bili vsi vzorci ustrezno pripravljene in razliti v podvzorce (Priloge B3 do B11).

Vzorci v poskusu so bili prav tako ustrezno pripravljene in razliti v podvzorce pri 1., 2., 5. in 6. ponovitvi poskusa (Priloga G). V 3. ponovitvi poskusa smo za vzorec 1 in pri 4. ponovitvi za vzorec 2 ugotovili neustrezno homogenost (Priloga G). V prvem primeru je bil kriterij za ustrezno homogenost 1,335 ($0,3 \times 4,449$) ŠSC \times 1000/ml, izračunana vrednost pa 3,865 ŠSC \times 1000/ml. V drugem primeru pa je bil kriterij za ustrezno homogenost 4,543 ($0,3 \times 15,144$) ŠSC \times 1000/ml, izračunana vrednost pa 6,794 (ŠSC \times 1000/ml). Za ostale vzorce v 3. in 4. ponovitvi poskusa je bila ugotovljena ustrezna homogenost (Priloga G). Vzorec 1 pri 3. ponovitvi poskusa je bil edini vzorec, ki je bil pripravljen z mešanjem mleka dveh krav, vzorec 2 pri 4. ponovitvi pa je bilo bazensko mleko. Glede na to, da smo tudi ostale vzorce pripravljali z mešanjem različnih osnovnih surovin in da je vzorec 2 pri 4. ponovitvi predstavljalo bazensko mleko, vzroka za neustrezno homogenost vzorcev ne moremo pripisati izbiri surovine.

Bolj verjetno je, da je bila nehomogenost vzorcev posledica neustrezne priprave teh dveh vzorcev.

5.1.5.2 Ugotavljanje roka uporabe vzorcev (test stabilnosti)

Stabilnost vzorcev smo ocenjevali na osnovi ponavljajočih meritev vzorcev v obdobju sedmih dni in primerjavi povprečij ŠSC s povprečjem ŠSC prvi dan meritve ($t = 0$). Standard ISO 13366-2/IDF 148-2 (2006) namreč navaja, da se lahko vzorci, konzervirani z bronopolom v 24-ih urah po odvzemu, hranijo pri temperaturi od 2 °C do 12 °C še dodatnih šest dni, torej skupaj sedem dni. Test stabilnosti smo opravili po postopku opisanem v standardu ISO 13528 (2005). Kot kriterija ustrezne stabilnosti smo upoštevali vrednosti za ponovljivost F-O-E metode (ISO 13366-2/IDF 148-2, 2006) oziroma kriterij iz standarda ISO 13528 (2005), ki je enak kot za test homogenosti vzorcev.

Ponovljivost predstavlja absolutno razliko med dvema neodvisnima, enkratnima meritvama, dobljenima z isto metodo, na identičnem testnem materialu, v istem laboratoriju, s strani iste osebe, z uporabo iste opreme, v kratkem časovnem obdobju. Če smo za kriterij stabilnosti oz. rok uporabe upoštevali kriterij za ponovljivost za F-O-E metodo (ISO 13366-2/IDF 148-2, 2006), so vsi vzorci, tako v MP OKTOBER 2014 kot tudi v poskusu (november 2014 do vključno april 2015), izkazovali ustrezno stabilnost v obdobju sedmih dni (Priloge B12 in G).

Pri upoštevanju kriterija za stabilnost po standardu ISO 13528 (2005), pa so rezultati kar v 18 primerih od skupno 39 vzorcev (MP OKTOBER 2014 in poskus skupaj) pokazali nestabilnost (Priloge B12 in G). Neustrezno stabilnost posameznih vzorcev smo ugotovili tako v MP OKTOBER 2014 kot tudi v vseh ponovitvah poskusa. Število neustreznih vzorcev v MP OKTOBER 2014 in posamezni ponovitvi poskusa se je gibalo med 2 in 3, izstopala pa je 6. ponovitev poskusa, kjer so bili neustrezni kar 4 vzorci od skupno 5 vzorcev (Preglednica 19).

Od skupno 18 nestabilnih vzorcev je bil le 2. vzorec v 3. ponovitvi poskusa neustrezen pri vseh meritvah v obdobju sedmih dni (Priloga G37). Število vzorcev, ki so sedmi dan izkazali stabilnost, kateri koli drugi dan prej pa ne, je bilo kar 6, medtem ko sta bila samo 2 vzorca nestabilna izključno sedmi dan.

Vzorci, ki so kateri koli dan meritve v obdobju sedmih dni izkazovali nestabilnost, so bili pripravljani tako iz bazenskega mleka kot z mešanjem mleka posameznih krav in bazenskega mleka oz. posnetega bazenskega mleka. Zanimivo je, da kriteriju za stabilnost ni ustrezal noben vzorec, pripravljen izključno iz bazenskega mleka, kar bi, glede na homogenost surovine, pričakovali. Zanimivo je tudi, da so bili vzorci, ki jim je

bila dodana smetana, tako zadovoljivo homogeni kot stabilni. Oba nehomogena vzorca (vzorec 1 / 3. ponovitev poskusa in vzorec 2 / 4. ponovitev poskusa) sta bila med sedem dnevnim shranjevanjem tudi nestabilna, kar je razumljivo že z vidika nehomogenosti.

V večini primerov (14 od 18), kjer je bila kateri koli dan testiranja ugotovljena neustrezna stabilnost, so bili to vzorci s $\dot{S}SC < 300.000$ celic/ml. Za vzorce z zelo nizkim $\dot{S}SC (< 40.000$ celic/ml) je bil kriterij za ustrezno stabilnost vzorcev glede na standard ISO 13528 (2005) 900 celic/ml, pri vzorcih s $\dot{S}SC$ med 110.000 celic/ml in 300.000 celic/ml pa so bili kriterij med 1.300 celic/ml in 6.400 celic/ml. Ob upoštevanju mej za ponovljivost, ki so odvisne od ravni $\dot{S}SC$ (pri 300.000 celic/ml je dovoljena razlika med dvema rezultatoma 42.000 celic/ml), predvsem pa mej za obnovljivost F-O-E metode (pri 300.000 celic/ml je dovoljena razlika med dvema rezultatoma 67.000 celic/ml), ter omejitev pri zagotavljanju homogenosti vzorcev menimo, da so ti kriteriji prestrogi. Poudariti je namreč potrebno, da so med sedem dnevnim hranjenjem vzorcev določene vrednosti za $\dot{S}SC$ nihale enkrat navzgor, drugič navzdol. Po sedem dnevnem shranjevanju vseh 39 vzorcev, konzerviranih z bronopolom, smo pri 18-ih vzorcih določili večje, pri 21-ih pa manjše vrednosti $\dot{S}SC$ od izhodiščnih ($t = 0$). Pri vzorcih s $\dot{S}SC < 300.000$ celic/ml so bile na primer vrednosti za $\dot{S}SC$ sedmi dan pri sedmih vzorcih manjše od izhodiščnih in pri sedmih vzorcih večje kot prvi dan ($t = 0$). Podobne rezultate navajajo tudi drugi viri (Barbano in sod., 2011; Erdem in sod., 2012; Bulletin IDF 466, 2013). Če za test stabilnosti (kriterij po ISO 13528, 2005) upoštevamo samo meritve, izvedene sedmi dan po pripravi vzorcev, torej zadnji dan roka uporabnosti, je bilo od skupno 39 vzorcev neustreznih 12 vzorcev.

Ugotavljali smo tudi stabilnost dveh vzorcev, ki smo ju takoj po pripravi zamrznili in hranili pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Priloga G38). Oba vzorca sta bila ustrezno pripravljena, kar smo potrdili s testom homogenosti. Vzorca smo odtajali 22., 31. in 45. dan po pripravi in analizirali. Pri vzorcu 1 smo pri prvem merjenju ($t = 0$) določili 153.100 celic/ml, 22. dan 155.200 celic/ml, 31. dan 156.800 celic/ml in 45. dan 163.000 celic/ml. Analize so pri vsakem merjenju pokazale večje vrednosti $\dot{S}SC$. Tudi povprečne vrednosti $\dot{S}SC$ za 2. vzorec ($t = 0$; 465.100 celic/ml) so od prve do zadnje kontrole nekoliko naraščale. Povprečna vrednost za $\dot{S}SC$, ki smo jo izmerili v vzorcu, odtajanem 45. dan, je bila 474.700 celic/ml. Vzorec 1 je kriteriju (razlika < 2.700 celic/ml) za stabilnost (ISO 13528, 2005) ustrezal 22. dan, vzorec 2 (razlika < 4.900 celic/ml) pa 31. dan. Oba vzorca sta tako 22., 31. kot 45. dan ustrezala kriterijem za ponovljivost F-O-E metode (13366-2/IDF 148-2, 2006). Naraščanje vrednosti $\dot{S}SC$ med hranjenjem zamrznjenih vzorcev, kar smo opazili v našem poskusu, je v nasprotju z mnogimi objavami (Barkema in sod., 1997; Malinowski in sod., 2008; Erdem in sod., 2012; Marzo in Barbano, 2013), ki navajajo, da se pri zamrznjenih vzorcih vrednost za $\dot{S}SC$ zniža, najverjetneje zaradi poškodb somatskih celic (kristali ledu) (Schukken in sod., 1989), ki nastanejo kot posledica neprimernega načina zamrzovanja in tajanja vzorcev

(Malinowski in sod., 2008; ISO 13366-2/IDF 148-2, 2006). Standard ISO 13366-2/IDF 148-2 (2006) pa celo navaja, da zamrzovanje vzorcev za določanje ŠSC ni zaželeno, saj je lahko določeno oz. izmerjeno ŠSC kar za 10 % do 20 % manjše od izhodiščnih vrednosti ŠSC.

Določitev manjšega števila somatskih celic v mleku po hranjenju vzorcev je lahko torej posledica mehanskih poškodb somatskih celic. Ena od možnih razlag določitve večjega ŠSC je, da pride po poškodbah somatskih celic med zamrzovanjem do združevanja citoplazemskih delcev, ki vsebujejo DNK, s kazeinskimi micelami, ki jih nato inštrument zazna oz. prešteje kot somatske celice, kar navajajo Hill in sodelavci (1982).

Lahko zaključimo, da je na rezultate stabilnosti vzorcev v veliki meri vplivala ponovljivost F-O-E metode. Dovoljena odstopanja za ponovljivost so namreč večja kot so predpisani kriteriji za ugotavljanje tako homogenosti kot stabilnosti (ISO 13528, 2005). Kot primer lahko prikažemo vrednosti za vzorec 2 v 6. ponovitvi poskusa (Priloga G36). Začetno povprečno ŠSC ($t = 0$) je bilo 295.300 celic/ml, izračunana vrednost kriterija za stabilnost pa 6.400 celic/ml. Standard ISO 13366-2/IDF 148-2 (2006) za raven ŠSC okrog 300.000 celic/ml predpisuje mejo za ponovljivost 42.000 celic/ml. Pri tem vzorcu smo sedmi dan določili najmanjše povprečje ŠSC in sicer 288.000 celic/ml. Razlika med povprečjema meritev na začetku in sedmi dan je bila tako 7.300 celic/ml in kriteriju stabilnosti ni več ustrezala. Razlika 7.300 celic/ml predstavlja le približno 2,5 % od povprečja ŠSC prvi dan. Podoben primer je 5. vzorec v 3. ponovitvi poskusa, pri katerem smo na koncu shranjevanja določili večje povprečje ŠSC od izhodiščnega (Priloga G18). Začetno povprečno ŠSC ($t = 0$) je bilo 1.374.300 celic/ml, izračunana vrednost kriterija za stabilnost pa 39.400 celic/ml. Standard ISO 13366-2/IDF 148-2 (2006) za raven ŠSC okrog 1.500.000 celic/ml predpisuje mejo za ponovljivost 126.000 celic/ml. Pri tem vzorcu smo sedmi dan določili 1.436.000 celic/ml. Razlika med povprečjema meritev na začetku in sedmi dan je bila tako 61.700 celic/ml in kriteriju stabilnosti ni več ustrezala, predstavljala pa je približno 4,5 % od povprečja ŠSC prvi dan.

Glede na to, da so se vse vrednosti pri vseh vzorcih v obdobju meritev sedmih dni gibale znotraj dovoljenih vrednosti za ponovljivost F-O-E metode (ISO 13366-2/IDF 148-2, 2006) ugotavljamo, da je bila stabilnost vzorcev surovega mleka, konzerviranega z bronopolom (1 tabletko / 40 ml mleka), namenjenih umerjanju inštrumentov za določanje ŠSC, ustrezna vsaj sedem dni.

5.1.6 Primerjava sistemov umerjanja

V prvi ponovitvi poskusa smo pri pregledu vrnjenih rezultatov ugotovili kar nekaj napak pri podajanju oz. prepisu rezultatov analiz, en laboratorij pa je zaradi okvare inštrumenta meritve opravil tri dni po preteku roka uporabnosti vzorcev. Zato smo celotno prvo ponovitev poskusa izključili iz analize in ponovno zaprosili laboratorije, da upoštevajo in natančno sledijo protokolu izvedbe.

Vsi v poskus vključeni laboratoriji, so pri ostalih ponovitvah poskusa (od 2 do 6) opravili analize vzorcev znotraj predvidenega roka uporabe vzorcev, to je sedem dni.

Pri vseh ponovitvah poskusa smo ugotovili večjo razpršenost oz. variabilnost pri vzorcih z večjim številom somatskih celic. To je pričakovano, saj so tudi mejne vrednosti za ponovljivost in obnovljivost večje pri večji ravni ŠSC (ISO 13366-1/IDF 148-1, 2008; ISO 13366-2/IDF 148-2, 2006).

Pri primerjavi sistemov umerjanj, na podlagi koeficientov variacije (KV%), so bili sistemi A₁, A₂, B in C med seboj zelo podobni, odstopala pa sta sistema T in D (Preglednica 25). Vrednosti KV% za sisteme A₁, A₂, B in C so se gibale med 2,0 (vzorec 5 v 6. ponovitvi) in 8,0 (vzorec 5 v 3. ponovitvi). Pri sistemih A₁, A₂, B in C so bile razlike med KV% zanemarljive in sicer največ 0,2. Pri sistemu D so se KV% gibali med 2,0 in 10,3, pri sistemu T pa med 2,2 in 7,3.

Pri ponovitvah 2 do 5 so bili KV% pri večini vzorcev (14 od 18 vzorcev) pri sistemu T najmanjši (Preglednica 25), pri vzorcih, kjer pa so bili KV% večji, pa je bila razlika v KV% v primerjavi z ostalimi sistemi (brez D) relativno majhna (največ 1,6; 4. vzorec/ponovitev 3). Obratno velja za sistem D, saj je bil pri večini vzorcev (13 od 18 vzorcev) KV% največji, še posebno je to bilo opazno pri vzorcih z < 400.000 celic/ml. Sistem D je enake zakonitosti kazal tudi pri 6. ponovitvi, medtem ko se je sistem T pri 6. ponovitvi od ostalih sistemov (razen D) razlikoval kar pri štirih vzorcih (vzorec 1, 2, 3 in 5). Pri slednjih dveh sta bila koeficienta variacije zelo velika glede na ostale sisteme (Slika 16, Preglednica 24). Pri vzorcu 4, ki je tudi edini izkazoval ustrezno stabilnost (Priloga G36), je bil KV% najmanjši.

Kljub dejstvu, da smo v vsaki ponovitvi poskusa ugotovili neustrezno stabilnost vsaj enega vzorca, nestabilnost vzorcev, razen v posameznih primerih, ni vplivala na razlike med laboratoriji, kar je pokazala primerjava koeficientov variacije med sistemom T in ostalimi sistemi, brez sistema D. Od dvanajstih vzorcev (2. do 6. ponovitev, brez obeh neustrezno homogenih vzorcev), pri katerih smo ugotovili neustrezno stabilnost, je bil pri šestih vzorcih (ponovitev/vzorec: 2/1, 2/4, 3/2, 3/5, 4/1 in 5/2) KV% za sistem T manjši od ostalih sistemov, pri šestih pa večji (ponovitev/vzorec: 5/1, 5/3, 6/1, 6/2, 6/3

in 6/5). Od slednjih so bile pri štirih vzorcih (5/1, 5/3, 6/1 in 6/2) razlike med KV% sistema T in ostalih sistemov relativno majhne (med 0,6 in 1,3 - Slika 14 in 16), pri ostalih dveh vzorcih (6/3 in 6/5) pa opazno večje (med 3,4 in 4,4; enkrat oz. dvakrat večji KV% pri sistemu T kot pri ostalih - Slika 16). Obratno pa smo npr. opazili pri vzorcu 4 v 3. ponovitvi, kjer je bil KV% pri sistemu T največji (Preglednica 21, Slika 10), vendar pa je ta vzorec vseh sedem dni izkazoval ustrezno stabilnost (Priloga G18).

Pri primerjavi povprečij ŠSC pri posameznih vzorcih v celotnem poskusu (Preglednice 20 do 24), smo z izračunom po sistemu B največkrat dobili najmanjše povprečje (pri 18 od 23 vzorcev), z izračunom po sistemu A₂ pa pri vseh vzorcih (pri 23 od 23 vzorcev) največje povprečje. Vrednosti povprečij ŠSC sistema A₂ so bile večje za 3,3 % do 5,6 % glede na povprečja sistema B (primerjava na 18 od 23 vzorcev). V MP OKTOBER 2014 sta sodelovala dva laboratorija z referenčno metodo (ISO 13366-1/IDF 148-1, 2008) in devet s F-O-E metodo (ISO 13366-2/IDF 148-2, 2006). Povprečje rezultatov dobljenih z referenčno metodo je bilo pri vseh vzorcih, razen pri prvem, večje od povprečja rezultatov dobljenih s F-O-E metodo. Za izračun referenčnih vrednosti pri sistemu A₂ (tehtana sredina) smo upoštevali faktor oz. utež 0,5 za referenčno metodo, zato so bile referenčne vrednosti večje. Večji rezultati ŠSC, dobljeni z umerjanjem po sistemu A₂, so bili torej posledica načina določitve referenčnih vrednosti za izračun umeritvenih enačb.

Glede na postavljene hipoteze, da bodo sistemi umerjanja A₁, A₂, B, C in D dali natančnejše rezultate od trenutnega stanja T oz. da bo sistem umerjanja C dal natančnejše rezultate od sistemov A₁, A₂, B in D, lahko povzamemo naslednji dve ugotovitvi:

- pri primerjavi vseh sistemov skupaj smo najnižjo vrednost za koeficient variacije največkrat, in sicer pri 15 od 23 vzorcev (Preglednica 25), dobili pri sistemu T;
- pri primerjavi sistemov umerjanja brez sistema T, so bili sistemi med seboj primerljivi, malenkostno je odstopal le sistem D. Koeficienti variacije so bili dostikrat enaki (pri 15 od 23 vzorcev) oz. so se zelo malo razlikovali. Najmanjši koeficient variacije smo dobili pri največjem številu vzorcev z umerjanjem po sistemu A₂ (19 od 23 vzorcev), sledili pa so mu sistemi C (15 od 23), A₁ (13 od 23), B (10 od 23) in D (5 od 23) (Preglednica 26).

Pri sistemu D so bili koeficienti variacije opazno večji, glede na ostale sisteme, pri vrednostih za ŠSC pod 400.000 celic/ml (Slike 8, 10, 12, 14 in 16; KV% od 4,1 do 10,3). Glede na dejstvo, da so bile referenčne vrednosti sistema D enake kot pri sistemu A₁, je tako način določitve vrednosti za odsek na ordinati, ki je bil pri sistemu D postavljen na 0, vplival na večjo variabilnost med laboratoriji (večje vrednosti za KV%). To morda kaže na dejstvo, da umerjanje inštrumentov samo s korekcijo naklona,

kot to navajajo različni viri (MIH, 2014; MIH, 2015; Orlandini, 2012), v tem merilnem območju ni najbolj primerno, ampak je potrebno upoštevati tudi vrednost odseka na ordinati. V poročilih MP organizator Actalia Cecalait (2013, 2014, 2015d) podaja predlagane umeritvene enačbe z obema parametroma, naklonom in odsekom na ordinati.

Če izvzamemo sistema T in D ugotavljamo, da so imeli koeficienti variacije trend padanja od 2. do 6. ponovitve poskusa. Sprememba je najbolj opazna od 4. ponovitve poskusa dalje. Kot namiguje trend padanja KV%, bi se lahko variabilnost med laboratoriji, ne glede na izbran sistem umerjanja (brez D in T), s časom (mesecem) zmanjševala. Seveda pa je priporočljivo izvajati preverjanje umerjanja oz. umerjanje inštrumentov mesečno (ISO 13366-2/IDF 148-2, 2006; Orlandini, 2012).

Izvedli smo tudi primerjavo sistemov po izločitvi vseh vzorcev, ki niso zadostili kriteriju za stabilnost iz standarda ISO 13528 (2005). Delež vzorcev z najnižjim koeficientom variacije je bil pri primerjavi vseh sistemov ponovno največji pri sistemu T (9 od 11 vzorcev). Pri primerjavi sistemov umerjanja brez sistema T pa je bil delež vzorcev z najnižjim KV% pri sistemih A₂ in C (8 od 11 vzorcev) enak.

Na podlagi omenjenih ugotovitev obe hipotezi zavrnamo.

5.1.7 Aplikacija sistemov umerjanja na primeru »Master instrument«-a

Glede na predlagano shemo »referenčnega sistema« bi, za prenos referenčnih vrednosti preko vzorcev SRM na lokalne nivoje, lahko skrbeli določeni nacionalni laboratoriji oz. tako imenovani »Master instrument«-i. »Master instrument« bi bil umerjen v »svetovnem referenčnem sistemu«, vrednosti ŠSC za vzorce SRM, dobljene z meritvami s tem inštrumentom, pa bi služile kot referenčne vrednosti za lokalne laboratorije, ki bi na ta način lahko umerjali inštrumente ter bili primerljivi na »svetovni ravni«.

Inštitut za mlekarstvo in probiotike (IML-PRO), Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, že vrsto let sodeluje v mednarodnih MP za določanje števila somatskih celic v mleku. Tudi sam organizira MP in je hkrati ponudnik sekundarnih referenčnih materialov (SRM). Želeli smo preveriti, ali bi bile meritve ŠSC z izbranim »Master instrument«-om (IML-PRO), ki bi bil umerjen na preskušane sisteme umerjanja (A₁, A₂, B in D), v mednarodnih MP bolj točne v smislu manjših razlik med rezultati inštrumenta in referenčnimi vrednostmi, kot pri trenutnem sistemu T. Meritve z inštrumentom smo preračunali na nove vrednosti glede na umeritvene enačbe omenjenih sistemov in rezultate primerjali z referenčnimi vrednostmi iz MP. Za primerjavo smo izbrali dve MP organizatorja MIH Hübner iz Nemčije (MIH, 2014; MIH, 2015).

Vrednosti za ŠSC so pri sistemu T, od referenčnih vrednosti iz MP v obeh primerjavah, v povprečju odstopale le za 1 % (101 % dosežene vrednosti za ŠSC glede na referenčne vrednosti) (Priloga I). Razlike med referenčnimi vrednostmi in izračunanimi vrednostmi za ŠSC, glede na posamezne sisteme umerjanj, pa bi bile večje in sicer bi vrednosti ŠSC pri sistemu A₁ odstopale za 4 %, pri A₂ za 7 %, pri B za 2 % in pri D za 4 % (A₁=104 %, A₂=107 %, B=102 % in D=104 % dosežene vrednosti za ŠSC glede na referenčne vrednosti) (Priloga I). Edino sistem B bi torej dal podobno povprečno odstopanje, vendar bi bilo odstopanje pri višjem ŠSC (okrog 600.000 celic/ml), zaradi upoštevanja večjega naklona (1,0202), tudi večje. Odstopanja pri višjih vrednostih ŠSC bi bila tudi pri ostalih sistemih iz istega razloga večja. Glede na podatek (Orlandini, 2012), da laboratoriji za dovoljeno povprečno odstopanje od referenčnih vrednosti uporabljajo vrednost 5 %, pa edino sistem A₂ v tem primeru ne bi bil ustrezen, za katerega pa smo že prej omenili, da daje med vsemi sistemi največje vrednosti za ŠSC. Pri sistemu A₂ je bila variabilnost med laboratoriji majhna (dobra natančnost; največkrat najmanjši KV%, če ne upoštevamo sistema T), vendar pa rezultati, glede na primerjavo z omenjenima MP (MIH, 2014; MIH, 2015), ne bi bili dovolj točni. Večja odstopanja vrednosti, izračunanih po sistemih A₁, A₂, B in D, so najverjetneje posledica dejstva, da večina sodelujočih laboratorijev v omenjenih MP ne umerja inštrumentov. Realnejšo oceno primernosti preskušanih sistemov umerjanja pa bomo lahko dobili, ko bo »svetovni referenčni sistem« umerjanj sprejet in vpeljan in bodo vsi sodelujoči laboratoriji upoštevali navodila za umerjanje.

5.2 SKLEPI

Glede na dobljene rezultate in ugotovitve lahko podamo sledeče sklepe.

Metoda kvartilov za ugotavljanje osamelcev je bolj stroga, saj smo ugotovili več osamelcev kot pa z metodo po Grubbs-u pri $\alpha = 0,05$. Prednost metode po Grubbs-u je, da upošteva določeno stopnjo značilnosti (α), poleg tega je metoda po Grubbs-u predpisana tudi s standardi.

Navodila (ISO 13366-2/IDF 148-2, 2006; Bulletin IDF 469, 2013), da morajo biti inštrumenti, ki sodelujejo v MP, iz katere se izračunavajo nove referenčne vrednosti za umerjanje, predhodno umerjeni, v našem primeru nismo upoštevali. Ugotovili smo namreč, da so bile razlike med povprečjem rezultatov referenčne metode in povprečjem rezultatov F-O-E metode v MP OKTOBER 2014 manjše, če začetnih umeritvenih enačb iz MP APRIL 2014 (pred-umerjanje) nismo upoštevali.

Variabilnost med laboratoriji je bila največkrat najmanjša pri sistemu umerjanja T, ki je predstavljal trenutne (mesečne) nastavitve naklonov umeritvenih krivulj za inštrumente sodelujočih laboratorijev.

Najbolj variabilne oz. najmanj natančne rezultate smo ugotovili pri sistemu D, pri katerem smo kot referenčne vrednosti upoštevali povprečja iz MP, pri umeritvenih enačbah pa smo določili vrednost odseka na ordinati nič ($a = 0$). Sistemi A₁, A₂, B in C so se med seboj malo razlikovali. Pri primerjavi sistemov brez sistema T pa je bila variabilnost med laboratoriji najmanjša pri sistemu A₂.

Hipotezo 1, da bodo sistemi umerjanja A₁, A₂, B, C in D dali natančnejše rezultate od trenutnega stanja T, zavrnamo.

Hipotezo 2, da bo sistem umerjanja C dal natančnejše rezultate od sistemov A₁, A₂, B in D, zavrnamo.

Trenutno najboljša izbira je sistem T, saj smo na primeru »*Master instrument*«-a potrdili, da bi v medlaboratorijskih primerjavah (MIH, 2014; MIH, 2015) s sistemom T, dosegli najmanjše razlike od referenčnih vrednosti, torej najboljše oz. najbolj točne rezultate.

6 POVZETEK

6.1 POVZETEK

Število somatskih celic (ŠSC) v mleku služi kot kazalnik zdravstvenega stanja mlečnih žlez molznic. Somatske celice v mleku vključujejo različne tipe belih krvnih celic in nekaj epitelnih celic. Povečano ŠSC je primarni kazalnik vnetja mlečne žleze, vrstna sestava teh celic in njihova koncentracija (število) pa se med vnetjem močno spreminjata (Orlandini in van den Bijgaart, 2011; Bulletin IDF 448, 2011). Ugotavljanje ŠSC je pomembno tudi z vidika higiene (Regulation (EC) No 853/2004) in plačevanja mleka, saj je podatek o ŠSC eden izmed parametrov kakovosti mleka.

Število somatskih celic v mleku se najpogosteje določa s fluoro-opto-elektronskimi (F-O-E) inštrumenti, princip metode pa opisuje standard ISO 13366-2/IDF 148-2. Ti inštrumenti morajo biti točno nastavljeni oz. umerjeni glede na uradno referenčno metodo (Commission Regulation (EC) No 1664/2006), to je mikroskopsko štetje, ki je opisano v standardu ISO 13366-1/IDF 148-1. Ker certificiranega referenčnega materiala (CRM), ki bi ga lahko uporabili kot »zlati standard« (angl. »golden standard«) za umerjanje ni (Baumgartner, 2008), si laboratoriji za umerjanje sami iščejo rešitve, kako priti do referenčnega materiala in referenčnih vrednosti. Umerjanje inštrumentov izvajajo laboratoriji z lokalnimi referenčnimi materiali, ki jih okarakterizira eden ali pa omejeno število lokalnih laboratorijev. Dodatno težavo predstavlja tudi ustrezna izvedba referenčne metode, saj je odvisna od natančnega dela oz. ocene posameznega analitika in pomeni tveganje subjektivne napake, je izredno zamudna in zahteva dobro usposobljene ljudi. Naštete pomanjkljivosti referenčne metode se kažejo predvsem v slabi primerljivosti rezultatov v MP in slabi ponovljivosti rezultatov v posameznem laboratoriju oz. pri posameznem analitiku. Poleg tega se referenčni materiali razlikujejo tudi po tipu celic in matriksu. Omenjene pomanjkljivosti kličejo po razvoju boljšega sistema za umerjanje inštrumentov za štetje somatskih celic v mleku.

V Sloveniji trenutno deluje sedem laboratorijev, ki opravljajo rutinske oz. inštrumentalne analize za ugotavljanje števila somatskih celic v mleku, in en laboratorij, ki izvaja referenčno metodo, nimamo pa vpeljanega sistema umerjanja inštrumentov. Zato smo se odločili, da proučimo načine, ki bi bili primerni za države z relativno majhnim številom laboratorijev in vzorcev, kot je naša. Ker je projektna skupina, ki sta jo imenovali IDF in ICAR že podala (Bulletin IDF 469, 2013) osnovne zahteve in postopke, kako naj bi sistem deloval, je bil namen tega dela, da na osnovi novih priporočil in smernic oblikujemo možne modele sistema umerjanja in jih preizkusimo na primeru uvedbe takega sistema v naš prostor.

Ker morajo biti inštrumenti, ki sodelujejo v MP, iz katere se izračunajo referenčne vrednosti za naknadno umerjanje, predhodno umerjeni (Bulletin IDF 469, 2013), smo v mesecu aprilu 2014 izvedli MP APRIL 2014, iz katere smo pridobili začetne umeritvene enačbe, ki naj bi jih nato upoštevali pri izračunih umeritvenih enačb v MP OKTOBER 2014. Ker so bile razlike med povprečjem rezultatov referenčne metode in povprečjem rezultatov F-O-E metode v MP OKTOBER 2014 manjše, če začetnih umeritvenih enačb iz MP APRIL 2014 nismo upoštevali, smo v MP OKTOBER 2014 upoštevali dejanske vrnjene rezultate laboratorijev in jih nismo preračunavali.

V MP OKTOBER 2014 smo pripravili devet vzorcev mleka. Vsak vzorec smo razlili v podvzorce in jih v okviru mednarodne MP, ki jo je organiziral IML-PRO, poslali enajstim laboratorijem. Laboratoriji so te podvzorce analizirali (dva laboratorija z referenčno metodo, devet s F-O-E metodo) in nam vrnili podatke in sicer za vsak podvzorec po dve meritvi. Vrnjene podatke meritev smo testirali na prisotnost osamelcev z metodo po Grubbs-u ($\alpha = 0,05$).

Preizkusili smo pet sistemov (označili smo jih z A_1 , A_2 , B, C in D) umerjanja inštrumentov, ki se razlikujejo glede na način določanja referenčnih vrednosti oz. načinu izračuna umeritvene enačbe, in jih primerjali s trenutnim stanjem (T). Načini umerjanja inštrumentov A_1 , A_2 in B so se razlikovali med seboj po postopku izračuna referenčnih vrednosti iz rezultatov MP. Pri načinu A_1 so referenčne vrednosti predstavljala povprečja vseh sodelujočih laboratorijev (Bulletin IDF 469, 2013), pri načinu A_2 smo referenčne vrednosti izračunali podobno kot pri sistemu A_1 , vendar smo za utež referenčne metode upoštevali vrednost 0,5 (ISO 13366-2/IDF 148-2, 2006), pri načinu B pa so referenčne vrednosti predstavljala »robustna« povprečja (ISO 13528, 2005). Pri načinu C so referenčne vrednosti oz. vrednosti za umerjanje predstavljale meritve izbranega inštrumenta (t.i. »Master instrument«), vključenega v mednarodno kontrolo. Pri načinu umerjanja D so bile referenčne vrednosti iste kot pri načinu A_1 , vendar smo kasneje za izračun umeritvene enačbe predpostavili, da je vrednost za odsek na ordinati enak nič ($a = 0$). Trenutno stanje (T) je vključevalo sprotne (mesečne) nastavitve (umerjanja) inštrumentov posameznih laboratorijev ali pa tovarniške nastavitve pri tistih laboratorijih, ki lastnih nastavitvev inštrumentov niso izvajali.

V primerjavo sistemov umerjanja (A_1 , A_2 , B, C, D in T) je bilo vključenih 6 laboratorijev. Število somatskih celic smo določali s F-O-E metodo z inštrumenti dveh različnih proizvajalcev. Poskus smo ponovili 6-krat in sicer enkrat mesečno. Za vsako ponovitev poskusa smo pripravili po pet kontrolnih vzorcev z različnim številom somatskih celic. Vzorce smo razlili v podvzorce in jih pošiljali šestim slovenskim laboratorijem. Laboratoriji so pri vsaki ponovitvi poskusa vrnili podatke S (meritve na inštrumentih z nastavitvami za naklon 1 in odsek na ordinati 0) in podatke za sistem T (meritve na inštrumentih z mesečnimi nastavitvami za naklon in odsek na ordinati).

Vrnjene podatke meritev smo testirali na prisotnost osamelcev z metodo po Grubbs-u ($\alpha = 0,05$). Na osnovi podatkov S in umeritvenih enačb posameznega laboratorija, smo za sisteme A₁, A₂, B, C in D izračunali nove vrednosti. Povprečja novih izračunanih vrednosti so predstavljala podatke sistemov A₁, A₂, B, C in D.

Statistično analizo smo izvedli za vsako ponovitev poskusa posebej. Primerjava sistemov je temeljila na primerjavi koeficientov variacije (KV%). Sistemi A₁, A₂, B in C so bili med seboj zelo podobni, odstopala pa sta sistema T in D. Vrednosti KV% za sisteme A₁, A₂, B in C so se gibale med 2,0 in 8,0. Pri sistemih A₁, A₂, B in C so bile razlike med KV% zanemarljive in sicer največ 0,2. Pri sistemu D so se KV% gibali med 2,0 in 10,3, pri sistemu T pa med 2,2 in 7,3. Če smo primerjali vse sisteme skupaj, je imel sistem T največkrat najnižjo vrednost za koeficient variacije in sicer pri 15 od 23 vzorcev. Ko smo primerjali sisteme umerjanja brez sistema T smo ugotovili, da je imel največkrat najmanjši koeficient variacije sistem A₂ (19 od 23 vzorcev), sledili so mu sistemi C (15 od 23), A₁ (13 od 23), B (10 od 23) in D (5 od 23).

Želeli smo tudi preveriti, ali bi bile meritve ŠSC z izbranim »*Master instrument*«-om, ki bi bil umerjen na preskušane sisteme umerjanja (A₁, A₂, B in D), v mednarodnih MP bolj točne v smislu manjših razlik med rezultati inštrumenta in referenčnimi vrednostmi, kot pri trenutnem sistemu T. Meritve, dobljene z izbranim inštrumentom, smo preračunali na nove vrednosti glede na umeritvene enačbe omenjenih sistemov in rezultate primerjali z referenčnimi vrednostmi iz MP. Za primerjavo smo izbrali dve medlaboratorijski primerjavi organizatorja MIH Hufner iz Nemčije (MIH, 2014; MIH, 2015). Vrednosti za ŠSC so pri sistemu T od referenčnih vrednosti iz MP v obeh primerjavah v povprečju odstopale le za 1 %, razlike med referenčnimi vrednostmi in izračunanimi vrednostmi za ŠSC glede na posamezne sisteme umerjanj, pa bi bile večje in sicer bi vrednosti ŠSC pri sistemu A₁ odstopale za 4 %, pri A₂ za 7 %, pri B za 2 % in pri D za 4 %.

Na podlagi zbranih rezultatov smo obe postavljeni hipotezi zavrnila ter hkrati ugotovili, da je obstoječe stanje (sistem T) trenutno najboljša izbira.

6.2 SUMMARY

Somatic cell count (SCC) in milk serves as an indicator of health status of mammary gland. Somatic cells in milk include various types of white blood cells and some epithelial cells. The cellular composition and the concentration (number) of cells change dramatically during periods of inflammation (Orlandini and van den Bijgaart, 2011; Bulletin IDF 448, 2011). Determination of the SCC is also important in terms of hygiene (Regulation (EC) No 853/2004) and the payment scheme, because SCC in milk is one of the quality parameters of milk.

The number of somatic cells in milk is most often determined by the fluoro-opto-electronic (F-O-E) instruments/counters, the method based on this principle is described in standard ISO 13366-2 / IDF 148-2. These instruments/counters must be calibrated according to the official reference method (Commission Regulation (EC) No 1664/2006) - direct microscopic somatic cell counting (DMSCC) described in ISO 13366-1/IDF 148-1. There is no certified reference material (CRM), which could be used as a "golden standard" for calibration of instruments (Baumgartner, 2008). Laboratories are trying to find different ways to get reference materials and also trying different ways to establish reference values on their own. Calibrations are performed by laboratories with "local" reference materials which are characterized by one or a limited number of local laboratories. Another problem is appropriate implementation of the reference method – the most limiting factors are precise estimation of the analyst (risk of subjective errors), it is extremely time consuming and requires well-trained people. Limitations of the reference method are mainly reflected as a poor repeatability and reproducibility. Additionally, the reference materials also differ in the type of cells and matrix. These weaknesses call for the development of a better system for the calibration of instruments for counting of somatic cells in milk (Baumgartner, 2008).

Currently seven laboratories perform routine (F-O-E) method and one laboratory performs reference method for enumeration of somatic cells in milk in Slovenia, but there is no system for calibration of the instruments. Therefore, we decided to examine different ways that would be appropriate for a country with a relatively small number of laboratories and samples. The IDF (International Dairy Federation) and ICAR (International Committee for Animal Recording) has already published (Bulletin IDF 469, 2013) basic requirements and procedures for reference materials for the calibration of automated somatic cell counters. On the basis of new recommendations and guidelines it was intention of this work to find out appropriate model of calibration for our country.

The instruments involved in the interlaboratory comparison from which are calculated reference values, should be accurately/properly calibrated (Bulletin IDF 469, 2013). In April 2014 we carried out interlaboratory comparison (MP APRIL 2014), from which we obtain an initial calibration equations which should then be taken into account in the calculation of calibration equations in interlaboratory comparison MP OCTOBER 2014. Since the differences between the average results of the reference method and the average of the results of F-O-E method in interlaboratory comparison OCTOBER 2014 were smaller if the initial calibration equations from interlaboratory comparison APRIL 2014 were not considered, we take into account the actual results in interlaboratory comparison OCTOBER 2014.

We prepared nine milk samples in interlaboratory comparison OCTOBER 2014. Each sample was divided into subsamples and sent to eleven laboratories. Laboratories (two laboratories performed the reference method and nine F-O-E method) returned data for each sample (two measurements). Returned data were tested for the presence of outliers according to Grubbs method ($\alpha = 0.05$).

We have tested five calibration systems (A_1 , A_2 , B, C and D), which vary depending on the determination of the reference values, and the method of calculating the calibration equations. These five calibration systems were compared to the current situation (T). Calibration systems A_1 , A_2 and B differed in the procedure of calculating reference values from the results of interlaboratory comparison (MP OCTOBER 2014). Reference values of system A_1 represented the averages of all participating laboratories (Bulletin IDF 469, 2013), the reference values of the system A_2 were calculated similarly to the system A_1 , but we take into account the weight of the reference method (k_{ref}) value of 0.5 (ISO 13366-2/IDF 148-2, 2006). Reference values of system B represented "robust" averages according to ISO 13528 (2005). Reference values of system C represented values obtained from "Master instrument", which was pre-calibrated according to system A_1 . Reference values of system D were the same as reference values of system A_1 , but in the calibration equations the intercept was set on zero ($a = 0$). The current system (T) included the current (monthly) adjustments (calibrations) or factory settings of the instruments (where no calibration was performed).

Six Slovenian laboratories were included in comparison of calibration systems (A_1 , A_2 , B, C, D and T). The number of somatic cells was determined by F-O-E method with instruments from two different manufacturers. The experiment was repeated 6 times - once per month. For each repetition of the experiment we prepared five control samples with different number/levels of somatic cells. The samples were divided into subsamples and sent to laboratories. Laboratories returned data S (measurements by instruments with settings for slope 1 and intercept 0) and data of system T (measurements by instruments at monthly adjustments). Returned data were tested for the presence of outliers by the Grubbs method ($\alpha = 0.05$). Data for calibration systems A_1 , A_2 , B, C and D were calculated from data S considering calibration equations for each laboratory.

The statistical analysis was performed for each repetition of the experiment separately. The comparison of systems based on a comparison of the coefficients of variation (CV%). Low value of CV% means smaller difference between laboratories (better precision). The CV% of the systems A_1 , A_2 , B and C were very similar, since CV% of the systems T and D deviated from other systems. The values of CV% for systems A_1 , A_2 , B and C were between 2.0 and 8.0, but the differences between systems (CV%) were never greater than 0.2. For the system D the CV% ranged between 2.0 and 10.3

and for the system T between 2.2 and 7.3. Comparison of all calibration systems showed that system T (current system) had lowest CV% at 15 out of 23 samples. Comparison of the calibration systems without system T showed that system A₂ had lowest CV% at 19 out of 23 samples, followed by system C (15 out of 23 samples), A₁ (13 out of 23 samples), B (10 out of 23 samples) and D (5 out of 23 samples).

We have also checked whether the measurements obtained by "Master instrument" calibrated according to calibration systems A₁, A₂, B and D would be more accurate (smaller differences between the results of the instrument and reference values) as for the current system T. The measurements obtained with the selected instrument, were recalculated to new values on the basis of calibration equations of systems A₁, A₂, B and D and the results were compared with reference values from two interlaboratory comparisons (MIH, 2014; MIH, 2015). Values for SCC for the system T in average deviated by only 1 % from the reference values in both comparisons. Differences between the reference values and the calculated values for SCC according to calibration systems A₁, A₂, B and D were greater (A₁ = 4 %, A₂ = 7 %, B = 2 % and D = 4 %). Greater differences of systems A₁, A₂, B and D from reference values are most likely due to the fact that the majority of the participating laboratories did not calibrate instruments in these two interlaboratory comparisons. Better (more realistic) assessment of the suitability of tested calibration systems can be expected when "global reference system" of calibration will be adopted and implemented, and all participating laboratories will follow the instructions for calibration of the instruments.

7 VIRI

- Actalia Cecalait. 2013. Final report of interlaboratory comparison - Cecalait[®] physico-chemical testing on raw milk – September 2013 – Enumeration of somatic cells. Poligny Cedex, Actalia Cecalait: 4 str. (osebni vir, oktober 2013)
- Actalia Cecalait. 2014. Final report of interlaboratory comparison - Cecalait[®] physico-chemical testing on raw milk – September 2014 – Enumeration of somatic cells. Poligny Cedex, Actalia Cecalait: 4 str. (osebni vir, oktober 2014)
- Actalia Cecalait. 2015a. Counting of somatic cells in milk. Poligny Cedex, Actalia Cecalait: 1 str.
<http://www.cecalait.com/pdf/1415627769.pdf> (09.01.2015)
- Actalia Cecalait. 2015b. Secondary reference materials (SRMs) – General information. Poligny Cedex, Actalia Cecalait: 1 str.
<http://www.cecalait.com/pdf/1415627742.pdf> (09.01.2015)
- Actalia Cecalait. 2015c. 2015 Actalia Cecalait's Catalogue of services. Poligny Cedex, Actalia Cecalait: 68 str.
<http://www.cecalait.com/pdf/1415622648.pdf> (09.01.2015)
- Actalia Cecalait. 2015d. Final report of interlaboratory comparison - Cecalait[®] physico-chemical testing on raw milk – March 2015 – Enumeration of somatic cells. Poligny Cedex, Actalia Cecalait: 4 str. (osebni vir, april 2015)
- A.I.A. 2013. Laboratorio standard latte. Roma, Associazione Italiana Allevatori: 37 str.
http://www.aia.it/lsl/download/format%20schede_Dicembre%202013.pdf
(10.01.2015)
- A.I.A. 2014a. Certificato materiali di riferimento latte bovino IV° trimestre 2014 – Latte trattato ad alta temperatura. Roma, Associazione Italiana Allevatori: 1 str.
http://www.aia.it/lsl/download/materiali_riferimento/tn0414.pdf (10.01.2015)
- A.I.A. 2014b. Certificato materiali di riferimento latte bovino IV° trimestre 2014 – (lotto MRCCSC151014) latte congelato. Roma, Associazione Italiana Allevatori: 1 str.
http://www.aia.it/lsl/download/materiali_riferimento/tn0414%20cong.pdf
(10.01.2015)

- A.I.A. 2015a. Ring test cellule somatiche Gennaio 2015. Roma, Associazione Italiana Allevatori: 21 str.
http://www.aia.it/lsl/download/ring_test/rtccsgennaio15.pdf (28.05.2015)
- A.I.A. 2015b. Ring test cellule somatiche Aprile 2015. Roma, Associazione Italiana Allevatori: 21 str.
http://www.aia.it/lsl/download/ring_test/rtccsaprile15.pdf (28.05.2015)
- A.I.A. 2015c. Ring test routine Febbraio 2015. Roma, Associazione Italiana Allevatori: 97 str.
http://www.aia.it/lsl/download/ring_test/rtroutinefebbraio%2015.pdf (28.05.2015)
- ANSES. 2013. Report of the questionnaire on the interest in a certified reference material for somatic cell counting in milk. Maisons-Alfort, Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail: 6 str.
referencesystemsc@gmail.com (osebni vir, 24.06.2013)
- Ardö Y. 1982. Bronopol as a preservative in milk samples for the determination of cell content using Fossomatic. *Milchwissenschaft*, 37: 139-142
- Auldist M.J., Hubble I.B. 1998. Effects of mastitis on raw milk and dairy products. *Australian Journal of Dairy Technology*, 53, 1: 28-36
- Barbano D.M., Podoll J., Wojciechowski K. L. 2011. A new approach to creating milk calibration standards for electronic somatic cell counters. V: IDF World Dairy Summit 2011 – Summilk, Parma, 15-19th October 2011. Brussels, International Dairy Federation: 1 str.
http://www.rawmilkconnect.dk/literature_98619/IDF_Poster_-_SCC_Standards_10-8-11 (27.08.2014)
- Barkema H.W., van der Schans J., Schukken Y.H., De Gee A.L.W., Lam T.J.G.M., Benedictus G. 1997. Effect on freezing on somatic cell count of quarter milk samples as determined by a Fossomatic electronic cell counter. *Journal of Dairy Science*, 80, 2: 422-426
- Baumgartner K. 2008. Architecture of reference systems, status quo of somatic cell counting and concept for the implementation of a reference system for somatic cell counting. *Bulletin of the IDF*, 427: 15-21

- Baumgartner C., van den Bijgaart H. 2010. International reference system for somatic cell counting in milk – a world wide challenge. V: Farm animal breeding, identification, production recording and management - Proceedings of the 37th ICAR Biennial Session, Riga, Latvia 31 May - 4 June 2010. Skujina E., Galvanoska E., Leray O., Mosconi C. (eds.). Roma, ICAR: 271-274
- Bentley Instruments. 2015. Somacount FCM – product overview. Chaska, Bentley Instruments, Inc.: 1 str.
<http://bentleyinstruments.com/products/somatic-cell-counting/nexgen> (30.08.2015)
- Berger T. 2014. How are the new statistical tools applied? V: I⁴ Newsletter, 2nd issue. IDF/ISO Analytical week and ICAR/INTERBULL conference, Berlin, 15th - 22th May 2014. Roma, ICAR: 6-6
http://www.icar.org/documents/Berlin_2014/i4_Newsletters/I4_ICARIDF2014_2.pdf (29.08.2015)
- Berger T., Egger C., Brunner S. 2011. Characterization of the ALP somatic cell count standard (SCCS) – a “Proficiency testing”. V: EU-RL MMP 2011 workshop, ANSES, Maisons-Alfort, 2. May 2011. Bern, Agroscope: 12 str.
<http://www.agroscope.admin.ch/publikationen/einzelpublikation/index.html?aid=26450&lang=en&pid=26892> (25.5.2015)
- Brolund L. 1985. Cell counts in bovine milk. Causes of variation and applicability for diagnosis of subclinical mastitis. Acta Veterinaria Scandinavica Supplementum, 80: 1-123
- Bulletin IDF 211. 1987. Bovine mastitis: definition & guidelines for diagnosis. Brussels, International Dairy Federation: 22 str.
- Bulletin IDF 321. 1997. Recommendations for presentation of mastitis-related data - guidelines for evaluation of the milking process. Brussels, International Dairy Federation: 36 str.
- Bulletin IDF 448. 2011. Suggested interpretation of mastitis terminology (revision of Bulletin of the IDF N° 338/1999). Brussels, International Dairy Federation: 35 str.
- Bulletin IDF 466. 2013. Guidelines for the use and interpretation of bovine milk somatic cell counts (SCC) in the dairy industry. Brussels, International Dairy Federation: 16 str.

Bulletin IDF 469. 2013. Requirements for reference materials for the calibration of automated somatic cell counters. Brussels, International Dairy Federation: 36 str.

Chrominski K., Tkacz M. 2010. Comparison of outlier detection methods in biomedical data. *Journal of Medical Informatics & Technologies*, 16: 89-94

Commission Regulation (EC) No 1664/2006 of 6 November 2006 amending Regulation (EC) No 2074/2005 as regards implementing measures for certain products of animal origin intended for human consumption and repealing certain implementing measures. 2006. *Official Journal of the European Union*, 49, L320: 13-45

de Haas Y., Barkema H.W., Schukken Y.H., de Jong G., Veerkamp R.F. 2005. Somatic cell count patterns to improve udder health by genetics and management. V: *Mastitis in dairy production: current knowledge and future solutions*. Hogeveen H. (ed.). Wageningen, Wageningen Academic Publishers: 439-444

DeLaval. 2003. DeLaval cell counter DCC - The power of knowing. Tumba, DeLaval International AB: 4 str.

http://www.delaval.com/ImageVaultFiles/id_169/cf_5/cell_counter_DCC.PDF
(02.01.2015)

Deperrois V. 2014. Performance of the network of NRL's milk & milk products for the counting of somatic cells in raw cow's milk. *IDF/ICAR Project on Reference System for Somatic Cell Counting in Milk, Newsletter*, 5: 3-3

<http://www.fil-idf.org/Public/TextFlowPage.php?ID=37599> (12.01.2015)

DQCI. 2015. Services – Dairy instrument calibration validation standards. Mounds View, DQCI Services, A Division of Diversified Laboratory Testing: 12 str.

<http://www.dqci.com/downloads/Calibration-standards.pdf> (09.01.2015)

DRRR. 2015. Statistical protocol, revision 16. Kempten, DRRR: 26 str.

<http://www.drrr.de/wp-content/uploads/2015/02/Statistisches-Protokoll5.pdf>
(13.10.2015)

Dulin A.M., Paape M.J., Weinland B.T. 1982. Differentiation and enumeration of somatic cells in goat milk. *Journal of Food Protection*, 45, 5: 435-439

ELSLAB. 2015. ESCC standards – 2015-01-15. Medina, Eastern Laboratory Service: 1 str.

<http://www.elslab.com/services/standards/results.php?stdType=escc&stdDate=2015-01-05&viewtype=view> (10.01.2015)

- Erdem H., Atasever S., Kul E. 2012. Effects of milk age and storage temperature on somatic cell count of bovine milk: a case study from Turkey. *Journal of Animal & Plant Sciences*, 22, 4: 884-887
- Ferrero F.J., Valledor M., Campo J.C. 2014. Screening method for early detection of mastitis in cows. *Measurement*, 47: 855-860
- FOSS. 2013. FossomaticTM FC – Somatic cell counting for raw milk testing. Hilleroed, FOSS: 7 str.
http://www.foss.dk/~media/files/documents/industrysolution/brochuresanddatasheet/fossomaticfc/fossomatic_fc_solution_brochure_gb-pdf.ashx (30.08.2015)
- Gonzalo C., Boixo J.C., Carriedo J.A., San Primitivo F. 2004. Evaluation of rapid somatic cell counter under different analytical conditions in ovine milk. *Journal of Dairy Science*, 87, 11: 3623-3628
- Gonzalo C., Martinez J.R., Carriedo J.A., San Primitivo F. 2003. Fossomaic cell-counting on ewe milk: comparison with direct microscopy and study of variation factors. *Journal of Dairy Science*, 86, 1: 138-145
- Gonzalo C., Linage B., Carriedo J.A., de la Fuente F., San Primitivo F. 2006. Evaluation of the overall accuracy of the DeLaval cell counter for somatic cell counts in ovine milk. *Journal of Dairy Science*, 89, 12: 4613-4619
- GraphPad Software. 2015. La Jolla, GraphPad Software, Inc.: programska oprema
<http://graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm> (31.08.2015)
- Green M.J., Green L.E., Schukken Y.H., Bradley A.J., Peeler E.J., Barkema H.W., de Haas Y., Collis V.J., Medley G.F. 2004. Somatic cell count distributions during lactation predict clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 87, 5: 1256–1264
- Grubbs F.E. 1969. Procedures for detecting outlying observations in samples. *Technometrics*, 11, 1: 1–21
- Hamann J. 2005. Diagnosis of mastitis and indicators of milk quality. V: Mastitis in dairy production: current knowledge and future solutions. Hogeveen H. (ed.). Wageningen, Wageningen Academic Publishers: 82-90

- Hanuš O., Sojková K., Hanušová K., Samková E., Hronek M., Hyšpler R., Kopecký J., Jedelská R. 2011. An experimental comparison of methods for somatic cell count determination in milk of various species of mammals. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 59, 1: 67-81
- Hill A.W., Hibbitt K.G., Davies J. 1982. Particles in bulk milk capable of causing falsely high electronic cell counts. *Journal of Dairy Research*, 49, 2: 171-177
- ICAR. 2012. International interlaboratory proficiency study – March 2012 – Physico-chemical analysis on raw milk (cow) – Enumeration of somatic cells. Poligny Cedex, Cecalait: 7 str. (osebni vir, marec 2012)
- ICAR. 2013. International interlaboratory proficiency study – September 2013 – Physico-chemical analysis on raw milk (cow) – Enumeration of somatic cells. Poligny Cedex, Cecalait: 7 str. (osebni vir, september 2013)
- ICAR. 2014a. International interlaboratory proficiency study – March 2014 – Physico-chemical analysis on raw milk (cow) – Enumeration of somatic cells. Poligny Cedex, Cecalait: 7 str. (osebni vir, marec 2014)
- ICAR. 2014b. International interlaboratory proficiency study – September 2014 – Physico-chemical analysis on raw milk (cow) – Enumeration of somatic cells. Poligny Cedex, Cecalait: 7 str. (osebni vir, september 2014)
- IDF 108B. Milk - Determination of freezing point (thermistor cryoscope method). 1991: 4 str.
- IDF 148A. Milk – Enumeration of somatic cells – Method A - Microscope method (Reference method). 1995: 8 str.
- ISO Guide 34. General requirements for the competence of reference material producers. 3rd ed. 2009: 34 str.
- ISO 707/IDF 50. Milk and milk products - Guidance on sampling. 3rd ed. 2008: 40 str.
- ISO 3534-1. Statistics - Vocabulary and symbols - Part 1: Probability and general statistical terms. 1st ed. 1993: 47 str.
- ISO 5725-2. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method. 1st ed. 1994: 42 str.

ISO 5725-6. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 6: Use in practice of accuracy values. 1st ed. 1994: 41 str.

ISO 8196-2/IDF 128-2. Milk - Definition and evaluation of the overall accuracy of alternative methods of milk analysis - Part 2: Calibration and quality control in the dairy laboratory. 2nd ed. 2009: 25 str.

ISO 13366-1. Milk - Enumeration of somatic cells - Part 1: Microscopic method. 1st ed. 1997: 6 str.

ISO 13366-1/IDF 148-1. Milk - Enumeration of somatic cells - Part 1: Microscopic method (Reference method). 2nd ed. 2008: 17 str.

ISO 13366-2/IDF 148-2. Milk - Enumeration of somatic cells - Part 2: Guidance on the operation of fluoro-opto-electronic counters. 2nd ed. 2006: 13 str.

ISO 13528. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons. 1st ed. 2005: 66 str.

Koch M. 2011a. Calculation of a robust mean according to algorithm A (ISO 5725-5 and ISO 13528 resp.) - AlgA.xlt. Stuttgart, AQS Baden-Wuerttemberg, Institute for Sanitary Engineering, Water Quality and Solid Waste Management, University of Stuttgart: programska oprema
<http://www.iswa.uni-stuttgart.de/ch/aqs/download/freeware.en.html> (november 2014)

Koch M. 2011b. Homogeneity check according to ISO 13528 and International Harmonized Protocol - homogeneity.xlt. Stuttgart, AQS Baden-Wuerttemberg, Institute for Sanitary Engineering, Water Quality and Solid Waste Management, University of Stuttgart: programska oprema
<http://www.iswa.uni-stuttgart.de/ch/aqs/download/freeware.en.html> (november 2014)

Košmelj K. 2007. Uporabna statistika. 2. izd. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 239 str.
http://www.bf.uni-lj.si/fileadmin/groups/2721/Uporabna_statistika_okt_2007/Uporabna_statistika_01.pdf (29.08.2015)

Leitner G., Merin U., Silanikove N. 2011. Effect of glandular bacterial infection and stage of lactation on milk quality: comparison among cows, goats and sheep. International Dairy Journal, 21, 4: 279-285

- Leitner G., Merin U., Krifucks O., Blum S., Rivas A.L., Silanikove N. 2012. Effect of intra-mammary bacterial infection with coagulase negative staphylococci and stage of lactation on shedding of epithelial cells and infiltration of leukocytes into milk: comparison among cows, goats and sheep. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 147, 3–4: 202–210
- Le Maréchal C., Thiéry R., Vautor E., Le Loir Y. 2011. Mastitis impact on technological properties of milk and quality of milk products – a review. *Dairy Science & Technology*, 91, 3: 247-282
- Leray O. 2009. Interlaboratory reference systems and centralised calibration – prerequisites and standard procedures. V: Identification, breeding, production, health and recording of farm animals. Proceedings of the 36th ICAR Biennial Session held in Niagara Falls, USA, 16-20 June 2008. Sattler J.D. (ed.). Roma, ICAR: 301-305
- Levowitz D., Weber M. 1956. An effective "single solution" stain. *Journal of Milk and Food Technology*, 19: 121-127
- Linsinger T.P.J., Kandler W., Krska R., Grasserbauer M. 1998. The influence of different evaluation techniques on the results of interlaboratory comparisons. *Accreditation and Quality Assurance*, 3, 8: 322-327
- Malinowski E., Smulski S., Gehrke M., Klossowska A., Arczynska A., Kaczmarowski M. 2008. Effect of storage conditions and preservation with Bronopol on somatic cell count with the DeLaval cell counter in cow milk. *Medycyna Weterynaryjna*, 64, 11: 1299-1303
- Marzo L.V., Barbano D.M. 2012. Freezing and thawing milk calibration standards for electronic somatic cell counters. *Journal of Dairy Science*, 95, Suppl. 2 / *Journal of Animal Science*, 90, Suppl. 3: 530-530
- Mednarodni slovar osnovnih in splošnih izrazov s področja meroslovja. 1999. Ljubljana, Urad RS za standardizacijo in meroslovje: 102 str.
- MIH. 2011. MSS cell count standards – Specification – Handling instructions. Hergatz, MIH Milchwirtschaftliches Institut Dr. J. Huefner: 1 str.
http://www.mih-huefner.de/pdf/en/mss/keimzaehl/somatische_zellen/cellcounthandling-new.pdf
(09.05.2015)

- MIH. 2014. Cell count controlmilk samples – 28. interlaboratory study Oct. 2014. Hergatz, MIH Milchwirtschaftliches Institut Dr. J. Huefner: 3 str. (osebni vir, november 2014)
- MIH. 2015. Cell count controlmilk samples – 29. interlaboratory study March 2015. Hergatz, MIH Milchwirtschaftliches Institut Dr. J. Huefner: 3 str. (osebni vir, april 2015)
- Moon J.S., Jang K.C., Jung S.C., Joo Y.S., Kim J.H., Wee S.H., Koo H.C., Park Y.H. 2012. Development of stabilized somatic cell standard solutions for calibration of electronic instruments analysing bovine raw milk. Korean Journal of Veterinary Public Health, 36, 3: 114-120
- Muir D.D. 2011. Towards a reference system for somatic cell counting in milk. Society of Dairy Technology, 64, 1: 149-150
- MUVA. 2015. Statistical protocol, revision 11. Kempten, MUVA Kempten: 20 str. [http://www.muva.de/muva/web.nsf/gfx/Statistical%20protocol_Rev11_engl.pdf/\\$file/Statistical%20protocol_Rev11_engl.pdf](http://www.muva.de/muva/web.nsf/gfx/Statistical%20protocol_Rev11_engl.pdf/$file/Statistical%20protocol_Rev11_engl.pdf) (13.10.2015)
- Ninane V., Orlandini S., Braun U. 2010a. IDF/ICAR project on reference system for somatic cell counting in milk. IDF/ICAR Project on Reference System for Somatic Cell Counting in Milk, Newsletter, 1: 1-3 <http://www.fil-idf.org/Public/TextFlowPage.php?ID=37599> (11.01.2015)
- Ninane V., Orlandini S., Braun U. 2010b. Outcome of questionnaire for reference material providers. IDF/ICAR Project on Reference System for Somatic Cell Counting in Milk, Newsletter, 2: 1-2 <http://www.fil-idf.org/Public/TextFlowPage.php?ID=37599> (11.01.2015)
- Ninane V. 2014. Comments of an ISO 13366-1/IDF 148-1 (new) user. IDF/ICAR Project on Reference System for Somatic Cell Counting in Milk, Newsletter, 5: 4-4 <http://www.fil-idf.org/Public/TextFlowPage.php?ID=37599> (12.01.2015)
- Orlandini S. 2012. International survey on somatic cell counting – situation of lab network organization and practices. V: 6th ICAR Reference Laboratory Network Conference Meeting, Cork, 28th May 2012. Baumgartner C., van den Bijgaart H., Leray O., Orlandini S. (eds.). Rome, ICAR: 28-56

- Orlandini S., Lattanzi L., Toscano A. M., Paggi U. 2008. Interlaboratory collaborative study on the reference method for somatic cell counting in cows milk ISO 13366-1/IDF 148-1. Bulletin of the IDF, 427: 2-14
- Orlandini S., van den Bijgaart H. 2011. Reference system for somatic cell counting in milk. Accreditation and Quality Assurance, 16, 8: 415-420
- Packard V.S., Tatini S., Fugua R., Heady J., Gilman C. 1992. Direct microscopic methods for bacterial or somatic cells. V: Standard methods for the examination of dairy products. Marshall R.T. (ed.). Washington, DC, American Public Health Association: 309-325
- Pelvan M., Unluturk S. 2015. Application of flow cytometry and fluorescence techniques in somatic cell analysis of raw milk. International Journal of Food Processing Technology, 2, 1: 11-16
- Pengov A. 2001. Mastitis. Ljubljana, Veterinarska fakulteta: 20 str.
- Pengov A. 2005. Zdraviti ali preprečevati? Sodobno kmetijstvo, 38, 2: 11-12
- Persson K., Sandgren C.H. 1992. The study of the development of endotoxin-induced inflammation in the bovine teat. Acta Veterinaria Scandinavica, 33, 4: 283-295
- PortaCheck. 2015. The PortaSCC[®] milk test instructions. Moorestown, PortaCheck, Inc: 1 str. (Navodila za uporabo)
<http://www.portacheck.com/pdfs/CowInstructions.pdf> (04.01.2015)
- QSE. 2014. Product and price list for reference materials and services from QSE GmbH. Wolnzach, QSE GmbH: 8 str.
<http://qse-gmbh.de/?wpmember-download=378> (25.5.2015)
- R Core Team. 2014. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, R Foundation for Statistical Computing: programska oprema
<http://www.R-project.org/> (09.09.2015)
- Ramsahoi L. 2015. Reference values for SCC testing for SCC fluoro-opto electronic milk analyzers. IDF/ICAR Project on Reference System for Somatic Cell Counting in Milk, Newsletter, 6: 3-3
<http://www.fil-idf.org/Public/TextFlowPage.php?ID=37599> (06.09.2015)

- Read Jr.R.B., Reyes A.L., Bradshaw J.G., Peeler J.T. 1967. Electronic counting of somatic cells in milk. *Journal of Dairy Science*, 50, 5: 669-674
- Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for on the hygiene of foodstuffs. 2004. *Official Journal of the European Union*, 47, L139: 1 - 151
- Reneau J.K. 1986. Effective use of dairy herd improvement somatic cell counts in mastitis control. *Journal of Dairy Science*, 69, 6: 1708-1720
- Ruegg P.L., Tabone T.J. 2000. The relationship between antibiotic violations and somatic cell counts in Wisconsin dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 83, 12: 2805-2809
- Sanchez A., Sierra D., Luengo C., Corrales J. C., Morales C. T., Contreras A., Gonzalo C. 2005. Influence of storage and preservation on Fossomatic cell count and composition of goat milk. *Journal of Dairy Science*, 88, 9: 3095–3100
- Sandgren H.C., Waller K.P., Emanuelson U. 2008. Therapeutic effects of systemic or intramammary antimicrobial treatment of bovine subclinical mastitis during lactation. *Veterinary Journal*, 175, 1: 108-117
- SAS. 2014. Verzija 9.2. Cary, SAS Institute Inc.: programska oprema
- Schalm O.W., Carroll E.J., Jain N.C. 1971. *Bovine mastitis*. Philadelphia, Lea & Febiger: 360 str.
- Schukken Y.H., Smith J.A.H., Grommers F.J., Vandegeer D., Brand A. 1989. Effect of freezing on bacteriologic culturing of mastitis milk samples. *Journal of Dairy Science*, 72, 7: 1900-1906
- Seškina R., Jankevica L. 2007. Influence of chemical preservatives on the quality and composition indices of raw milk samples. *Acta Universitatis Latviensis*, 723: 171-180
- Sharma N., Singh N.K., Bhadwal M.S. 2011. Relationship of somatic cell count and mastitis: an overview. *Asian - Australasian Journal of Animal Sciences*, 24, 3: 429-438

- Silveira T.M.L., Fonseca L.M., Lago T.B.N., Viegas D.R., 2005. Comparison between standard method and electronic analyses for measurement of the bovine milk somatic cell count. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 57, 1: 128-132
- Slovenska Akreditacija. 2005. Prevod EA 04/14 Izbira in uporaba referenčnih materialov. Ljubljana, Slovenska Akreditacija: 13 str.
<http://www.slo-akreditacija.si/files/documents/28/files/oa06.pdf> (29.08.2015)
- Smith K.L. 1996. Standards for somatic cells in milk: physiological and regulatory. *Newsletters of the International Dairy Federation*, 144 / *Mastitis Newsletter*, 21: 7-9
- Smith K.L. 1999. Suggested interpretation of mastitis terminology. *Bulletin of the IDF*, 338: 3-26
- Smith K.L., Hillerton J.E., Harmon R.J. 2001. National Mastitis Council guidelines on normal and abnormal milk based on somatic cell counts and signs of clinical mastitis. Madison, National Mastitis Council: 3 str.
<https://nmconline.org/docs/abnmilk.pdf> (12.10.2015)
- van den Bijgaart H. 2014a. Foreword. *IDF/ICAR Project on Reference System for Somatic Cell Counting in Milk, Newsletter*, 5: 1-1
<http://www.fil-idf.org/Public/TextFlowPage.php?ID=37599> (12.01.2015)
- van den Bijgaart H. 2014b. What is reference system and why do we need it? *IDF/ICAR Project on Reference System for Somatic Cell Counting in Milk, Newsletter*, 5: 5-6
<http://www.fil-idf.org/Public/TextFlowPage.php?ID=37599> (12.01.2015)
- Zeng S.S. 1996. Comparison of goat milk standards with cow milk standards for analyses of somatic cell count, fat and protein in goat milk. *Small Ruminant Research*, 21, 3: 221-225
- Zeng S.S., Escobar E.N, Hart S.P., Hinckley L., Baulthaus M., Robinson G.T., Jahnke G. 1999. Comparative study of the effects of testing laboratory, counting method, storage and shipment on somatic cell counts in goat milk. *Small Ruminant Research*, 31, 2: 103–107
- Whist A.C., Østerås O. 2006. Associations between somatic cell counts at calving or prior to drying-off and future somatic cell counts in the remaining or subsequent lactation. *Journal of Dairy Research*, 73, 3: 277-287

Williams P., Garry E., Ouattara G. 2007. The effect of Bronopol on the freezing point and impedance of milk samples. Norwood, Advanced Instruments: 6 str.

http://www.aicompanies.com/documents/file/EffectBronopol_Brochure_WEB.pdf

(29.08.2015)

ZAHVALA

Iskreno bi se rad zahvalil mentorici prof. dr. Ireni Rogelj za strokovno pomoč in nasvete, za skrben pregled ter spodbudo pri izdelavi magistrske naloge.

Iskrena hvala tudi somentorici prof. dr. Katarini Košmelj za nasvete, izbiro in izvedbo statistične analize.

Hvala predsednici komisije prof. dr. Barbari Jeršek ter članicama doc. dr. Andreji Čanžek Majhenič in prof. dr. Veroniki Kralj-Iglič za temeljit in hiter pregled naloge.

Rad bi se zahvalil vsem, ki so sodelovali in s tem omogočili raziskavo: Mateja Kavčič Korenjak, Tatjana Čeh, Mateja Čibron, Saška Hodnik, Saša Rupnik in Iztok Goršič. Hvala tudi Boštjanu Bavdku, Tomažu Peršinu in Alešu Omahnu za tehnično podporo.

Posebej bi se rad zahvalil sodelavcem laboratorija Inštituta za mlekarstvo in probiotike. Ta naloga je plod tudi vaše pomoči. Hvala Vanji, Stanki, Ireni, Marti, Mojci, Jadranki, Renati, Petri, Darji in Andreju.

Hvala tudi vsem ostalim sodelavcem, še posebej Primožu za odgovore na marsikatero vprašanje.

Ne nazadnje pa gre zahvala mojim staršem, ki so mi omogočili tako študij, kot nadaljevanje izobraževanja in brez njih ta naloga danes ne bi bila izdelana. Hvala tudi bratu.

Hvala tebi Eva, ki si mi ves čas stala ob strani in mi nudila vso podporo in pomoč.

PRILOGE

Priloga A

Izračuni in podatki v medlaboratorijski primerjavi APRIL 2014

Priloga A1: Vrnjeni rezultati laboratorijev v medlaboratorijski primerjavi APRIL 2014

Laboratorij	Vzorec	Ponovitev meritve	Rezultat SSC (1000/ml)	Laboratorij	Vzorec	Ponovitev meritve	Rezultat SSC (1000/ml)	Laboratorij	Vzorec	Ponovitev Meritve	Rezultat SSC (1000/ml)
1	1	1	185	5	1	1	160	9	1	1	177
	2	1	494		2	1	400		2	1	469
	3	1	570		3	1	495		3	1	568
	4	1	821		4	1	800		4	1	823
	5	1	1345		5	1	1250		5	1	1535
	1	2	188		1	2	170		1	2	185
	2	2	515		2	2	410		2	2	459
	3	2	533		3	2	510		3	2	583
	4	2	806		4	2	820		4	2	826
	5	2	1430		5	2	1300		5	2	1522
2	1	1	163	6	1	1	60*	10	1	1	177
	2	1	426		2	1	130*		2	1	473
	3	1	528		3	1	120*		3	1	580
	4	1	752		4	1	340*		4	1	752
	5	1	1392		5	1	740*		5	1	1462
	1	2	167		1	2	60*		1	2	183
	2	2	430		2	2	140*		2	2	487
	3	2	519		3	2	110*		3	2	571
	4	2	746		4	2	330*		4	2	747
	5	2	1369		5	2	700*		5	2	1504
3	1	1	168	7	1	1	184	11	1	1	189
	2	1	434		2	1	415		2	1	468
	3	1	527		3	1	529		3	1	576
	4	1	788		4	1	773		4	1	833
	5	1	1317		5	1	1384		5	1	1357
	1	2	152		1	2	167		1	2	185
	2	2	447		2	2	443		2	2	480
	3	2	538		3	2	534		3	2	581
	4	2	772		4	2	771		4	2	852
	5	2	1307		5	2	1362		5	2	1353
4	1	1	185	8	1	1	181				
	2	1	448		2	1	461				
	3	1	544		3	1	560				
	4	1	786		4	1	808				
	5	1	1405		5	1	1276				
	1	2	186		1	2	182				
	2	2	447		2	2	457				
	3	2	533		3	2	560				
	4	2	778		4	2	807				
	5	2	1417		5	2	1260				

Opomba: * Ugotovljeni osamelci z metodo po Grubbs-u ($\alpha = 0,05$). Po izločitvi teh rezultatov, osamelcev pri ponovnem testiranju ni bilo več. Vsi podatki za laboratorij 6 so bili iz nadaljnje obdelave izločeni.

Priloga A2: Ugotavljanje homogenosti vzorcev v medlaboratorijski primerjavi APRIL 2014.

	Vzorec				
	1	2	3	4	5
Maksimalna razlika med podvzorci (ŠSC/ml)	19.000	37.000	42.000	41.000	106.000
Kriterij iz ISO 13366-2/IDF 148-2 Preračun glede na območje ŠSC/ml	25.000	50.000	50.000	63.000	126.000

Priloga A3: Referenčne vrednosti v medlaboratorijski primerjavi APRIL 2014.

	Vzorec				
	1	2	3	4	5
Referenčne vrednosti* ŠSC (1000/ml)	176,7	453,2	547,0	793,1	1377,4

Opomba: * Referenčne vrednosti so predstavljala povprečja vrnjenih rezultatov po izločitvi osamelcev z metodo po Grubbs-u ($\alpha = 0,05$).

Priloga A4: Vrednosti za umeritvene enačbe (b = naklon, a = odsek na ordinati) za posamezen laboratorij v medlaboratorijski primerjavi APRIL 2014.

Laboratorij	Vrednosti za umeritveno enačbo	
	b	a
1	1,0067	-23,805
2	0,9857	29,557
3	1,0439	-3,8473
4	0,9748	13,519
5	Referenčna metoda.	
6	Laboratorij izločen iz raziskave.	
7	0,9971	15,196
8	1,1036	-53,614
9	0,8872	35,381
10	0,9261	27,108
11	1,0261	-35,88

Priloga B

Izračuni in podatki v medlaboratorijski primerjavi OKTOBER 2014

Priloga B1: Vrnjeni rezultati laboratorijev v medlaboratorijski primerjavi OKTOBER 2014.

Laboratorij	Vzorec	Ponovitev	ŠSC (1000/ml)	Laboratorij	Vzorec	Ponovitev	ŠSC (1000/ml)	Laboratorij	Vzorec	Ponovitev	ŠSC (1000/ml)
1	1	1	26	3	1	1	31	5	1	1	20
	2	1	196		2	1	196		2	1	179
	3	1	365		3	1	351		3	1	404
	4	1	490		4	1	452		4	1	600
	5	1	583		5	1	554		5	1	707
	6	1	739		6	1	705		6	1	899
	7	1	901		7	1	773		7	1	1004
	8	1	1120		8	1	1041		8	1	1112
	9	1	1412		9	1	1248		9	1	1509
	1	2	29		1	2	34		1	2	24
	2	2	193		2	2	196		2	2	197
	3	2	352		3	2	353		3	2	412
	4	2	477		4	2	446		4	2	568
	5	2	592		5	2	555		5	2	675
	6	2	745		6	2	696		6	2	857
	7	2	875		7	2	776		7	2	1045
	8	2	1111		8	2	1063		8	2	1184
	9	2	1386		9	2	1267		9	2	1455
2	1	1	31	4	1	1	37	6	1	1	33
	2	1	177		2	1	196		2	1	192
	3	1	331		3	1	373		3	1	398
	4	1	412		4	1	466		4	1	489
	5	1	519		5	1	607		5	1	672
	6	1	654		6	1	736		6	1	781
	7	1	758		7	1	850		7	1	884
	8	1	1012		8	1	1047		8	1	1207
	9	1	1145		9	1	1361		9	1	1472
	1	2	32		1	2	32		1	2	34
	2	2	170		2	2	198		2	2	192
	3	2	332		3	2	387		3	2	386
	4	2	418		4	2	476		4	2	543
	5	2	510		5	2	573		5	2	632
	6	2	642		6	2	726		6	2	786
	7	2	756		7	2	866		7	2	918
	8	2	1032		8	2	1123		8	2	1215
	9	2	1165		9	2	1382		9	2	1519

se nadaljuje

Priloga B3: Ugotavljanje homogenosti vzorca 1 v medlaboratorijski primerjavi OKTOBER 2014 ($\text{ŠSC} \times 1000/\text{ml}$).

Homogeneity check (ISO 13528 Annex B)			Example data	
Sample t	value#1, $x_{t,1}$	value#2, $x_{t,2}$	sample average (B.4), x_t	between-test-portion ranges (B.5), w_t
1	39	34	36,5	5
2	34	36	35	2
3	30	33	31,5	3
4	33	36	34,5	3
5	38	28	33	10
6	36	32	34	4
7	38	37	37,5	1
8	35	30	32,5	5
9	33	29	31	4
10	35	33	34	2
	number of samples g		10	
	general average (B.6)		33,95	
	STD of sample averages (B.7), s_x		2,060878993	
	within-samples STD (B.8), s_w		3,232645975	
	between-samples STD (B.9), s_S		0	
	Expected standard deviation for proficiency assessment			2,966
	Homogeneity	ok		

Priloga B4: Ugotavljanje homogenosti vzorca 2 v medlaboratorijski primerjavi OKTOBER 2014 ($\text{ŠSC} \times 1000/\text{ml}$).

Homogeneity check (ISO 13528 Annex B)			Example data	
Sample t	value#1, $x_{t,1}$	value#2, $x_{t,2}$	sample average (B.4), x_t	between-test-portion ranges (B.5), w_t
1	194	193	193,5	1
2	192	187	189,5	5
3	199	201	200	2
4	196	174	185	22
5	180	182	181	2
6	197	178	187,5	19
7	196	188	192	8
8	206	189	197,5	17
9	192	190	191	2
10	190	198	194	8
	number of samples g		10	
	general average (B.6)		191,1	
	STD of sample averages (B.7), s_x		5,675483337	
	within-samples STD (B.8), s_w		8,062257748	
	between-samples STD (B.9), s_S		0	
	Expected standard deviation for proficiency assessment			4,449
	Homogeneity	ok		

Priloga B5: Ugotavljanje homogenosti vzorca 3 v medlaboratorijski primerjavi OKTOBER 2014 ($\check{S}SC \times 1000/ml$).

Homogeneity check (ISO 13528 Annex B)			Example data	
Sample t	value#1, $x_{t,1}$	value#2, $x_{t,2}$	sample average (B.4), $x_{t,}$	between-test-portion ranges (B.5), w_t
1	360	344	352	16
2	355	362	358,5	7
3	361	372	366,5	11
4	349	372	360,5	23
5	357	365	361	8
6	366	357	361,5	9
7	355	361	358	6
8	362	377	369,5	15
9	351	378	364,5	27
10	362	365	363,5	3
	number of samples g		10	
	general average (B.6)		361,55	
	STD of sample averages (B.7), s_x		4,884499292	
	within-samples STD (B.8), s_w		10,24451073	
	between-samples STD (B.9), s_s		0	
Expected standard deviation for proficiency assessment				32,626
Homogeneity		ok		

Priloga B6: Ugotavljanje homogenosti vzorca 4 v medlaboratorijski primerjavi OKTOBER 2014 ($\check{S}SC \times 1000/ml$).

Homogeneity check (ISO 13528 Annex B)			Example data	
Sample t	value#1, $x_{t,1}$	value#2, $x_{t,2}$	sample average (B.4), $x_{t,}$	between-test-portion ranges (B.5), w_t
1	466	487	476,5	21
2	476	489	482,5	13
3	488	463	475,5	25
4	453	458	455,5	5
5	453	465	459	12
6	462	475	468,5	13
7	469	474	471,5	5
8	460	443	451,5	17
9	489	459	474	30
10	481	440	460,5	41
	number of samples g		10	
	general average (B.6)		467,5	
	STD of sample averages (B.7), s_x		10,27672667	
	within-samples STD (B.8), s_w		14,94657151	
	between-samples STD (B.9), s_s		0	
Expected standard deviation for proficiency assessment				40,7825
Homogeneity		ok		

Priloga B7: Ugotavljanje homogenosti vzorca 5 v medlaboratorijski primerjavi OKTOBER 2014 ($\check{S}SC \times 1000/ml$).

Homogeneity check (ISO 13528 Annex B)			Example data	
Sample t	value#1, $x_{t,1}$	value#2, $x_{t,2}$	sample average (B.4), x_t	between-test-portion ranges (B.5), w_t
1	573	597	585	24
2	559	574	566,5	15
3	589	573	581	16
4	589	569	579	20
5	555	575	565	20
6	560	585	572,5	25
7	587	585	586	2
8	589	570	579,5	19
9	565	573	569	8
10	575	586	580,5	11
	number of samples g		10	
	general average (B.6)		576,4	
	STD of sample averages (B.7), s_x		7,589466384	
	within-samples STD (B.8), s_w		12,31259518	
	between-samples STD (B.9), s_S		0	
	Expected standard deviation for proficiency assessment			39,2995
	Homogeneity	ok		

Priloga B8: Ugotavljanje homogenosti vzorca 6 v medlaboratorijski primerjavi OKTOBER 2014 ($\check{S}SC \times 1000/ml$).

Homogeneity check (ISO 13528 Annex B)			Example data	
Sample t	value#1, $x_{t,1}$	value#2, $x_{t,2}$	sample average (B.4), x_t	between-test-portion ranges (B.5), w_t
1	700	696	698	4
2	741	708	724,5	33
3	738	701	719,5	37
4	749	736	742,5	13
5	732	714	723	18
6	692	694	693	2
7	718	684	701	34
8	696	746	721	50
9	724	736	730	12
10	728	737	732,5	9
	number of samples g		10	
	general average (B.6)		718,5	
	STD of sample averages (B.7), s_x		16,14001239	
	within-samples STD (B.8), s_w		18,50945704	
	between-samples STD (B.9), s_S		9,444575162	
	Expected standard deviation for proficiency assessment			60,0615
	Homogeneity	ok		

Priloga B9: Ugotavljanje homogenosti vzorca 7 v medlaboratorijski primerjavi OKTOBER 2014 (ŠSC×1000/ml).

Homogeneity check (ISO 13528 Annex B)			Example data	
Sample t	value#1, $x_{t,1}$	value#2, $x_{t,2}$	sample average (B.4), x_t	between-test-portion ranges (B.5), w_t
1	830	818	824	12
2	815	862	838,5	47
3	833	844	838,5	11
4	832	834	833	2
5	875	857	866	18
6	843	812	827,5	31
7	837	794	815,5	43
8	874	778	826	96
9	825	821	823	4
10	844	816	830	28
	number of samples g		10	
	general average (B.6)		832,2	
	STD of sample averages (B.7), s_x		13,81866692	
	within-samples STD (B.8), s_w		27,95353287	
	between-samples STD (B.9), s_s		0	
Expected standard deviation for proficiency assessment				90,463
Homogeneity		ok		

Priloga B10: Ugotavljanje homogenosti vzorca 8 v medlaboratorijski primerjavi OKTOBER 2014 (ŠSC×1000/ml).

Homogeneity check (ISO 13528 Annex B)			Example data	
Sample t	value#1, $x_{t,1}$	value#2, $x_{t,2}$	sample average (B.4), x_t	between-test-portion ranges (B.5), w_t
1	1087	1085	1086	2
2	1068	1080	1074	12
3	1081	1089	1085	8
4	1077	1067	1072	10
5	1085	1113	1099	28
6	1089	1089	1089	0
7	1042	1082	1062	40
8	1134	1081	1107,5	53
9	1121	1076	1098,5	45
10	1053	1063	1058	10
	number of samples g		10	
	general average (B.6)		1083,1	
	STD of sample averages (B.7), s_x		16,37545589	
	within-samples STD (B.8), s_w		19,53202498	
	between-samples STD (B.9), s_s		8,798042712	
Expected standard deviation for proficiency assessment				96,395
Homogeneity		ok		

Priloga B11: Ugotavljanje homogenosti vzorca 9 v medlaboratorijski primerjavi OKTOBER 2014 ($\check{S}SC \times 1000/ml$).

Homogeneity check (ISO 13528 Annex B)			Example data	
Sample t	value#1, $\bar{x}_{t,1}$	value#2, $\bar{x}_{t,2}$	sample average (B.4), \bar{x}_t	between-test-portion ranges (B.5), w_t
1	1325	1326	1325,5	1
2	1325	1351	1338	26
3	1357	1350	1353,5	7
4	1293	1322	1307,5	29
5	1304	1343	1323,5	39
6	1333	1352	1342,5	19
7	1323	1331	1327	8
8	1278	1306	1292	28
9	1348	1303	1325,5	45
10	1346	1282	1314	64
number of samples g			10	
general average (B.6)			1324,9	
STD of sample averages (B.7), s_x			17,67106863	
within-samples STD (B.8), s_w			22,82323378	
between-samples STD (B.9), s_s			7,198379447	
Expected standard deviation for proficiency assessment				131,2455
Homogeneity		ok		

Priloga B12: Ugotavljanje stabilnosti vzorcev v medlaboratorijski primerjavi OKTOBER 2014 ($\check{S}SC \times 1000/ml$).

Dan (dan priprave vzorcev = 0; 21.10.2014)	1	2	3	6	7
Vzorec	\bar{x}	\bar{y}_2	\bar{y}_3	\bar{y}_6	\bar{y}_7
1	34,0	32,7	33,8	32,8	29,7
$ \bar{x}-\bar{y}_i $		1,3	0,2	1,2	4,3
$\hat{\sigma}$		2,966	2,966	2,966	2,966
$0,3 \times \hat{\sigma}$		0,9	0,9	0,9	0,9
$ \bar{x}-\bar{y}_i < 0,3 \times \hat{\sigma}$		FALSE	ok	FALSE	FALSE
r		5,2	5,2	5,2	5,2
$ \bar{x}-\bar{y}_i < r$		ok	ok	ok	ok
2	191,1	186,3	192,5	187,2	182,3
$ \bar{x}-\bar{y}_i $		4,8	1,4	3,9	8,8
$\hat{\sigma}$		4,449	4,449	4,449	4,449
$0,3 \times \hat{\sigma}$		1,3	1,3	1,3	1,3
$ \bar{x}-\bar{y}_i < 0,3 \times \hat{\sigma}$		FALSE	FALSE	FALSE	FALSE
r		32,6	32,6	32,6	32,6
$ \bar{x}-\bar{y}_i < r$		ok	ok	ok	ok

se nadaljuje

nadaljevanje Priloge B12

Dan (dan priprave vzorcev = 0; 21.10.2014)	1	2	3	6	7
Vzorec	\bar{x}	\bar{y}_2	\bar{y}_3	\bar{y}_6	\bar{y}_7
3	361,6	364,2	365,0	360,3	365,3
$ \bar{x}-\bar{y}_i $		2,6	3,4	1,3	3,7
$\hat{\sigma}$		32,626	32,626	32,626	32,626
$0,3 \times \hat{\sigma}$		9,8	9,8	9,8	9,8
$ \bar{x}-\bar{y}_i < 0,3 \times \hat{\sigma}$		ok	ok	ok	ok
r		51,0	51,0	51,0	51,0
$ \bar{x}-\bar{y}_i < r$		ok	ok	ok	ok
4	467,5	470,8	466,7	460,2	463,3
$ \bar{x}-\bar{y}_i $		3,3	0,8	7,3	4,2
$\hat{\sigma}$		40,7825	40,7825	40,7825	40,7825
$0,3 \times \hat{\sigma}$		12,2	12,2	12,2	12,2
$ \bar{x}-\bar{y}_i < 0,3 \times \hat{\sigma}$		ok	ok	ok	ok
r		53,4	53,4	53,4	53,4
$ \bar{x}-\bar{y}_i < r$		ok	ok	ok	ok
5	576,4	576,7	585,2	572,5	568,5
$ \bar{x}-\bar{y}_i $		0,3	8,8	3,9	7,9
$\hat{\sigma}$		39,2995	39,2995	39,2995	39,2995
$0,3 \times \hat{\sigma}$		11,8	11,8	11,8	11,8
$ \bar{x}-\bar{y}_i < 0,3 \times \hat{\sigma}$		ok	ok	ok	ok
r		64,8	64,8	64,8	64,8
$ \bar{x}-\bar{y}_i < r$		ok	ok	ok	ok
6	718,5	729,3	716,3	714,2	726,8
$ \bar{x}-\bar{y}_i $		10,8	2,2	4,3	8,3
$\hat{\sigma}$		60,0615	60,0615	60,0615	60,0615
$0,3 \times \hat{\sigma}$		18,0	18,0	18,0	18,0
$ \bar{x}-\bar{y}_i < 0,3 \times \hat{\sigma}$		ok	ok	ok	ok
r		60,7	60,7	60,7	60,7
$ \bar{x}-\bar{y}_i < r$		ok	ok	ok	ok
7	832,2	825,5	819,7	824,0	818,7
$ \bar{x}-\bar{y}_i $		6,7	12,5	8,2	13,5
$\hat{\sigma}$		90,463	90,463	90,463	90,463
$0,3 \times \hat{\sigma}$		27,1	27,1	27,1	27,1
$ \bar{x}-\bar{y}_i < 0,3 \times \hat{\sigma}$		ok	ok	ok	ok
r		71,2	71,2	71,2	71,2
$ \bar{x}-\bar{y}_i < r$		ok	ok	ok	ok

se nadaljuje

nadaljevanje Priloge B12

Dan (dan priprave vzorcev = 0; 21.10.2014)	1	2	3	6	7
Vzorec	\bar{x}	\bar{y}_2	\bar{y}_3	\bar{y}_6	\bar{y}_7
8	1083,1	1102,3	1077,3	1084,2	1082,8
$ \bar{x}-\bar{y}_i $		19,2	5,8	1,1	0,3
$\hat{\sigma}$		96,395	96,395	96,395	96,395
$0,3 \times \hat{\sigma}$		28,9	28,9	28,9	28,9
$ \bar{x}-\bar{y}_i < 0,3 \times \hat{\sigma}$		ok	ok	ok	ok
r		93,4	93,4	93,4	93,4
$ \bar{x}-\bar{y}_i < r$		ok	ok	ok	ok
9	1324,9	1326,0	1318,3	1298,5	1330,6
$ \bar{x}-\bar{y}_i $		1,1	6,6	26,4	5,7
$\hat{\sigma}$		131,2455	131,2455	131,2455	131,2455
$0,3 \times \hat{\sigma}$		39,4	39,4	39,4	39,4
$ \bar{x}-\bar{y}_i < 0,3 \times \hat{\sigma}$		ok	ok	ok	ok
r		113,1	113,1	113,1	113,1
$ \bar{x}-\bar{y}_i < r$		ok	ok	ok	ok

Vrednosti za r so dobljene s preračunom iz podanih kriterijev za s_r v standardu ISO 13366-2/IDF 148-2 (2006) glede na število somatskih celic ($r = 2,8s_r$). Faktor 2,8 je povzet iz standarda ISO 5725-6 (1994).

Priloga B13: Povzetek ugotavljanja stabilnosti vzorcev v MP OKTOBER 2014 (dan priprave vzorcev $t = 0$) pri upoštevanju kriterija iz standarda ISO 13528 (2005).

Vzorec	t (dan)			
	2	3	6	7
1	✘	✓	✘	✘
2	✘	✘	✘	✘
3	✓	✓	✓	✓
4	✓	✓	✓	✓
5	✓	✓	✓	✓
6	✓	✓	✓	✓
7	✓	✓	✓	✓
8	✓	✓	✓	✓
9	✓	✓	✓	✓

Legenda: ✓ ustrezna stabilnost, ✘ neustrezna stabilnost

Priloga B14: Ugotavljanje osamelcev z metodo po Grubbs-u ($\alpha = 0,05$) v medlaboratorijski primerjavi OKTOBER 2014 po upoštevanju začetnih umeritvenih enačb iz MP APRIL 2014.

	Vzorec								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Povprečje (ŠSC×1000/ml)	39,44	190,40	369,21	483,15	595,02	735,26	861,68	1.109,14	1.355,78
Sd (ŠSC×1000/ml)	18,98	18,43	25,26	49,50	62,19	79,38	96,77	110,39	159,51
Kritična vrednost G	2,65	2,76	2,76	2,76	2,76	2,76	2,76	2,76	2,76
Zaznan osamelec?*	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne

Opomba: * Za nekatere laboratorije smo z upoštevanjem začetnih umeritvenih enačb dobili negativne vrednosti za ŠSC. Negativne vrednosti smo pred testiranjem na prisotnost osamelcev z metodo po Grubbs-u ($\alpha = 0,05$) izločili.

Priloga C

Preverjanje, ali umeritvene enačbe iz medlaboratorijske primerjave APRIL 2014 v medlaboratorijski primerjavi OKTOBER 2014 upoštevamo, ali ne

Priloga C1: Oznake laboratorijev v celotni raziskavi.

Oznaka laboratorija		
MP APRIL 2014	MP OKTOBER 2014	POSKUS
1	6	1
2	3	/
3	8	3
4	10	5
5	/	/
6	/	/
7	7	2
8	9	4
9	4	/
10	2	/
11	11	6
/	1	/
/	5	/

Priloga C2: Vrednosti kriterijev za preverjanje, ali umeritvene enačbe iz medlaboratorijske primerjave APRIL 2014 v medlaboratorijski primerjavi OKTOBER 2014 upoštevamo, ali ne.

Vzorec	Vrednosti kriterija (ŠSC/ml)				CD_R
	$CD_{Bulletin}$		CD_{ISO}		
	z upoštevanjem	brez upoštevanja	z upoštevanjem	brez upoštevanja	
1	3971	2784	3420	2813	7812
2	17062	17421	19073	19096	48888
3	30863	30362	37467	37507	81536
4	39329	38640	50283	50321	93394
5	48249	38443	61222	61265	113484
6	50165	49346	76432	76517	121464
7	58697	57844	89846	89935	142380
8	75760	75862	111793	111921	186732
9	92482	91867	138872	139006	226128

Vrednosti za CD_R so dobljene s preračunom iz podanih kriterijev za s_R v standardu ISO 13366-2/IDF 148-2 (2006) glede na število somatskih celic ($CD_R = R = 2,8s_R$). Faktor 2,8 je povzet iz standarda ISO 5725-6 (1994).

Priloga C3: Izračun razlik med referenčno metodo in F-O-E metodo v MP OKTOBER 2014 z upoštevanjem (D_z) in brez upoštevanja (D_{brez}) začetnih umeritvenih enačb iz MP APRIL 2014, ter primerjava razlik s kritičnimi razlikami (CD).

Vzorec	D_z ŠSC/ml	D_{brez} ŠSC/ml	D_{brez} < D_z	D_z < $CD_{Bulletin}$	D_{brez} < $CD_{Bulletin}$	D_z < CD_{ISO}	D_{brez} < CD_{ISO}	D_z < CD_R	D_{brez} < CD_R
1	18897	6750	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✓
2	1039	583	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
3	17158	16361	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
4	61839	61083	✓	✗	✗	✗	✗	✓	✓
5	54059	53194	✓	✗	✗	✓	✓	✓	✓
6	91351	89667	✓	✗	✗	✗	✗	✓	✓
7	115578	113806	✓	✗	✗	✗	✗	✓	✓
8	27634	25083	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
9	103553	100889	✓	✗	✗	✓	✓	✓	✓

Legenda: ✓ da, ✗ ne

Priloga D

Vrednosti koeficientov determinacije (R^2) pri izračunih umeritvenih enačb za posamezen laboratorij pri sistemih umerjanja A₁, A₂, B, C in D

Laboratorij	Koeficient determinacije (R^2)				
	Sistem umerjanja				
	A ₁	A ₂	B	C	D
1	0,9989	0,9975	0,999	0,9982	0,9986
2	0,9999	0,9996	0,9996	0,9981	0,9998
3	0,9997	0,9994	0,9993	0,9976	0,9997
4	0,9997	0,999	0,9994	0,9986	0,9995
5	0,9989	0,9972	0,9995	0,9992	0,9988
6	0,9984	0,9966	0,999	MA	0,9984

Legenda: MA »Master instrument«

Priloga E

Vrnjeni rezultati laboratorijev v poskusu

Priloga E1: Vrnjeni rezultati laboratorijev za 1. ponovitev poskusa, izmerjeni z inštrumenti z nastavitvami za naklon 1 in odsek na ordinati 0 (podatki S).

Laboratorij	Ponovitev	ŠSC (1000/ml)				
		Vzorec				
		1	2	3	4	5
1	1	33	231	574	818	1285
	2	35	236	581	824	1305
	3	36	231	560	841	1311
	4	34	229	558	855	1319
	5	33	257	558	845	1310
	6	28	234	562	825	1320
	7	37	234	270**	833	1321
	8	38	230	573	878	1326
	9	34	244	559	824	1319
	10	36	230	593	846	1315
2*	1	38	230	519	772	1236
	2	39	238	519	795	1293
	3	37	225	519	800	1255
	4	37	227	519	809	1234
	5	42	232	516	787	1272
	6	43	226	555	785	1228
	7	35	223	545	808	1209
	8	40	233	522	788	1244
	9	42	225	527	799	1212
	10	40	238	531	775	1226
3	1	33	566**	558	836	1371
	2	41	558**	537	814	1291
	3	38	542**	549	795	1275
	4	36	574**	565	787	1288
	5	35	545**	584	815	1249
	6	36	540**	548	828	1318
	7	36	544**	545	792	1300
	8	29	546**	541	805	1272
	9	39	545**	548	810	1328
	10	36	547**	568	810	1273
4	1	35	268	630	908	1548
	2	36	278	641	931	1542
	3	35	280	625	899	1535
	4	33	261	653	905	1553
	5	34	264	642	913	1508
	6	32	264	630	876	1544
	7	34	265	635	903	1543
	8	32	274	640	912	1536
	9	33	255	633	923	1523
	10	31	276	661	907	1493

se nadaljuje

nadaljevanje Priloge E1

Laboratorij	Ponovitev	ŠSC (1000/ml)				
		Vzorec				
		1	2	3	4	5
5	1	40	238	577	872	1350
	2	40	262	559	862	1338
	3	39	255	581	863	1345
	4	30	266	593	852	1337
	5	37	259	570	846	1347
	6	38	273	603	864	1333
	7	40	260	589	830	1333
	8	38	240	591	858	1351
	9	36	265	608	578**	1336
	10	36	256	561	834	1345
6	1	42	239	587	838	1299
	2	43	258	573	844	1313
	3	36	243	566	844	1328
	4	35	241	583	847	1343
	5	37	246	573	831	1310
	6	31	246	572	857	1274
	7	37	240	570	827	1322
	8	35	246	588	815	1288
	9	36	253	564	837	1314
	10	35	236	577	805	1271

Opomba: *Laboratorij 2 je zaradi okvare inštrumenta meritve opravil tri dni po preteku roka uporabnosti vzorcev. **Očitna odstopanja rezultatov.

Priloga E2: Vrnjeni rezultati laboratorija 1 za 1. ponovitev poskusa, izmerjeni z inštrumentom z nastavitvami za naklon in odsek na ordinati glede na sistem T.

Laboratorij	Ponovitev	ŠSC (1000/ml)				
		Vzorec				
		1	2	3	4	5
1	1	40	257	599	910	1373
	2	32	250	630	885	1385
	3	32	255	614	924	1421
	4	35	250	604	923	1425
	5	43	272	606	897	1410
	6	30	241	632	949	1386
	7	36	245	606	881	1391
	8	33	256	618	887	1404
	9	36	259	614	868	1409
	10	35	255	591	906	1395

Laboratorij 4 je za 1. ponovitev poskusa poslal le podatke S. Vrednosti za sistem T smo izračunali glede na podan naklon (0,88625).

Priloga E3: Vrnjeni rezultati laboratorijev za 2. ponovitev poskusa, izmerjeni z inštrumenti z nastavitvami za naklon 1 in odsek na ordinati 0 (podatki S).

Laboratorij	Ponovitev	ŠSC (1000/ml)				
		Vzorec				
		1	2	3	4	5
1	1	163	389	648	260	929
	2	149	369	675	270	952
	3	164	408	672	247	930
	4	147	406	668	255	977
	5	162	363	657	259	933
	6	158	392	670	254	950
	7	146	393	655	261	945
	8	155	379	683	249	972
	9	165	350	672	256	968
	10	139	372	664	253	906
2	1	173	384	664	271	959
	2	168	390	656	256	969
	3	168	390	672	255	995
	4	177	404	691	269	962
	5	183	391	652	265	984
	6	169	384	657	258	963
	7	167	389	660	254	969
	8	164	382	652	269	960
	9	161	394	646	253	961
	10	174	402	659	256	961
3	1	159	381	657	250	953
	2	165	392	651	258	959
	3	142	376	649	245	959
	4	155	380	652	246	942
	5	141	379	649	262	955
	6	162	388	659	240	956
	7	160	383	641	248	933
	8	163	381	625	263	991
	9	144	383	663	251	958
	10	156	364	649	259	949
4	1	180	451	770	311	1057
	2	183	459	774	298	1101
	3	183	436	778	290	1100
	4	171	454	779	287	1116
	5	167	441	759	275	1059
	6	172	436	785	285	1096
	7	164	441	763	299	1070
	8	172	448	766	299	1107
	9	165	435	765	291	1091
	10	182	458	790	291	1100

se nadaljuje

nadaljevanje Priloge E3

Laboratorij	Ponovitev	ŠSC (1000/ml)				
		Vzorec				
		1	2	3	4	5
5	1	176	424	688	265	1020
	2	159	434	677	275	1017
	3	160	424	718	285	991
	4	165	397	694	270	1016
	5	175	426	691	271	1016
	6	160	433	675	276	1019
	7	166	426	685	277	1008
	8	168	424	666	291	1012
	9	156	415	701	285	976
	10	167	416	695	271	986
6	1	171	386	688	275	999
	2	164	379	683	259	980
	3	178	416	668	273	1036
	4	171	387	652	261	1012
	5	163	387	705	245	1029
	6	165	380	645	265	999
	7	164	393	653	262	974
	8	178	383	675	266	984
	9	171	417	697	263	997
	10	169	392	680	263	990

Priloga E4: Vrnjeni rezultati laboratorija 1 za 2. ponovitev poskusa, izmerjeni z inštrumentom z nastavitvami za naklon in odsek na ordinati glede na sistem T.

Laboratorij	Ponovitev	ŠSC (1000/ml)				
		Vzorec				
		1	2	3	4	5
1	1	170	409	670	275	947
	2	157	422	677	254	949
	3	153	389	686	246	946
	4	170	379	694	278	989
	5	155	410	676	265	949
	6	160	405	706	255	982
	7	151	394	685	246	957
	8	168	419	685	252	947
	9	161	404	675	273	955
	10	165	394	684	265	947

Laboratorij 4 je za 2. ponovitev poskusa poslal le podatke S. Vrednosti za stanje T smo izračunali glede na podan naklon (0,9009).

Priloga E5: Vrnjeni rezultati laboratorijev za 3. ponovitev poskusa, izmerjeni z inštrumenti z nastavitvami za naklon 1 in odsek na ordinati 0 (podatki S).

Laboratorij	Ponovitev	ŠSC (1000/ml)				
		Vzorec				
		1	2	3	4	5
1	1	105	204	612	1054	1421
	2	123	198	635	1033	1438
	3	99	215	632	1044	1480
	4	117	210	613	1071	1456
	5	110	233	632	1067	1450
	6	111	221	618	1044	1440
	7	104	204	643	1042	1449
	8	111	204	661	1049	1434
	9	105	214	639	1085	1494
	10	113	218	645	1073	1438
2	1	119	215	618	922	1261
	2	119	219	613	952	1295
	3	117	223	623	942	1253
	4	111	221	626	969	1313
	5	117	219	608	966	1267
	6	111	221	608	927	1281
	7	113	213	608	929	1265
	8	114	220	615	952	1280
	9	114	224	619	937	1270
	10	127	216	610	955	1274
3	1	122	213	594	1007	1344
	2	110	209	604	957	1358
	3	102	209	599	929	1304
	4	98	197	588	974	1330
	5	113	211	581	997	1359
	6	111	191	585	954	1374
	7	111	209	616	993	1326
	8	107	208	611	967	1311
	9	116	197	600	991	1376
	10	106	176	608	960	1320
4	1	120	237	753	1341	1965
	2	120	257	710	1346	1997
	3	119	249	730	1335	1892
	4	117	240	734	1335	1900
	5	126	244	742	1320	1850
	6	118	251	728	1333	1932
	7	118	262	744	1321	2013
	8	117	246	735	1307	1907
	9	117	234	731	1399	1929
	10	116	249	717	1349	1880

se nadaljuje

nadaljevanje Priloge E5

Laboratorij	Ponovitev	ŠSC (1000/ml)				
		Vzorec				
		1	2	3	4	5
5	1	128	229	659	980	1353
	2	119	247	665	946	1340
	3	123	248	671	1001	1312
	4	124	237	682	981	1333
	5	121	224	667	1015	1310
	6	131	234	671	977	1323
	7	126	250	673	1010	1327
	8	123	240	680	1026	1336
	9	112	239	660	996	1307
	10	120	242	663	1013	1319
6	1	121	234	640	1002	1377
	2	122	228	675	997	1393
	3	118	229	652	1021	1421
	4	100	246	625	996	1369
	5	113	240	636	1016	1424
	6	106	229	644	1002	1371
	7	112	229	618	1043	1407
	8	112	248	655	1031	1401
	9	124	220	650	1027	1393
	10	96	226	625	1016	1368

Priloga E6: Vrnjeni rezultati laboratorijev 1, 3 in 4 za 3. ponovitev poskusa, izmerjeni z inštrumentom z nastavitvami za naklon in odsek na ordinati glede na sistem T.

Laboratorij	Ponovitev	ŠSC (1000/ml)				
		Vzorec				
		1	2	3	4	5
1	1	118	244	643	1025	1461
	2	120	214	656	1047	1483
	3	103	224	657	1071	1545
	4	120	219	657	1071	1527
	5	116	227	644	1051	1480
	6	118	227	687	1105	1495
	7	117	223	668	1071	1516
	8	109	222	658	1076	1542
	9	118	233	679	1074	1496
	10	111	234	660	1026	1493
3	1	116	233	654	1060	1470
	2	117	233	638	1006	1447
	3	128	219	654	1054	1438
	4	121	222	633	1022	1457
	5	123	222	649	1035	1435
	6	117	219	631	1019	1429
	7	112	227	627	1024	1419
	8	102	225	645	1045	1416
	9	125	224	635	1019	1433
	10	116	227	645	1073	1411
4	1	108	215	678	1133	1457
	2	103	217	648	1145	1515
	3	101	213	649	1196	1521
	4	101	218	659	1153	1487
	5	108	211	634	1188	1471
	6	98	219	649	1168	1493
	7	101	220	654	1172	1528
	8	106	208	654	1176	1478
	9	111	217	673	1172	1464
	10	104	216	654	1168	1504

Priloga E7: Vrnjeni rezultati laboratorijev za 4. ponovitev poskusa, izmerjeni z inštrumenti z nastavitvami za naklon 1 in odsek na ordinati 0 (podatki S).

Laboratorij	Ponovitev	ŠSC (1000/ml)				
		Vzorec				
		1	2	3	4	5
1	1	134	273	430	734	1671
	2	131	255	434	690	1629
	3	136	253	441	723	1621
	4	130	252	433	731	1647
	5	127	260	444	732	1649
	6	125	243	465	743	1640
	7	130	259	425	708	1635
	8	142	245	417	706	1604
	9	138	257	419	719	1604
	10	130	249	422	709	1562
2	1	124	251	461	755	1709
	2	141	268	466	801	1693
	3	126	262	491	769	1716
	4	125	261	492	785	1753
	5	129	265	466	781	1722
	6	127	263	491	785	1674
	7	129	267	479	797	1735
	8	142	263	498	782	1746
	9	131	268	458	766	1726
	10	132	264	463	785	1761
3	1	135	285	537	931	2013
	2	141	293	520	937	2028
	3	134	296	533	924	2066
	4	133	284	547	913	2008
	5	133	284	537	951	2109
	6	131	307	546	949	2078
	7	135	288	557	940	2113
	8	136	286	542	920	2022
	9	135	289	548	925	2105
	10	130	275	574	924	2063
4	1	128	239	420	716	1603
	2	129	242	417	717	1620
	3	139	235	415	713	1598
	4	119	249	430	708	1590
	5	120	233	428	706	1594
	6	122	240	424	717	1580
	7	128	250	438	713	1580
	8	120	262	440	727	1581
	9	125	239	419	709	1576
	10	119	234	416	707	1576

se nadaljuje

nadaljevanje Priloge E7

Laboratorij	Ponovitev	ŠSC (1000/ml)				
		Vzorec				
		1	2	3	4	5
5	1	110	242	456	782	1715
	2	119	250	458	753	1741
	3	119	262	449	775	1778
	4	131	251	477	755	1735
	5	129	238	449	793	1787
	6	123	250	478	807	1750
	7	115	262	442	787	1754
	8	125	263	493	785	1771
	9	122	246	468	799	1712
	10	118	235	456	773	1713
6	1	132	254	466	784	1666
	2	134	246	455	774	1712
	3	125	268	439	768	1714
	4	128	258	457	751	1720
	5	121	249	442	765	1765
	6	128	274	479	763	1733
	7	130	261	477	797	1763
	8	127	264	460	756	1748
	9	134	264	457	762	1751
	10	131	273	459	784	1716

Priloga E8: Vrnjeni rezultati laboratorijev 3 in 4 za 4. ponovitev poskusa, izmerjeni z inštrumentom z nastavitvami za naklon in odsek na ordinati glede na sistem T.

Laboratorij	Ponovitev	ŠSC (1000/ml)				
		Vzorec				
		1	2	3	4	5
3	1	142	277	470	808	1727
	2	129	268	460	764	1679
	3	135	265	459	741	1714
	4	129	272	467	764	1711
	5	131	270	464	755	1726
	6	129	276	448	751	1692
	7	140	256	456	755	1703
	8	126	257	460	762	1731
	9	130	260	484	729	1721
	10	126	269	461	732	1722
4	1	122	253	494	809	1803
	2	120	241	480	809	1801
	3	121	258	474	787	1783
	4	123	247	480	783	1800
	5	115	247	471	811	1751
	6	122	253	465	806	1743
	7	116	256	450	790	1756
	8	117	246	465	797	1789
	9	118	266	469	801	1738
	10	123	248	461	786	1751

Priloga E9: Vrnjeni rezultati laboratorijev za 5. ponovitev poskusa, izmerjeni z inštrumenti z nastavitvami za naklon 1 in odsek na ordinati 0 (podatki S).

Laboratorij	Ponovitev	ŠSC (1000/ml)				
		Vzorec				
		1	2	3	4	5
1	1	151	285	530	774	1028
	2	151	279	545	781	1059
	3	154	299	548	800	1033
	4	158	317	527	815	1089
	5	155	295	523	816	1048
	6	166	289	510	774	1054
	7	165	279	559	807	1037
	8	161	269	541	799	1025
	9	152	316	550	811	1061
	10	167	286	546	778	1068
2	1	153	282	493	748	1045
	2	157	297	472	770	1032
	3	143	275	481	780	1031
	4	157	273	491	777	1025
	5	143	275	487	753	1008
	6	154	274	489	763	1005
	7	147	278	475	757	1038
	8	154	278	478	749	1004
	9	158	274	488	755	1017
	10	158	278	490	747	1029
3	1	171	278	547	759	1001
	2	156	299	534	747	982
	3	152	290	545	755	1001
	4	164	279	522	785	1011
	5	167	285	518	762	989
	6	164	290	526	757	990
	7	160	282	514	747	1044
	8	147	275	528	766	1021
	9	159	313	524	768	998
	10	161	277	518	748	972
4	1	184	335	627	919	1192
	2	174	333	605	908	1216
	3	171	315	612	923	1203
	4	176	319	638	933	1183
	5	170	325	630	927	1176
	6	180	319	636	921	1193
	7	168	329	623	918	1240
	8	180	322	616	918	1167
	9	164	323	635	899	1159
	10	170	327	600	933	1173

se nadaljuje

nadaljevanje Priloge E9

Laboratorij	Ponovitev	ŠSC (1000/ml)				
		Vzorec				
		1	2	3	4	5
5	1	158	298	522	803	1102
	2	164	276	538	792	1093
	3	157	302	531	810	1066
	4	167	316	519	811	1105
	5	161	299	531	796	1107
	6	164	288	530	802	1086
	7	163	296	517	831	1080
	8	152	303	526	830	1115
	9	153	292	535	839	1103
	10	158	296	528	796	1076
6	1	143	279	545	776	1015
	2	152	274	531	781	1073
	3	152	277	542	757	1075
	4	159	300	560	774	1080
	5	150	294	529	786	1061
	6	155	282	536	783	1072
	7	157	300	549	798	1057
	8	163	279	548	764	1064
	9	166	274	516	784	1057
	10	149	284	532	763	1059

Priloga E10: Vrnjeni rezultati laboratorijev 3 in 4 za 5. ponovitev poskusa, izmerjeni z inštrumentom z nastavitvami za naklon in odsek na ordinati glede na sistem T.

Laboratorij	Ponovitev	ŠSC (1000/ml)				
		Vzorec				
		1	2	3	4	5
3	1	160	294	584	794	1030
	2	157	306	542	809	1054
	3	172	309	570	807	1010
	4	162	306	561	811	1059
	5	166	288	559	798	1053
	6	172	289	525	800	1057
	7	171	312	559	816	1003
	8	147	293	553	796	1049
	9	158	302	552	773	1027
	10	164	289	553	816	1012
4	1	150	293	552	836	1020
	2	154	286	532	816	1051
	3	150	292	526	808	1039
	4	140	284	540	810	1024
	5	148	277	526	815	1035
	6	150	284	542	820	1070
	7	156	292	547	724	1042
	8	155	290	560	812	1059
	9	150	292	545	800	1070
	10	149	286	538	792	1049

Priloga E11: Vrnjeni rezultati laboratorijev za 6. ponovitev poskusa, izmerjeni z inštrumenti z nastavitvami za naklon 1 in odsek na ordinati 0 (podatki S).

Laboratorij	Ponovitev	ŠSC (1000/ml)				
		Vzorec				
		1	2	3	4	5
1	1	142	308	498	872	1308
	2	158	326	510	849	1380
	3	154	295	503	875	1403
	4	152	325	527	882	1411
	5	165	314	548	869	1410
	6	156	307	506	865	1410
	7	150	302	526	871	1417
	8	165	306	520	865	1417
	9	153	298	531	874	1441
	10	163	295	526	864	1393
2	1	132	287	425	827	1171
	2	138	277	438	816	1177
	3	149	286	453	799	1180
	4	143	280	435	794	1184
	5	157	279	408	818	1182
	6	150	282	446	829	1156
	7	148	279	417	821	1169
	8	149	278	461	808	1219
	9	139	266	444	825	1213
	10	147	278	442	832	1201
3	1	149	306	436	838	1255
	2	167	294	461	828	1266
	3	161	322	448	819	1253
	4	144	290	437	864	1211
	5	158	318	433	848	1270
	6	167	300	450	846	1254
	7	153	288	453	802	1242
	8	158	289	438	818	1239
	9	146	288	446	829	1209
	10	155	280	448	838	1261
4	1	173	324	577	978	1575
	2	162	320	576	995	1561
	3	161	310	573	974	1525
	4	165	342	585	1010	1554
	5	166	333	592	1023	1588
	6	162	341	582	1006	1560
	7	166	340	575	1021	1562
	8	166	326	591	1005	1576
	9	163	330	582	998	1584
	10	173	338	586	981	1516

se nadaljuje

nadaljevanje Priloge E11

Laboratorij	Ponovitev	ŠSC (1000/ml)				
		Vzorec				
		1	2	3	4	5
5	1	159	297	451	858	1286
	2	163	311	457	849	1253
	3	163	295	469	873	1247
	4	165	295	446	851	1286
	5	172	298	476	830	1276
	6	168	295	456	836	1276
	7	152	310	477	874	1289
	8	157	299	491	877	1277
	9	158	304	475	821	1243
	10	159	301	443	852	1279
6	1	151	302	479	846	1313
	2	157	286	488	837	1290
	3	141	287	480	836	1302
	4	157	289	513	863	1362
	5	144	309	474	846	1336
	6	150	301	502	868	1305
	7	163	303	492	842	1329
	8	155	305	481	842	1291
	9	152	284	471	807	1288
	10	158	304	493	870	1273

Priloga E12: Vrnjeni rezultati laboratorijev 3 in 4 za 6. ponovitev poskusa, izmerjeni z inštrumentom z nastavitvami za naklon in odsek na ordinati glede na sistem T.

Laboratorij	Ponovitev	ŠSC (1000/ml)				
		Vzorec				
		1	2	3	4	5
3	1	158	317	492	895	1313
	2	159	321	470	880	1278
	3	165	330	490	886	1303
	4	159	315	474	854	1306
	5	173	304	489	866	1328
	6	169	303	488	880	1293
	7	169	301	460	894	1183
	8	161	311	464	891	1256
	9	162	300	469	871	1265
	10	158	307	488	876	1282
4	1	150	301	521	905	1427
	2	145	300	518	890	1441
	3	148	308	539	881	1422
	4	155	291	519	879	1370
	5	148	288	518	894	1397
	6	149	299	515	875	1362
	7	149	293	517	897	1403
	8	149	297	523	882	1415
	9	155	304	510	870	1402
	10	148	306	523	887	1404

Priloga F

Ugotavljanje osamelcev z metodo po Grubbs-u za posamezno ponovitev poskusa

Priloga F1: Ugotavljanje osamelcev z metodo po Grubbs-u ($\alpha = 0,05$) za podatke S za 1. ponovitev poskusa.

	Vzorec				
	1	2	3	4	5
Povprečje ($\bar{S} \times 1000/\text{ml}$)	36,20	247,20	574,71	839,02	1338,45
Sd ($\bar{S} \times 1000/\text{ml}$)	3,35	16,34	36,66	39,99	95,06
Kritična vrednost G	3,20	3,13	3,19	3,19	3,20
Zaznan osamelec?	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne

Priloga F2: Ugotavljanje osamelcev z metodo po Grubbs-u ($\alpha = 0,05$) za podatke S za 2. ponovitev poskusa.

	Vzorec				
	1	2	3	4	5
Povprečje ($\bar{S} \times 1000/\text{ml}$)	164,73	402,27	685,55	266,93	994,30
Sd ($\bar{S} \times 1000/\text{ml}$)	10,43	26,55	43,23	15,83	51,29
Kritična vrednost G	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20
Zaznan osamelec?	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne

Priloga F3: Ugotavljanje osamelcev z metodo po Grubbs-u ($\alpha = 0,05$) za podatke S za 3. ponovitev poskusa.

	Vzorec				
	1	2	3	4	5
Povprečje ($\bar{S} \times 1000/\text{ml}$)	114,92	225,33	648,32	1053,73	1451,83
Sd ($\bar{S} \times 1000/\text{ml}$)	7,77	17,96	45,48	134,54	222,63
Kritična vrednost G	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20
Zaznan osamelec?	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne

Priloga F4: Ugotavljanje osamelcev z metodo po Grubbs-u ($\alpha = 0,05$) za podatke S za 4. ponovitev poskusa.

	Vzorec				
	1	2	3	4	5
Povprečje ($\bar{S} \times 1000/\text{ml}$)	128,70	259,97	466,67	782,68	1745,73
Sd ($\bar{S} \times 1000/\text{ml}$)	6,83	16,86	41,37	73,79	155,75
Kritična vrednost G	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20
Zaznan osamelec?	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne

Priloga F5: Ugotavljanje osamelcev z metodo po Grubbs-u ($\alpha = 0,05$) za podatke S za 5. ponovitev poskusa.

Vzorec	Vzorec				
	1	2	3	4	5
Povprečje ($\text{SSC} \times 1000/\text{ml}$)	159,75	293,70	539,77	803,72	1069,88
Sd ($\text{SSC} \times 1000/\text{ml}$)	9,13	18,24	42,91	57,12	64,30
Kritična vrednost G	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20
Zaznan osamelec?	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne

Priloga F6: Ugotavljanje osamelcev z metodo po Grubbs-u ($\alpha = 0,05$) za podatke S za 6. ponovitev poskusa.

	Vzorec				
	1	2	3	4	5
Povprečje ($\text{SSC} \times 1000/\text{ml}$)	156,15	302,03	489,12	869,23	1328,40
Sd ($\text{SSC} \times 1000/\text{ml}$)	9,13	18,09	51,70	62,67	125,51
Kritična vrednost G	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20
Zaznan osamelec?	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne

Priloga F7: Ugotavljanje osamelcev z metodo po Grubbs-u ($\alpha = 0,05$) za podatke sistema T.

	Ponovitev poskusa	Vzorec				
		1	2	3	4	5
Zaznan osamelec?	1	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
	2	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
	3	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
	4	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
	5	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
	6	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne

Priloga F8: Primerjava ugotavljanja osamelcev z metodo po Grubbs-u ($\alpha = 0,05$) in metodo kvartilov za podatke S.

Podatki	Lastnosti	Število osamelcev	
		Metoda kvartilov	Metoda Grubbs ($\alpha = 0,05$)
Medlaboratorijska primerjava (oktober 2014)	9 vzorcev 2 ponovitvi 11 laboratorijev N=198	6	ni osamelcev
1. ponovitev poskusa (november 2014)	5 vzorcev 10 ponovitev 6 laboratorijev N=300 N ₍₋₁₂₎ =288	25 (brez izločitve podatkov, ki so očitno odstopali) 12 (po izločitvi 12-ih podatkov, ki so očitno odstopali)	2 (brez izločitve podatkov, ki so očitno odstopali) ni osamelcev (po izločitvi 12-ih ih podatkov, ki so očitno odstopali)
2. ponovitev poskusa (december 2014)	5 vzorcev 10 ponovitev 6 laboratorijev N=300	16	ni osamelcev
3. ponovitev poskusa (januar 2015)	5 vzorcev 10 ponovitev 6 laboratorijev N=300	21	ni osamelcev
4. ponovitev poskusa (februar 2015)	5 vzorcev 10 ponovitev 6 laboratorijev N=300	23	ni osamelcev
5. ponovitev poskusa (marec 2015)	5 vzorcev 10 ponovitev 6 laboratorijev N=300	23	ni osamelcev
6. ponovitev poskusa (april 2015)	5 vzorcev 10 ponovitev 6 laboratorijev N=300	10	ni osamelcev

Priloga G

Ugotavljanje homogenosti in stabilnosti vzorcev pri posamezni ponovitvi poskusa

Priloga G1: Homogenost za vzorec 1; 1. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$).

Homogeneity check (ISO 13528 Annex B)			Example data	
Sample t	value#1, $x_{t,1}$	value#2, $x_{t,2}$	sample average (B.4), \bar{x}_t	between-test-portion ranges (B.5), w_t
1	36	43	39,5	7
2	34	43	38,5	9
3	36	35	35,5	1
4	35	36	35,5	1
5	35	43	39	8
6	39	46	42,5	7
7	42	36	39	6
8	44	34	39	10
9	42	35	38,5	7
10	40	39	39,5	1
number of samples g			10	
general average (B.6)			38,65	
STD of sample averages (B.7), s_x			2,014530549	
within-samples STD (B.8), s_w			4,642197755	
between-samples STD (B.9), s_s			0	
Expected standard deviation for proficiency assessment				2,966
Homogeneity			ok	

Priloga G2: Homogenost za vzorec 2; 1. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$).

Homogeneity check (ISO 13528 Annex B)			Example data	
Sample t	value#1, $x_{t,1}$	value#2, $x_{t,2}$	sample average (B.4), \bar{x}_t	between-test-portion ranges (B.5), w_t
1	245	250	247,5	5
2	257	246	251,5	11
3	241	248	244,5	7
4	247	251	249	4
5	242	254	248	12
6	259	246	252,5	13
7	258	250	254	8
8	254	248	251	6
9	255	234	244,5	21
10	244	253	248,5	9
number of samples g			10	
general average (B.6)			249,1	
STD of sample averages (B.7), s_x			3,186778241	
within-samples STD (B.8), s_w			7,569676347	
between-samples STD (B.9), s_s			0	
Expected standard deviation for proficiency assessment				*13,57
Homogeneity			ok	

* $\hat{\sigma}$ je interpolirana (glede na \bar{x}) med vrednostjo za $\hat{\sigma}=4,449$ (pri 194×1000 celic/ml iz MP oktober 2014) in vrednostjo za $\hat{\sigma}=32,626$ (pri 364×1000 celic/ml iz MP oktober 2014).

Priloga G3: Homogenost za vzorec 3; 1. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$).

Homogeneity check (ISO 13528 Annex B)			Example data	
Sample t	value#1, $x_{t,1}$	value#2, $x_{t,2}$	sample average (B.4), \bar{x}_t	between-test-portion ranges (B.5), w_t
1	581	590	585,5	9
2	566	578	572	12
3	560	563	561,5	3
4	570	584	577	14
5	538	586	562	48
6	579	545	562	34
7	548	544	546	4
8	560	578	569	18
9	576	586	581	10
10	545	579	562	34
	number of samples g		10	
	general average (B.6)		567,8	
	STD of sample averages (B.7), s_x		11,5811149	
	within-samples STD (B.8), s_w		16,56200471	
	between-samples STD (B.9), s_S		0	
Expected standard deviation for proficiency assessment				39,2995
Homogeneity			ok	

Priloga G4: Homogenost za vzorec 4; 1. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$).

Homogeneity check (ISO 13528 Annex B)			Example data	
Sample t	value#1, $x_{t,1}$	value#2, $x_{t,2}$	sample average (B.4), \bar{x}_t	between-test-portion ranges (B.5), w_t
1	842	877	859,5	35
2	893	839	866	54
3	827	840	833,5	13
4	850	858	854	8
5	854	806	830	48
6	828	812	820	16
7	845	846	845,5	1
8	821	839	830	18
9	822	819	820,5	3
10	856	833	844,5	23
	number of samples g		10	
	general average (B.6)		840,35	
	STD of sample averages (B.7), s_x		16,06938082	
	within-samples STD (B.8), s_w		19,74461952	
	between-samples STD (B.9), s_S		7,956129712	
Expected standard deviation for proficiency assessment				90,463
Homogeneity			ok	

Priloga G5: Homogenost za vzorec 5; 1. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$).

Homogeneity check (ISO 13528 Annex B)			Example data	
Sample t	value#1, $x_{t,1}$	value#2, $x_{t,2}$	sample average (B.4), \bar{x}_t	between-test-portion ranges (B.5), w_t
1	1273	1300	1286,5	27
2	*	*		
3	1266	1269	1267,5	3
4	1302	1271	1286,5	31
5	1303	1248	1275,5	55
6	1249	1307	1278	58
7	1272	1304	1288	32
8	1320	1309	1314,5	11
9	1289	1289	1289	0
10	1346	1305	1325,5	41
	number of samples g		9	
	general average (B.6)		1290,111111	
	STD of sample averages (B.7), s_x		18,54180712	
	within-samples STD (B.8), s_w		24,62383669	
	between-samples STD (B.9), s_S		6,374319136	
	Expected standard deviation for proficiency assessment			96,395
	Homogeneity	ok		

*Podatka sta bila izločena zaradi napake pri meritvi z inštrumentom. Meritvi sta bili 1018 in 1010 $\check{S}SC \times 1000/ml$.

Priloga G6: Ugotavljanje stabilnosti vzorcev za 1. ponovitev poskusa ($\bar{S}SC \times 1000/ml$).

Dan (dan priprave vzorcev = 0; 04.11.2014)	1	2	3	6	7
Vzorec	\bar{x}	\bar{y}_2	\bar{y}_3	\bar{y}_6	\bar{y}_7
1	38,7	37,5	39,2	39,3	39,8
$ \bar{x}-\bar{y}_i $		1,2	0,5	0,6	1,1
$\hat{\sigma}$		2,966	2,966	2,966	2,966
$0,3 \times \hat{\sigma}$		0,9	0,9	0,9	0,9
$ \bar{x}-\bar{y}_i < 0,3 \times \hat{\sigma}$		FALSE	ok	ok	FALSE
r		6,5	6,5	6,5	6,5
$ \bar{x}-\bar{y}_i < r$		ok	ok	ok	ok
2	249,1	242,7	242,5	247,3	245,3
$ \bar{x}-\bar{y}_i $		6,4	6,6	1,8	3,8
$\hat{\sigma}$		13,57*	13,57*	13,57*	13,57*
$0,3 \times \hat{\sigma}$		4,1	4,1	4,1	4,1
$ \bar{x}-\bar{y}_i < 0,3 \times \hat{\sigma}$		FALSE	FALSE	ok	ok
r		34,9	34,9	34,9	34,9
$ \bar{x}-\bar{y}_i < r$		ok	ok	ok	ok
3	567,8	578,7	575,2	567,3	567,3
$ \bar{x}-\bar{y}_i $		10,9	7,4	0,5	0,5
$\hat{\sigma}$		39,2995	39,2995	39,2995	39,2995
$0,3 \times \hat{\sigma}$		11,8	11,8	11,8	11,8
$ \bar{x}-\bar{y}_i < 0,3 \times \hat{\sigma}$		ok	ok	ok	ok
r		63,6	63,6	63,6	63,6
$ \bar{x}-\bar{y}_i < r$		ok	ok	ok	ok
4	840,4	849,3	829,8	814,8	822,3
$ \bar{x}-\bar{y}_i $		8,9	10,6	25,6	18,1
$\hat{\sigma}$		90,463	90,463	90,463	90,463
$0,3 \times \hat{\sigma}$		27,1	27,1	27,1	27,1
$ \bar{x}-\bar{y}_i < 0,3 \times \hat{\sigma}$		ok	ok	ok	ok
r		70,6	70,6	70,6	70,6
$ \bar{x}-\bar{y}_i < r$		ok	ok	ok	ok
5	1290,1	1285,2	1317,3	1291,2	1306,7
$ \bar{x}-\bar{y}_i $		4,9	27,2	1,1	16,6
$\hat{\sigma}$		96,395	96,395	96,395	96,395
$0,3 \times \hat{\sigma}$		28,9	28,9	28,9	28,9
$ \bar{x}-\bar{y}_i < 0,3 \times \hat{\sigma}$		ok	ok	ok	ok
r		108,4	108,4	108,4	108,4
$ \bar{x}-\bar{y}_i < r$		ok	ok	ok	ok

* $\hat{\sigma}$ je interpolirana (glede na \bar{x}) med vrednostjo za $\hat{\sigma}=4,449$ (pri 194×1000 celic/ml iz MP oktober 2014) in vrednostjo za $\hat{\sigma}=32,626$ (pri 364×1000 celic/ml iz MP oktober 2014). Vrednosti za r so dobljene s preračunom iz podanih kriterijev za s_r ($r = 2,8s_r$) v standardu ISO 13366-2/IDF 148-2 (2006) glede na število somatskih celic.

Priloga G7: Homogenost za vzorec 1; 2. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$).

Homogeneity check (ISO 13528 Annex B)			Example data	
Sample t	value#1, $x_{t,1}$	value#2, $x_{t,2}$	sample average (B.4), \bar{x}_t	between-test-portion ranges (B.5), w_t
1	172	171	171,5	1
2	170	170	170	0
3	178	168	173	10
4	169	159	164	10
5	180	157	168,5	23
6	184	153	168,5	31
7	174	166	170	8
8	157	167	162	10
9	162	171	166,5	9
10	169	180	174,5	11
	number of samples g		10	
	general average (B.6)		168,85	
	STD of sample averages (B.7), s_x		3,873341939	
	within-samples STD (B.8), s_w		10,1414989	
	between-samples STD (B.9), s_S		0	
	Expected standard deviation for proficiency assessment			4,449
	Homogeneity	ok		

Priloga G8: Homogenost za vzorec 2; 2. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$).

Homogeneity check (ISO 13528 Annex B)			Example data	
Sample t	value#1, $x_{t,1}$	value#2, $x_{t,2}$	sample average (B.4), \bar{x}_t	between-test-portion ranges (B.5), w_t
1	381	436	408,5	55
2	382	393	387,5	11
3	392	391	391,5	1
4	390	392	391	2
5	391	379	385	12
6	386	419	402,5	33
7	394	417	405,5	23
8	386	391	388,5	5
9	393	413	403	20
10	399	394	396,5	5
	number of samples g		10	
	general average (B.6)		395,95	
	STD of sample averages (B.7), s_x		8,384675174	
	within-samples STD (B.8), s_w		16,37528626	
	between-samples STD (B.9), s_S		0	
	Expected standard deviation for proficiency assessment			32,626
	Homogeneity	ok		

Priloga G9: Homogenost za vzorec 3; 2. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$).

Homogeneity check (ISO 13528 Annex B)			Example data	
Sample t	value#1, $x_{t,1}$	value#2, $x_{t,2}$	sample average (B.4), \bar{x}_t	between-test-portion ranges (B.5), w_t
1	695	669	682	26
2	672	677	674,5	5
3	678	677	677,5	1
4	647	690	668,5	43
5	676	693	684,5	17
6	668	676	672	8
7	714	697	705,5	17
8	705	663	684	42
9	717	674	695,5	43
10	662	679	670,5	17
	number of samples g		10	
	general average (B.6)		681,45	
	STD of sample averages (B.7), s_x		11,70339457	
	within-samples STD (B.8), s_w		18,8348082	
	between-samples STD (B.9), s_S		0	
	Expected standard deviation for proficiency assessment			39,2995
	Homogeneity	ok		

Priloga G10: Homogenost za vzorec 4; 2. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$).

Homogeneity check (ISO 13528 Annex B)			Example data	
Sample t	value#1, $x_{t,1}$	value#2, $x_{t,2}$	sample average (B.4), \bar{x}_t	between-test-portion ranges (B.5), w_t
1	271	281	276	10
2	276	274	275	2
3	254	269	261,5	15
4	266	263	264,5	3
5	260	262	261	2
6	272	277	274,5	5
7	265	258	261,5	7
8	259	266	262,5	7
9	261	271	266	10
10	266	276	271	10
	number of samples g		10	
	general average (B.6)		267,35	
	STD of sample averages (B.7), s_x		6,146588937	
	within-samples STD (B.8), s_w		5,766281297	
	between-samples STD (B.9), s_S		4,599516883	
	Expected standard deviation for proficiency assessment			*16,594
	Homogeneity	ok		

* $\hat{\sigma}$ je interpolirana (glede na \bar{x}) med vrednostjo za $\hat{\sigma}=4,449$ (pri 194×1000 celic/ml iz MP oktober 2014) in vrednostjo za $\hat{\sigma}=32,626$ (pri 364×1000 celic/ml iz MP oktober 2014).

Priloga G11: Homogenost za vzorec 5; 2. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$).

Homogeneity check (ISO 13528 Annex B)			Example data	
Sample t	value#1, $x_{t,1}$	value#2, $x_{t,2}$	sample average (B.4), \bar{x}_t	between-test-portion ranges (B.5), w_t
1	1025	996	1010,5	29
2	1032	991	1011,5	41
3	1020	979	999,5	41
4	1016	985	1000,5	31
5	954	987	970,5	33
6	977	990	983,5	13
7	996	995	995,5	1
8	1003	1022	1012,5	19
9	952	968	960	16
10	963	1003	983	40
	number of samples g		10	
	general average (B.6)		992,7	
	STD of sample averages (B.7), s_x		18,00648031	
	within-samples STD (B.8), s_w		20,78460969	
	between-samples STD (B.9), s_S		10,40352504	
Expected standard deviation for proficiency assessment				90,463
Homogeneity		ok		

Priloga G12: Ugotavljanje stabilnosti vzorcev za 2. ponovitev poskusa ($\text{ŠSC} \times 1000/\text{ml}$).

Dan (dan priprave vzorcev = 0; 02.12.2014)	1 3.12.2014	2 4.12.2014	3 5.12.2014	6 8.12.2014	7 9.12.2014
Vzorec	\bar{x}	\bar{y}_2	\bar{y}_3	\bar{y}_6	\bar{y}_7
1	168,9	168,7	174,7	170,0	170,5
$ \bar{x}-\bar{y}_i $		0,2	5,8	1,1	1,6
$\hat{\sigma}$		4,449	4,449	4,449	4,449
$0,3 \times \hat{\sigma}$		1,3	1,3	1,3	1,3
$ \bar{x}-\bar{y}_i < 0,3 \times \hat{\sigma}$		ok	FALSE	ok	FALSE
r		28,4	28,4	28,4	28,4
$ \bar{x}-\bar{y}_i < r$		ok	ok	ok	ok
2	396,0	403,2	391,8	396,0	399,5
$ \bar{x}-\bar{y}_i $		7,2	4,2	0,0	3,5
$\hat{\sigma}$		32,626	32,626	32,626	32,626
$0,3 \times \hat{\sigma}$		9,8	9,8	9,8	9,8
$ \bar{x}-\bar{y}_i < 0,3 \times \hat{\sigma}$		ok	ok	ok	ok
r		44,4	44,4	44,4	44,4
$ \bar{x}-\bar{y}_i < r$		ok	ok	ok	ok
3	681,5	683,0	671,7	678,3	686,7
$ \bar{x}-\bar{y}_i $		1,5	9,8	3,2	5,2
$\hat{\sigma}$		39,2995	39,2995	39,2995	39,2995
$0,3 \times \hat{\sigma}$		11,8	11,8	11,8	11,8
$ \bar{x}-\bar{y}_i < 0,3 \times \hat{\sigma}$		ok	ok	ok	ok
r		57,2	57,2	57,2	57,2
$ \bar{x}-\bar{y}_i < r$		ok	ok	ok	ok
4	267,4	273,0	264,7	254,7	273,5
$ \bar{x}-\bar{y}_i $		5,6	2,7	12,7	6,1
$\hat{\sigma}$		16,594*	16,594*	16,594*	16,594*
$0,3 \times \hat{\sigma}$		5,0	5,0	5,0	5,0
$ \bar{x}-\bar{y}_i < 0,3 \times \hat{\sigma}$		FALSE	ok	FALSE	FALSE
r		37,4	37,4	37,4	37,4
$ \bar{x}-\bar{y}_i < r$		ok	ok	ok	ok
5	992,7	1004,3	996,8	984,5	982,3
$ \bar{x}-\bar{y}_i $		11,6	4,1	8,2	10,4
$\hat{\sigma}$		90,463	90,463	90,463	90,463
$0,3 \times \hat{\sigma}$		27,1	27,1	27,1	27,1
$ \bar{x}-\bar{y}_i < 0,3 \times \hat{\sigma}$		ok	ok	ok	ok
r		83,4	83,4	83,4	83,4
$ \bar{x}-\bar{y}_i < r$		ok	ok	ok	ok

* $\hat{\sigma}$ je interpolirana (glede na \bar{x}) med vrednostjo za $\hat{\sigma}=4,449$ (pri 194×1000 celic/ml iz MP oktober 2014) in vrednostjo za $\hat{\sigma}=32,626$ (pri 364×1000 celic/ml iz MP oktober 2014). Vrednosti za r so dobljene s preračunom iz podanih kriterijev za s_r ($r = 2,8s_r$) v standardu ISO 13366-2/IDF 148-2 (2006) glede na število somatskih celic.

Priloga G13: Homogenost za vzorec 1; 3. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$).

Homogeneity check (ISO 13528 Annex B)			Example data	
Sample t	value#1, $x_{t,1}$	value#2, $x_{t,2}$	sample average (B.4), \bar{x}_t	between-test-portion ranges (B.5), w_t
1	115	118	116,5	3
2	113	124	118,5	11
3	107	108	107,5	1
4	112	107	109,5	5
5	108	117	112,5	9
6	115	107	111	8
7	123	127	125	4
8	124	115	119,5	9
9	117	102	109,5	15
10	111	113	112	2
	number of samples g		10	
	general average (B.6)		114,15	
	STD of sample averages (B.7), s_x		5,532981917	
	within-samples STD (B.8), s_w		5,599107072	
	between-samples STD (B.9), s_S		3,865085884	
	Expected standard deviation for proficiency assessment			4,449
	Homogeneity		not ok	

Priloga G14: Homogenost za vzorec 2; 3. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$).

Homogeneity check (ISO 13528 Annex B)			Example data	
Sample t	value#1, $x_{t,1}$	value#2, $x_{t,2}$	sample average (B.4), \bar{x}_t	between-test-portion ranges (B.5), w_t
1	217	223	220	6
2	218	227	222,5	9
3	220	232	226	12
4	216	222	219	6
5	215	235	225	20
6	212	218	215	6
7	228	226	227	2
8	226	224	225	2
9	226	223	224,5	3
10	226	217	221,5	9
	number of samples g		10	
	general average (B.6)		222,55	
	STD of sample averages (B.7), s_x		3,722678247	
	within-samples STD (B.8), s_w		6,445928948	
	between-samples STD (B.9), s_S		0	
	Expected standard deviation for proficiency assessment			*9,171
	Homogeneity		ok	

* $\hat{\sigma}$ je interpolirana (glede na \bar{x}) med vrednostjo za $\hat{\sigma}=4,449$ (pri 194×1000 celic/ml iz MP oktober 2014) in vrednostjo za $\hat{\sigma}=32,626$ (pri 364×1000 celic/ml iz MP oktober 2014).

Priloga G15: Homogenost za vzorec 3; 3. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$).

Homogeneity check (ISO 13528 Annex B)			Example data	
Sample t	value#1, $x_{t,1}$	value#2, $x_{t,2}$	sample average (B.4), \bar{x}_t	between-test-portion ranges (B.5), w_t
1	613	645	629	32
2	619	652	635,5	33
3	658	628	643	30
4	632	622	627	10
5	638	621	629,5	17
6	635	614	624,5	21
7	653	631	642	22
8	634	612	623	22
9	641	645	643	4
10	622	641	631,5	19
	number of samples g		10	
	general average (B.6)		632,8	
	STD of sample averages (B.7), s_x		7,64198927	
	within-samples STD (B.8), s_w		16,10589954	
	between-samples STD (B.9), s_S		0	
	Expected standard deviation for proficiency assessment			39,2995
	Homogeneity		ok	

Priloga G16: Homogenost za vzorec 4; 3. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$).

Homogeneity check (ISO 13528 Annex B)			Example data	
Sample t	value#1, $x_{t,1}$	value#2, $x_{t,2}$	sample average (B.4), \bar{x}_t	between-test-portion ranges (B.5), w_t
1	999	1009	1004	10
2	1036	984	1010	52
3	1006	1004	1005	2
4	1024	1052	1038	28
5	976	1006	991	30
6	993	961	977	32
7	1045	995	1020	50
8	1031	1000	1015,5	31
9	989	991	990	2
10	991	983	987	8
	number of samples g		10	
	general average (B.6)		1003,75	
	STD of sample averages (B.7), s_x		18,14639542	
	within-samples STD (B.8), s_w		21,26617032	
	between-samples STD (B.9), s_S		10,15709932	
	Expected standard deviation for proficiency assessment			96,395
	Homogeneity		ok	

Priloga G17: Homogenost za vzorec 5; 3. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$).

Homogeneity check (ISO 13528 Annex B)			Example data	
Sample t	value#1, $x_{t,1}$	value#2, $x_{t,2}$	sample average (B.4), \bar{x}_t	between-test-portion ranges (B.5), w_t
1	1395	1433	1414	38
2	1403	1391	1397	12
3	1335	1408	1371,5	73
4	1346	1351	1348,5	5
5	1377	1384	1380,5	7
6	1339	1422	1380,5	83
7	1369	1345	1357	24
8	1358	1371	1364,5	13
9	1349	1365	1357	16
10	1346	1399	1372,5	53
	number of samples g		10	
	general average (B.6)		1374,3	
	STD of sample averages (B.7), s_x		19,83151252	
	within-samples STD (B.8), s_w		29,74054472	
	between-samples STD (B.9), s_s		0	
Expected standard deviation for proficiency assessment				131,2455
Homogeneity		ok		

Priloga G18: Ugotavljanje stabilnosti vzorcev za 3. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$).

Dan (dan priprave vzorcev = 0; 06.01.2015)	1	2	3	6	7
	7.1.2015	8.1.2015	9.1.2015	12.1.2015	13.1.2015
Vzorec	\bar{x}	\bar{y}_2	\bar{y}_3	\bar{y}_6	\bar{y}_7
1	114,2	114,0	118,0	119,5	110,3
$ \bar{x}-\bar{y}_i $		0,2	3,8	5,3	3,9
$\hat{\sigma}$		4,449	4,449	4,449	4,449
$0,3 \times \hat{\sigma}$		1,3	1,3	1,3	1,3
$ \bar{x}-\bar{y}_i < 0,3 \times \hat{\sigma}$		ok	FALSE	FALSE	FALSE
r		19,2	19,2	19,2	19,2
$ \bar{x}-\bar{y}_i < r$		ok	ok	ok	ok
2	222,6	236,2	232,5	225,7	227,8
$ \bar{x}-\bar{y}_i $		13,6	9,9	3,1	5,2
$\hat{\sigma}$		9,171*	9,171*	9,171*	9,171*
$0,3 \times \hat{\sigma}$		2,8	2,8	2,8	2,8
$ \bar{x}-\bar{y}_i < 0,3 \times \hat{\sigma}$		FALSE	FALSE	FALSE	FALSE
r		37,4	37,4	37,4	37,4
$ \bar{x}-\bar{y}_i < r$		ok	ok	ok	ok
3	632,8	642,7	638,5	624,7	637,5
$ \bar{x}-\bar{y}_i $		9,9	5,7	8,1	4,7
$\hat{\sigma}$		39,2995	39,2995	39,2995	39,2995
$0,3 \times \hat{\sigma}$		11,8	11,8	11,8	11,8
$ \bar{x}-\bar{y}_i < 0,3 \times \hat{\sigma}$		ok	ok	ok	ok
r		53,2	53,2	53,2	53,2
$ \bar{x}-\bar{y}_i < r$		ok	ok	ok	ok
4	1003,8	978,7	1011,0	1005,3	1020,5
$ \bar{x}-\bar{y}_i $		25,1	7,2	1,5	16,7
$\hat{\sigma}$		96,395	96,395	96,395	96,395
$0,3 \times \hat{\sigma}$		28,9	28,9	28,9	28,9
$ \bar{x}-\bar{y}_i < 0,3 \times \hat{\sigma}$		ok	ok	ok	ok
r		84,3	84,3	84,3	84,3
$ \bar{x}-\bar{y}_i < r$		ok	ok	ok	ok
5	1374,3	1375,2	1414,0	1375,3	1436,0
$ \bar{x}-\bar{y}_i $		0,9	39,7	1,0	61,7
$\hat{\sigma}$		131,2455	131,2455	131,2455	131,2455
$0,3 \times \hat{\sigma}$		39,4	39,4	39,4	39,4
$ \bar{x}-\bar{y}_i < 0,3 \times \hat{\sigma}$		ok	FALSE	ok	FALSE
r		115,4	115,4	115,4	115,4
$ \bar{x}-\bar{y}_i < r$		ok	ok	ok	ok

* $\hat{\sigma}$ je interpolirana (glede na \bar{x}) med vrednostjo za $\hat{\sigma}=4,449$ (pri 194×1000 celic/ml iz MP oktober 2014) in vrednostjo za $\hat{\sigma}=32,626$ (pri 364×1000 celic/ml iz MP oktober 2014). Vrednosti za r so dobljene s preračunom iz podanih kriterijev za s_r ($r = 2,8s_r$) v standardu ISO 13366-2/IDF 148-2 (2006) glede na število somatskih celic.

Priloga G19: Homogenost za vzorec 1; 4. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$).

Homogeneity check (ISO 13528 Annex B)			Example data	
Sample t	value#1, $x_{t,1}$	value#2, $x_{t,2}$	sample average (B.4), \bar{x}_t	between-test-portion ranges (B.5), w_t
1	129	131	130	2
2	133	124	128,5	9
3	115	133	124	18
4	131	124	127,5	7
5	133	139	136	6
6	138	138	138	0
7	127	133	130	6
8	136	125	130,5	11
9	129	133	131	4
10	135	128	131,5	7
	number of samples g		10	
	general average (B.6)		130,7	
	STD of sample averages (B.7), s_x		3,987480407	
	within-samples STD (B.8), s_w		5,983310121	
	between-samples STD (B.9), s_S		0	
	Expected standard deviation for proficiency assessment			4,449
	Homogeneity	ok		

Priloga G20: Homogenost za vzorec 2; 4. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$).

Homogeneity check (ISO 13528 Annex B)			Example data	
Sample t	value#1, $x_{t,1}$	value#2, $x_{t,2}$	sample average (B.4), \bar{x}_t	between-test-portion ranges (B.5), w_t
1	260	246	253	14
2	245	250	247,5	5
3	260	252	256	8
4	249	257	253	8
5	259	258	258,5	1
6	277	269	273	8
7	244	251	247,5	7
8	273	261	267	12
9	260	268	264	8
10	255	278	266,5	23
	number of samples g		10	
	general average (B.6)		258,6	
	STD of sample averages (B.7), s_x		8,72671505	
	within-samples STD (B.8), s_w		7,745966692	
	between-samples STD (B.9), s_S		6,793788012	
	Expected standard deviation for proficiency assessment			*15,144
	Homogeneity	not ok		

* $\hat{\sigma}$ je interpolirana (glede na \bar{x}) med vrednostjo za $\hat{\sigma}=4,449$ (pri 194×1000 celic/ml iz MP oktober 2014) in vrednostjo za $\hat{\sigma}=32,626$ (pri 364×1000 celic/ml iz MP oktober 2014).

Priloga G21: Homogenost za vzorec 3; 4. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$).

Homogeneity check (ISO 13528 Annex B)			Example data	
Sample t	value#1, $x_{t,1}$	value#2, $x_{t,2}$	sample average (B.4), \bar{x}_t	between-test-portion ranges (B.5), w_t
1	467	447	457	20
2	459	443	451	16
3	470	474	472	4
4	468	461	464,5	7
5	474	447	460,5	27
6	468	470	469	2
7	466	437	451,5	29
8	456	446	451	10
9	469	478	473,5	9
10	458	469	463,5	11
	number of samples g		10	
	general average (B.6)		461,35	
	STD of sample averages (B.7), s_x		8,596026214	
	within-samples STD (B.8), s_w		11,39517442	
	between-samples STD (B.9), s_S		2,994439291	
Expected standard deviation for proficiency assessment				40,7825
Homogeneity		ok		

Priloga G22: Homogenost za vzorec 4; 4. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$).

Homogeneity check (ISO 13528 Annex B)			Example data	
Sample t	value#1, $x_{t,1}$	value#2, $x_{t,2}$	sample average (B.4), \bar{x}_t	between-test-portion ranges (B.5), w_t
1	782	757	769,5	25
2	769	795	782	26
3	782	808	795	26
4	818	788	803	30
5	773	779	776	6
6	746	759	752,5	13
7	768	741	754,5	27
8	774	763	768,5	11
9	772	793	782,5	21
10	768	761	764,5	7
	number of samples g		10	
	general average (B.6)		774,8	
	STD of sample averages (B.7), s_x		16,32686947	
	within-samples STD (B.8), s_w		14,86943173	
	between-samples STD (B.9), s_S		12,49066318	
Expected standard deviation for proficiency assessment				60,0615
Homogeneity		ok		

Priloga G23: Homogenost za vzorec 5; 4. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$).

Homogeneity check (ISO 13528 Annex B)			Example data	
Sample t	value#1, $x_{t,1}$	value#2, $x_{t,2}$	sample average (B.4), \bar{x}_t	between-test-portion ranges (B.5), w_t
1	1702	1700	1701	2
2	1705	1663	1684	42
3	1743	1705	1724	38
4	1764	1704	1734	60
5	1694	1705	1699,5	11
6	1707	1756	1731,5	49
7	1724	1764	1744	40
8	1727	1744	1735,5	17
9	1729	1695	1712	34
10	1707	1706	1706,5	1
	number of samples g		10	
	general average (B.6)		1717,2	
	STD of sample averages (B.7), s_x		19,45250627	
	within-samples STD (B.8), s_w		24,87971061	
	between-samples STD (B.9), s_S		8,300602388	
Expected standard deviation for proficiency assessment				131,2455
Homogeneity		ok		

Priloga G24: Ugotavljanje stabilnosti vzorcev za 4. ponovitev poskusa ($\text{ŠSC} \times 1000/\text{ml}$).

Dan (dan priprave vzorcev = 0; 03.02.2015)	1	2	3	6	7
Vzorec	\bar{x}	\bar{y}_2	\bar{y}_3	\bar{y}_6	\bar{y}_7
1	130,7	132,5	127,8	124,7	131,3
$ \bar{x}-\bar{y}_i $		1,8	2,9	6,0	0,6
$\hat{\sigma}$		4,449	4,449	4,449	4,449
$0,3 \times \hat{\sigma}$		1,3	1,3	1,3	1,3
$ \bar{x}-\bar{y}_i < 0,3 \times \hat{\sigma}$		FALSE	FALSE	FALSE	ok
r		22,0	22,0	22,0	22,0
$ \bar{x}-\bar{y}_i < r$		ok	ok	ok	ok
2	258,6	261,7	256,5	252,8	259,3
$ \bar{x}-\bar{y}_i $		3,1	2,1	5,8	0,7
$\hat{\sigma}$		15,144*	15,144*	15,144*	15,144*
$0,3 \times \hat{\sigma}$		4,5	4,5	4,5	4,5
$ \bar{x}-\bar{y}_i < 0,3 \times \hat{\sigma}$		ok	ok	FALSE	ok
r		36,2	36,2	36,2	36,2
$ \bar{x}-\bar{y}_i < r$		ok	ok	ok	ok
3	461,4	464,8	460,2	460,2	454,7
$ \bar{x}-\bar{y}_i $		3,4	1,2	1,2	6,7
$\hat{\sigma}$		40,7825	40,7825	40,7825	40,7825
$0,3 \times \hat{\sigma}$		12,2	12,2	12,2	12,2
$ \bar{x}-\bar{y}_i < 0,3 \times \hat{\sigma}$		ok	ok	ok	ok
r		51,7	51,7	51,7	51,7
$ \bar{x}-\bar{y}_i < r$		ok	ok	ok	ok
4	774,8	764,2	760,2	767,7	764,5
$ \bar{x}-\bar{y}_i $		10,6	14,6	7,1	10,3
$\hat{\sigma}$		60,0615	60,0615	60,0615	60,0615
$0,3 \times \hat{\sigma}$		18,0	18,0	18,0	18,0
$ \bar{x}-\bar{y}_i < 0,3 \times \hat{\sigma}$		ok	ok	ok	ok
r		65,1	65,1	65,1	65,1
$ \bar{x}-\bar{y}_i < r$		ok	ok	ok	ok
5	1717,2	1708,2	1684,2	1702,0	1741,0
$ \bar{x}-\bar{y}_i $		9,0	33,0	15,2	23,8
$\hat{\sigma}$		131,2455	131,2455	131,2455	131,2455
$0,3 \times \hat{\sigma}$		39,4	39,4	39,4	39,4
$ \bar{x}-\bar{y}_i < 0,3 \times \hat{\sigma}$		ok	ok	ok	ok
r		144,2	144,2	144,2	144,2
$ \bar{x}-\bar{y}_i < r$		ok	ok	ok	ok

* $\hat{\sigma}$ je interpolirana (glede na \bar{x}) med vrednostjo za $\hat{\sigma}=4,449$ (pri 194×1000 celic/ml iz MP oktober 2014) in vrednostjo za $\hat{\sigma}=32,626$ (pri 364×1000 celic/ml iz MP oktober 2014). Vrednosti za r so dobljene s preračunom iz podanih kriterijev za s_r ($r = 2,8s_r$) v standardu ISO 13366-2/IDF 148-2 (2006) glede na število somatskih celic.

Priloga G25: Homogenost za vzorec 1; 5. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$).

Homogeneity check (ISO 13528 Annex B)			Example data	
Sample t	value#1, $x_{t,1}$	value#2, $x_{t,2}$	sample average (B.4), \bar{x}_t	between-test-portion ranges (B.5), w_t
1	163	147	155	16
2	169	159	164	10
3	153	163	158	10
4	152	167	159,5	15
5	140	161	150,5	21
6	158	165	161,5	7
7	146	158	152	12
8	155	153	154	2
9	152	148	150	4
10	153	156	154,5	3
	number of samples g		10	
	general average (B.6)		155,9	
	STD of sample averages (B.7), s_x		4,712866549	
	within-samples STD (B.8), s_w		8,197560613	
	between-samples STD (B.9), s_S		0	
	Expected standard deviation for proficiency assessment			4,449
	Homogeneity	ok		

Priloga G26: Homogenost za vzorec 2; 5. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$).

Homogeneity check (ISO 13528 Annex B)			Example data	
Sample t	value#1, $x_{t,1}$	value#2, $x_{t,2}$	sample average (B.4), \bar{x}_t	between-test-portion ranges (B.5), w_t
1	277	268	272,5	9
2	289	287	288	2
3	286	291	288,5	5
4	281	280	280,5	1
5	277	284	280,5	7
6	294	281	287,5	13
7	287	288	287,5	1
8	293	282	287,5	11
9	283	291	287	8
10	279	290	284,5	11
	number of samples g		10	
	general average (B.6)		284,4	
	STD of sample averages (B.7), s_x		5,135930079	
	within-samples STD (B.8), s_w		5,639148872	
	between-samples STD (B.9), s_S		3,23693957	
	Expected standard deviation for proficiency assessment			*19,419
	Homogeneity	ok		

* $\hat{\sigma}$ je interpolirana (glede na \bar{x}) med vrednostjo za $\hat{\sigma}=4,449$ (pri 194×1000 celic/ml iz MP oktober 2014) in vrednostjo za $\hat{\sigma}=32,626$ (pri 364×1000 celic/ml iz MP oktober 2014).

Priloga G27: Homogenost za vzorec 3; 5. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$).

Homogeneity check (ISO 13528 Annex B)			Example data	
Sample t	value#1, $x_{t,1}$	value#2, $x_{t,2}$	sample average (B.4), \bar{x}_t	between-test-portion ranges (B.5), w_t
1	531	544	537,5	13
2	540	542	541	2
3	530	526	528	4
4	507	519	513	12
5	524	521	522,5	3
6	502	512	507	10
7	541	517	529	24
8	541	499	520	42
9	523	521	522	2
10	510	529	519,5	19
	number of samples g		10	
	general average (B.6)		523,95	
	STD of sample averages (B.7), s_x		10,35334085	
	within-samples STD (B.8), s_w		12,54392283	
	between-samples STD (B.9), s_S		5,340099874	
	Expected standard deviation for proficiency assessment			39,2995
	Homogeneity	ok		

Priloga G28: Homogenost za vzorec 4; 5. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$).

Homogeneity check (ISO 13528 Annex B)			Example data	
Sample t	value#1, $x_{t,1}$	value#2, $x_{t,2}$	sample average (B.4), \bar{x}_t	between-test-portion ranges (B.5), w_t
1	775	778	776,5	3
2	779	762	770,5	17
3	803	764	783,5	39
4	749	738	743,5	11
5	763	763	763	0
6	760	785	772,5	25
7	795	800	797,5	5
8	798	757	777,5	41
9	787	786	786,5	1
10	763	784	773,5	21
	number of samples g		10	
	general average (B.6)		774,45	
	STD of sample averages (B.7), s_x		14,45769691	
	within-samples STD (B.8), s_w		15,35089574	
	between-samples STD (B.9), s_S		9,549869109	
	Expected standard deviation for proficiency assessment			60,0615
	Homogeneity	ok		

Priloga G29: Homogenost za vzorec 5; 5. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$).

Homogeneity check (ISO 13528 Annex B)			Example data	
Sample t	value#1, $x_{t,1}$	value#2, $x_{t,2}$	sample average (B.4), \bar{x}_t	between-test-portion ranges (B.5), w_t
1	1006	1041	1023,5	35
2	1062	1053	1057,5	9
3	1047	1010	1028,5	37
4	1041	1043	1042	2
5	1057	1009	1033	48
6	1042	1056	1049	14
7	1084	1077	1080,5	7
8	1077	1068	1072,5	9
9	1051	1042	1046,5	9
10	1046	1033	1039,5	13
number of samples g			10	
general average (B.6)			1047,25	
STD of sample averages (B.7), s_x			18,43343882	
within-samples STD (B.8), s_w			16,67183253	
between-samples STD (B.9), s_s			14,17097974	
Expected standard deviation for proficiency assessment				96,395
Homogeneity		ok		

Priloga G30: Ugotavljanje stabilnosti vzorcev za 5. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$).

Dan (dan priprave vzorcev = 0; 03.03.2015)	1	2	3	6	7
Vzorec	\bar{x}	\bar{y}_2	\bar{y}_3	\bar{y}_6	\bar{y}_7
1	155,9	152,0	163,0	154,5	156,7
$ \bar{x}-\bar{y}_i $		3,9	7,1	1,4	0,8
$\hat{\sigma}$		4,449	4,449	4,449	4,449
$0,3 \times \hat{\sigma}$		1,3	1,3	1,3	1,3
$ \bar{x}-\bar{y}_i < 0,3 \times \hat{\sigma}$		FALSE	FALSE	FALSE	ok
r		26,2	26,2	26,2	26,2
$ \bar{x}-\bar{y}_i < r$		ok	ok	ok	ok
2	284,4	287,7	290,5	281,0	283,2
$ \bar{x}-\bar{y}_i $		3,3	6,1	3,4	1,2
$\hat{\sigma}$		19,419*	19,419*	19,419*	19,419*
$0,3 \times \hat{\sigma}$		5,8	5,8	5,8	5,8
$ \bar{x}-\bar{y}_i < 0,3 \times \hat{\sigma}$		ok	FALSE	ok	ok
r		39,8	39,8	39,8	39,8
$ \bar{x}-\bar{y}_i < r$		ok	ok	ok	ok
3	524,0	527,5	539,7	525,3	525,5
$ \bar{x}-\bar{y}_i $		3,5	15,7	1,3	1,5
$\hat{\sigma}$		39,2995	39,2995	39,2995	39,2995
$0,3 \times \hat{\sigma}$		11,8	11,8	11,8	11,8
$ \bar{x}-\bar{y}_i < 0,3 \times \hat{\sigma}$		ok	FALSE	ok	ok
r		58,7	58,7	58,7	58,7
$ \bar{x}-\bar{y}_i < r$		ok	ok	ok	ok
4	774,5	780,2	768,3	768,7	761,2
$ \bar{x}-\bar{y}_i $		5,7	6,2	5,8	13,3
$\hat{\sigma}$		60,0615	60,0615	60,0615	60,0615
$0,3 \times \hat{\sigma}$		18,0	18,0	18,0	18,0
$ \bar{x}-\bar{y}_i < 0,3 \times \hat{\sigma}$		ok	ok	ok	ok
r		65,1	65,1	65,1	65,1
$ \bar{x}-\bar{y}_i < r$		ok	ok	ok	ok
5	1047,3	1056,3	1049,5	1028,0	1025,8
$ \bar{x}-\bar{y}_i $		9,0	2,2	19,3	21,5
$\hat{\sigma}$		96,395	96,395	96,395	96,395
$0,3 \times \hat{\sigma}$		28,9	28,9	28,9	28,9
$ \bar{x}-\bar{y}_i < 0,3 \times \hat{\sigma}$		ok	ok	ok	ok
r		88,0	88,0	88,0	88,0
$ \bar{x}-\bar{y}_i < r$		ok	ok	ok	ok

* $\hat{\sigma}$ je interpolirana (glede na \bar{x}) med vrednostjo za $\hat{\sigma}=4,449$ (pri 194×1000 celic/ml iz MP oktober 2014) in vrednostjo za $\hat{\sigma}=32,626$ (pri 364×1000 celic/ml iz MP oktober 2014). Vrednosti za r so dobljene s preračunom iz podanih kriterijev za s_r ($r = 2,8s_r$) v standardu ISO 13366-2/IDF 148-2 (2006) glede na število somatskih celic.

Priloga G31: Homogenost za vzorec 1; 6. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$).

Homogeneity check (ISO 13528 Annex B)			Example data	
Sample t	value#1, $x_{t,1}$	value#2, $x_{t,2}$	sample average (B.4), \bar{x}_t	between-test-portion ranges (B.5), w_t
1	171	143	157	28
2	151	150	150,5	1
3	155	162	158,5	7
4	156	151	153,5	5
5	150	150	150	0
6	158	148	153	10
7	151	151	151	0
8	158	151	154,5	7
9	143	147	145	4
10	155	161	158	6
	number of samples g		10	
	general average (B.6)		153,1	
	STD of sample averages (B.7), s_x		4,175324339	
	within-samples STD (B.8), s_w		7,280109889	
	between-samples STD (B.9), s_S		0	
	Expected standard deviation for proficiency assessment			4,449
	Homogeneity	ok		

Priloga G32: Homogenost za vzorec 2; 6. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$).

Homogeneity check (ISO 13528 Annex B)			Example data	
Sample t	value#1, $x_{t,1}$	value#2, $x_{t,2}$	sample average (B.4), \bar{x}_t	between-test-portion ranges (B.5), w_t
1	304	289	296,5	15
2	291	276	283,5	15
3	294	291	292,5	3
4	309	290	299,5	19
5	288	295	291,5	7
6	299	294	296,5	5
7	311	278	294,5	33
8	307	311	309	4
9	293	291	292	2
10	296	299	297,5	3
	number of samples g		10	
	general average (B.6)		295,3	
	STD of sample averages (B.7), s_x		6,549809158	
	within-samples STD (B.8), s_w		10,02995513	
	between-samples STD (B.9), s_S		0	
	Expected standard deviation for proficiency assessment			*21,225
	Homogeneity	ok		

* $\hat{\sigma}$ je interpolirana (glede na \bar{x}) med vrednostjo za $\hat{\sigma}=4,449$ (pri 194×1000 celic/ml iz MP oktober 2014) in vrednostjo za $\hat{\sigma}=32,626$ (pri 364×1000 celic/ml iz MP oktober 2014).

Priloga G33: Homogenost za vzorec 3; 6. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$).

Homogeneity check (ISO 13528 Annex B)			Example data	
Sample t	value#1, $x_{t,1}$	value#2, $x_{t,2}$	sample average (B.4), \bar{x}_t	between-test-portion ranges (B.5), w_t
1	500	490	495	10
2	477	476	476,5	1
3	497	483	490	14
4	501	470	485,5	31
5	498	483	490,5	15
6	465	486	475,5	21
7	475	466	470,5	9
8	484	472	478	12
9	488	487	487,5	1
10	489	491	490	2
	number of samples g		10	
	general average (B.6)		483,9	
	STD of sample averages (B.7), s_x		8,140434059	
	within-samples STD (B.8), s_w		10,37786105	
	between-samples STD (B.9), s_S		3,523729085	
	Expected standard deviation for proficiency assessment			40,7825
	Homogeneity	ok		

Priloga G34: Homogenost za vzorec 4; 6. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$).

Homogeneity check (ISO 13528 Annex B)			Example data	
Sample t	value#1, $x_{t,1}$	value#2, $x_{t,2}$	sample average (B.4), \bar{x}_t	between-test-portion ranges (B.5), w_t
1	842	856	849	14
2	859	843	851	16
3	886	841	863,5	45
4	848	881	864,5	33
5	851	869	860	18
6	856	838	847	18
7	846	840	843	6
8	851	839	845	12
9	843	860	851,5	17
10	840	867	853,5	27
	number of samples g		10	
	general average (B.6)		852,8	
	STD of sample averages (B.7), s_x		7,554248253	
	within-samples STD (B.8), s_w		16,44992401	
	between-samples STD (B.9), s_S		0	
	Expected standard deviation for proficiency assessment			90,463
	Homogeneity	ok		

Priloga G35: Homogenost za vzorec 5; 6. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$).

Homogeneity check (ISO 13528 Annex B)			Example data	
Sample t	value#1, $x_{t,1}$	value#2, $x_{t,2}$	sample average (B.4), \bar{x}_t	between-test-portion ranges (B.5), w_t
1	1381	1353	1367	28
2	1363	1330	1346,5	33
3	1384	1332	1358	52
4	1358	1307	1332,5	51
5	1391	1371	1381	20
6	1306	1348	1327	42
7	1340	1302	1321	38
8	1362	1385	1373,5	23
9	1382	1371	1376,5	11
10	1365	1326	1345,5	39
	number of samples g		10	
	general average (B.6)		1352,85	
	STD of sample averages (B.7), s_x		21,59224398	
	within-samples STD (B.8), s_w		25,45289767	
	between-samples STD (B.9), s_s		11,92895637	
Expected standard deviation for proficiency assessment				131,2455
Homogeneity		ok		

Priloga G36: Ugotavljanje stabilnosti vzorcev za 6. ponovitev poskusa ($\check{S}SC \times 1000/ml$).

Dan (dan priprave vzorcev = 0; 31.03.2015)	1	2	3	7
Vzorec	\bar{x}	\bar{y}_2	\bar{y}_3	\bar{y}_7
1	153,1	152,2	150,5	146,5
$ \bar{x}-\bar{y}_i $		0,9	2,6	6,6
$\hat{\sigma}$		4,449	4,449	4,449
$0,3 \times \hat{\sigma}$		1,3	1,3	1,3
$ \bar{x}-\bar{y}_i < 0,3 \times \hat{\sigma}$		ok	FALSE	FALSE
r		25,7	25,7	25,7
$ \bar{x}-\bar{y}_i < r$		ok	ok	ok
2	295,3	292,3	292,8	288,0
$ \bar{x}-\bar{y}_i $		3,0	2,5	7,3
$\hat{\sigma}$		21,225*	21,225*	21,225*
$0,3 \times \hat{\sigma}$		6,4	6,4	6,4
$ \bar{x}-\bar{y}_i < 0,3 \times \hat{\sigma}$		ok	ok	FALSE
r		41,3	41,3	41,3
$ \bar{x}-\bar{y}_i < r$		ok	ok	ok
3	483,9	473,0	475,2	465,8
$ \bar{x}-\bar{y}_i $		10,9	8,7	18,1
$\hat{\sigma}$		40,7825	40,7825	40,7825
$0,3 \times \hat{\sigma}$		12,2	12,2	12,2
$ \bar{x}-\bar{y}_i < 0,3 \times \hat{\sigma}$		ok	ok	FALSE
r		54,2	54,2	54,2
$ \bar{x}-\bar{y}_i < r$		ok	ok	ok
4	852,8	843,0	843,2	828,0
$ \bar{x}-\bar{y}_i $		9,8	9,6	24,8
$\hat{\sigma}$		90,463	90,463	90,463
$0,3 \times \hat{\sigma}$		27,1	27,1	27,1
$ \bar{x}-\bar{y}_i < 0,3 \times \hat{\sigma}$		ok	ok	ok
r		71,6	71,6	71,6
$ \bar{x}-\bar{y}_i < r$		ok	ok	ok
5	1352,9	1284,0	1329,7	1277,8
$ \bar{x}-\bar{y}_i $		68,9	23,2	75,1
$\hat{\sigma}$		131,2455	131,2455	131,2455
$0,3 \times \hat{\sigma}$		39,4	39,4	39,4
$ \bar{x}-\bar{y}_i < 0,3 \times \hat{\sigma}$		FALSE	ok	FALSE
r		113,6	113,6	113,6
$ \bar{x}-\bar{y}_i < r$		ok	ok	ok

* $\hat{\sigma}$ je interpolirana (glede na \bar{x}) med vrednostjo za $\hat{\sigma}=4,449$ (pri 194×1000 celic/ml iz MP oktober 2014) in vrednostjo za $\hat{\sigma}=32,626$ (pri 364×1000 celic/ml iz MP oktober 2014). Vrednosti za r so dobljene s preračunom iz podanih kriterijev za s_r ($r = 2,8s_r$) v standardu ISO 13366-2/IDF 148-2 (2006) glede na število somatskih celic.

Priloga G37: Povzetek ugotavljanja stabilnosti vzorcev pri ponovitvah poskusa (dan priprave vzorcev $t = 0$) pri upoštevanju kriterija iz standarda ISO 13528 (2005).

Ponovitev poskusa	Vzorec	t (dan)			
		2	3	6	7
1	1	✘	✓	✓	✘
	2	✘	✘	✓	✓
	3	✓	✓	✓	✓
	4	✓	✓	✓	✓
	5	✓	✓	✓	✓
2	1	✓	✘	✓	✘
	2	✓	✓	✓	✓
	3	✓	✓	✓	✓
	4	✘	✓	✘	✘
	5	✓	✓	✓	✓
3	1	✓	✘	✘	✘
	2	✘	✘	✘	✘
	3	✓	✓	✓	✓
	4	✓	✓	✓	✓
	5	✓	✘	✓	✘
4	1	✘	✘	✘	✓
	2	✓	✓	✘	✓
	3	✓	✓	✓	✓
	4	✓	✓	✓	✓
	5	✓	✓	✓	✓
5	1	✘	✘	✘	✓
	2	✓	✘	✓	✓
	3	✓	✘	✓	✓
	4	✓	✓	✓	✓
	5	✓	✓	✓	✓
6	1	✓	✘	ni meritev	✘
	2	✓	✓		✘
	3	✓	✓		✘
	4	✓	✓		✓
	5	✘	✓		✘

Legenda: ✓ ustrežna stabilnost, ✘ neustrežna stabilnost

Priloga G38: Ugotavljanje homogenosti in stabilnosti zamrznjenjih (-20 °C) vzorcev (april 2015).

Dan (dan priprave vzorcev = 0; 14.04.2015)	2 16.4.2015	22 6.5.2015	31 15.5.2015	45 29.5.2015	
Vzorec	Test homogenosti	\bar{x}	\bar{y}_{22}	\bar{y}_{31}	\bar{y}_{45}
1	ok	153,1	155,2	156,8	163,0
$ \bar{x}-\bar{y}_i $			2,1	3,7	9,9
$0,3 \times \hat{\sigma}$		$(\hat{\sigma} = 8,898)$	2,7	2,7	2,7
$ \bar{x}-\bar{y}_i < 0,3 \times \hat{\sigma}$			ok	FALSE	FALSE
r			25,0	25,0	25,0
$ \bar{x}-\bar{y}_i < r$			ok	ok	ok
2	ok	465,1	479,5	468,2	474,7
$ \bar{x}-\bar{y}_i $			14,4	3,1	9,6
$0,3 \times \hat{\sigma}$		$(\hat{\sigma} = 16,313)$	4,9	4,9	4,9
$ \bar{x}-\bar{y}_i < 0,3 \times \hat{\sigma}$			FALSE	ok	FALSE
r			50,0	50,0	50,0
$ \bar{x}-\bar{y}_i < r$			ok	ok	ok

Vrednosti za $\hat{\sigma}$ so izračunane iz medlaboratorijske primerjave organizirane (IML-PRO) v aprilu 2015, vrednosti za r pa so povzete iz standarda ISO 13366-2/IDF 148-2 (2006) glede na raven števila somatskih celic.

Priloga H

Podatki za statistično analizo:

Povprečja za sisteme umerjanja A₁, A₂, B, C in D, izračunana iz vrnjenih podatkov S z upoštevanjem umeritvenih enačb, ter povprečja sistema T

Priloga H1: Povprečja za posamezen vzorec po laboratorijih za posamezne sisteme umerjanj A₁, A₂, B, C, D in T ter podatki S za 1. ponovitev poskusa.

Vzorec	Laboratorij	Sistem umerjanja	ŠSC (1000/ml)
1	1	A1	44,5
1	1	A2	47,1
1	1	B	41,8
1	1	C	45,2
1	1	D	31,8
1	1	T	35,2
1	1	S	34,4
1	2	A1	36,5
1	2	A2	38,5
1	2	B	33,9
1	2	C	37,5
1	2	D	43,7
1	2	T	39,3
1	2	S	39,3
1	3	A1	39,4
1	3	A2	41,5
1	3	B	36,8
1	3	C	40,5
1	3	D	37,4
1	3	T	35,9
1	3	S	35,9
1	4	A1	40,0
1	4	A2	42,3
1	4	B	37,4
1	4	C	40,8
1	4	D	28,7
1	4	T	29,7
1	4	S	33,5
1	5	A1	40,5
1	5	A2	43,1
1	5	B	37,6
1	5	C	40,9
1	5	D	37,8
1	5	T	37,4
1	5	S	37,4
1	6	A1	37,5
1	6	A2	40,1
1	6	B	34,7
1	6	C	37,5

Vzorec	Laboratorij	Sistem umerjanja	ŠSC (1000/ml)
1	6	D	37,7
1	6	T	36,7
1	6	S	36,7
2	1	A1	227,6
2	1	A2	234,4
2	1	B	223,4
2	1	C	228,1
2	1	D	217,6
2	1	T	254,0
2	1	S	235,6
2	2	A1	250,1
2	2	A2	257,1
2	2	B	245,8
2	2	C	250,7
2	2	D	255,5
2	2	T	229,7
2	2	S	229,7
2	3	A1	np
2	3	A2	np
2	3	B	np
2	3	C	np
2	3	D	np
2	3	T	np
2	3	S	np
2	4	A1	239,1
2	4	A2	245,9
2	4	B	234,9
2	4	C	239,6
2	4	D	230,4
2	4	T	238,0
2	4	S	268,5
2	5	A1	261,9
2	5	A2	269,5
2	5	B	257,3
2	5	C	262,2
2	5	D	259,9
2	5	T	257,4
2	5	S	257,4

se nadaljuje

nadaljevanje Priloge H1

Vzorec	Laboratorij	Sistem umerjanja	ŠSC (1000/ml)
2	6	A1	251,5
2	6	A2	258,8
2	6	B	247,0
2	6	C	251,5
2	6	D	251,6
2	6	T	244,8
2	6	S	244,8
3	1	A1	530,7
3	1	A2	544,3
3	1	B	524,1
3	1	C	530,8
3	1	D	525,2
3	1	T	611,4
3	1	S	568,7
3	2	A1	583,9
3	2	A2	598,7
3	2	B	576,9
3	2	C	584,0
3	2	D	586,5
3	2	T	527,2
3	2	S	527,2
3	3	A1	577,6
3	3	A2	592,2
3	3	B	570,6
3	3	C	577,7
3	3	D	576,8
3	3	T	554,3
3	3	S	554,3
3	4	A1	552,8
3	4	A2	566,9
3	4	B	546,1
3	4	C	553,0
3	4	D	548,3
3	4	T	566,3
3	4	S	639,0
3	5	A1	589,8
3	5	A2	604,8
3	5	B	582,7
3	5	C	589,9
3	5	D	588,9
3	5	T	583,2
3	5	S	583,2
3	6	A1	591,2
3	6	A2	606,3
3	6	B	584,2
3	6	C	591,2
3	6	D	591,3

Vzorec	Laboratorij	Sistem umerjanja	ŠSC (1000/ml)
3	6	T	575,3
3	6	S	575,3
4	1	A1	776,6
4	1	A2	795,8
4	1	B	768,0
4	1	C	776,4
4	1	D	774,7
4	1	T	903,0
4	1	S	838,9
4	2	A1	880,8
4	2	A2	902,5
4	2	B	871,4
4	2	C	880,4
4	2	D	880,9
4	2	T	791,8
4	2	S	791,8
4	3	A1	842,2
4	3	A2	863,0
4	3	B	833,1
4	3	C	841,9
4	3	D	842,1
4	3	T	809,2
4	3	S	809,2
4	4	A1	780,4
4	4	A2	799,7
4	4	B	771,9
4	4	C	780,2
4	4	D	778,9
4	4	T	804,4
4	4	S	907,7
4	5	A1	861,8
4	5	A2	882,9
4	5	B	852,7
4	5	C	861,7
4	5	D	861,7
4	5	T	853,4
4	5	S	853,4
4	6	A1	857,7
4	6	A2	878,7
4	6	B	848,6
4	6	C	857,7
4	6	D	857,7
4	6	T	834,5
4	6	S	834,5
5	1	A1	1208,0
5	1	A2	1237,1
5	1	B	1196,1

se nadaljuje

nadaljevanje Priloge H1

Vzorec	Laboratorij	Sistem umerjanja	ŠSC (1000/ml)
5	1	C	1207,4
5	1	D	1212,6
5	1	T	1399,9
5	1	S	1313,1
5	2	A1	1384,6
5	2	A2	1418,1
5	2	B	1371,2
5	2	C	1383,4
5	2	D	1380,5
5	2	T	1240,9
5	2	S	1240,9
5	3	A1	1348,0
5	3	A2	1380,7
5	3	B	1334,9
5	3	C	1346,9
5	3	D	1349,1
5	3	T	1296,5
5	3	S	1296,5
5	4	A1	1309,5

Vzorec	Laboratorij	Sistem umerjanja	ŠSC (1000/ml)
5	4	A2	1341,1
5	4	B	1296,8
5	4	C	1308,7
5	4	D	1315,0
5	4	T	1358,2
5	4	S	1532,5
5	5	A1	1353,1
5	5	A2	1385,2
5	5	B	1340,1
5	5	C	1352,7
5	5	D	1354,5
5	5	T	1341,5
5	5	S	1341,5
5	6	A1	1342,7
5	6	A2	1374,6
5	6	B	1329,8
5	6	C	1342,7
5	6	D	1342,5
5	6	T	1306,2
5	6	S	1306,2

Opomba: np - ni podatka; podatki S - meritve na inštrumentih z nastavitvami za naklon 1 in odsek na ordinati 0.

Priloga H2: Povprečja za posamezen vzorec po laboratorijih za posamezne sisteme umerjanj A₁, A₂, B, C, D in T ter podatki S za 2. ponovitev poskusa.

Vzorec	Laboratorij	Sistem umerjanja	ŠSC (1000/ml)
1	1	A1	154,1
1	1	A2	159,2
1	1	B	150,5
1	1	C	154,7
1	1	D	143,0
1	1	T	161,0
1	1	S	154,8
1	2	A1	183,5
1	2	A2	189,1
1	2	B	179,8
1	2	C	184,3
1	2	D	189,6
1	2	T	170,4
1	2	S	170,4
1	3	A1	162,7
1	3	A2	167,7
1	3	B	159,2
1	3	C	163,6
1	3	D	161,0
1	3	T	154,7
1	3	S	154,7
1	4	A1	159,0
1	4	A2	164,0
1	4	B	155,4
1	4	C	159,6
1	4	D	149,2
1	4	T	156,7
1	4	S	173,9
1	5	A1	169,1
1	5	A2	174,6
1	5	B	165,2
1	5	C	169,4
1	5	D	166,8
1	5	T	165,2
1	5	S	165,2
1	6	A1	173,9
1	6	A2	179,6
1	6	B	170,1
1	6	C	173,9
1	6	D	174,1
1	6	T	169,4
1	6	S	169,4
2	1	A1	360,9
2	1	A2	370,7
2	1	B	355,7

Vzorec	Laboratorij	Sistem umerjanja	ŠSC (1000/ml)
2	1	C	361,3
2	1	D	352,9
2	1	T	402,5
2	1	S	382,1
2	2	A1	431,1
2	2	A2	442,3
2	2	B	425,3
2	2	C	431,4
2	2	D	435,0
2	2	T	391,0
2	2	S	391,0
2	3	A1	397,3
2	3	A2	407,8
2	3	B	391,9
2	3	C	397,8
2	3	D	396,2
2	3	T	380,7
2	3	S	380,7
2	4	A1	389,3
2	4	A2	399,6
2	4	B	383,9
2	4	C	389,7
2	4	D	382,6
2	4	T	401,7
2	4	S	445,9
2	5	A1	427,5
2	5	A2	438,8
2	5	B	421,6
2	5	C	427,6
2	5	D	426,0
2	5	T	421,9
2	5	S	421,9
2	6	A1	402,8
2	6	A2	413,6
2	6	B	397,2
2	6	C	402,8
2	6	D	402,9
2	6	T	392,0
2	6	S	392,0
3	1	A1	619,6
3	1	A2	635,3
3	1	B	612,3
3	1	C	619,7
3	1	D	615,4

se nadaljuje

nadaljevanje Priloge H2

Vzorec	Laboratorij	Sistem umerjanja	ŠSC (1000/ml)
3	1	T	683,8
3	1	S	666,4
3	2	A1	733,9
3	2	A2	752,2
3	2	B	725,7
3	2	C	733,7
3	2	D	735,3
3	2	T	660,9
3	2	S	660,9
3	3	A1	676,4
3	3	A2	693,4
3	3	B	668,7
3	3	C	676,4
3	3	D	675,9
3	3	T	649,5
3	3	S	649,5
3	4	A1	666,2
3	4	A2	682,9
3	4	B	658,6
3	4	C	666,2
3	4	D	663,2
3	4	T	696,3
3	4	S	772,9
3	5	A1	696,3
3	5	A2	713,7
3	5	B	688,4
3	5	C	696,3
3	5	D	695,7
3	5	T	689,0
3	5	S	689,0
3	6	A1	693,3
3	6	A2	710,6
3	6	B	685,5
3	6	C	693,3
3	6	D	693,4
3	6	T	674,6
3	6	S	674,6
4	1	A1	246,5
4	1	A2	253,7
4	1	B	242,2
4	1	C	247,0
4	1	D	236,8
4	1	T	260,9
4	1	S	256,4
4	2	A1	284,7
4	2	A2	292,6
4	2	B	280,2

Vzorec	Laboratorij	Sistem umerjanja	ŠSC (1000/ml)
4	2	C	285,4
4	2	D	289,9
4	2	T	260,6
4	2	S	260,6
4	3	A1	264,0
4	3	A2	271,3
4	3	B	259,6
4	3	C	264,7
4	3	D	262,4
4	3	T	252,2
4	3	S	252,2
4	4	A1	259,5
4	4	A2	266,8
4	4	B	255,1
4	4	C	260,0
4	4	D	251,1
4	4	T	263,6
4	4	S	292,6
4	5	A1	281,2
4	5	A2	289,3
4	5	B	276,5
4	5	C	281,5
4	5	D	279,3
4	5	T	276,6
4	5	S	276,6
4	6	A1	270,4
4	6	A2	278,2
4	6	B	265,8
4	6	C	270,4
4	6	D	270,5
4	6	T	263,2
4	6	S	263,2
5	1	A1	874,2
5	1	A2	895,7
5	1	B	864,9
5	1	C	874,0
5	1	D	873,8
5	1	T	956,8
5	1	S	946,2
5	2	A1	1078,8
5	2	A2	1105,1
5	2	B	1067,8
5	2	C	1078,1
5	2	D	1077,2
5	2	T	968,3
5	2	S	968,3
5	3	A1	994,0

se nadaljuje

nadaljevanje Priloge H2

Vzorec	Laboratorij	Sistem umerjanja	ŠSC (1000/ml)
5	3	A2	1018,4
5	3	B	983,7
5	3	C	993,5
5	3	D	994,3
5	3	T	955,5
5	3	S	955,5
5	4	A1	934,5
5	4	A2	957,4
5	4	B	924,8
5	4	C	934,2
5	4	D	935,1
5	4	T	981,7
5	4	S	1089,7

Vzorec	Laboratorij	Sistem umerjanja	ŠSC (1000/ml)
5	5	A1	1015,5
5	5	A2	1040,1
5	5	B	1005,1
5	5	C	1015,3
5	5	D	1015,9
5	5	T	1006,1
5	5	S	1006,1
5	6	A1	1027,9
5	6	A2	1052,7
5	6	B	1017,4
5	6	C	1027,9
5	6	D	1027,8
5	6	T	1000,0
5	6	S	1000,0

Opomba: podatki S - meritve na inštrumentih z nastavitvami za naklon 1 in odsek na ordinati 0.

Priloga H3: Povprečja za posamezen vzorec po laboratorijih za posamezne sisteme umerjanj A₁, A₂, B, C, D in T ter podatki S za 3. ponovitev poskusa.

Vzorec	Laboratorij	Sistem umerjanja	ŠSC (1000/ml)
1*	1	A1	np
1*	1	A2	np
1*	1	B	np
1*	1	C	np
1*	1	D	np
1*	1	T	np
1*	1	S	np
1*	2	A1	np
1*	2	A2	np
1*	2	B	np
1*	2	C	np
1*	2	D	np
1*	2	T	np
1*	2	S	np
1*	3	A1	np
1*	3	A2	np
1*	3	B	np
1*	3	C	np
1*	3	D	np
1*	3	T	np
1*	3	S	np
1*	4	A1	np
1*	4	A2	np
1*	4	B	np
1*	4	C	np
1*	4	D	np
1*	4	T	np
1*	4	S	np
1*	5	A1	np
1*	5	A2	np
1*	5	B	np
1*	5	C	np
1*	5	D	np
1*	5	T	np
1*	5	S	np
1*	6	A1	np
1*	6	A2	np
1*	6	B	np
1*	6	C	np
1*	6	D	np
1*	6	T	np
1*	6	S	np
2	1	A1	206,2
2	1	A2	212,5
2	1	B	202,2

Vzorec	Laboratorij	Sistem umerjanja	ŠSC (1000/ml)
2	1	C	206,7
2	1	D	195,9
2	1	T	226,7
2	1	S	212,1
2	2	A1	238,2
2	2	A2	245,0
2	2	B	234,0
2	2	C	238,9
2	2	D	243,7
2	2	T	219,1
2	2	S	219,1
2	3	A1	211,8
2	3	A2	218,0
2	3	B	207,9
2	3	C	212,6
2	3	D	210,2
2	3	T	225,1
2	3	S	202,0
2	4	A1	220,8
2	4	A2	227,2
2	4	B	216,7
2	4	C	221,3
2	4	D	211,9
2	4	T	215,4
2	4	S	246,9
2	5	A1	243,4
2	5	A2	250,6
2	5	B	239,0
2	5	C	243,6
2	5	D	241,3
2	5	T	239,0
2	5	S	239,0
2	6	A1	239,2
2	6	A2	246,3
2	6	B	234,9
2	6	C	239,2
2	6	D	239,4
2	6	T	232,9
2	6	S	232,9
3	1	A1	589,2
3	1	A2	604,2
3	1	B	582,2
3	1	C	589,3
3	1	D	584,6

se nadaljuje

nadaljevanje Priloge H3

Vzorec	Laboratorij	Sistem umerjanja	ŠSC (1000/ml)
3	1	T	660,9
3	1	S	633,0
3	2	A1	682,2
3	2	A2	699,3
3	2	B	674,4
3	2	C	682,1
3	2	D	684,0
3	2	T	614,8
3	2	S	614,8
3	3	A1	623,5
3	3	A2	639,3
3	3	B	616,2
3	3	C	623,6
3	3	D	622,9
3	3	T	641,1
3	3	S	598,6
3	4	A1	631,9
3	4	A2	647,9
3	4	B	624,6
3	4	C	632,0
3	4	D	628,5
3	4	T	655,2
3	4	S	732,4
3	5	A1	676,3
3	5	A2	693,2
3	5	B	668,5
3	5	C	676,3
3	5	D	675,6
3	5	T	669,1
3	5	S	669,1
3	6	A1	659,8
3	6	A2	676,4
3	6	B	652,2
3	6	C	659,8
3	6	D	659,8
3	6	T	642,0
3	6	S	642,0
4	1	A1	974,3
4	1	A2	998,0
4	1	B	964,2
4	1	C	973,9
4	1	D	975,4
4	1	T	1061,7
4	1	S	1056,2
4	2	A1	1052,8
4	2	A2	1078,5
4	2	B	1042,0

Vzorec	Laboratorij	Sistem umerjanja	ŠSC (1000/ml)
4	2	C	1052,1
4	2	D	1051,4
4	2	T	945,1
4	2	S	945,1
4	3	A1	1012,1
4	3	A2	1036,9
4	3	B	1001,7
4	3	C	1011,5
4	3	D	1012,4
4	3	T	1035,7
4	3	S	972,9
4	4	A1	1145,3
4	4	A2	1173,1
4	4	B	1133,9
4	4	C	1144,7
4	4	D	1148,7
4	4	T	1167,1
4	4	S	1338,6
4	5	A1	1003,8
4	5	A2	1028,1
4	5	B	993,6
4	5	C	1003,6
4	5	D	1004,1
4	5	T	994,5
4	5	S	994,5
4	6	A1	1043,4
4	6	A2	1068,6
4	6	B	1032,9
4	6	C	1043,4
4	6	D	1043,3
4	6	T	1015,1
4	6	S	1015,1
5	1	A1	1332,6
5	1	A2	1364,5
5	1	B	1319,7
5	1	C	1331,9
5	1	D	1339,1
5	1	T	1503,8
5	1	S	1450,0
5	2	A1	1423,9
5	2	A2	1458,3
5	2	B	1410,1
5	2	C	1422,6
5	2	D	1419,4
5	2	T	1275,9
5	2	S	1275,9
5	3	A1	1393,4

se nadaljuje

nadaljevanje Priloge H3

Vzorec	Laboratorij	Sistem umerjanja	ŠSC (1000/ml)
5	3	A2	1427,1
5	3	B	1379,9
5	3	C	1392,1
5	3	D	1394,6
5	3	T	1435,5
5	3	S	1340,2
5	4	A1	1643,2
5	4	A2	1682,4
5	4	B	1627,8
5	4	C	1641,9
5	4	D	1653,1
5	4	T	1491,8
5	4	S	1926,5

Vzorec	Laboratorij	Sistem umerjanja	ŠSC (1000/ml)
5	5	A1	1337,5
5	5	A2	1369,3
5	5	B	1324,7
5	5	C	1337,1
5	5	D	1338,9
5	5	T	1326,0
5	5	S	1326,0
5	6	A1	1431,3
5	6	A2	1465,2
5	6	B	1417,8
5	6	C	1431,3
5	6	D	1431,1
5	6	T	1392,4
5	6	S	1392,4

Opomba: *vzorec 1 je bil zaradi nehomogenosti iz obdelave izločen; np - ni podatka; podatki S - meritve na inštrumentih z nastavitvami za naklon 1 in odsek na ordinati 0.

Priloga H4: Povprečja za posamezen vzorec po laboratorijih za posamezne sisteme umerjanj A₁, A₂, B, C, D in T ter podatki S za 4. ponovitev poskusa.

Vzorec	Laboratorij	Sistem umerjanja	ŠSC (1000/ml)
1	1	A1	123,4
1	1	A2	127,8
1	1	B	120,1
1	1	C	124,0
1	1	D	111,8
1	1	T	121,1
1	1	S	121,1
1	2	A1	132,5
1	2	A2	136,8
1	2	B	129,2
1	2	C	133,4
1	2	D	139,0
1	2	T	124,9
1	2	S	124,9
1	3	A1	139,5
1	3	A2	143,9
1	3	B	136,1
1	3	C	140,4
1	3	D	137,7
1	3	T	131,7
1	3	S	132,3
1	4	A1	125,4
1	4	A2	129,7
1	4	B	122,1
1	4	C	126,1
1	4	D	115,2
1	4	T	119,7
1	4	S	134,3
1	5	A1	134,3
1	5	A2	139,0
1	5	B	130,7
1	5	C	134,6
1	5	D	131,9
1	5	T	130,6
1	5	S	130,6
1	6	A1	132,4
1	6	A2	137,1
1	6	B	128,9
1	6	C	132,4
1	6	D	132,6
1	6	T	129,0
1	6	S	129,0
2*	1	A1	np
2*	1	A2	np
2*	1	B	np

Vzorec	Laboratorij	Sistem umerjanja	ŠSC (1000/ml)
2*	1	C	np
2*	1	D	np
2*	1	T	np
2*	1	S	np
2*	2	A1	np
2*	2	A2	np
2*	2	B	np
2*	2	C	np
2*	2	D	np
2*	2	T	np
2*	2	S	np
2*	3	A1	np
2*	3	A2	np
2*	3	B	np
2*	3	C	np
2*	3	D	np
2*	3	T	np
2*	3	S	np
2*	4	A1	np
2*	4	A2	np
2*	4	B	np
2*	4	C	np
2*	4	D	np
2*	4	T	np
2*	4	S	np
2*	5	A1	np
2*	5	A2	np
2*	5	B	np
2*	5	C	np
2*	5	D	np
2*	5	T	np
2*	5	S	np
2*	6	A1	np
2*	6	A2	np
2*	6	B	np
2*	6	C	np
2*	6	D	np
2*	6	T	np
2*	6	S	np
3	1	A1	434,2
3	1	A2	445,6
3	1	B	428,3
3	1	C	434,4
3	1	D	427,2

se nadaljuje

nadaljevanje Priloge H4

Vzorec	Laboratorij	Sistem umerjanja	ŠSC (1000/ml)
3	1	T	462,6
3	1	S	462,6
3	2	A1	468,9
3	2	A2	481,0
3	2	B	462,8
3	2	C	469,2
3	2	D	472,5
3	2	T	424,7
3	2	S	424,7
3	3	A1	451,6
3	3	A2	463,4
3	3	B	445,7
3	3	C	452,0
3	3	D	450,6
3	3	T	462,9
3	3	S	433,0
3	4	A1	472,5
3	4	A2	484,7
3	4	B	466,4
3	4	C	472,7
3	4	D	466,9
3	4	T	470,9
3	4	S	544,1
3	5	A1	482,4
3	5	A2	495,0
3	5	B	476,2
3	5	C	482,6
3	5	D	481,1
3	5	T	476,5
3	5	S	476,5
3	6	A1	471,8
3	6	A2	484,1
3	6	B	465,6
3	6	C	471,8
3	6	D	471,9
3	6	T	459,1
3	6	S	459,1
4	1	A1	723,8
4	1	A2	741,8
4	1	B	715,7
4	1	C	723,7
4	1	D	721,2
4	1	T	780,9
4	1	S	780,9
4	2	A1	792,7
4	2	A2	812,4
4	2	B	784,0

Vzorec	Laboratorij	Sistem umerjanja	ŠSC (1000/ml)
4	2	C	792,4
4	2	D	793,5
4	2	T	713,3
4	2	S	713,3
4	3	A1	749,1
4	3	A2	767,7
4	3	B	740,7
4	3	C	748,9
4	3	D	748,7
4	3	T	756,1
4	3	S	719,5
4	4	A1	800,5
4	4	A2	820,3
4	4	B	791,8
4	4	C	800,3
4	4	D	799,2
4	4	T	797,9
4	4	S	931,4
4	5	A1	788,5
4	5	A2	808,0
4	5	B	779,9
4	5	C	788,4
4	5	D	788,2
4	5	T	780,6
4	5	S	780,6
4	6	A1	791,8
4	6	A2	811,3
4	6	B	783,2
4	6	C	791,8
4	6	D	791,8
4	6	T	770,4
4	6	S	770,4
5	1	A1	1601,6
5	1	A2	1639,6
5	1	B	1586,5
5	1	C	1600,5
5	1	D	1612,1
5	1	T	1745,6
5	1	S	1745,6
5	2	A1	1776,1
5	2	A2	1818,7
5	2	B	1759,5
5	2	C	1774,2
5	2	D	1768,7
5	2	T	1589,8
5	2	S	1589,8
5	3	A1	1690,3

se nadaljuje

nadaljevanje Priloge H4

Vzorec	Laboratorij	Sistem umerjanja	ŠSC (1000/ml)
5	3	A2	1730,9
5	3	B	1674,4
5	3	C	1688,5
5	3	D	1692,2
5	3	T	1712,6
5	3	S	1626,2
5	4	A1	1756,7
5	4	A2	1798,5
5	4	B	1740,3
5	4	C	1755,3
5	4	D	1768,1
5	4	T	1771,5
5	4	S	2060,5

Vzorec	Laboratorij	Sistem umerjanja	ŠSC (1000/ml)
5	5	A1	1737,6
5	5	A2	1778,4
5	5	B	1721,7
5	5	C	1736,9
5	5	D	1740,2
5	5	T	1723,5
5	5	S	1723,5
5	6	A1	1777,2
5	6	A2	1818,8
5	6	B	1761,0
5	6	C	1777,2
5	6	D	1776,9
5	6	T	1728,8
5	6	S	1728,8

Opomba: *vzorec 2 je bil zaradi nehomogenosti iz obdelave izločen ; np - ni podatka; podatki S - meritve na inštrumentih z nastavitvami za naklon 1 in odsek na ordinati 0.

Priloga H5: Povprečja za posamezen vzorec po laboratorijih za posamezne sisteme umerjanj A₁, A₂, B, C, D in T ter podatki S za 5. ponovitev poskusa.

Vzorec	Laboratorij	Sistem umerjanja	ŠSC (1000/ml)
1	1	A1	157,0
1	1	A2	162,2
1	1	B	153,4
1	1	C	157,6
1	1	D	145,9
1	1	T	158,0
1	1	S	158,0
1	2	A1	163,3
1	2	A2	168,4
1	2	B	159,8
1	2	C	164,2
1	2	D	169,5
1	2	T	152,4
1	2	S	152,4
1	3	A1	168,3
1	3	A2	173,5
1	3	B	164,7
1	3	C	169,2
1	3	D	166,6
1	3	T	162,9
1	3	S	160,1
1	4	A1	158,8
1	4	A2	163,8
1	4	B	155,2
1	4	C	159,4
1	4	D	149,1
1	4	T	150,2
1	4	S	173,7
1	5	A1	163,6
1	5	A2	168,9
1	5	B	159,8
1	5	C	163,9
1	5	D	161,2
1	5	T	159,7
1	5	S	159,7
1	6	A1	158,7
1	6	A2	164,0
1	6	B	155,0
1	6	C	158,7
1	6	D	158,9
1	6	T	154,6
1	6	S	154,6
2	1	A1	278,4
2	1	A2	286,3
2	1	B	273,8

Vzorec	Laboratorij	Sistem umerjanja	ŠSC (1000/ml)
2	1	C	278,8
2	1	D	269,1
2	1	T	291,4
2	1	S	291,4
2	2	A1	304,7
2	2	A2	313,0
2	2	B	300,0
2	2	C	305,3
2	2	D	309,7
2	2	T	278,4
2	2	S	278,4
2	3	A1	299,9
2	3	A2	308,1
2	3	B	295,2
2	3	C	300,5
2	3	D	298,4
2	3	T	298,8
2	3	S	286,8
2	4	A1	286,7
2	4	A2	294,6
2	4	B	282,1
2	4	C	287,1
2	4	D	278,6
2	4	T	287,6
2	4	S	324,7
2	5	A1	301,4
2	5	A2	309,8
2	5	B	296,5
2	5	C	301,6
2	5	D	299,5
2	5	T	296,6
2	5	S	296,6
2	6	A1	292,1
2	6	A2	300,4
2	6	B	287,3
2	6	C	292,1
2	6	D	292,2
2	6	T	284,3
2	6	S	284,3
3	1	A1	502,7
3	1	A2	515,7
3	1	B	496,3
3	1	C	502,9
3	1	D	496,8

se nadaljuje

nadaljevanje Priloge H5

Vzorec	Laboratorij	Sistem umerjanja	ŠSC (1000/ml)
3	1	T	537,9
3	1	S	537,9
3	2	A1	535,9
3	2	A2	549,6
3	2	B	529,3
3	2	C	536,0
3	2	D	538,9
3	2	T	484,4
3	2	S	484,4
3	3	A1	549,8
3	3	A2	563,9
3	3	B	543,1
3	3	C	550,0
3	3	D	549,0
3	3	T	555,8
3	3	S	527,6
3	4	A1	538,6
3	4	A2	552,4
3	4	B	532,0
3	4	C	538,8
3	4	D	533,9
3	4	T	540,8
3	4	S	622,2
3	5	A1	534,0
3	5	A2	547,7
3	5	B	527,3
3	5	C	534,1
3	5	D	532,8
3	5	T	527,7
3	5	S	527,7
3	6	A1	553,7
3	6	A2	567,9
3	6	B	546,9
3	6	C	553,7
3	6	D	553,8
3	6	T	538,8
3	6	S	538,8
4	1	A1	737,1
4	1	A2	755,4
4	1	B	728,8
4	1	C	737,0
4	1	D	734,6
4	1	T	795,5
4	1	S	795,5
4	2	A1	845,0
4	2	A2	865,9
4	2	B	835,9

Vzorec	Laboratorij	Sistem umerjanja	ŠSC (1000/ml)
4	2	C	844,6
4	2	D	845,4
4	2	T	759,9
4	2	S	759,9
4	3	A1	790,5
4	3	A2	810,1
4	3	B	781,8
4	3	C	790,3
4	3	D	790,2
4	3	T	802,0
4	3	S	759,4
4	4	A1	790,7
4	4	A2	810,3
4	4	B	782,1
4	4	C	790,6
4	4	D	789,4
4	4	T	803,3
4	4	S	919,9
4	5	A1	819,1
4	5	A2	839,3
4	5	B	810,3
4	5	C	819,0
4	5	D	818,9
4	5	T	811,0
4	5	S	811,0
4	6	A1	798,2
4	6	A2	817,9
4	6	B	789,5
4	6	C	798,2
4	6	D	798,2
4	6	T	776,6
4	6	S	776,6
5	1	A1	968,8
5	1	A2	992,4
5	1	B	958,8
5	1	C	968,5
5	1	D	969,9
5	1	T	1050,2
5	1	S	1050,2
5	2	A1	1140,6
5	2	A2	1168,4
5	2	B	1129,1
5	2	C	1139,8
5	2	D	1138,5
5	2	T	1023,4
5	2	S	1023,4
5	3	A1	1041,2

se nadaljuje

nadaljevanje Priloge H5

Vzorec	Laboratorij	Sistem umerjanja	ŠSC (1000/ml)
5	3	A2	1066,7
5	3	B	1030,5
5	3	C	1040,5
5	3	D	1041,5
5	3	T	1035,4
5	3	S	1000,9
5	4	A1	1019,7
5	4	A2	1044,5
5	4	B	1009,2
5	4	C	1019,2
5	4	D	1021,3
5	4	T	1045,9
5	4	S	1190,2

Vzorec	Laboratorij	Sistem umerjanja	ŠSC (1000/ml)
5	5	A1	1103,3
5	5	A2	1129,8
5	5	B	1092,2
5	5	C	1103,0
5	5	D	1103,9
5	5	T	1093,3
5	5	S	1093,3
5	6	A1	1090,9
5	6	A2	1117,1
5	6	B	1080,0
5	6	C	1090,9
5	6	D	1090,8
5	6	T	1061,3
5	6	S	1061,3

Opomba: podatki S - meritve na inštrumentih z nastavitvami za naklon 1 in odsek na ordinati 0.

Priloga H6: Povprečja za posamezen vzorec po laboratorijih za posamezne sisteme umerjanj A₁, A₂, B, C, D in T ter podatki S za 6. ponovitev poskusa.

Vzorec	Laboratorij	Sistem umerjanja	ŠSC (1000/ml)
1	1	A1	155,0
1	1	A2	160,1
1	1	B	151,4
1	1	C	155,6
1	1	D	143,9
1	1	T	155,8
1	1	S	155,8
1	2	A1	155,3
1	2	A2	160,1
1	2	B	151,8
1	2	C	156,1
1	2	D	161,5
1	2	T	145,2
1	2	S	145,2
1	3	A1	163,9
1	3	A2	168,9
1	3	B	160,3
1	3	C	164,8
1	3	D	162,1
1	3	T	163,3
1	3	S	155,8
1	4	A1	152,0
1	4	A2	156,9
1	4	B	148,5
1	4	C	152,7
1	4	D	142,2
1	4	T	149,6
1	4	S	165,7
1	5	A1	165,5
1	5	A2	170,9
1	5	B	161,7
1	5	C	165,8
1	5	D	163,2
1	5	T	161,6
1	5	S	161,6
1	6	A1	156,9
1	6	A2	162,1
1	6	B	153,1
1	6	C	156,9
1	6	D	157,0
1	6	T	152,8
1	6	S	152,8
2	1	A1	293,1
2	1	A2	301,4
2	1	B	288,4

Vzorec	Laboratorij	Sistem umerjanja	ŠSC (1000/ml)
2	1	C	293,5
2	1	D	284,1
2	1	T	307,6
2	1	S	307,6
2	2	A1	305,6
2	2	A2	314,0
2	2	B	300,9
2	2	C	306,2
2	2	D	310,6
2	2	T	279,2
2	2	S	279,2
2	3	A1	311,0
2	3	A2	319,4
2	3	B	306,2
2	3	C	311,6
2	3	D	309,6
2	3	T	310,9
2	3	S	297,5
2	4	A1	291,5
2	4	A2	299,6
2	4	B	286,9
2	4	C	292,0
2	4	D	283,5
2	4	T	298,7
2	4	S	330,4
2	5	A1	305,3
2	5	A2	313,9
2	5	B	300,4
2	5	C	305,5
2	5	D	303,4
2	5	T	300,5
2	5	S	300,5
2	6	A1	305,1
2	6	A2	313,7
2	6	B	300,2
2	6	C	305,1
2	6	D	305,3
2	6	T	297,0
2	6	S	297,0
3	1	A1	485,9
3	1	A2	498,6
3	1	B	479,7
3	1	C	486,1
3	1	D	479,8

se nadaljuje

nadaljevanje Priloge H6

Vzorec	Laboratorij	Sistem umerjanja	ŠSC (1000/ml)
3	1	T	519,5
3	1	S	519,5
3	2	A1	482,6
3	2	A2	495,0
3	2	B	476,4
3	2	C	482,8
3	2	D	486,1
3	2	T	436,9
3	2	S	436,9
3	3	A1	464,1
3	3	A2	476,1
3	3	B	458,1
3	3	C	464,4
3	3	D	463,1
3	3	T	478,4
3	3	S	445,0
3	4	A1	504,5
3	4	A2	517,5
3	4	B	498,2
3	4	C	504,7
3	4	D	499,3
3	4	T	520,3
3	4	S	581,9
3	5	A1	470,0
3	5	A2	482,2
3	5	B	463,8
3	5	C	470,1
3	5	D	468,6
3	5	T	464,1
3	5	S	464,1
3	6	A1	500,8
3	6	A2	513,8
3	6	B	494,4
3	6	C	500,8
3	6	D	500,8
3	6	T	487,3
3	6	S	487,3
4	1	A1	803,6
4	1	A2	823,4
4	1	B	794,8
4	1	C	803,4
4	1	D	802,2
4	1	T	868,6
4	1	S	868,6
4	2	A1	908,9
4	2	A2	931,3
4	2	B	899,3

Vzorec	Laboratorij	Sistem umerjanja	ŠSC (1000/ml)
4	2	C	908,5
4	2	D	908,8
4	2	T	816,9
4	2	S	816,9
4	3	A1	866,9
4	3	A2	888,3
4	3	B	857,6
4	3	C	866,5
4	3	D	866,8
4	3	T	879,3
4	3	S	833,0
4	4	A1	857,8
4	4	A2	878,9
4	4	B	848,6
4	4	C	857,5
4	4	D	857,3
4	4	T	886,0
4	4	S	999,1
4	5	A1	860,5
4	5	A2	881,6
4	5	B	851,3
4	5	C	860,4
4	5	D	860,4
4	5	T	852,1
4	5	S	852,1
4	6	A1	869,2
4	6	A2	890,5
4	6	B	860,0
4	6	C	869,2
4	6	D	869,2
4	6	T	845,7
4	6	S	845,7
5	1	A1	1286,2
5	1	A2	1317,0
5	1	B	1273,6
5	1	C	1285,5
5	1	D	1292,0
5	1	T	1399,0
5	1	S	1399,0
5	2	A1	1322,2
5	2	A2	1354,1
5	2	B	1309,2
5	2	C	1321,0
5	2	D	1318,5
5	2	T	1185,2
5	2	S	1185,2
5	3	A1	1295,6

se nadaljuje

nadaljevanje Priloge H6

Vzorec	Laboratorij	Sistem umerjanja	ŠSC (1000/ml)
5	3	A2	1327,0
5	3	B	1282,9
5	3	C	1294,5
5	3	D	1296,6
5	3	T	1280,7
5	3	S	1246,0
5	4	A1	1332,9
5	4	A2	1365,0
5	4	B	1319,9
5	4	C	1332,0
5	4	D	1338,7
5	4	T	1404,3
5	4	S	1560,1

Vzorec	Laboratorij	Sistem umerjanja	ŠSC (1000/ml)
5	5	A1	1282,3
5	5	A2	1312,9
5	5	B	1269,9
5	5	C	1281,9
5	5	D	1283,5
5	5	T	1271,2
5	5	S	1271,2
5	6	A1	1345,5
5	6	A2	1377,4
5	6	B	1332,6
5	6	C	1345,5
5	6	D	1345,3
5	6	T	1308,9
5	6	S	1308,9

Opomba: podatki S - meritve na inštrumentih z nastavitvami za naklon 1 in odsek na ordinati 0.

Priloga I

Aplikacija sistemov umerjanja na primeru »Master instrument«-a

Priloga I1: Primerjava sistemov umerjanja za »Master instrument« in njihov vpliv na uspešnost v medlaboratorijski primerjavi »MIH Hübner Oktober 2014« (MIH, 2014).

Sistem umerjanja	Vzorec (ŠSC×1000/ml)			Vrednosti umeritvene enačbe	
	1	2	3	naklon	odklon
A ₁	149	383	622	1,0281	-0,2204
A ₂	154	394	637	1,0512	1,504
B	145	378	614	1,0202	-2,7521
D	149	383	622	1,0278	0
T	145	373	605	1	0
REF	140	376	600	/	/
	Odstotek od REF (%)			Povprečje (%)	
A ₁	106	102	104	104	
A ₂	110	105	106	107	
B	104	100	102	102	
D	106	102	104	104	
T	104	99	101	101	

REF = referenčna vrednost iz MP, Razlika = vrednost ŠSC – REF, % = vrednost ŠSC/REF × 100

Priloga I2: Primerjava sistemov umerjanja za »Master instrument« in njihov vpliv na uspešnost v medlaboratorijski primerjavi »MIH Hübner Marec 2015« (MIH, 2015).

Sistem umerjanja	Vzorec (ŠSC×1000/ml)			Vrednosti umeritvene enačbe	
	1	2	3	naklon	odklon
A ₁	110	285	613	1,0281	-0,2204
A ₂	114	293	628	1,0512	1,504
B	106	280	605	1,0202	-2,7521
D	110	285	613	1,0278	0
T	107	277	596	1	0
REF	106	279	582	/	/
	Odstotek od REF (%)			Povprečje (%)	
A ₁	104	102	105	104	
A ₂	108	105	108	107	
B	100	100	104	102	
D	104	102	105	104	
T	101	99	102	101	

REF = referenčna vrednost iz MP, Razlika = vrednost ŠSC – REF, % = vrednost ŠSC/REF × 100