

Skraćena validacija automatske metode za sedimentaciju eritrocita

Drežnjak, Ana

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split / Sveučilište u Splitu**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:176:547298>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-03**

Repository / Repozitorij:



[Repository of the University Department for Health Studies, University of Split](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA
MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Ana Drežnjak

**SKRAĆENA VALIDACIJA AUTOMATSKE METODE
ZA SEDIMENTACIJU ERITROCITA**

Završni rad

Split, 2023

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PRIJEDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Ana Drežnjak

**Skraćena validacija automatske metode za sedimentaciju
eritrocita**

**Abbreviated validation of an automated method for
erythrocyte sedimentation**

Završni rad/Bachelor's Thesis

Mentor:

Doc. dr. sc. Daniela Šupe Domić

Split, 2023

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Sveučilišni odjel zdravstvenih studija
Medicinsko laboratorijska dijagnostika

Znanstveno područje: Biomedicina i zdravstvo
Znanstveno polje: Kliničke medicinske znanosti

Mentor: doc.dr.sc. Daniela Šupe Domić

SKRAĆENA VALIDACIJA AUTOMATSKE METODE ZA SEDIMENTACIJU ERITROCITA

Ana Drežnjak

Sažetak: Cilj ovog rada je usporediti dvije metode za test brzine sedimentacije eritrocita. Test brzine sedimentacije eritrocita važan je u kliničkoj praksi, a koristi se kod sumnje na upalnu reakciju. Uspoređivana je automatizirana metoda na iSED uređaju sa Westergren metodom, a prihvatljivost metode određena je statističkom analizom. Westergren metoda referentna je metoda za test brzine sedimentacije eritrocita, a metoda se izvodi tako da se na epruvetu s antikoagulansom natrijevim citratom (1:5) stavi Westergrenova cjevčica te nakon jedan sat očitaju rezultati. Uređaj iSED automatizirana je metoda za koju se koristi uzorak pune krvi u epruvetu sa K3EDTA antikoagulansom. Metoda je brza i jednostavna. U ovom radu ispitano je 119 uzoraka krvi koristeći obje metode. Kompatibilnost metoda uspoređena je statističkom analizom koristeći Bland Altman dijagram, Passing Bablok regresijska analiza te Spearmanov koeficijent korelacije. Metode su pokazale dobru koleraciju, no uočena je sistematska pogreška, nelinearnost i odstupanja, stoga je zaključeno da automazirana metoda na uređaju iSED ne može zamijeniti referentnu Westergren metodu.

Ključne riječi: brzina sedimentacije eritrocita, Westergren metoda, iSED analizator

Rad sadrži: 31 stranica, 8 slika, 4 tablice, 21 literaturnu referencu

Jezik izvornika: hrvatski

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR'S THEISIS

University of Split
University Department for Health Studies

Scientific area: Biomedicine and health
Scientific field: Clinical medical sciences

Supervisor: dr.sc. Daniela Šupe Domić

Abbreviated validation of an automated method for erythrocyte sedimentation

Ana Drežnjak

Summary: The aim of this research is to compare two methods for erythrocyte sedimentation rate. The erythrocyte sedimentation rate is a test important in clinical practice and is used for monitoring the inflammatory state of the patient. The automated method on iSED analyzer was compared to the referenced Westergren method and the acceptability of the method was determined by statistical analysis. The Westergren method is a referenced method for erythrocyte sedimentation rate. This method is performed using a Westergren pipette that is inserted in the test tube with anticoagulant sodium citrate (1:5) and after one hour the results are ready to be read. Analyzator iSED is an automated method that uses a whole blood sample in the tube with K3EDTA anticoagulant. It is a fast and simple method. In this research, 119 patient's blood samples, that were non clotted and non lipemic, were analyzed by both methods. Compatibility of methods was compared by statistical analysis using Bland Altman plot, Passing Bablok regression analysis and Spearman's coefficient of colleration. The two compared methods showed a good correlation however, systematic error, nonlinearity and deviations were observed, therefore it is concluded that the automated method on iSED analyzer can not replace the reference Westergren method.

Ključne riječi: erythrocyte sedimentation rate, Westergren method, iSED analyzer

Thesis contains: 31 pages, 8 pictures, 4 tables, 21 literature references

Original in: Croatian

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1.	VALIDACIJA KLINIČKE METODE	1
1.2.	KRV I OSNOVNE KOMPONENTE KRVI	1
1.3.	SEDIMENTACIJA ERITROCITA	3
1.3.1.	Određivanje brzine sedimentacije eritrocita.....	6
1.3.1.1	<i>Westergren metoda</i>	6
1.3.1.2	<i>Modificirana Westergren metoda</i>	6
1.3.1.3	<i>Automatizirane metode</i>	7
2.	HIPOTEZA	8
3.	CILJ RADA	9
4.	MATERIJALI I METODE	10
4.1.	MATERIJALI.....	10
4.2.	METODE.....	10
4.2.1.	Westergren metoda.....	10
4.2.2.	iSED analizator	12
4.2.3.	Statistička obrada podataka.....	13
5.	REZULTATI.....	14
5.1.	Prikaz rezultata analize brzine sedimentacije eritrocita dobiveni Westergren metodom i automatiziranom metodom na uređaju iSED	14
5.2.	Usporedba razlika dobivenih rezultata analize brzine sedimentacije eritrocita dobiveni Westergren metodom i automatiziranom metodom na uređaju iSED – Bland Altmanov dijagram.....	17
5.3.	Rezultati usporedbe standardne Westergren metode i metode na automatskom uređaju iSED Alcor Scientific pomoću Passing Bablok regresijske analize i koeficijenta korelacije metoda	18
6.	RASPRAVA	21

7.	ZAKLJUČAK	22
8.	LITERATURA	23
9.	ŽIVOTOPIS	25

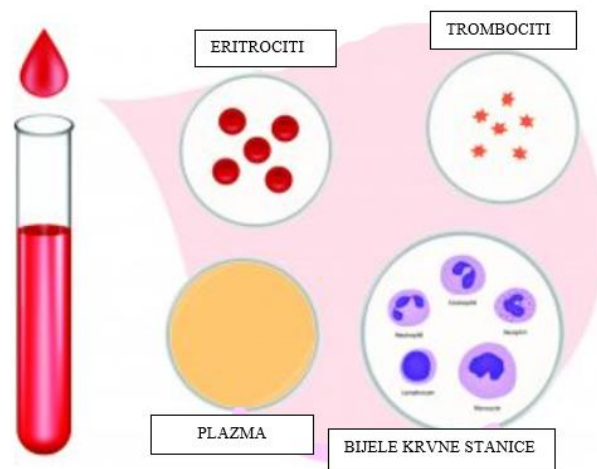
1. UVOD

1.1. VALIDACIJA KLINIČKE METODE

Validacija kliničke metode nužna je pri uvođenju novih analitičkih metoda. Proces validacije kliničke metode ima nekoliko kvalifikacijskih faza: protokol kvalifikacije performansi (PQ), kvalifikacije rada (OQ) i kvalifikacije instalacije (IQ). (1) Validaciju je bitno dobro isplanirati jer je to eksperiment i postupak koji troši i novac i vrijeme. Zbog toga su u planiranju validacije ključna dva koraka: prepoznati bitne radne značajke metode te postavljanje kriterija za određene značajke. Radne značajke metode su linearnost, analitička točnost i preciznost, granica kvantifikacije, granica detekcije, selektivnost te robusnost metode. U procesu validacije potrebno je ispitati samo one radne značajke koje su bitne za određenu metodu. (2) Stoga možemo reći da se validacija metode zasniva na testiranju svih značajki koji su temelj analitičke metode. Istovremeno se provodi dokumentiranje karakteristika izvedbe metode, kako bi se utvrdilo je li metoda prikladna za određenu analitičku svrhu. (3)

1.2. KRV I OSNOVNE KOMPONENTE KRVI

Krv je specijalizirana tjelesna tekućina koja čini od 7% do 8% ukupne tjelesne težine. Zbog funkcija kao što su transport kisika i hranjivih tvari do pluća i tkiva, stvaranja krvnih ugrušaka, reguliranja tjelesne temperature, krv se stoljećima smatrala esencijom života. Četiri su glavne komponente krvi, a to su: plazma, trombociti, bijele krvne stanice i crvene krvne stanice. (Slika 1) (4) (5)



Slika 1. Glavne komponente krvi

Plazma je svijetlo žuta tekuća komponenta krvi koja čini oko 55% pune krvi. Dobiva se tako što se venska krv uzorkuje u spremnik s antikoagulansom kalij-etilendiamintetraoctenom kiselinom (K3EDTA), heparinom ili citratom te se centrifugira kako bi se plazma odvojila od sedimentiranih stanica. (6) Glavna uloga plazme je prijenos proteina, hormona i hranjivih tvari te uklanjanje otpadnih tvari iz organizma. Proteini, albumin i fibrinogen i faktori zgrušavanja važne su komponente plazme koje se mogu koristiti u liječenju rijetkih kroničnih stanja kao što su hemofilija, u teškim krvarenjima i diseminiranoj intravaskularnoj koagulaciji, a nalaze se u svježoj smrznutoj plazmi koja se izdvoji prilikom darivanja krvi. (7)

Trombociti su mali fragmenti stanica megakariocita sa glavnom ulogom u zgrušavanju krvi. Za razliku od leukocita i eritrocita, trombociti su nalik disku i imaju otvore na membrani zbog kojih trombociti podsjećaju na izgled spužve. Struktura trombocita podijeljena je na četiri zone, a to su periferna zona, zona organela, strukturna zona te zona membranskog sustava. Najvažnija uloga trombocita je zaustavljanje krvarenja primarnom i sekundarnom hemostazom. To postižu adhezijom na mjesto

ozljede krvne žile te sprječavanjem otjecanja krvi formiranjem krajnjeg produkta procesa zgrušavanja krvi. Kvalitativni i kvantitativni poremećaji u broju trombocita mogu uzrokovati po život opasna stanja.

Bijele krvne stanice ili leukociti su stanice s jezgrom koje nastaju u koštanoj srži i limfnim čvorovima te štite naš organizam od stranih antigena i patogena. Protiv infekcija se bore fagocitozom te razvojem adaptivnog imunološkog odgovora. Životni vijek leukocita je od tri do pet dana. U bijele krvne stanice ubrajamo neutrofilne, bazofilne, eozinofilne granulocite, limfocite i monocite, a međusobno se razlikuju po morfološkim osobinama. Glavna uloga neutrofila je obrana od bakterijskih i gljivičnih infekcija. Eozinofilni granulociti sudjeluju u obrani od parazitarnih infekcija te zajedno s bazofilnim granulocitima djeluju u alergijskim reakcijama. Monociti imaju sposobnost fagocitoze, a iz njih nastaju i makrofagi. Zajedno uklanjaju mikroorganizme iz našeg organizma procesom fagocitoze. Limfociti se dijele na limfocite T i limfocite B. U borbi protiv patogena imaju sposobnost pamćenja antigena stoga u ponovnom dodiru sa određenim antigenom omogućuju da se reakcija obrane organizma odvija puno brže. (4)

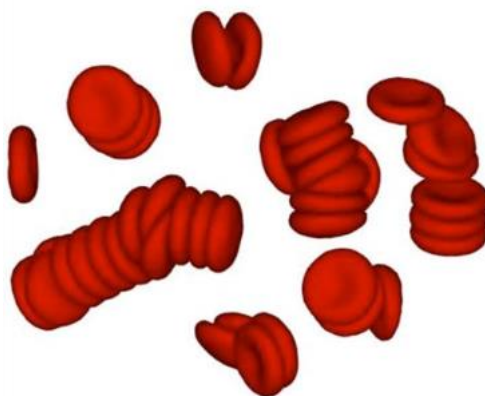
Crvene krvne stanice ili eritrociti prve su krvne stanice prepoznate nakon otkrića mikroskopa. Proizvode se u koštanoj srži eritropoezom, a životni vijek zrelih eritrocita je oko 120 dana. S obzirom da zreli eritrociti nemaju jezgru, stanične organele i enzime, oštećenje membrane eritrocita je nepopravljivo. Citoplazma eritrocita bogata je unutarstaničnim acidofilnim proteinom, hemoglobinom, bez kojega eritrociti ne bi mogli obavljati svoju ulogu, a to je prijenos kisika iz pluća u tkiva. U prijenosu kisika eritrocitima, važni su proteini njihove stanične membrane: integralni proteini koji vežu hemoglobin i periferni membranski proteini koji tvore citoskeletnu mrežu i omogućavaju prolaz eritrocita kroz kapilare, bez narušavanja njihove funkcije i oblika. (4) (8)

1.3. SEDIMENTACIJA ERITROCITA

Sedimentacija eritrocita podrazumijeva odvajanje staničnog od plazmatskog dijela krvi pod utjecajem gravitacije. Procjena brzine sedimentacije eritrocita ima kliničku i

patofiziološku vrijednost, a promjene ukazuju na promijenjenu ravnotežu elektrostatskih, gravitacijskih i viskoznih sila krvnih sastojaka, a mjeri se u jedinici mm/3.6ks.

Sedimentacija započinje suspenzijom krvnih stanica u razrijeđenoj plazmi. U toj suspenziji stanice, eritrociti, nasumično su raspoređeni, a nakon kratkog vremena one se prestrojavaju, a potom i agregiraju u stupčaste nakupine eritrocita, tzv. *rouleaux* formacija (slika 2). Agregiranjem eritrocita povećavaju se njihov volumen i gustoća što ubrzava sedimentaciju eritrocita i dovodi do taloženja eritrocita na dno epruvete. Važno je naglasiti da nakupine eritrocita treba razlikovati od aglutinata, koji nastaju reakcijom antigen-antitijelo. (9)



Slika 2. Agregacija eritrocita – *rouleaux* formacija

Test brzine sedimentacije eritrocita je jeftina, jednostavna i široko primjenjiva metoda osjetljiva na male promjene plazminog i staničnog dijela krvi. Nakon otkrića ovaj test se koristio kao test za dokazivanje trudnoće jer je uočeno da je u trudnoći brzina sedimentacije eritrocita povišena zbog povišene razine cirkulirajućeg fibrinogena. Test danas se koristi kao jedan od pokazatelja upalnog odgovora. Sedimentacija eritrocita započinje agregacijom eritrocita stvaranjem *Rouleaux* formacija. Eritrociti su zbog sijalinske kiseline na membrani negativno nabijeni i međusobno se odbijaju. S druge strane, međusobno se privlače zbog van der Waalsovih sila koje spadaju u elektrodinamičke sile. Ravnoteža između tih dviju sila je temelj homeostatskog stanja

krvi. U agregaciji eritrocita važnu ulogu ima veličina molekula prisutnih u krvi. Glavni čimbenik je koncentracija proteina fibrinogena u krvi koji neutralizira negativni naboj eritrocita. Uz fibrinogen značajni su imunoglobulini i albumin. (10) (11) Brzina sedimentacije eritrocita je nespecifičan upalni parametar povišen kod raznih akutnih bakterijskih i virusnih infekcija, kroničnih infekcija, malignih bolesti i anemije. Snižene razine sedimentacije eritrocita ukazuju na prirodne srčane anomalije, policitemiju rubra vera te određene vrste anemija (srpasta anemija i hipokromna mikrocitna anemija). (9) Vrijednosti brzine sedimentacije eritrocita ovise o brojnim čimbenicima (broj, oblik i veličina eritrocita, koncentracija proteina plazme). Vrijednosti sedimentacije razlikuju se po dobi i spolu (tablica 1). Način života, pušenje, konzumacija alkohola i tjelesna aktivnost također mogu utjecati na brzinu sedimentacije eritrocita. (10,11)

Tablica 1. Referentne vrijednosti sedimentacije eritrocita ovisno o dobi i spolu

DOB (godine)	Referentni intervali (mm/3.6ks)
Muškarci	
0-7	0-20
8-14	2-21
15-19	2-12
20-50	2-13
50+	3-23
Žene	
8-19	2-20
20-50	4-24
50+	5-28

1.3.1. Određivanje brzine sedimentacije eritrocita

Za određivanje brzine sedimentacije eritrocita postoje tri metode koje se danas koriste, a to su referentna Westergren metoda, modificirana Westergren metoda, te automatizirane metode.

1.3.1.1 Westergren metoda

Prema Međunarodnom vijeću za standardizaciju u hematologiji (ICSH) i Institutu za kliničke i laboratorijske standarde (CLSI) metoda po Westergrenu je referentna metoda (zlatni standard) za određivanje brzine sedimentacije eritrocita. (12). Na rezultate Westergren metode mogu utjecati i patofiziološka stanja bolesnika i tehnički čimbenici. Uzroci lažno povišene vrijednost brzine sedimentacije eritrocita korištenjem ove metode mogu biti: (13)

- Očitavanje rezultata prije ili nakon jednog sata
- Nepravilan omjer uzorka i antikoagulansa
- Cijevčica nije u postavljena u potpunosti okomito
- Prisutnost ugrušaka u uzorku

Lažno snižene vrijednosti javljaju se zbog:

- Nepravilnog miješanja krvi
- Nepravilnog omjera uzorka krvi i antikoagulansa
- Mjehurića zraka u Westergrenovoj cijevi
- Niske sobne temperature

1.3.1.2. Modificirana Westergren metoda

Modificirane Westergren metode temelje se na Westergrenovoj metodi, ali sa nekim izmjenama. Najčešće izmjene su skraćivanje vremena ispitivanja, korištenje standardnih epruveta sa antikoagulansom kalij etilendiamintetraoctena kiselina K3EDTA i Westergrenovih cijevčica različitih duljina napravljenih od plastike umjesto stakla. Iako je dokazano da modificirane Westergren metode imaju dobru korelaciju sa referentnom Westergren metodom, poznato je da imaju različite osjetljivosti za razna patofiziološka stanja. (14)

1.3.1.3. Automatizirane metode

Brže i jednostavnije automatizirane metode za određivanje brzine sedimentacije eritrocita imaju brojne prednosti kao što su mogućnost korištenja epruveta sa K3EDTA antikoagulansom, smanjenje vjerojatnosti ljudske pogreške, povećana ekonomska učinkovitost i povezivanje uređaja sa laboratorijskim sustavom. Negativna strana automatizirane metode je ta što uređaji nisu dovoljno ispitani da bi se znalo kako određena stanja djeluju na sami rezultat npr. kod hladne aglutinacije uređaj ne može izmjeriti brzinu sedimentacije eritrocita. Opaženo je da pacijenti koji imaju nisku razinu fibrinogena mogu imati sniženu brzinu sedimentacije eritrocita, a pacijenti sa nemjerljivom razinom fibrinogena mogu imati brzinu sedimentacije eritrocita jednakoj nuli. Hemoliza, lipemija i anemija također mogu utjecati na brzinu sedimentacije eritrocita, a s obzirom da automatizirani uređaji nisu dovoljno ispitani, nije poznato kako navedena stanja utječu na sami rezultat analize. Pored svega navedenog moguće su i mehaničke pogreške uređaja. (14)

Potpuno automatizirani uređaj, iSED (Alcor Scientific Inc, Rhode Island, SAD), koristi novu tehnologiju za brže rezultate testa brzine sedimentacije. Procjenjuje agregaciju eritrocita u fazi formiranja *rouleaux* formacije, koja je proporcionalna brzini sedimentacije eritrocita. Analizator iSED radi na principu reologije i fotometrije. (15) Reologija proučava svojstvo tvari koje je izloženo primjeni mehaničke sile, a fotometrija mjeri svojstva svjetlosti. (16) (17)

2. HIPOTEZA

Automatizirana metoda brzine sedimentacije eritrocita na uređaju iSED klinički i dijagnostički je korisna zbog jednostavnosti i brzine dobivanja rezultata, a mogla bi zamijeniti modificiranu Westergren metodu.

3. CILJ RADA

Ciljevi ovog rada su:

1. Upoznati se sa pojmovima validacija metode i sedimentacija eritrocita
2. Usporediti metode za sedimentaciju eritrocita; zlatni standard, Westergren metodu i automatiziranu metodu na uređaju iSED
3. Na osnovu rezultata utvrditi usporedivost metoda statističkom analizom

4. MATERIJALI I METODE

4.1. MATERIJALI

U ovom istraživanju nasumično je analizirano 119 uzoraka pacijenata različite dobi na Zavodu za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Split. Uzorkovalo se 4 ml venske krvi u epruvetu sa antikoagulansom K3 etilendiamintetraoctena kiselina K3EDTA (ljubičasti čep) te u epruvetu za sedimentaciju sa antikoagulansom natrijevim citratom (crni čep) proizvođača Becton Dickinson. Nakon uzorkovanja epruvete su homogenizirane laganim miješanjem. Također je provjereno da je isključena prisutnost ugruška u uzorku. U rad su uzeti isključivo uzorci uzorkovani do oznake na epruveti te oni koji nisu imali ugrušak. Analiza se morala obraditi unutar 2 sata od venepunkcije. Uzorci venske krvi su analizirani dvjema analitičkim metodama: Westergren metodom i automatskim analizatorom iSED Alcor Scientific.

Statistička analiza izvršena je pomoću statističkog softvera „MedCalc“ (ver. 22.001).

4.2. METODE

4.2.1. Westergen metoda

Westergren metodom mjeri se brzina pada eritrocita na dno Westergrenove epruvete, odnosno brzina sedimentacije. Analiza započinje uzorkovanjem venske krvi u epruvetu koja sadrži antikoagulans natrijev citrat, a može se koristiti i epruveta sa K3EDTA antikoagulansom (slika 3). Uzorak iz epruvete za sedimentaciju koristi se samo za test sedimentacije eritrocita zbog velikog volumena koji je potreban za ovu metodu i ne kombinira se sa drugim testovima. U uzorak krvi nakon miješanja, okomito se postavi Westergren-Katzova cjevčica u kojoj se krv podiže kapilarnim silama. Uzorci se postavljaju na stalak i nakon 60 minuta vizualno se očitava vrijednost do koje su eritrociti sedimentirali, odnosno očitava se stupac plazme iznad istaloženih eritrocita.



Slika 3. Epruveta sa K3EDTA antikoagulansom (lijevo) i epruveta sa natrijevim citratom (desno)

Westergrenova cjevčica (slika 4) napravljena je od stakla i graduirana je u milimetrima od 0 do 200 u smjeru odozgo prema dolje. Mjerimo visinu stupca plazme nakon 60 minuta, a rezultati se prikazuju u mjernoj jedinici milimetrima na 3.6ks (mm/3.6ks). Cjevčicu je zajedno s epruvetom potrebno staviti na stalak na ravnu površinu i izbjegavati vibracije koje mogu uzrokovati pogrešne rezultate (promjena kuta cjevčice za 3 stupnja uzrokuje lažno povećanu vrijednost brzine sedimentacije eritrocita). Prilikom izvođenja metode potrebno je obratiti pažnju na temperaturu prostorije koja bi trebala biti oko 25°C i ne bi trebala biti niža od 20°C. (12) (13)



Slika 4. Westergrenova cijev na stalku

4.2.2. iSED analizator

Za ovu metodu potreban je uzorak venske krvi u epruveti sa EDTA antikoagulansom. Uzorak krvi ne bi smio biti lipemičan ili hemolitičan zbog interferencija. Za razliku od Westergren metode, za analizator iSED (slika 5) potrebno je samo 100 mikrolitara uzorka, koji se izravno iz epruvete aspirira u mikroprotočnu ćeliju. S obzirom da uređaj iSED ima vlastiti čitač crtičnih kodova, uzorak sa naljepljenim crtičnim kodom potrebno je okrenuti prema čitaču. Uzorak se može označiti i ručno, pomoću tipkovnice. Uređaj koristi komercijalnu kontrolu Seditrol koja je stabilna do 60 dana ako se skladišti po preporuci proizvođača. Uzorci krvi bolesnika se kontinuirano stavljaju na unutarnji rotor automatskog analizatora. Nakon aspiracije uzorka optički detektor mjeri agregaciju eritrocita, a rezultati budu gotovi za 20 sekundi i prikazani su u mjernoj jedinici milimetar po satu (mm/h) s rasponom mjerenja od 1 do 130 mm/h. Odmah nakon završetka analize rezultate možemo vidjeti na ekranu ili papiru kojeg ispisuje sam uređaj. Automatski analizator izbaci analizirane uzorke te se na taj način oslobodi mjesto za analizu novih uzoraka. Na analizatoru se svakodnevno provodila

kontrola kvalitete u obje razine (Razina 1 i Razina 2) i preporučeni postupci redovitog dnevnog i periodičkog održavanja. (14)



Slika 5. Alcor Scientific – iSED

4.2.3. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka koristili su se Bland-Altmanov dijagram, Passing Bablok regresija te Spearmanov koeficijent korelacije za prikaz korelacije između Westergren metode i metode na automatskom uređaju. Analiza je izvršena pomoću statističkog softvera „MedCalc“ (ver. 22.001). Statistička značajnost određena je s $P < 0,05$.

5. REZULTATI

5.1. Prikaz rezultata analize brzine sedimentacije eritrocita dobiveni Westergren metodom i automatiziranom metodom na uređaju iSED

U tablici 2 prikazani su rezultati analize brzine sedimentacije eritrocita dobiveni standardnom Westergren metodom i metodom na automatskom uređaju iSED Alcor Scientific.

Tablica 2. Rezultati analize brzine sedimentacije eritrocita

ID	SE	ISED
112010799	18	2
112010814	13	20
112010802	8	14
112010834	6	8
112010855	40	41
112010741	20	23
112010514	30	40
112010507	22	26
112010588	24	48
112010605	26	45
112010617	38	43
112010209	10	28
112010211	7	11
112010210	3	22
112010224	28	31
112010237	45	50
112010713	60	22
112010662	75	56
112010767	40	33
112010300	17	29
212010945	21	10
212010966	68	82
212011006	27	65
212010959	27	50

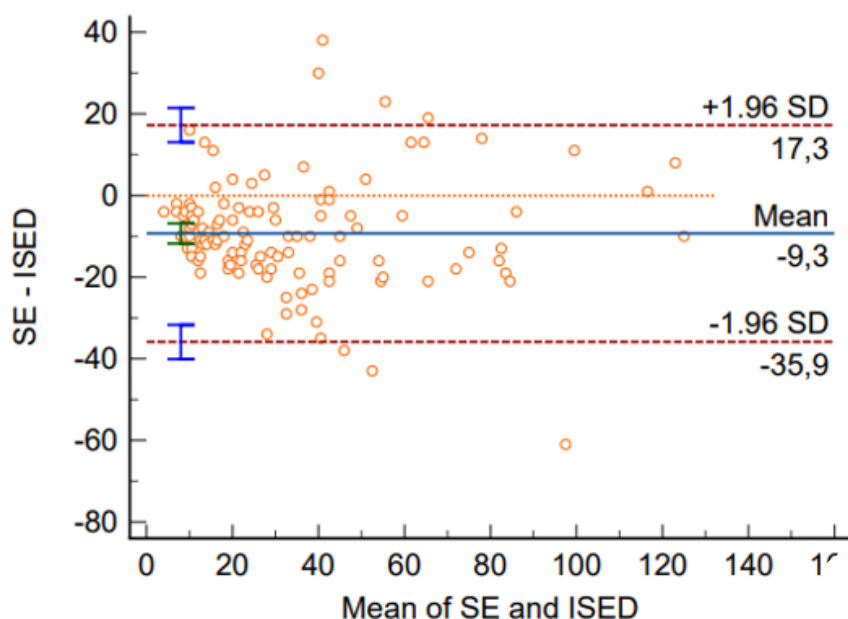
212011023	24	28
212011090	76	89
212010814	17	19
212010853	127	119
212010816	18	27
212010216	22	50
212010226	18	38
212010275	55	25
212010373	117	116
212010280	120	130
212010671	63	81
212010755	6	14
212010614	20	23
212010428	3	13
212010465	4	17
212010811	9	11
512010846	9	17
512010792	22	18
512010859	10	14
512010682	5	9
512010301	4	20
512010267	10	19
512010262	12	31
512010222	26	23
512010207	17	15
512010202	5	15
512010191	4	14
512010187	15	29
512010204	17	23
512010168	19	34
512010200	7	18
512010159	11	22
512010155	31	74
512010175	33	43
512010169	40	50
512011051	30	25
712010233	71	58
712010235	23	58
712010369	68	55
712010566	32	53

712010639	37	53
712010615	20	45
712010645	17	35
712010730	74	95
712010750	28	38
712010764	18	47
712010899	42	43
712010906	74	90
712010965	43	42
712010949	22	36
712011062	67	44
712011065	57	62
712011254	74	93
712010290	10	21
712010323	11	27
712010350	6	11
812011004	7	19
812010952	23	38
812010371	20	38
812010596	44	65
812010761	45	53
812010673	55	76
812010620	105	94
812010185	26	40
812010372	46	62
812010424	85	71
812010551	3	16
812010545	3	18
812010466	3	18
812010534	8	20
812010539	10	22
812010282	14	20
812010304	17	34
812011024	9	12
812010888	8	13
2112010752	84	88
2112010723	45	65
2112010487	33	52
2112010198	24	55
2112010631	67	128

2112010505	53	49
2112010240	27	33
2112010222	7	14
2112010247	11	45
2112010329	2	6
2112010325	8	19
2112010323	13	27
2112010498	20	7
2112010339	14	30
2112010395	17	34
2112010397	18	29
2112010468	11	28
2112010467	5	20
2112010139	13	23
2112010178	5	9

5.2. Usporedba razlika dobivenih rezultata analize brzine sedimentacije eritrocita dobiveni Westergren metodom i automatiziranom metodom na uređaju iSED – Bland Altmanov dijagram

Bland-Altmanov dijagram (Slika 6) koristi se za procjenu slaganja između dvije metode, odnosno dva različita testa za jedno svojstvo. 95% interval pouzdanosti (dalje 95 % CI) je između -11,7639 i -6,8412. Puna plava crta označava srednju vrijednost, koja je u ovom slučaju -9,3. Dvije crvene isprekidane crte označavaju raspon varijabli u $\pm 1,96$ SD unutar kojeg razlike mjerenja nisu statistički značajne. Gornja granica je 17,3 (95% CI između 13,0544 i 21,4909). Donja granica je -35,8777 (95% CI između -40,0959 i -31,6595). Sistematska pogreška (SE: 3%) i ukupna pogreška (TE: 10%) korištene su kao granice prihvatljivosti, a u usporedbi Westergren metode i automatizirane metode ukazale su na sistematsku pogrešku.



Slika 6. Bland Altmanov dijagram razlike među dobivenim rezultatima mjerenja

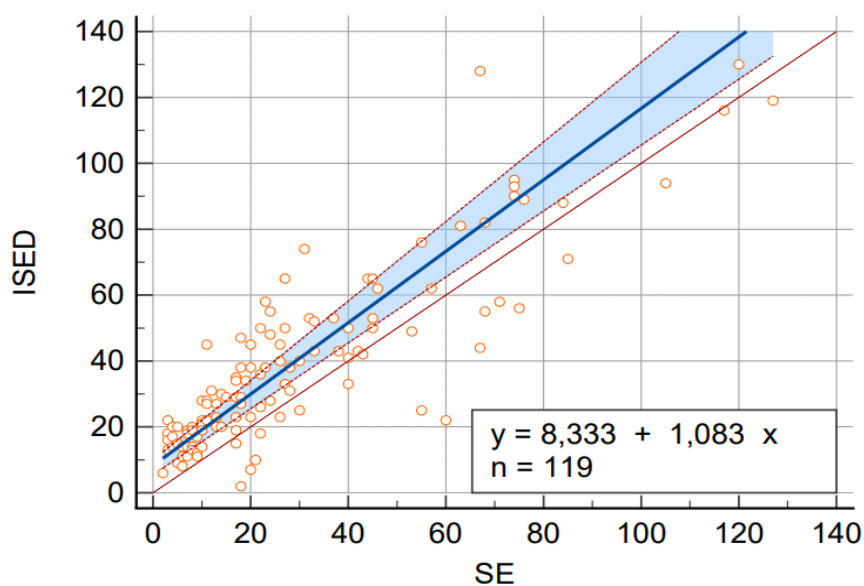
5.3. Rezultati usporedbe standardne Westergren metode i metode na automatskom uređaju iSED Alcor Scientific pomoću Passing Bablok regresijske analize i koeficijenta korelacije metoda

Passing Bablok regresijska analiza (slika 7) omogućuje procjenu slaganja dviju metoda uz linearni odnos između podataka i dijagram reziduala koji otkriva moguća odstupanja i identificira moguću nelinearnost. U tablici 3 navedeni su dobiveni rezultati regresijske analize za Westergren metodu i automatsku metodu na uređaju iSED. Rezultati Cusumovog testa linearnosti nisu statistički značajni ($P = 0,64$), čime je ispunjen preduvjet za provedbu Passing Bablok regresijske analize.

Tablica 3. Tablični Passing Bablog regresijska analiza

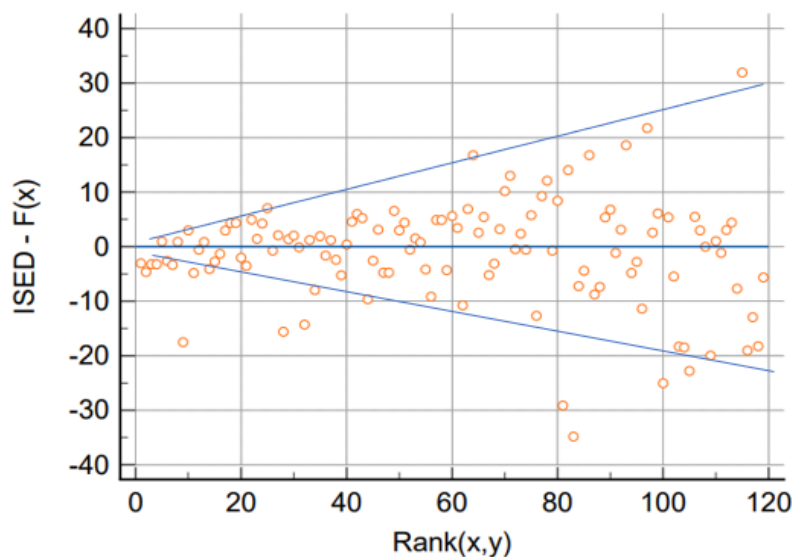
	Westergren	iSED
Najviša vrijednost	127,0	130,0
Najniža vrijednost	2,0	2,0
Standardna devijacija	26,8099	26,9783
Medijan	20,0	31,0
Rezidualna standardna devijacija (RSD)	9,7675	
±1,96 RSD	Od -19,1443 i 19,1443	
Cusum test linearnosti	P=0,64	

Analiza je dala jednadžbu „ $y=8,333 + 1,083x$ “. Nagib pravca je 1,0833 (95% CI između 1,000 i 1,2069), a presjecište pravca 8,3333 (95% CI između 5,5517 i 10,000).



Slika 7. Passing Bablok dijagram usporedbe metoda

Passing Bablok dijagram reziduala prikazuje odstupanja od linearnosti variranja rezultata oko pravca (slika 8), a u usporedbi Westergren metode i automatizirane iSED metode uočena je heteroskedastičnost što ukazuje na problem jer bi reziduali trebali imati konstantnu varijancu. (19)



Slika 8. Passing Bablok dijagram reziduala

Spearmanov koeficijent korelacije neparametarska je mjera koja procjenjuje odnos dviju varijabli. (20) U ovom istraživanju koeficijent korelacije je visok ($\rho=0,848$) uz značajnost $P<0,0001$ što upućuje na dobru povezanost između dvije metode, a rezultati analize prikazani su u tablici 4.

Tablica 4. Tablični prikaz Spearmanov-og koeficijenta korelacije

Broj uzoraka	119
Spearmanov koeficijent korelacije	0,848
Level značajnosti	$P<0,0001$
95% CI	0,788 - 0,892

6. RASPRAVA

U ovom istraživanju uspoređivale su se dvije metode za sedimentaciju eritrocita, Westergren metoda i automatizirana metoda na uređaju iSED. Za statističku obradu podataka koristili su se standardni grafovi za usporedbu dvije metode, a to su Bland Altman dijagram, Passing Bablok regresija te Spearmanov koeficijent korelacije. Bland Altman dijagram analiziran je pomoću sistematske i ukupne pogreške koje su ukazale da je u usporedbi mjerenja dviju metoda pristuna sistematska pogreška. Passing Bablok dijagram reziduala ukazuje na heteroskedastičnost, što znači da povećanjem vrijednosti na x osi, odnosno vrijednosti brzine sedimentacije eritrocita, povećavaju se i nesukladnosti dvije metode. Dijagram reziduala prikazao je nejednaku varijancu reziduala, a zaključak je da dvije ispitivane metode nemaju linearan odnos. Passing Bablok regresijska analiza dala je jednadžbu pravca $y=8,333 + 1,083x$. Nagib pravca je 1,083 (95% CI između 1,000 i 1,2069). Idealno bi nagib pravca trebao biti 1, a odstupanja ukazuju da postoji proporcionalna razlika između dvije metode. Presjecište pravca 8,3333 (95% CI između 5,5517 i 10,000). U idealnom slučaju ova vrijednost jednaka je nuli, a ako se vrijednost značajno razlikuje od nule ukazuje na to da se obje metode razlikuju za konstantan iznos. (21) S obzirom da je Passing Bablok jednadžba za dvije identične metode $y=1x$ odnosno $y=x$, u ovom istraživanju upućuje na to da Westergren metoda i automatizirana metoda na iSED uređaju nisu kompatibilne. S druge strane, Spearmanov koeficijent korelacije ($\rho=0,848$) ukazuje na dobru korelaciju dvije ispitivane metode. Level značajnosti je $P<0,0001$, a 95% CI između 0,788 i 0,892. S obzirom na ostalu statističku analizu možemo zaključiti da automatizirana metoda na uređaju iSED ne može zamijeniti referentu Westergren metodu.

7. ZAKLJUČAK

Brzina sedimentacije eritrocita klinički je važan test kod sumnje na upalna stanja organizma te nekih bolesti kao što je reumatoidni artritis. Referentna metoda za brzinu sedimentacije eritrocita je Westergren metoda, a u novije vrijeme koriste se i automatizirane metode na raznim uređajima. U ovom istraživanju uspoređena je Westergren metoda sa automatiziranom metodom na uređaju iSED. Ispitani su uzorci krvi 119 pacijenata, a odnos dvije metode uspoređen je statističkom analizom. Statistička analiza ukazala je na dobru korelaciju dvije metode ali i na odstupanja, nesukladnosti te sistemsku pogrešku mjerenja, stoga zaključujemo da automatizirana metoda na uređaju iSED nije prihvatljiva i ne može zamijeniti referentnu Westergren metodu. U novije vrijeme postoje brojni automatizirani uređaji za test brzine sedimentacije eritrocita i u mnogim istraživanjima su se dokazali kao dosljedna, čak i bolja metoda, no u ovom istraživanju dokazano je suprotno.

8. LITERATURA

1. Das B. Validation Protocol: First Step of a Lean-Total Quality Management Principle in a New Laboratory Set-up in a Tertiary Care Hospital in India. *Indian J Clin Biochem.* 2011 Jul;26(3):235-43. doi: 10.1007/s12291-011-0110-x. Epub 2011 Feb 18. PMID: 22754186; PMCID: PMC3162948.
2. Gašljević V. Validacija i mjerna nesigurnost. *Biochemia Medica* [Internet]. 2010 [pristupljeno 09.05.2023.];20(1):57-63. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/47850>
3. IUPAC Technical Report: Harmonized Guidelines for Single Laboratory Validation of Methods of Analysis, *Pure Appl. Chem.*, Vol. 74, No. 5, pp. 835-855, 2002.
4. Shirlyn B. Mckenzie, J. Lynne Williams, *Clinical Laboratory Hematology*. Pearson education 2015.
5. Hematology Glossary [Internet]. [pristupljeno 09.05.2023]. Dostupno na: <https://www.hematology.org:443/education/patients/blood-basics>
6. Kiseleva O, Kurbatov I, Ilgisonis E, Poverennaya E. Defining Blood Plasma and Serum Metabolome by GC-MS. *Metabolites.* 2021 Dec 24;12(1):15. doi: 10.3390/metabo12010015. PMID: 35050137; PMCID: PMC8779220
7. Stanford Medicine Children's Health [Internet]. [pristupljeno 09.05.2023]. Dostupno na: <https://www.stanfordchildrens.org/en/topic/default?id=what-is-plasma-160-37>
8. Cells of the blood [Internet]. Kenhub. [pristupljeno 09.05.2023]. Dostupno na: <https://www.kenhub.com/en/library/anatomy/cells-of-the-blood>
9. Kovač Z. Patofiziologija sedimentacije eritrocita. *Medicinski vjesnik* [Internet]. 1990 [pristupljeno 10.05.2023.];22((1-2)):17-24. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/196180>
10. Bochen K, Krasowska A, Milaniuk S, Kulczyńska M, Prystupa A, Dzida G. Erythrocyte sedimentation rate – an old marker with new applications. *J Pre Clin Clin Res.* 2011;5(2):50-55.
11. Alende-Castro V, Alonso-Sampedro M, Vazquez-Temprano N, et al. Factors influencing erythrocyte sedimentation rate in adults: New evidence for an old

- test. *Medicine* (Baltimore). 2019;98(34):e16816.
doi:10.1097/MD.00000000000016816
12. Tishkowsky K, Gupta V. Brzina sedimentacije eritrocita. [Pristupljeno 08.05. 2023]. U: StatPearls [Internet]. Otok s blagom (FL): StatPearls Publishing; siječnja 2023. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557485/>
 13. Otopina i postupak sedimentacije eritrocita (ESR). [Internet]. 2020 [pristupljeno 13.05.2023]. Dostupno na: <https://labpedia.net/erythrocyte-sedimentation-rate-esr-solution-and/>
 14. Kratz A, Plebani M, Peng M, Lee YK, McCafferty R, Machin SJ, International Council for Standardization in Haematology (ICSH). ICSH recommendations for modified and alternate methods measuring the erythrocyte sedimentation rate. *International journal of laboratory hematology*. 2017 Oct;39(5):448-57
 15. Lapić I, Miloš M, Tosato F, et al. Analytical validation of the iSED automated analyzer for erythrocyte sedimentation rate. *Int J Lab Hematol*. 2020;42(2):109-115. doi:10.1111/ijlh.13120
 16. Reologija. In: Wikipedija [Internet]. 2022 [pristupljeno 14.05.2023.]. Dostupno na: <https://hr.wikipedia.org/w/index.php?title=Reologija&oldid=6317888>
 17. Fotometrija. In: Wikipedija [Internet]. 2022 [pristupljeno 14.05.2023]. Dostupno na: <https://hr.wikipedia.org/w/index.php?title=Fotometrija&oldid=6254750>
 18. Alcor. iSED [Internet]. Alcor Scientific. [pristupljeno 15.06.2023.]. Dostupno na: <https://alcorscientific.com/clinical-laboratory/ised/>
 19. Bilić-Zulle L. Comparison of methods: Passing and Bablok regression. *Biochem Med (Zagreb)*. 2011;21(1):49-52. doi:10.11613/bm.2011.010
 20. Spearman's rank correlation coefficient. In: Wikipedia [Internet]. 2023 [pristupljeno 14.05.2023.]. Dostupno na: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Spearman%27s_rank_correlation_coefficient&oldid=1148440452
 21. Schoonjans F. MedCalc's Free statistical calculators [Internet]. MedCalc. [pristupljeno 10.06.2023]. Dostupno na: <https://www.medcalc.org/calc/>

9. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI:

Ime i prezime: Ana Drežnjak
Datum rođenja: 1. listopad 2001.
Mjesto rođenja: Mostar, BiH

OBRAZOVANJE

2008. – 2016. : Osnovna škola Prozor
2016. – 2020. : Srednja škola Prozor, Opća gimnazija
2020. – 2023. : Sveučilišni odjel zdravstvenih studije Split

Preddiplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika