

Verifikacija kapilarne elektroforeze hemoglobina na uređaju miniCAP flex-piercing

Benček, Nives

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:503431>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-26**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Nives Benček

**Verifikacija kapilarne elektroforeze hemoglobina
na uređaju miniCAP flex-piercing**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu i izrađen u Odjelu za elektroforetsku i imunokemijsku laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Dunje Rogić.

Zahvaljujem se prof. dr.sc. Dunji Rogić na stručnom vodstvu pri izradi ovog diplomskog rada. Posebno hvala i komentorici Dragani Šegulji spec. medicinske biokemije i laboratorijske medicine na nesebičnoj pomoći, savjetima, trudu i strpljenju.

Hvala Mami i Moniki na bezuvjetnoj moralnoj i financijskoj podršci tijekom cijelog mog studiranja. Uvijek su bile tu da priskoče u pomoć, a bez njih moje studiranje ne bi bilo moguće. Hvala vam za sve!

Hvala mojim Biokemičarkama na svim druženjima i zajedničkim trenucima, podijeljenim skriptama, savjetima i informacijama. One su učinile ovo studiranje puno lakšim, zabavnijim i ljepšim.

Hvala mom Martinu, na svom strpljenju ovog svijeta, na svojoj pomoći i pojašnjenjima oko zadaća i zadataka, potpori i podršci u svim oblicima. Hvala što si bio uz mene i podržavao me u svakom trenutku. Hvala ti za Ljubav.

SADRŽAJ:

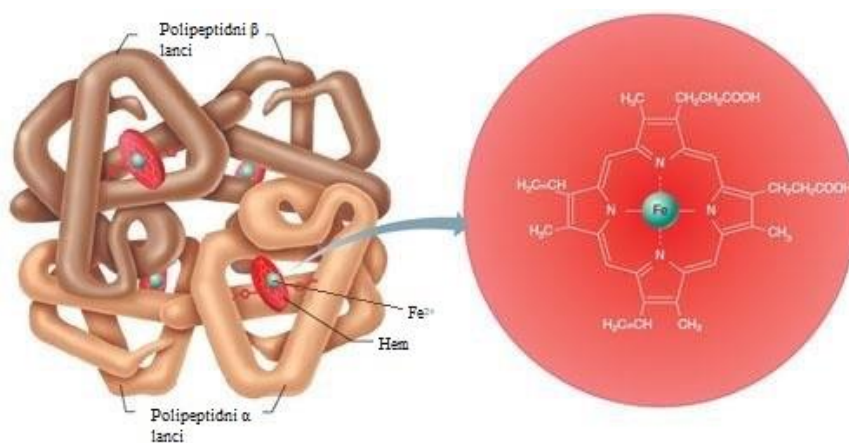
1. UVOD	1
1.1. Hemoglobin	1
1.1.1. Varijante hemoglobina	2
1.1.2. Hemoglobinopatije	3
1.2. Metode razdvajanja	4
1.2.1. Elektroforeza	4
1.2.1.1. Kapilarna zonska elektroforeza	5
1.2.1.2. Značaj kapilarne elektroforeze u postavljanju dijagnoze hemoglobinopatija	7
1.2.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti	7
1.3. Verifikacija analitičkih metoda	9
1.3.1. Ispitivanje preciznosti metode	10
1.3.1.1. Ponovljivost	10
1.3.1.2. Međupreciznost	10
1.3.2. Procjena točnosti metode	11
1.3.3. Usporedba rezultata s rutinskom metodom	11
2. OBRAZLOŽENJE TEME	13
3. MATERIJALI I METODE	14
3.1. Uzorci	14
3.2. Kontrolni uzorci	14
3.3. Reagensi i potrošni materijal	14
3.4. Načelo metode i uvjeti provođenja elektroforeze	15
3.5. Statistička obrada	16
3.6. Provođenje verifikacije	16
3.6.1. Ispitivanje preciznosti metode	17
3.6.2. Procjena točnosti metode	18
3.6.3. Usporedba rezultata s rutinskom metodom	18
4. REZULTATI	19
4.1. Ispitivanje preciznosti	19
4.2. Procjena točnosti	28
4.3. Usporedba rezultata s rutinskom metodom	29
5. RASPRAVA	32
6. ZAKLJUČAK	35
7. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA	36
8. LITERATURA	38
9. SAŽETAK/SUMMARY	41

1. UVOD

1.1. Hemoglobin

Hemoproteini su složeni proteini (proteidi) čija je prostetska skupina porfirinski prsten s inkorporiranim željezom. U te se spojeve ubrajaju hemoglobin, mioglobin, enzimi iz porodice citokroma, katalaze i peroksidaze. Hemoglobin (Mr 66,7 kDa) je globularni protein sastavljen od globina i prostetske skupine hema (Čvorišćec i sur., ured., 2009.; McKenzie i sur., 2020.). Odrasli muškarac mase 70kg sadrži 630g hemoglobina, koji ukupno sadržava 2,2g željeza (Labar, 2017.). Hemoglobin zauzima otprilike 33% volumena eritrocita, a svaka stanica sadrži otprilike 28-34pg hemoglobina. Tijekom eritropoeze, većina hemoglobina se sintetizira u fazi polikromatofilnog eritroblasta, 75-80% ukupnog hemoglobina nastaje ekstruzijom jezgre, a ostalih 20-25% nastaje iz retikulocita. Zreli eritrocit ne sadrži jezgru, ribosome ni mitohondrije pa ne može sintetizirati nove molekule hemoglobina (McKenzie i sur., 2020.). Tetramer je koji se sastoji od četiri polipeptidna lanca (dva para) i četiri hema (Slika 1.) (Čvorišćec i sur., ured., 2009.; Labar, 2017.). Svaka je prostetska skupina hema vezana za jedan polipeptidni lanac. Četiri podjedinice hemoglobina su povezane ionskim vezama, hidrofobnim vezama te vodikovim vezama u tetraedalnu strukturu dajući pritom hemoglobinu gotovo sferičan oblik. (McKenzie i sur., 2020.). Hemoglobini različitih vrsta razlikuju se po kristalnim oblicima, topljivosti, sadržaju aminokiselina, afinitetu prema kisiku i apsorpcijskim spektrima. Te su razlike vezane za proteinski dio hemoglobinske molekule, dok je hem u svim vrstama isti (Čvorišćec i sur., ured., 2009.). Prostetska skupina hem sastoji se od željeza i protoporfirina IX (Slika 1.) (Gamulin i sur., 2005). Na hem otpada 4% molekule hemoglobina. Smješten je na površini molekule, a svi polipeptidni lanci globina smješteni su u unutrašnjosti (Labar, 2017.). Porphirinski prsten, protoporfirin IX je sastavljen od četiri pirolna prstena s ionom željeza umetnutim u njihov centar (Slika 1.). Željezni ioni sadrže šest elektronskih parova po atomu, četiri s kojima tvore koordinatne veze s dušikovim atomima svakog pirolnog prstena. Peti par tvori koordinantnu vezu s N-proksimalnim histidinom, a šesti par je vezno mjesto za molekulu kisika. U deoksigeniranom stanju, sa šestim elektronskim parom je vezana voda (Čvorišćec i sur., ured., 2009.). Željezo mora biti u Fe^{2+} obliku kako bi se za molekulu hemoglobina vezao kisik (McKenzie i sur., 2020.). Hemoglobin je jedini feroprotoporfirin koji stvara stabilan kompleks u kojem željezo i nakon vezanja molekule kisika ostaje u dvovalentnom obliku (Čvorišćec i sur., ured., 2009.). Svaka podjedinica hema veže jednu molekulu kisika tako da je veže za centralni ion željeza. Svaka molekula hemoglobina sadrži četiri atoma željeza, pa tako može vezati četiri molekule kisika (Čvorišćec i sur., ured., 2009.;

www.britannica.com/science/hemoglobin). Njegova je funkcija omogućavanje unutarnjeg disanja tj. prijenos kisika iz pluća u tkiva te ugljikova dioksida iz tkiva natrag u pluća (Labar, 2017.). Također je transporter dušikova oksida, koji djeluje kao jaki vazodilatator i modulira tonus krvnih žila (Labar, 2017.; McKenzie i sur., 2020.).



Slika 1. Struktura molekule hemoglobina (preuzeto i prilagođeno prema <https://www.toppr.com>)

1.1.1. Varijante hemoglobina

Proteinska komponenta hemoglobina je polipeptid globin koji čini 96 % cjelokupne molekule hemoglobina. Globin se sastoji od četiri polipeptidna lanca čije je stvaranje pod kontrolom skupine gena smještenih na kromosomima 11 (ϵ , δ i β) i 16 (ζ i α). Poznato je sedam vrsta polipeptidnih lanaca: zeta (ζ), alfa (α), epsilon (ϵ), gama A(γ^A), gama G(γ^G), delta(δ), beta(β). Tijekom ranog embrionalnog života, dva su dominantna polipeptidna lanca u hemoglobinu (ζ i ϵ). Nakon 8-12 tjedana života sinteza ζ lanca se zamjenjuje sintezom α lanca. Ostalih pet lanaca je dominantno tijekom fetalnog života i nakon rođenja (Labar, 2017.; McKenzie i sur., 2020.). Postoje dva tipa γ -lanaca, γ^A i γ^G , ovisno o tome koja je aminokiselina (glicin ili alanin) na položaju 136 polipeptidnog lanca. Sinteza γ^G lanca dominira prije rođenja, ali su sinteze oba γ lanca u jednakom omjeru u odrasloj dobi. U odrasloj dobi većina stanica dominantno stvara α i β lance (McKenzie i sur., 2020.). α lanci tvore s drugim lancima dimere, odnosno tetramere (Labar, 2017.). Tetramer je uvijek sastavljen od dva α i dva druga lanca, a tip lanaca koji se nalazi u sastavu hemoglobina određuje varijantu hemoglobina. Sastav globinskih lanaca određuje različita funkcionalna i fizikalna svojstva hemoglobina (McKenzie i sur., 2020.).

Pojedinačni globinski lanci izraženi su u različitim omjerima tijekom razvoja ljudskog embrija, fetusa ili odrasle osobe. Embrionalni hemoglobini nastaju povezivanjem embrionalnih

globinskih lanaca (ζ i ϵ) ili međusobnim povezivanjem ζ i ϵ lanaca s α i γ lancima. Ovi hemoglobini se mogu detektirati u ranoj hematopoezi u žumanjčanoj vreći ili jetri, do 12. tjedna trudnoće. HbF se kao dominantni hemoglobin u fetalnoj dobi može detektirati do 36. tjedna trudnoće. Čine ga dva α lanca i dva γ lanca. Nakon rođenja novorođenčce sadrži 50-85% HbF, a odrasloj dobi eritrociti sadrže <2% HbF (McKenzie i sur., 2020.; Labar, 2017.). U eritrocitima odrasle osobe dominantno se nalazi HbA (95%), koji sadrži dva α lanca i dva β lanca, i HbA₂ koji sadrži dva α lanca i dva δ lanca (Labar, 2017.). HbA₂ se pojavljuje kasnije u fetalnom životu kada čini manje od 1% ukupnog hemoglobina. Postiže normalne odrasle vrijednosti nakon prve godine života (1,5-3,7%). Prijelaz s HbF na HbA nakon rođenja nije kompletan i dijelom je reverzibilan pa se primjerice kod pacijenata s hemoglobinopatijama još uvijek nalazi povišeni udio HbF (McKenzie i sur., 2020.).

1.1.2. Hemoglobinopatije

Hemoglobinopatije su poremećaji građe ili sinteze hemoglobina (McKenzie i sur., 2020.). Radi se o čestim monogenским, nasljednim bolestima i jednom od glavnih svjetskih zdravstvenih problema. Do sada je opisano više od 1400 inačica hemoglobina kod odraslih (Gamulin i sur., 2005.; Topić i sur., 2018.). Općenita podjela je u dvije velike skupine: kvalitativni poremećaji - strukturalne hemoglobinske varijante i kvantitativni poremećaji - talasemije (Gamulin i sur., 2005.; Topić i sur., 2018.). Obje skupine su povezane sa supstitucijama i/ili delecijama u α ili β lancu (Kohne, 2011.). Također postoji podjela na nasljedne i stečene hemoglobinopatije. Stečene hemoglobinopatije nastaju zbog oštećenja funkcije hemoglobina vanjskim čimbenicima, kao što su ugljikov monoksid i oksidirajući spojevi (kloridi i nitriti) (Gamulin i sur., 2005.). Većina neuobičajenih hemoglobina ne uzrokuje kliničke promjene kod heterozigota ili to čine vrlo malo, jer se nasljeđuju autosomno-recesivno (HbC, HbE, HbS), dok se drugi (HbM, Hb Köln) nasljeđuju autosomno dominantno pa se i u heterozigota pojavljuju klinički simptomi (Čvorišćec i sur., ured., 2009.). U slučaju blaže kliničke slike, varijante hemoglobina slučajno se otkrivaju, jer mutacije mijenjaju fizikalno-kemijska svojstva globina, koja se očituju promjenama elektroforetskog kretanja, topljivosti, funkcije i stabilnosti hemoglobina (Gamulin i sur., 2005.; Topić i sur., 2018.; McKenzie i sur., 2020.). Uglavnom su poremećaji vezani uz globinske lance, dok hem ostaje nepromijenjen (McKenzie i sur., 2020.). Talasemije su nasljedni autosomni recesivni poremećaji sinteze jednog ili više globinskih lanaca hemoglobina uzrokovani mutacijama gena odgovornih za sintezu jednog od lanaca. Novosintetizirani lanci imaju nepromijenjenu strukturu hemoglobina, ali se stvaraju u smanjenoj količini (Gamulin i sur., 2005.; Topić i sur., 2018.). Hemoglobinske varijante su

nasljedni, strukturni poremećaju hemoglobina koji proizlaze iz genetske mutacije u kodirajućoj regiji globinskog gena što rezultira delecijom ili supstitucijom aminokiseline u proteinskom lancu globina. Sinteza takvih globinskih lanaca količinom je zadovoljavajuća, ali jedan od globinskih lanca ima promjenu u strukturi (McKenzie i sur., 2020.). Kliničko značenje promjene ovisi o tipu aminokiseline i o mjestu koje je zahvaćeno mutacijom. S obzirom na navedeno, hemoglobinopatije mogu biti asimptomatske ili povezane s kroničnom hemolitičkom anemijom (McKenzie i sur., 2020.). U klinički značajnoj bolesti, zahvaćeni su α ili β lanac, a klinički je posebno zanimljivo pet neuobičajenih hemoglobina: S, C, E, O-Arab i D. Ostale globinske mutacije mogu uzrokovati nastanak hemoglobina s velikim afinitetom za kisik, što uzrokuje nastanak policitemije rubre vere, nestabilnih hemoglobina i posljedično hemolitičke bolesti te mutacije koje pospješuju oksidaciju hemoglobina, zbog čega nastaju methemoglobin i cijanoza (Labar, 2017.).

1.2. Metode razdvajanja

1.2.1. Elektroforeza

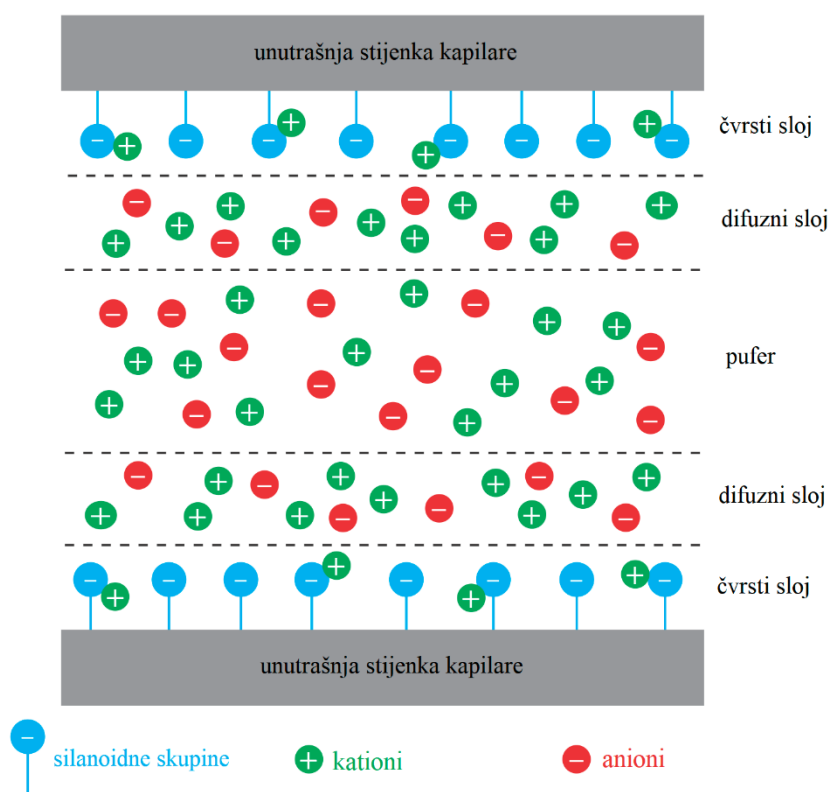
Elektroforeza je putovanje nabijenih čestica u električnom polju. Brzina putovanja čestica ovisi o naboju čestica, veličini, obliku, koncentraciji i električnom naboju molekule, jakosti električnog polja, viskoznosti, pH, temperaturi i ionskoj jakosti pufera, osobinama nosača te o vremenu putovanja. Da bi navedeno bilo zadovoljeno, potrebno je tijekom elektroforeze održavati konstantnost sredine. To se postiže tako da elektroforeza teče u puferiziranoj sredini uz pufer određenog pH, ionske jakosti i vodljivosti (Čvorišćec i sur., ured., 2009.). Molekule se tijekom elektroforetske analize kreću prema katodi (negativnoj elektrodi) ili anodi (pozitivnoj elektrodi), ovisno o vrsti naboja koju nose (Tietz, 2008.). Kod amfoternih spojeva, npr. proteina koji sadrže ionizirajuće amino i karboksilne skupine, naboj aminokiseline od kojih su sastavljeni ovisi o pH sredine. U otopini s nižim pH od svoje izoelektrične točke (engl. *Isoelectric point*, pI), amino skupina veže protone, dobiva pozitivni naboj, i putuje u električnom polju prema katodi. Obratno, kod alkalnijeg pH u odnosu na pI, karboksilna skupina otpušta protone, dobiva negativni naboj pa putuje prema anodi (Tietz, 2008.; Čvorišćec i sur., ured., 2009.). Samo pri jednom određenom pH molekula ima isti broj pozitivnih i negativnih naboja. Taj je pH jednak pI molekule pa ona ne putuje u električnom polju i električki je neutralna. Postoji više različitih tehnika elektroforetskog razdvajanja analita, međutim u sklopu ovog diplomskog rada u fokus je stavljena kapilarna elektroforeza. Ovisno o svojstvima analita, postoji nekoliko vrsta kapilarne elektroforeze koje omogućuju njihovo razdvajanje.

1.2.1.1. Kapilarna zonska elektroforeza

Kapilarna zonska elektroforeza (engl. *Capillary Zone Electrophoresis*, CZE) ili kapilarna elektroforeza slobodne otopine (engl. *Free Solution Capillary Electrophoresis*) je separacijska tehnika koja se temelji na migraciji električno nabijenih čestica pod djelovanjem električnog polja visokog potencijala (10-30 kV) u uskoj kapilari ispunjenoj otopinom elektrolita. (Nigović, 2014.) Najjednostavniji je oblik kapilarne elektroforeze, prvi put opisan 1960. godine. U današnje se vrijeme nadopunjuje s tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) ili ju zamjenjuje. Od prednosti treba istaknuti kratko vrijeme analize, visoku učinkovitost, različite mehanizme razdvajanja, mogućnost analize različitih vrsta analita, potrebne vrlo male količine uzoraka i pufera, niske troškove, jednostavnost tehnike i ekološku prihvatljivost. Primjenu je našla u analizi velikih molekula, poput proteina, peptida i nukleinskih kiselina, malih organskih molekula, poput lijekova, hormona, biljnih metabolita, sastojaka prehrambenih namirnica te anorganskih iona. Kapilarna zonska elektroforeza koristi se za detekciju, kao i za relativnu kvantifikaciju različitih hemoglobinskih varijanti. Kapilarnom zonskom elektroforezom moguće je odijeliti i anionske i kationske otopljene tvari zahvaljujući elektroosmotskom toku (engl. *Electroosmotic Flow*, EOF). Nabijene čestice putuju različitim brzinama prema jednoj od elektroda ovisno o njihovom naboju i polumjeru iona, a neutralne čestice kreću se unutar kolone zahvaljujući elektroosmotskom toku (Matišić, 2015).

Razdvajanje analita u kapilarnoj elektroforezi temelji se na njihovoj različitoj brzini putovanja kroz kapilaru. Izvodi se u uskim, staklenim kapilarama tankih stijenki, unutarnjeg promjera najčešće od 25 do 150 μm (Lauer i Rozing, 2014). Takva površina unutrašnje stijenke kapilare sadrži brojne silanoidne skupine koje se ovisno o pH vrijednosti elektrolita mogu nalaziti u anionskoj formi. Kapilara je spojena na detektor na svom terminalnom kraju, a preko puferskih spremnika na visokonaponsko napajanje. Glavna prednost je učinkovito odvođenje topline u usporedbi s klasičnom elektroforezom koje dopušta primjenu većeg napona, što povećava učinkovitost, a smanjuje vrijeme odvajanja u nekim slučajevima na manje od jedne minute (Tietz, 2008.). Zbog posebno visokog negativnog naboja na stijenkama kapilara javlja se elektroosmotski tok, koji je znatno veći od elektroforetskog toka, i razdvaja proteine u smjeru od anode prema katodi (Matišić, 2015). Stvara se dvostruki električni sloj, čvrsti sloj u kojem se nalaze kationi, i difuzijski sloj u kojem se javljaju i kationi i anioni. Kada se na krajevima kapilare primijeni napon, kationi u difuznom sloju dvostrukog sloja privučeni su prema katodi, a za sobom nose i molekule vode koje ih okružuju, stvarajući elektroosmotski tok.

Elektroosmotski tok je tok čistog pufera u kapilari, a nastaje kao posljedica površinskog naboja unutrašnje stijenke kapilare. Negativno nabijena unutrašnja stijenka kapilare uzrokuje elektroosmotski tok od anode prema katodi. Kationi putuju najbrže jer se zbog svoje elektroforetske pokretljivosti kreću u istom smjeru kao i elektroosmotski tok, odnosno prema katodi. Anioni su zbog svog negativnog naboja nošeni prema anodi, ali elektroosmotski tok je veći od njihove elektroforetske pokretljivosti pa u konačnici putuju prema katodi, ali se kreću najsporije. Zbog obrnuto proporcionalne ovisnosti polumjera nabijene čestice i njene elektroforetske pokretljivosti, kationi manjeg polumjera putovat će brže prema katodi od onih većeg polumjera. Također, anioni manjeg polumjera jače su nošeni prema anodi pa će najsporije putovati. Neutralne molekule putuju nošene elektroosmotskim tokom prema katodi kao neovisna zona, bez međusobnog razdvajanja (Lauer i Rozing 2014; Nigović 2014; Watson 2012). Za kapilarnu elektroforezu se koristi nekoliko vrsta detektora, ovisno o vrsti analita i cilju analize. Najčešće su korišteni UV detektor, fluorescencijski detektor ili maseni spektrometar (Nigović, 2014.).



Slika 2. Prikaz elektroosmotskog toka (preuzeto i prilagođeno prema <https://chem.libretexts.org>)

1.2.1.2. Značaj kapilarne elektroforeze u postavljanju dijagnoze hemoglobinopatija

Laboratorijski testovi dizajnirani za otkrivanje i prepoznavanje varijanti hemoglobina temelje se na promijenjenoj strukturi ili funkciji hemoglobinske molekule. Mnoge supstitucijske mutacije aminokiselina mijenjaju ukupni naboj molekule i omogućuju detekciju strukturne varijante hemoglobina elektroforezom hemoglobina. Neke supstitucije mogu uzrokovati identične promjene u neto naboju molekule tako da dvije različite varijante hemoglobina mogu imati identičnu elektroforetsku pokretljivost. Druge supstitucije ne mijenjaju naboj lanca hemoglobina pa mutirana varijanta hemoglobina migrira identično normalnom lancu globina i ne stvara dodatnu vrpcu na gelu. Mijenjanjem medija i pH analize mogu se otkriti i identificirati mnoge klinički značajne varijante hemoglobina. Rezultati laboratorijskih pretraga u parametrima krvne slike daju važne informacije u postavljanju sumnje na hemoglobinopatije. Važan sljedeći korak je upotreba specifičnih pretraga za utvrđivanje pojedinih poremećaja sinteze hemoglobina. Ključna pretraga u dijagnostici je elektroforeza hemoglobina koja omogućuje razlikovanje strukturnih varijanti hemoglobina i određivanje udjela pojedinih vrsta temeljem njihove različite elektroforetske pokretljivosti (Topić i sur., 2018.). Laboratorij u tom području ima nekoliko mogućnosti: primjena elektroforeze u alkalnom ili kiselom mediju na agarozu ili primjena kapilarne elektroforeze.

Novije metode su izoelektrično fokusiranje, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti ili molekularne metode. Kromatografske metode na mikrokolonama koje sadrže ionski izmjenjivač, uključujući tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti, omogućuju pouzdano kvantitativno određivanje pojedinih hemoglobinskih frakcija (primjerice niskih koncentracija pojedinih varijanti) te bolju razlučivost i identifikaciju određenih varijanti hemoglobina u odnosu na rezultate dobivene elektroforezom na agaroznom gelu (McKenzie i sur., 2020.).

1.2.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Kromatografija je proces fizičkog odvajanja, identifikacije i kvantifikacije komponenata uzorka na temelju njihove raspodjele između stacionarne i mobilne faze (Wilson i Walker 2010.). Postoji više tehnika izvedbe kromatografije: kromatografija na papiru (engl. *Paper Chromatography*, PC) tankoslojna kromatografija (engl. *Thin-layer Chromatography*, TLC), kolonska kromatografija (engl. *Column Chromatography*, CC) koja se dijeli na tekućinsku kromatografiju u koloni (engl. *Liquid Chromatography*, LC) i plinsku kromatografiju (engl.

Gas Chromatography, GC). Svi kromatografski sustavi, bez obzira na izvedbu sastoje se od stacionarne faze, koja može biti kruta tvar, gel, tekućina ili smjesa krutina/tekućina koja je imobilizirana, i mobilne faze, koja može biti tekuća ili plinovita. Uzorak se razdvaja na komponente distribucijom između mobilne i stacionarne faze. Mobilna faza prolazi preko ili kroz stacionarnu fazu nakon što je smjesa analita koja se treba odvojiti nanosena na stacionarnu fazu. Komponente uzorka mogu biti vezane samo na stacionarnoj fazi, samo u mobilnoj fazi ili se rasporediti između te dvije faze. Komponente s većim afinitetom za stacionarnu fazu provode većinu vremena u stacionarnoj fazi i migriraju sporije od onih s manjim afinitetom. Komponente s manjim afinitetom za stacionarnu fazu većinu vremena provode u mobilnoj fazi pa imaju brže kromatografsko putovanje.

Kolonska kromatografija je jedna od najčešće korištenih metoda. U kolonskoj se kromatografiji stacionarna faza nalazi unutar uske staklene ili metalne cijevi dok mobilna faza prolazi kroz cijev zbog visokog tlaka. Nakon nanošenja uzorka, mobilna faza, koja se obično naziva eluent, prolazi kroz kolonu korištenjem sustava pumpi ili primijenjenim tlakom plina. Stacionarna faza se ili nanosi na diskretne male čestice i pakira u kolonu ili se nanosi kao tanki film na unutarnju stijenku kolone. Kako eluent teče kroz kolonu, komponente se odvajaju na temelju svojih koeficijenata raspodjele i pojedinačno izlaze u eluatu dok napušta kolonu (Wilson i Walker, 2010.). Tipovi kolonske kromatografije obuhvaćaju plinsku kromatografiju, tekućinsku kromatografiju i kromatografiju superkritičnim fluidom engl. *Supercritical Fluid Chromatography*, SFC) (Skoog i sur. 2014).

Tekućinska kromatografija je visokoautomatizirana kromatografska tehnika razdvajanja uzorka na komponente. Tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) moderni je oblik tekućinske kromatografije koji koristi kolone s malim česticama (stacionarna faza) kroz koje se mobilna faza upumpava pod visokim tlakom. Osnovni princip rada tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti obuhvaća prolazak tekuće mobilne faze koja sadrži uzorak pod visokim tlakom kroz stupac napunjen odgovarajućom stacionarnom fazom. Na taj se način komponente smjese odvajaju visokom rezolucijom. Odvajanje je postignuto interakcijom molekula sa stacionarnom fazom u koloni, a komponente se razdvajaju na temelju vremena koje im je potrebno za prolazak kroz stupac. Stacionarnu fazu čine čvrste, porozne čestice silika gela, promjera svega nekoliko μm (3-10), koje mogu imati nepravilan ili sferičan oblik. Veličina čestica utječe na učinkovitost razdvajanja i pozadinski tlak na koloni. Što je veličina čestica manja, veća je učinkovitost tj. veća je površina za adsorpciju/desorpciju i manje zadržavanja analita unutar čestice. Mobilna

faza mora ulaziti u pore kako bi se analit zadržavao. Ukoliko u pore ne ulazi mobilna faza, analit se ne zadržava. HPLC instrumenti se općenito sastoje od spremnika s mobilnom fazom, pumpe koja tjera mobilnu fazu kroz sustav pod visokim tlakom, injektora koji služi uvođenju uzorka u mobilnu fazu, kromatografske kolone, detektora te uređaja za prikupljanje podataka (Kljaić, 2019.). Prednosti HPLC metode su brza i precizna kvantitativna analiza, automatiziranost i visoko osjetljiva detekcija. HPLC tehnikom s kationskom izmjenom omogućuje se kvantitativni rezultat, a time i klasifikacija podtipova β -talasemije. Ukoliko ni nakon toga dijagnoza nije sigurna, HPLC tehnikom obrnute faze mogu se odijeliti pojedini globinski lanci, te zaključiti je li riječ o poremećaju α , β ili γ -lanca (Labar, 2017.).

1.3. Verifikacija analitičkih metoda

Provođenjem postupaka validacije laboratorijskih metoda, omogućava se izdavanje pouzdanih rezultata laboratorijskih pretraga koji omogućuju donošenje medicinskih odluka prilikom postavljanja dijagnoze, praćenja tijeka bolesti i učinkovitosti terapije (Bilić-Zulle, 2006.). Stoga je prilikom uvođenja novih metoda u rutinski rad laboratorija potrebno procijeniti jesu li pogodne i prihvatljive za rad u uvjetima laboratorija i jesu li usporedive s prethodno korištenim metodama. Sve analitičke metode moraju biti odgovarajuće validirane/verificirane prije primjene u kliničkoj praksi. Validacijom se ispituju opće karakteristike određene metode tj. dokazuje se služi li određena metoda svrsi kojoj je primarno namijenjena. Najčešće ju provodi sam proizvođač. Ukoliko medicinski biokemičar želi prilagoditi postojeću metodu vlastitom laboratoriju ili uvesti novu metodu, dužan je provesti validaciju. Dakle, laboratorij provodi validaciju za nestandardne metode, metode razvijene u laboratoriju (*in house* metode) ili standardne metode korištene izvan njihovog namjeravanog područja. Postupak validacije obuhvaća ispitivanje sljedećih značajki metode: preciznost, istinitost, linearnost, granice detekcije, granice kvantifikacije, referentne intervale, analitičku specifičnost, utjecaj matriksa, interferencija i drugih značajki (Saračević, 2013.).

Za razliku od validacije, verifikacija podrazumijeva postupak potvrđivanja određenih značajki metode koje je postavio proizvođač. Temeljem verifikacijskih podataka donosi se odluka o prihvatljivosti postupka ispitivanja za kliničku primjenu. Verifikacija se provodi za već validirane metode, a provodi se pri uvođenju nove metode ili analizatora u laboratorij, kada validirana metoda doživi novo izdanje ili kad se iz bilo kojih razloga promjene neki uvjeti u laboratoriju koji utječu na metodu. Prije uvođenja nove metode u rutinski rad, laboratorij procesom kratke evaluacije (verifikacije) provjerava može li nova metoda zadovoljiti potrebe tog laboratorija i funkcionira li onako kako je naznačio proizvođač u uvjetima tog laboratorija

(Vuljanić, 2021.). Laboratorij, dakle, u svakom slučaju odabire validiranu metodu, bez obzira je li vlastita, normirana ili prilagođena, jer se samo na taj način postižu točni i pouzdani rezultati ispitivanja, umjeravanja ili uzorkovanja. Ovisno o složenosti metode, verifikacija može biti jednostavnija ili složenija, a u pojedinim situacijama može se približiti validaciji metode (Grgić, 2019.). Postupak verifikacije obuhvaća najmanje provjeru preciznosti, istinitosti (točnosti), linearnosti i referentnih intervala. S obzirom da postoji puno kvantitativnih metoda temeljenih na različitim principima, ne postoji jedinstveni verifikacijski protokol, već je preporuka da svaki laboratorij osmisli vlastiti protokol, ovisno o metodi, analitu koji se određuje itd. (Vuljanić, 2021.).

1.3.1. Ispitivanje preciznosti metode

Preciznost metode se definira kao bliskost slaganja niza neovisnih rezultata mjerenja dobivenih ponovljenim mjerenjima na istim ili sličnim objektima pod određenim uvjetima. Dakle, preciznost predstavlja raspršenost oko srednje vrijednosti mjerenja. Što je raspršenost mjerenja manja, manja je i preciznost. Cilj mjerenja preciznosti je procijeniti u kojoj mjeri slučajna pogreška utječe na rezultat mjerenja, tj. procijeniti što sve može utjecati na varijacije u laboratorijskom određivanju te isto minimizirati. Preciznost se obično ne predstavlja kao brojčana vrijednost, već se validacijom/verifikacijom izražava kvantitativno u smislu nepreciznosti tj. slučajne pogreške kao standardne devijacije ili koeficijenta varijacije rezultata u skupu ponovljenih mjerenja (CLSI, 2014.). Određuje se mjerenjem ponovljivosti (preciznosti u seriji (engl. *repeatability*)) i međupreciznosti (preciznost iz dana u dan (engl. *intermediate precision*)) odnosno obnovljivosti (engl. *reproducibility*).

1.3.1.1. Ponovljivost

Ponovljivost (preciznost u seriji) predstavlja neslaganje u skupu ponovljenih mjerenja kad su sva mjerenja izvedena pod jednakim uvjetima. Dakle, predstavlja preciznost u uvjetima pod kojima isti analitičar, koristeći istu opremu u istom laboratoriju, te primjenjujući istu metodu dobiva nezavisne rezultate ispitivanja na istovjetnim uzorcima. Ponovljivost se odnosi na varijabilnost koja je posljedica isključivo čimbenika unutar serije (CLSI, 2014.).

1.3.1.2. Međupreciznost

Međupreciznost (preciznost iz dana u dan) predstavlja neslaganja unutar istog laboratorija u duljem vremenskom razdoblju, koja su posljedica promjene određenih uvjeta primjerice

promjena serije reagensa ili tehničkog osoblja (CLSI, 2014.). Analitičar je dužan procijeniti na koji način promjena prethodno navedenih uvjeta utječe na odabranu metodu te na temelju toga odrediti na koji način postupati.

1.3.2. Procjena točnosti metode

Točnost predstavlja bliskost slaganja između srednje vrijednosti rezultata dobivenih iz velikog niza mjerenja i prave vrijednosti mjerene veličine. Obično se izražava kao mjerno odstupanje tj. sustavna pogreška (engl. *bias*) i/ili iskorištenje, tj. kao apsolutni ili relativni pojam. Apsolutni pojam predstavlja odstupanje, izražen kao apsolutna koncentracija, a relativni pojam predstavlja postotak odstupanja, izražen kao apsolutna koncentracija ili kao postotak (CLSI, 2014.).

1.3.3. Usporedba rezultata s rutinskom metodom

Usporedba rezultata s rutinskom metodom je postupak kojim se ispituje podudarnost rezultata mjerenja dobivenih ispitivanom metodom koja se uvodi, u odnosu na postojeću metodu koja se do sada koristila u laboratoriju. Cilj je osigurati da promjena metode ne uzrokuje promjenu u laboratorijskim rezultatima te posljedično promjenu u kliničkoj odluci (Vuljanić, 2021.). Usporedbu je potrebno provesti analizom uzoraka iz cijeloga koncentracijskog područja pomoću obje metode. Prednosti dostupnosti dviju ili više metoda koje su istovremeno funkcionalne, a rezultati su im međusobno usporedivi su: veća učinkovitost laboratorija (analiza većeg broja uzoraka), postizanje potrebnog TAT (engl. *turn around time*) i brže izdavanje nalaza te brzi i pouzdani prelazak s jednoga mjernoga sustava na drugi ukoliko se pojavi pogreška.

Pri promjeni korištene metode, analitičkog sustava ili kod paralelne upotrebe više analitičkih sustava, neophodno je provjeriti jesu li metode međusobno usporedive i hoće li promjena metode imati klinički utjecaj za bolesnika (Topić i sur., 2018.). Najčešće korišteni statistički postupci su Passing-Bablok i Demingova regresija te Bland-Altmanova analiza. Passing-Bablok regresija je model linearne regresije koji pretpostavlja da niti jedna od dviju metoda nije apsolutno točna. Rezultati se prikazuju u koordinatnom sustavu, gdje se vrijednosti dobivene jednom metodom (Metoda 1) nanose na os x, a vrijednosti druge metode (Metoda 2) na os y. Ova regresija prikazuje odnos dviju metoda kao regresijskog pravca s pripadnom jednadžbom:

$$Y = A (95\% CI) + B (95\% CI)$$

gdje je A odsječak na y osi, B koeficijent smjera pravca, a 95% CI (engl. *confidence interval*) 95% interval pouzdanosti

Interval pouzdanosti predstavlja raspon vrijednosti unutar kojih se s određenom sigurnošću nalazi mjereni parametar. Najčešće se koristi 95% interval pouzdanosti. Intervali pouzdanosti omogućuju identifikaciju konstantnog ili proporcionalnog odstupanja metoda. Konstantno odstupanje predstavlja matematički otklon između metoda koji je jednak u svim koncentracijskim područjima i odgovara iznosu odsjeka na osi y (A). Prisutnost konstantnog odstupanja procjenjuje se provjerom intervala pouzdanosti za odsječak na osi y (A). Ukoliko 95% interval pouzdanosti odsjeka na osi y (A) ne obuhvaća 0, postoji statistički značajno konstantno odstupanje između metoda. Proporcionalno odstupanje predstavlja matematički otklon između metoda koji je ovisan o veličini koncentracijskog područja i odgovara koeficijentu smjera pravca. Prisutnost proporcionalnog odstupanja procjenjuje se provjerom intervala pouzdanosti za koeficijent smjera pravca (B). Ukoliko 95% CI koeficijenta smjera pravca ne obuhvaća 1, postoji statistički značajno proporcionalno odstupanje između metoda (Topić i sur., 2018.).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

U Odjelu za elektroforetsku i imunokemijsku laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb instaliran je novi automatizirani sustav za kapilarnu elektroforezu miniCAP flex-piercing (Sebia, Lisses, Francuska) kojim se dobiva potpuni profil varijanti hemoglobina, od uobičajenih hemoglobinskih varijanti A, A2 i F do najznačajnijih ostalih hemoglobinskih varijanti S, C, E i D uz njihovu relativnu kvantifikaciju.

Sustav istog principa rada već postoji u Odjelu, Capillarys 2 (Sebia, Lisses, Francuska) i na njemu se do sada provodio rutinski rad, ali za razliku od trenutnog sustava, novi omogućava provođenje analize iz začepljene primarne epruvete.

Cilj ovog istraživanja jest provesti postupak verifikacije novog sustava za kapilarnu elektroforezu te ocijeniti analitičke karakteristike sustava prije uvođenja istoga u svakodnevnu kliničku primjenu. Verifikacija je obuhvatila ispitivanje preciznosti, procjenu točnosti te usporedbu s rezultatima sustava korištenog u rutinskom radu.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorci

Za provjeru preciznosti korišteni su komercijalni kontrolni uzorci koji sadrže HbA i HbA₂ u dvije razine - normalnoj i patološkoj (Normal HbA₂ Control i Pathological HbA₂ Control) te kontrolni uzorak koji sadrži hemoglobine A, F S i C (Hb AFSC Control). Za procjenu točnosti korišteni su rezultati analize kontrolnih uzoraka, dok je za provedbu usporedbe metoda korišteno 75 uzoraka krvi pacijenata za kvantifikaciju HbA i HbA₂ te 26 uzoraka za kvantifikaciju HbF. Uzorci su zaprimljeni u Odjel za elektroforetsku i imunokemijsku laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb. Za analizu su korišteni uzorci pune krvi uzorkovane u standardizirane epruvete s podtlakom za hematološke pretrage s K₂EDTA ili K₃EDTA kao antikoagulantom (Beckman Dickinson Vacutainer®, New Jersey, SAD). Uzorci za analizu su bili pohranjeni do analize na 2-8°C.

3.2. Kontrolni uzorci

1. Kontrolni uzorak HbA₂ unutar granica referentnog intervala (Normal HbA₂ Control) (Ref. 4778, LOT: 11021/xx)
2. Patološki HbA₂ kontrolni uzorak (Pathological HbA₂ Control) (Ref. 4779, LOT: 16049/xx)
3. Kontrolni uzorak koji sadrži hemoglobine A, F S i C (Hb AFSC Control) (Ref. 4792, LOT: 15109/xx)

Kontrolni uzorci namijenjeni su kontroli migracije prije pokretanja nove sekvence analize i poslije analize kompletnog nosača uzoraka te za kontrolu kvalitete kvantifikacije hemoglobina A₂ postupkom elektroforeze na sustavu miniCAP flex-piercing. Stabilizirani liofilizirani kontrolni uzorci se skladište na temperaturi 2-8°C, a stabilni su do isteka roka trajanja naznačenog na kutiji.

3.3. Reagensi i potrošni materijal

miniCAP hemoglobin(E) komplet reagensa se sastoji od:

1. pufer (2 bočice, 250 mL svaka) spreman za upotrebu; sastav: puferska otopina pH 9,4 ± 0,5
2. hemolizirajuća otopina (1 bočica, 225 mL) za razrjeđivanje i hemolizu eritrocita, spremna za upotrebu, sastav: puferska otopina pH 8,7 ± 0,5.

3. otopina za ispiranje kapilara prije i nakon elektroforeze (1 bočica, 25 mL). Bočicu osnovne otopine za ispiranje (25 mL) potrebno je razrijediti do 250 mL destiliranom ili deioniziranom vodom. Nakon razrjeđenja, otopina za ispiranje sadrži lužnatu otopinu pH ~ 12.
4. reagens čašice za jednokratnu upotrebu za pripremu bioloških uzoraka namijenjene analizi u automatiziranom sustavu. Jedna čašica reagensa namijenjena je analizi 2 uzorka. Komplet sadrži 1 paket od 125 reagens čašica.
5. filter za filtriranje pufera za analizu. Pri promjeni kompleta, potrebno je zamijeniti sve filtere. Komplet sadrži 3 filtera.
6. posuda namijenjena za automatizirano skupljanje korištenih reagens čašica (4 posude)
7. naljepnice za raspoznavanje epruvete s hemolizirajućom otopinom. Sadrže crtični kod za hemolizirajuću otopinu (5 listića, 4 naljepnice)

Ostali potrebni reagensi:

1. destilirana ili deionizirana voda za ispiranje kapilara u automatiziranom sustavu
2. miniCAP flex-piercing CAPICLEAN, otopina za čišćenje sonde za uzorke u automatiziranom sustavu; bočica koncentrirane otopine (25 mL) sadrži: proteolitičke enzime, tenzide i aditive koji nisu štetni u korištenim koncentracijama, a potrebni su za optimalan učinak
3. otopina natrijevog hipoklorita za čišćenje sonde za uzorkovanje; priprema se razrjeđivanjem 250 mL 9,6 % kloridne koncentrirane otopine hladnom destiliranom ili deioniziranom vodom do 1 L

3.4. Načelo metode i uvjeti provođenja elektroforeze

Sustav Sebia miniCAP flex-piercing je automatizirani sustav za kapilarnu elektroforezu koji koristi dvije staklene kapilare za višestruko i istovremeno elektroforetsko odvajanje velikom brzinom. Zahvaljujući paralelnom funkcioniranju kapilara istodobno se provode dvije separacijske analize hemoglobina. Sustav koristi metodu koja se može smatrati posrednom vrstom između klasične zonske elektroforeze i tekućinske kromatografije. Hemolizati eritrocita automatski se priređuju miješanjem uzorka s hemolizirajućom otopinom u samom analizatoru. Volumen uzorka pune krvi koji se aspirira je 20 µL. Razrijeđen uzorak se ubrizgava aspiracijom na anodnom kraju kapilare. Migracija se provodi pri konstantnom naponu u trajanju od 8 minuta. Po principu kapilarne zonske elektroforeze (Poglavlje 1.2.1.1.) nabijene se molekule razdvajaju prema njihovoj elektroforetskoj pokretljivosti (visoki napon od 9600 V) u lužnatom

puferu specifične pH vrijednosti. Na katodnom kraju kapilare detektiraju se hemoglobinske frakcije na valnoj duljini specifičnoj za apsorpciju hemoglobina (415 nm). Nakon završenoga elektroforetskog razdvajanja očitaju se relativne koncentracije (%) individualnih zona hemoglobina. Nakon analize kapilara se automatski ispire otopinom za ispiranje i priprema za novu analizu.

Elferogrami koji se dobiju vizualno se procjenjuju kako bi se ustanovile abnormalnosti obrazaca. Izravna detekcija omogućuje točnu relativnu kvantifikaciju pojedinačne hemoglobinske frakcije, a posebno je usmjerena na A2 hemoglobin zbog dijagnosticiranja β -talasemije. Isto tako, visoka rezolucija ovog postupka trebala bi omogućiti identifikaciju hemoglobinskih varijanti, i posebice razlučiti hemoglobine S od D te E od C. Primjenom lužnatog pH pufera, varijante hemoglobina detektiraju se sljedećim redoslijedom, od katode prema anodi: varijanta A2, C, A2/O-Arab, E, S, D, G-Philadelphia, F, A, Hope, Bart, J, N-Baltimore i H. Sustav je potpuno automatiziran - od začepljene, primarne epruvete s uzorkom sve do konačnog elektroforetskog profila: identifikacija uzorka (skeniranje crtičnog koda), razrjeđenje uzorka, čišćenje kapilara, injektiranje uzoraka u kapilare, migracija, detekcija, obrade rezultata i prijenosa rezultata na umreženo računalo (Matišić, 2015.).

3.5. Statistička obrada

Za prikaz rezultata i statističku obradu podataka korišteni su računalni programi Microsoft office Excel 2007 (Microsoft, SAD) i statistički program MedCalc verzija 17.2. (MedCalc Software, Ostend, Belgija). Uporabom programa Microsoft Office Excel 2007 obrađeni su podaci potrebni za ispitivanje preciznosti metode (ponovljivost i međupreciznost), a uporabom statističkog programa MedCalc te primjenom Passing Bablok regresijske analize podatci potrebni za procjenu točnosti i provedbu usporedbe metoda. Dobiveni podatci zatim su uspoređivani s kriterijima prihvatljivosti koje je deklarirao proizvođač.

3.6. Provođenje verifikacije

Prvi korak u postupku verifikacije je upoznavanje s analitičkim sustavom ili novom metodom pri čemu se postiže potrebno iskustvo da bi se verifikacija uspješno provela. Ovaj dio podrazumijeva provedbu edukacije voditelja ispitivanja i ostalog osoblja koje će biti zaduženo za rad na analitičkom sustavu ili novoj metodi. Uključivanje razdoblja upoznavanja u vremenski okvir provedbe postupka verifikacije ključno je za smisljeno ispitivanje preciznosti. Prije provedbe postupka potrebno je postaviti analitičke ciljeve tj. kriterije prihvatljivosti

metode i provesti unutarnju kontrolu kvalitete. Kriteriji za procjenu prihvatljivosti metode mogu biti deklarirani u uputama proizvođača, ali korisnik može definirati i strože kriterije. Drugi korak u postupku verifikacije je izrada plana verifikacije koji ovisi o vrsti analitičke metode (kvantitativna, polukvantitativna ili kvalitativna), namjeravanoj kliničkoj primjeni, raspoloživosti kontrolnih uzoraka i stabilnosti analita u biološkom materijalu. Nakon provedene verifikacije slijedi izrada izvještaja o verifikaciji koji uključuje ocjenjivanje, odobravanje i utvrđivanje prihvatljivosti analitičke metode za kliničku primjenu (Flegar Mešić Z., 2010.).

3.6.1. Ispitivanje preciznosti metode

Ispitivanje preciznosti metode provedeno je prema CLSI EP15-A3 protokolu (CLSI, 2014.). Korišteni su komercijalno dostupni kontrolni uzorci u dvije koncentracijske razine (Sebia, Lisses, Francuska) te kontrolni uzorak koji sadrži varijante hemoglobina A, F S i C. Svi kontrolni uzorci analizirani su prema osnovnom dizajnu CLSI protokola (5 x 5) - u peteroplikatu tijekom 5 radnih dana što daje ukupno 25 rezultata po uzorku.

Preciznost se izražava kao koeficijent varijacije koji govori o odnosu standardne devijacije prema aritmetičkoj sredini (koliko % od aritmetičke sredine iznosi standardna devijacija) (Bilić Zulle, 2006.). Dobivene vrijednosti zatim su uspoređivane s kriterijima prihvatljivosti koje je deklarirao proizvođač te je na temelju toga donesen zaključak o prihvatljivosti preciznosti metode i utvrđeno ima li metoda zadovoljavajuću ponovljivost i međupreciznost.

Izračun za ponovljivost (preciznost u seriji) predstavlja skupnu standardnu devijaciju izračunatu iz standardnih devijacija svakog dana tijekom 5 dana određivanja:

$$S_r = \sqrt{\frac{S_{d1}^2 + S_{d2}^2 + S_{d3}^2 + S_{d4}^2 + S_{d5}^2}{D}}$$

gdje su S_{d1} , S_{d2} , S_{d3} , S_{d4} , S_{d5} standardna odstupanja za svaku seriju određivanja, a D skupno standardno odstupanje (D za 5 dana iznosi 5)

Izračun za koeficijent varijacije:

$$KV (\%) = \frac{S_r}{\bar{x}} \times 100$$

gdje je $\bar{x}$ srednja vrijednost svih aritmetičkih sredina kroz 5 dana

Izračun za međupreciznost (preciznost iz dana u dan) predstavlja standardnu devijaciju izračunatu iz aritmetičkih sredina svakog dana određivanja:

$$S_b = \sqrt{\frac{\sum_{d=1}^D (\bar{x}_d - \bar{\bar{x}})^2}{D - 1}}$$

gdje je $\bar{x}_d$ aritmetička sredina svakog dana određivanja, a $\bar{\bar{x}}$ srednja vrijednost svih vrijednosti mjerenja tijekom 5 dana

Izračun za koeficijent varijacije:

$$KV (\%) = \frac{S_b}{\bar{\bar{x}}} \times 100$$

3.6.2. Procjena točnosti metode

Točnost je procijenjena usporedbom rezultata srednje vrijednosti svih mjerenja kontrolnih uzoraka kroz pet dana (grand mean) na novom sustavu za kapilarnu elektroforezu te je izražena kao odstupanje (bias). Dobiveni rezultati za bias zatim su uspoređivani s kriterijima prihvatljivosti koje je deklarirao proizvođač te je na temelju toga donesen zaključak o prihvatljivosti metode.

3.6.3. Usporedba rezultata s rutinskom metodom

Usporedba vrijednosti dvaju sustava provedena je usporedbom rezultata novog sustava za kapilarnu elektroforezu (miniCAP flex-piercing) s postojećim sustavom u laboratoriju (Capillars 2). Pri tom je korišteno 75 uzoraka bolesnika za kvantifikaciju HbA i HbA₂ te 26 uzoraka za kvantifikaciju HbF varijante hemoglobina.

Na temelju dobivenih podataka za usporedivost metode donosi se zaključak o postojanju konstantnog i/ili proporcionalnog odstupanja u izmjerenim vrijednostima dobivenima na novom u odnosu na stari sustav za kapilarnu elektroforezu te se procjenjuje odstupanje između metoda.

4. REZULTATI

4.1. Ispitivanje preciznosti

Tablica 1. Ispitivanje preciznosti frakcije HbA u kontrolnom uzorku Normal HbA₂ Control na Sebia miniCAP flex-piercing sustavu za kapilarnu elektroforezu

Kontroli uzorak	Normal HbA ₂ Control - HbA				
Dan	1	2	3	4	5
Mjerenje 1	97,30	97,30	97,20	97,30	97,30
Mjerenje 2	97,30	97,40	97,30	97,40	97,30
Mjerenje 3	97,30	97,30	97,30	97,30	97,40
Mjerenje 4	97,30	97,40	97,30	97,40	97,40
Mjerenje 5	97,30	97,30	97,30	97,30	97,30
Aritmetička sredina svake serije određivanja ($\bar{x}$)	97,30	97,34	97,28	97,34	97,34
Standardno odstupanje za svaku seriju određivanja ($S_{d1}, S_{d2}, S_{d3}, S_{d4}, S_{d5}$)	0,0000	0,0548	0,0447	0,0548	0,0548
PONOVLJIVOST (preciznost u seriji, S_r)	0,0469				
Koeficijent varijacije (KV%)	0,0482				
MEĐUPRECIZNOST (preciznost iz dana u dan) S_b	0,0283				
Koeficijent varijacije (KV%)	0,0291				

Tablica 2. Kriteriji prihvatljivosti za ponovljivost i međupreciznost frakcije HbA na Sebia miniCAP flex-piercing sustavu za kapilarnu elektroforezu

HbA	Kriteriji prihvatljivosti (%)
Ponovljivost	0,3
Međupreciznost	0,7

KV ostvareni tijekom ispitivanja preciznosti u laboratorijskim uvjetima za frakciju HbA u kontrolnom uzorku Normal HbA₂ Control zadovoljavaju postavljene kriterije prihvatljivosti. Ponovljivost (preciznost u seriji) iznosi 0,05%, a međupreciznost (preciznost iz dana u dan) 0,03%.

Tablica 3. Ispitivanje preciznosti frakcije HbA₂ u kontrolnom uzorku Normal HbA₂ Control na Sebia miniCAP flex-piercing sustavu za kapilarnu elektroforezu

Kontroli uzorak	Normal HbA ₂ Control - HbA ₂				
Dan	1	2	3	4	5
Mjerenje 1	2,70	2,70	2,80	2,70	2,70
Mjerenje 2	2,70	2,60	2,70	2,60	2,70
Mjerenje 3	2,70	2,70	2,70	2,70	2,60
Mjerenje 4	2,70	2,60	2,70	2,60	2,60
Mjerenje 5	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
Aritmetička sredina svake serije određivanja ($\bar{x}$)	2,70	2,66	2,72	2,66	2,66
Standardno odstupanje za svaku seriju određivanja ($S_{d1}, S_{d2}, S_{d3}, S_{d4}, S_{d5}$)	0,0000	0,0548	0,0447	0,0548	0,0548
PONOVLJIVOST (preciznost u seriji, S_r)	0,0469				
Koeficijent varijacije (KV%)	1,7502				
MEĐUPRECIZNOST (preciznost iz dana u dan) S_b	0,0283				
Koeficijent varijacije (KV%)	1,0554				

Tablica 4. Kriteriji prihvatljivosti za ponovljivost i međupreciznost frakcije HbA₂ na Sebia miniCAP flex-piercing sustavu za kapilarnu elektroforezu

HbA ₂	Kriteriji prihvatljivosti (%)
Ponovljivost	1,5
Međupreciznost	2,9

KV ostvaren tijekom ispitivanja ponovljivosti u laboratorijskim uvjetima za frakciju HbA₂ u kontrolnom uzorku Normal HbA₂ Control je za 0,25% viši od postavljenog kriterija prihvatljivosti. KV za međupreciznost zadovoljava postavljeni kriterij prihvatljivosti. Ponovljivost (preciznost u seriji) iznosi 1,75%, dok je međupreciznost (preciznost iz dana u dan) 1,06%.

Tablica 5. Ispitivanje preciznosti frakcije HbA u kontrolnom uzorku Pathological HbA₂ Control na Sebia miniCAP flex-piercing sustavu za kapilarnu elektroforezu

Kontroli uzorak	Pathological HbA ₂ Control - HbA				
Dan	1	2	3	4	5
Mjerenje 1	93,50	93,60	93,70	93,50	93,70
Mjerenje 2	93,80	93,70	93,80	93,60	93,80
Mjerenje 3	93,60	93,80	93,70	93,80	93,70
Mjerenje 4	93,70	93,80	93,80	93,90	93,90
Mjerenje 5	93,60	93,60	93,70	93,60	93,60
Aritmetička sredina svake serije određivanja ($\bar{x}$)	93,64	93,70	93,74	93,68	93,74
Standardno odstupanje za svaku seriju određivanja ($S_{d1}, S_{d2}, S_{d3}, S_{d4}, S_{d5}$)	0,1140	0,1000	0,0548	0,1643	0,1140
PONOVLJIVOST (preciznost u seriji, S_r)	0,1149				
Koeficijent varijacije (KV%)	0,1226				
MEĐUPRECIZNOST (preciznost iz dana u dan) S_b	0,0424				
Koeficijent varijacije (KV%)	0,0453				

Tablica 6. Kriteriji prihvatljivosti za ponovljivost i međupreciznost frakcije HbA na Sebia miniCAP flex-piercing sustavu za kapilarnu elektroforezu

HbA	Kriteriji prihvatljivosti (%)
Ponovljivost	0,3
Međupreciznost	0,7

KV ostvareni tijekom ispitivanja preciznosti u laboratorijskim uvjetima za frakciju HbA u kontrolnom uzorku Pathological HbA₂ Control zadovoljavaju postavljene kriterije prihvatljivosti. Ponovljivost (preciznost u seriji) iznosi 0,12%, a međupreciznost (preciznost iz dana u dan) 0,05%.

Tablica 7. Ispitivanje preciznosti frakcije HbA₂ u kontrolnom uzorku Pathological HbA₂ Control na Sebia miniCAP flex-piercing sustavu za kapilarnu elektroforezu

Kontroli uzorak	Pathological HbA ₂ Control - HbA ₂				
Dan	1	2	3	4	5
Mjerenje 1	6,50	6,40	6,30	6,50	6,30
Mjerenje 2	6,20	6,30	6,20	6,40	6,20
Mjerenje 3	6,40	6,20	6,30	6,20	6,30
Mjerenje 4	6,30	6,20	6,20	6,10	6,10
Mjerenje 5	6,40	6,40	6,30	6,40	6,40
Aritmetička sredina svake serije određivanja ($\bar{x}$)	6,36	6,30	6,26	6,32	6,26
Standardno odstupanje za svaku seriju određivanja ($S_{d1}, S_{d2}, S_{d3}, S_{d4}, S_{d5}$)	0,1140	0,1000	0,0548	0,1643	0,1140
PONOVLJIVOST (preciznost u seriji, S_r)	0,1149				
Koeficijent varijacije (KV%)	1,8237				
MEĐUPRECIZNOST (preciznost iz dana u dan) S_b	0,0424				
Koeficijent varijacije (KV%)	0,6734				

Tablica 8. Kriteriji prihvatljivosti za ponovljivost i međupreciznost frakcije HbA₂ na Sebia miniCAP flex-piercing sustavu za kapilarnu elektroforezu

HbA ₂	Kriteriji prihvatljivosti (%)
Ponovljivost	1,5
Međupreciznost	2,9

KV ostvaren tijekom ispitivanja ponovljivosti u laboratorijskim uvjetima za frakciju HbA₂ u kontrolnom uzorku Pathological HbA₂ Control je za 0,32% viši od postavljenog kriterija prihvatljivosti. KV za međupreciznost zadovoljava postavljeni kriterij prihvatljivosti. Ponovljivost (preciznost u seriji) iznosi 1,82%, a međupreciznost (preciznost iz dana u dan) iznosi 0,67%.

Tablica 9. Ispitivanje preciznosti frakcije HbA u kontrolnom uzorku Hb AFSC Control na Sebia miniCAP flex-piercing sustavu za kapilarnu elektroforezu

Kontroli uzorak	Hb AFSC Control - HbA				
Dan	1	2	3	4	5
Mjerenje 1	44,90	45,40	45,60	46,00	45,70
Mjerenje 2	45,10	45,60	45,50	45,60	45,70
Mjerenje 3	44,90	45,40	45,40	45,90	/
Mjerenje 4	45,10	45,30	45,40	45,80	/
Mjerenje 5	/	/	/	/	/
Aritmetička sredina svake serije određivanja ($\bar{x}$)	45,00	45,425	45,475	45,825	45,700
Standardno odstupanje za svaku seriju određivanja (s_{d1} , s_{d2} , s_{d3} , s_{d4} , s_{d5})	0,1155	0,1258	0,0957	0,1708	0,0000
PONOVLJIVOST (preciznost u seriji, S_r)	0,1162				
Koeficijent varijacije (KV%)	0,2554				
MEĐUPRECIZNOST (preciznost iz dana u dan) S_b	0,3176				
Koeficijent varijacije KV%	0,6987				

Tablica 10. Kriteriji prihvatljivosti za ponovljivost i međupreciznost frakcije HbA na Sebia miniCAP flex-piercing sustavu za kapilarnu elektroforezu

HbA	Kriteriji prihvatljivosti (%)
Ponovljivost	0,3
Međupreciznost	0,7

KV ostvareni tijekom ispitivanja preciznosti u laboratorijskim uvjetima za frakciju HbA u kontrolnom uzorku Hb AFSC Control zadovoljavaju postavljeni kriterij prihvatljivosti. Ponovljivost (preciznost u seriji) iznosi 0,26%, a međupreciznost (preciznost iz dana u dan) 0,70%.

Tablica 11. Ispitivanje preciznosti frakcije HbA₂ u kontrolnom uzorku Hb AFSC Control na Sebia miniCAP flex-piercing sustavu za kapilarnu elektroforezu

Kontroli uzorak	Hb AFSC Control - HbA ₂				
Dan	1	2	3	4	5
Mjerenje 1	2,80	2,70	2,70	2,60	2,90
Mjerenje 2	2,80	2,50	2,60	2,60	2,90
Mjerenje 3	2,90	2,70	2,60	2,50	/
Mjerenje 4	2,60	2,50	2,60	2,70	/
Mjerenje 5	/	/	/	/	/
Aritmetička sredina svake serije određivanja ($\bar{x}$)	2,775	2,600	2,625	2,600	2,900
Standardno odstupanje za svaku seriju određivanja (s_{d1} , s_{d2} , s_{d3} , s_{d4} , s_{d5})	0,1258	0,1155	0,0500	0,0816	0,0000
PONOVLJIVOST (preciznost u seriji, S_r)	0,0876				
Koeficijent varijacije (KV%)	3,2429				
MEĐUPRECIZNOST (preciznost iz dana u dan) S_b	0,1358				
Koeficijent varijacije KV%	5,0697				

Tablica 12. Kriteriji prihvatljivosti za ponovljivost i međupreciznost frakcije HbA₂ na Sebia miniCAP flex-piercing sustavu za kapilarnu elektroforezu

HbA ₂	Kriteriji prihvatljivosti (%)
Ponovljivost	1,5
Međupreciznost	2,9

KV ostvareni tijekom ispitivanja preciznosti u laboratorijskim uvjetima za frakciju HbA₂ u kontrolnom uzorku Hb AFSC Control su viši od postavljenih kriterija prihvatljivosti. Ponovljivost (preciznost u seriji) iznosi 3,24% i viša je za 1,74%, dok je međupreciznost (preciznost iz dana u dan) 5,07% i viša je za 2,17% od kriterija prihvatljivosti.

Tablica 13. Ispitivanje preciznosti frakcije HbF u kontrolnom uzorku Hb AFSC Control na Sebia miniCAP flex-piercing sustavu za kapilarnu elektroforezu

Kontroli uzorak	Hb AFSC Control - HbF				
Dan	1	2	3	4	5
Mjerenje 1	26,30	26,30	26,20	25,80	25,80
Mjerenje 2	26,10	26,30	26,20	26,00	26,00
Mjerenje 3	26,20	26,30	26,20	25,90	/
Mjerenje 4	26,20	26,30	26,20	26,00	/
Mjerenje 5	/	/	/	/	/
Aritmetička sredina svake serije određivanja ($\bar{x}$)	26,200	26,300	26,2	25,925	25,900
Standardno odstupanje za svaku seriju određivanja (s_{d1} , s_{d2} , s_{d3} , s_{d4} , s_{d5})	0,0816	0,0000	0,0000	0,0957	0,1414
PONOVLJIVOST (preciznost u seriji, S_r)	0,0847				
Koeficijent varijacije (KV%)	0,3243				
MEĐUPRECIZNOST (preciznost iz dana u dan) S_b	0,1824				
Koeficijent varijacije KV%	0,6981				

Tablica 14. Kriteriji prihvatljivosti za ponovljivost i međupreciznost frakcije HbF na Sebia miniCAP flex-piercing sustavu za kapilarnu elektroforezu

HbF	Kriteriji prihvatljivosti (%)
Ponovljivost	1,3
Međupreciznost	1,9

KV ostvareni tijekom ispitivanja preciznosti u laboratorijskim uvjetima za frakciju HbF u kontrolnom uzorku Hb AFSC Control zadovoljavaju postavljene kriterije prihvatljivosti. Ponovljivost (preciznost u seriji) iznosi 0,32%, a međupreciznost (preciznost iz dana u dan) 0,70% .

Tablica 15. Ispitivanje preciznosti frakcije HbS u kontrolnom uzorku Hb AFSC Control na Sebia miniCAP flex-piercing sustavu za kapilarnu elektroforezu

Kontroli uzorak	Hb AFSC Control - HbS				
Dan	1	2	3	4	5
Mjerenje 1	17,50	17,30	17,30	17,20	17,40
Mjerenje 2	17,50	17,10	17,20	17,20	17,20
Mjerenje 3	17,60	17,30	17,40	17,20	/
Mjerenje 4	17,40	17,30	17,30	17,10	/
Mjerenje 5	/	/	/	/	/
Aritmetička sredina svake serije određivanja ($\bar{x}$)	17,500	17,250	17,3	17,175	17,300
Standardno odstupanje za svaku seriju određivanja (s_{d1} , s_{d2} , s_{d3} , s_{d4} , s_{d5})	0,0816	0,1000	0,0816	0,0500	0,1414
PONOVLJIVOST (preciznost u seriji, S_r)	0,0957				
Koeficijent varijacije (KV%)	0,5533				
MEĐUPRECIZNOST (preciznost iz dana u dan) S_b	0,1204				
Koeficijent varijacije KV%	0,6958				

Tablica 16. Kriteriji prihvatljivosti za ponovljivost i međupreciznost frakcije HbS na Sebia miniCAP flex-piercing sustavu za kapilarnu elektroforezu

HbS	Kriteriji prihvatljivosti (%)
Ponovljivost	0,9
Međupreciznost	1,8

KV ostvareni tijekom ispitivanja preciznosti u laboratorijskim uvjetima za frakciju HbS u kontrolnom uzorku Hb AFSC Control zadovoljavaju postavljene kriterije prihvatljivosti. Ponovljivost (preciznost u seriji) iznosi 0,55%, a međupreciznost (preciznost iz dana u dan) 0,70%.

Tablica 17. Ispitivanje preciznosti frakcije HbC u kontrolnom uzorku Hb AFSC Control na Sebia miniCAP flex-piercing sustavu za kapilarnu elektroforezu

Kontroli uzorak	Hb AFSC Control - HbC				
Dan	1	2	3	4	5
Mjerenje 1	8,50	8,30	8,20	8,40	8,20
Mjerenje 2	8,50	8,50	8,50	8,60	8,20
Mjerenje 3	8,40	8,30	8,40	8,50	/
Mjerenje 4	8,70	8,60	8,50	8,40	/
Mjerenje 5	/	/	/	/	/
Aritmetička sredina svake serije određivanja ($\bar{x}$)	8,525	8,425	8,4	8,475	8,200
Standardno odstupanje za svaku seriju određivanja (s_{d1} , s_{d2} , s_{d3} , s_{d4} , s_{d5})	0,1258	0,1500	0,1414	0,0957	0,0000
PONOVLJIVOST (preciznost u seriji, S_r)	0,1162				
Koeficijent varijacije (KV%)	1,3824				
MEĐUPRECIZNOST (preciznost iz dana u dan) S_b	0,1268				
Koeficijent varijacije (KV%)	1,5049				

Tablica 18. Kriteriji prihvatljivosti za ponovljivost i međupreciznost frakcije HbC na Sebia miniCAP flex-piercing sustavu za kapilarnu elektroforezu

HbC	Kriteriji prihvatljivosti (%)
Ponovljivost	1,2
Međupreciznost	3,2

KV ostvaren tijekom ispitivanja ponovljivosti u laboratorijskim uvjetima za frakciju HbC u kontrolnom uzorku Hb AFSC Control je za 0,18% viši od kriterija prihvatljivosti. KV za međupreciznost zadovoljava postavljeni kriterij prihvatljivosti. Ponovljivost (preciznost u seriji) iznosi 1,38% , dok je međupreciznost (preciznost iz dana u dan) 1,50%

4.2. Procjena točnosti

Tablica 19. Procjena točnosti na miniCAP flex-piercing sustavu za kapilarnu elektroforezu

Kontrolni uzorak	Ciljne vrijednosti proizvođača	$\bar{x}$ (grand mean)	Odstupanje (%)	Kriterij prihvatljivosti proizvođača
Normal HbA ₂ Control HbA	97,4	97,3	0,1	0,5
Normal HbA ₂ Control HbA ₂	2,6	2,7	3,8	19,2
Pathological HbA ₂ Control HbA	93,7	93,7	0	1,0
Pathological HbA ₂ Control HbA ₂	6,3	6,3	0	14,3
Hb AFSC Control - HbA	45,1	45,5	0,9	4,5
Hb AFSC Control - HbA ₂	2,8	2,7	3,6	10,0
Hb AFSC Control - HbF	26,7	26,1	2,2	10,1
Hb AFSC Control - HbS	17,0	17,3	1,8	14,1
Hb AFSC Control - HbC	8,4	8,4	0	16,7

* $\bar{x}$ (grand mean) - srednja vrijednost svih vrijednosti mjerenja tijekom 5 dana

Ostvarena odstupanja procjene točnosti svih ispitivanih frakcija hemoglobina u kontrolnim uzorcima Normal HbA₂ Control, Pathological HbA₂ Control i Hb AFSC Control zadovoljavaju postavljene kriterije prihvatljivosti.

4.3. Usporedba rezultata s rutinskom metodom

PASSING-BABLOK REGRESIJSKA ANALIZA ZA HbA:

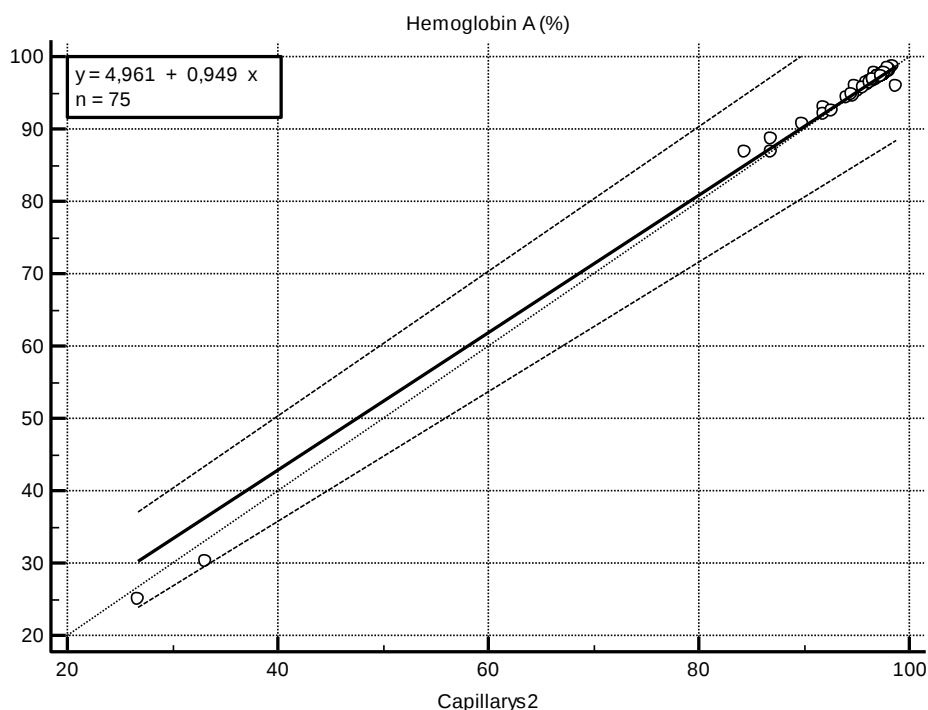
Varijabla x: Capillarys 2

Varijabla y: miniCAP flex-piercing

Broj uzoraka: 75 (min 26,7%, max 98,7%)

Tablica 20. Passing Bablok regresijska analiza za frakciju HbA dobivena korištenjem MedCalc programa

y = 4,961017 + 0,949153 x	
Konstantno odstupanje	
Odsječak na osi y (A)	4,9610
95% CI	0,0000 to 10,2421
Proporcionalno odstupanje	
Nagib pravca (B)	0,9492
95% CI	0,8947 to 1,0000
Cusum test linearnosti	Nema značajnog odstupanja od linearnosti (P=0,07)



Slika 3. Passing Bablok regresijska analiza ukazuje na odsutnost konstantnog i proporcionalnog odstupanja u rezultatima. Cusumov test ne prikazuje postojanje značajnog odstupanja linearnog odnosa Capillarys 2 i miniCAP flex-piercing sustava za kapilarnu elektroforezu.

PASSING-BABLOK REGRESIJSKA ANALIZA ZA HbA₂:

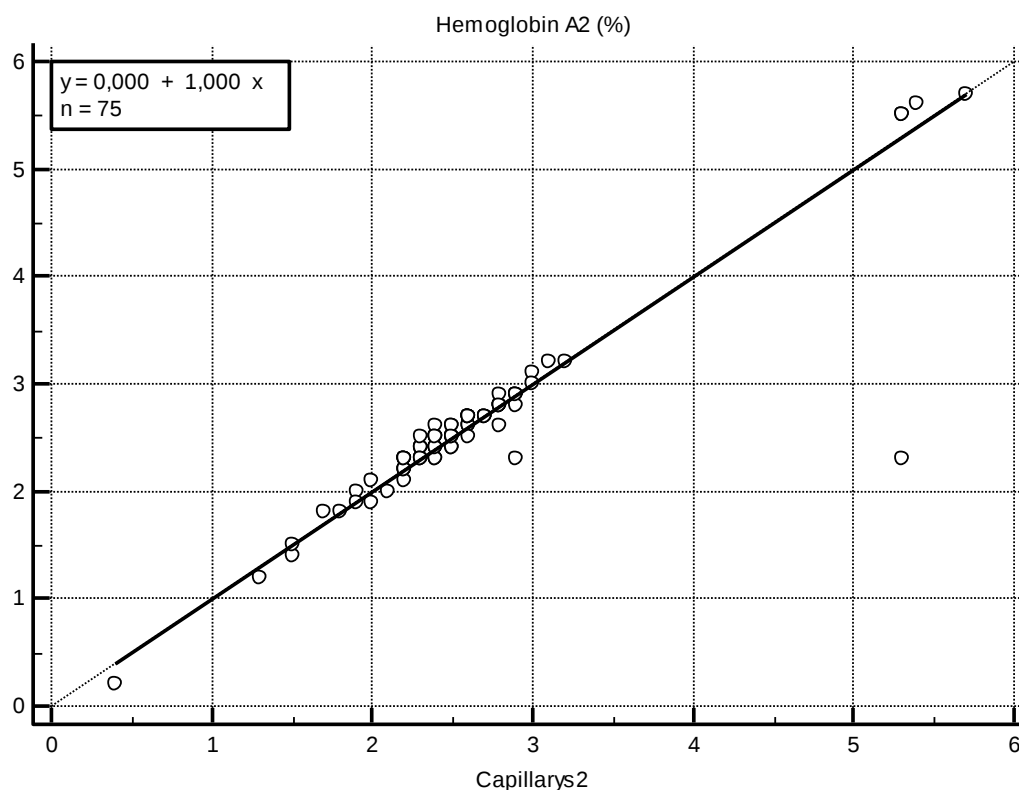
Varijabla x: Capillarys 2

Varijabla y: miniCAP flex-piercing

Broj uzoraka: 75 (min 0,4%, max 5,7%)

Tablica 21. Passing Bablok regresijska analiza za frakciju HbA₂ dobivena korištenjem MedCalc programa

y = 0,000000 + 1,000000 x	
Konstantno odstupanje	
Odsječak na osi y (A)	0,0000
95% CI	-4,885 x 10 ⁻¹⁵ do 0,0000
Proporcionalno odstupanje	
Nagib pravca (B)	1,0000
95% CI	1,0000 do 1,0000
Cusum test linearnosti	Nema značajnog odstupanja od linearnosti (P=0,33)



Slika 4. Passing Bablok regresijska analiza ukazuje na odsutnost konstantnog i proporcionalno odstupanje u rezultatima. Cusumov test ne prikazuje postojanje značajnog odstupanja linearnog odnosa Capillarys 2 i miniCAP flex-piercing sustava za kapilarnu elektroforezu.

PASSING-BABLOK REGRESIJSKA ANALIZA ZA HbF:

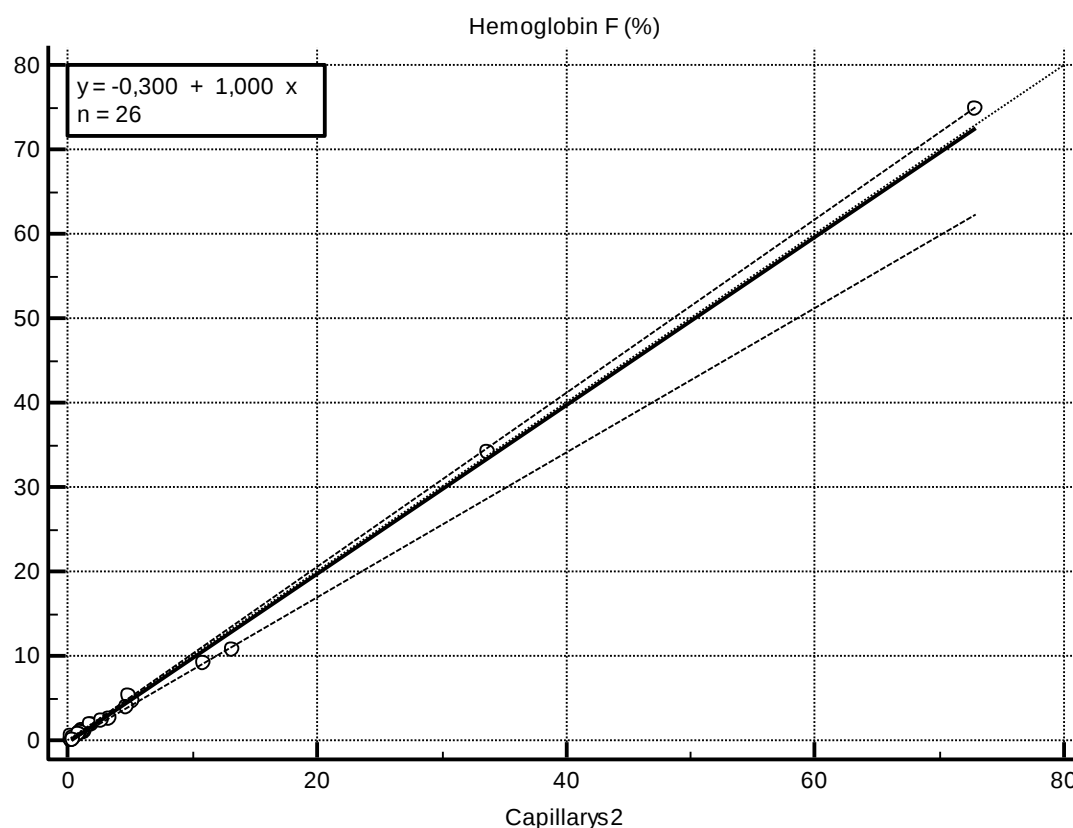
Varijabla x: Capillarys 2

Varijabla y: miniCAP flex-piercing

Broj uzoraka: 26 (min 0,3%, max 72,9%)

Tablica 22. Passing Bablok regresijska analiza za frakciju HbF dobivena korištenjem MedCalc programa

y = -0,300000 + 1,000000 x	
Konstantno odstupanje	
Odsječak na osi y (A)	-0,3000
95% CI	-0,3249 to -0,1439
Proporcionalno odstupanje	
Nagib pravca (B)	1,0000
95% CI	0,8585 to 1,0293
Cusum test linearnosti	Nema značajnog odstupanja od linearnosti (P=0,39)



Slika 5. Passing Bablok regresijska analiza ukazuje na postojanje manjeg konstantnog odstupanja, dok proporcionalno odstupanje nije nađeno između miniCAP flex-piercing i Capillarys 2 sustava za kapilarnu elektroforezu. Cusumov test ne prikazuje postojanje značajnog odstupanja linearnog odnosa dvaju sustava.

5. RASPRAVA

Prije uvođenja nove metode ili analizatora u rutinski rad nužno je provesti odgovarajuću verifikaciju. Verifikacija novog sustava za kapilarnu elektroforezu, miniCAP flex-piercing, obuhvatila je ispitivanje nekoliko analitičkih značajki metoda: ispitivanje preciznosti (ponovljivost i međupreciznost), procjenu točnosti i usporedbu s rezultatima sustava u rutinskom radu. Budući da se radi o pretrazi kojom se relativno kvantificiraju frakcije hemoglobina, ispitivanje mjernog raspona nije primjenjivo. Cilj provođenja verifikacije bio je ocijeniti analitičke karakteristike novog sustava te procijeniti može li novi sustav za kapilarnu elektroforezu zamijeniti postojeći sustav u laboratorijskom radu.

Rezultati ispitivanja preciznosti za sva tri kontrolna uzorka, prikazani su kao koeficijenti varijacije za ponovljivost (preciznost u seriji) i međupreciznost (preciznost iz dana u dan). Dobivene vrijednosti KV uspoređene su s KV dobivenim tijekom validacije metode od strane proizvođača. Ispitivanje preciznosti na kontrolnom uzorku Hb AFSC Control provedeno je na 18 rezultata mjerenja za svaku varijantu hemoglobina, zbog malog volumena kontrolnog materijala (1mL).

Ostvareni KV za frakciju HbA u svim kontrolnim uzorcima zadovoljavaju postavljene kriterije prihvatljivosti, i za ponovljivost i za međupreciznost. Također, verifikacijom su potvrđeni svi navodi proizvođača o preciznosti za frakcije HbF i HbS. Nešto više vrijednosti KV ponovljivosti od navedene nađene su u frakciji HbA₂, kao i HbC. Najviši ostvareni KV ponovljivosti bio je 3,24%. Niti jedan KV ponovljivosti nije premašio 5%, što se smatra prihvatljivom varijacijom za relativnu kvantifikaciju frakcija kapilarnom elektroforezom.

Jedini KV za međupreciznost koji nije zadovoljio postavljeni kriterij dobiven je analizom kontrolnog uzorka s najnižim udjelom frakcije HbA₂, Hb AFSC Control.

Rezultati ispitivanja preciznosti upućuju na to da je veća nepreciznost moguća u relativnoj kvantifikaciji frakcija udjela manjeg od 10%. Logično, manje vrijednosti, posljedično dovode do izračuna većih varijacija.

S obzirom da su rezultati većine provedenih mjerenja za sva tri kontrolna uzorka unutar kriterija prihvatljivosti proizvođača, a uočena odstupanja očekivana, može se zaključiti da novi sustav za kapilarnu elektroforezu miniCAP flex-piercing ima zadovoljavajuću ponovljivost i međupreciznost.

Rezultati procjene točnosti prikazani su kao odstupanje (bias). Dobivene vrijednosti za bias uspoređene su s kriterijima prihvatljivosti koje je deklarirao proizvođač te je na temelju toga donesen zaključak o prihvatljivosti metode.

Verifikacijom su potvrđeni svi navodi proizvođača za ostvareni bias za frakcije HbA, HbA₂, HbF, HbS i HbC u svim kontrolnim uzorcima.

Usporedba dvaju sustava za kapilarnu elektroforezu provedena je analizom 75 uzoraka bolesnika za HbA i HbA₂ te 26 uzoraka za HbF najprije na postojećem (Capillarys 2), a zatim na novom (miniCAP flex-piercing) sustavu za kapilarnu elektroforezu. Između rezultata frakcija HbA i HbA₂ nije detektirano ni konstantno ni proporcionalno odstupanje. Iz Passing Bablok regresijske analize vidljivo je postojanje manjeg konstantnog odstupanja u vrijednostima HbF tj. uočeno je da novi sustav za kapilarnu elektroforezu mjeri nešto niže vrijednosti od starog sustava. Provedeno istraživanje obuhvatilo je široki raspon udjela frakcije HbF (0,3-72,9%). Detektirano odstupanje nije klinički značajno pa neće imati utjecaj na rezultat za bolesnika tj. ne može se zaključiti da su metode neusporedive na temelju postojanja ovog odstupanja. Na temelju dobivenih rezultata, može se zaključiti da su miniCAP flex-piercing i Capillarys 2 sustav za kapilarnu elektroforezu međusobno usporedivi za provođenje elektroforeze hemoglobina.

Cusumov test linearnosti, nakon upotrebe Passing-Bablok regresijske metode, koji se koristi za procjenu valjanosti linearnog modela, pokazao je da nema značajnog odstupanja u linearnom odnosu između kvantifikacije varijanti hemoglobina na miniCAP flex-piercing i Capillarys 2 sustavu.

Također, miniCAP flex-piercing ima dodatne prednosti pred Capillarys 2 sustavom za kapilarnu elektroforezu. MiniCAP ne zahtijeva pripremu hemolizata uzorka pune krvi, već je sustav u potpunosti automatiziran te se hemolizat priprema neposredno prije provođenja analize u samom uređaju. Isto tako, miniCAP ne zahtijeva otvaranje primarne epruvete prije analize već se ona provodi iz primarne zatvorene epruvete.

Pregledom dostupnih literaturnih podataka, pronađena je studija provedene verifikacije analitičkih značajki miniCAP flex-piercing sustava za detekciju neuobičajenih hemoglobinskih frakcija kao i studija u kojoj je provedena usporedba kapilarne elektroforeze s jednim (Keren i sur., 2008.) ili dva (Oyaert i sur., 2015.) HPLC sustava. U prvoj studiji (Oyaert i sur., 2015.) korišteni su uzorci pune krvi uzorkovane u standardizirane epruvete za hematološke pretrage s EDTA kao antikoagulantom te ostaci uzoraka krvi iz pupkovine. Provedena je relativna

kvantifikacija frakcija HbA₂, HbF i HbS na Sebia miniCAP sustavu kapilarnom elektroforezom te na dva sustava koja rade na principu tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti. Dobiveni rezultati pokazali su zadovoljavajuću međupreciznost i ponovljivost na miniCAP sustavu za elektroforezu. Usporedba kapilarne elektroforeze na miniCAP sustavu s dva HPLC sustava također je pokazala zadovoljavajuće rezultate. Korišteni su uzorci niske i visoke relativne koncentracije HbA₂ i HbF. Iako je usporedba triju sustava zadovoljavajuća, dobivene su nešto više vrijednosti relativne kvantifikacije HbA₂ na miniCAP sustavu kod zdravih pojedinaca. Također je zaključeno da obje korištene HPLC metode imaju ograničenu linearnost za frakciju HbF. HPLC sustav ima veću preciznost i mogućnost detekcije velikog broja varijanti, ali interpretacija rezultata može biti prezahtjevna za uvođenje ove metode u rutinski rad laboratorija. Isti zaključci su izvedeni u drugoj studiji (Keren i sur., 2018.) usporedbe Capillary sustava za kapilarnu elektroforezu s HPLC sustavom.

6. ZAKLJUČAK

Provedbom verifikacije Sebia miniCAP flex-piercing sustava za kapilarnu elektroforezu, statističkom obradom i pregledom rezultata, doneseni su sljedeći zaključci.

1. Novi sustav osigurava bolju zaštitu osoblja od kontakta s biološkim materijalom te automatizira postupak pripreme uzorka za analizu.
2. Ispitivani sustav za kapilarnu elektroforezu miniCAP flex-piercing omogućava razdvajanje najčešćih varijanti hemoglobina: A, F, S, C i A2.
3. U laboratoriju je moguće ostvariti navedene analitičke karakteristike proizvođača ispitivanog uređaja.
4. Ostvarena ponovljivost i međupreciznost osiguravaju prihvatljivu preciznost kvantifikacije varijanti hemoglobina A, F, S, C i A2.
5. Rezultati procjene točnosti na miniCAP flex-piercing sustavu za kapilarnu elektroforezu su unutar prihvatljivih vrijednosti kontrolnih uzoraka navedenih od proizvođača.
6. Passing Bablok regresijskom analizom utvrđeno je postojanje manjeg konstantnog odstupanja za HbF, odnosno uočeno je da novi sustav mjeri niže vrijednosti HbF u odnosu na postojeći, međutim, to odstupanje nije klinički značajno pa se navedeni sustavi za kapilarnu elektroforezu smatraju međusobno usporedivim za sve tri uspoređivane varijante hemoglobina.
7. Novi sustav zadovoljava postavljene kriterije za uvođenje u rutinsku primjenu u laboratoriju, a zamjena postojećeg sustava novim neće utjecati na rezultate analize bolesnika.

7. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

CC - kromatografija na koloni; engl. *Column Chromatography*

CI - interval pouzdanosti; engl. *Confidence Interval*

CLSI - Institut za kliničke i laboratorijske standarde; engl. *Clinical and Laboratory Standards Institute*

Cusum - test za procjenu valjanosti linearnog modela; engl. *Cumulative Sum*

CZE - kapilarna zonska elektroforeza; engl. *Capillary Zone Electrophoresis* ili kapilarna elektroforeza slobodne otopine; engl. *Free Solution Capillary Electrophoresis*

D - skupno standardno odstupanje

EOF - elektroosmotski tok; engl. *Electroosmotic Flow*

Fe²⁺ - divalentni ion željeza

GC - plinska kromatografija; engl. *Gas Chromatography*

Hb - hemoglobin

HPLC - tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti; engl. *High Performance Liquid Chromatography*

K₂EDTA/K₃EDTA - etilendiamintetraoctena kiselina; engl. *Ethylenediaminetetraacetic Acid*

kV – kilovolt, mjerna jedinica

KV% - koeficijent varijacije; engl. *Variation Coefficient*

LC - tekućinska kromatografija u koloni; engl. *Liquid Chromatography*

LPLC - niskotlačna tekućinska kromatografija; engl. *Low Pressure Liquid Chromatography*

PC - kromatografija na papiru; engl. *Paper Chromatography*

pI - izoelektrična točka; engl. *Isoelectric Point*

QC - kontrola kvalitete; engl. *Quality Control*

S_b - međupreciznost (preciznost iz dana u dan); engl. *Intermediate Precision*

S_r - ponovljivost (preciznost u seriji); engl. *Repeatability*

$Sd_1, Sd_2, Sd_3, Sd_4, Sd_5$ - standardna odstupanja za svaku seriju određivanja

SFC - kromatografija superkritičnim fluidom; engl. *Supercritical Fluid Chromatography*

TAT - vrijeme od primitka zahtjeva do izdavanja nalaza; engl. *Turn Around Time*

TLC - tankoslojna kromatografija; engl. *Thin-layer Chromatograph*

UV - ultraljubičasto svjetlo; engl. *Ultra Violet*

$\overline{x_d}$ - aritmetička sredina svakog dana određivanja

$\overline{x}$ - srednja vrijednost svih aritmetičkih sredina kroz 5 dana

$\bar{\bar{x}}$ - srednja vrijednost svih vrijednosti mjerenja tijekom 5 dana

α - grčko slovo alfa

β - grčko slovo beta

γ - grčko slovo gama

δ - grčko slovo delta

ε - grčko slovo epsilon

ζ - grčko slovo zeta

8. LITERATURA

Anemija srpastih stanica, 2018., <https://www.hemed.hr/Default.aspx?sid=14354>, pristupljeno 12.6.2022.

Bilić-Zulle L. Analitička evaluacija metoda. U: Osnove biostatistike u svakodnevnoj praksi. Priručnik za trajno usavršavanje Šimundić A.M., urednica, Zagreb, Medicinska naklada, 2008., str. 57-65.

Bilić-Zulle L. Comparison of method: Passing and Bablok regression. *Biochem. Med.*, 2011., 21, 49-52.

CLSI. User Verification of Precision and Estimation of Bias; Approved Guideline - Third Edition. CLSI document EP15-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.

Čvorišćec D, Čepelak I. Štrausova medicinska biokemija. Zagreb, Medicinska naklada, 2009., str. 198-199., 202., 222., 232., 236-237., 239-240.

Damić M, Nigović B. Kapilarna elektroforeza u farmaciji. *Farm. Glas.*, 2010., 66, 195-207.

Flegar Meštić Z. Postupci ispitivanja (5.5.) - kratka analitička validacija. U: Akreditacija medicinsko biokemijskog laboratorija priručnik. Galjanić S, Vukasinović I, Flegar Meštić Z, urednici, Zagreb, Medicinska biokemija, 2010., str. 123-133.

Gamulin S, Marušić M, Kovač Z i suradnici. Patofiziologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2005. str. 151., 776, 777.

Grgić Z. Odabir, verifikacija i validacija laboratorijskih metoda. *Svijet po mjeri*, 2019., 1, 3-6.

Hemoglobin, 2020., <https://www.britannica.com/science/hemoglobin>, pristupljeno 17.6.2022.

Keren D. F, Hedstrom D, Gulbranson R, Ou C-N, Bak R. Comparison of Sebia Capillarys capillary electrophoresis with the Primus high-pressure liquid chromatography in the evaluation of hemoglobinopathies. *Am J Clin Pathol*, 2008., 130, 824-831.

Kljaić O.G, Kromatografske metode, Predavanje, kolegij: Analitička biokemija, Merlin 19/20, Zagreb, 2019.

Kohne E. Hemoglobinopathies. U: Clinical laboratory diagnostics: use and assessment of clinical laboratory results. Lothar Thomas, Frankfurt/Main, TH-Books-Verlagsgesellschaft, 1998., str. 486-493.

- Kohne E. Hemoglobinopathies: clinical manifestations, diagnosis, and treatment. Dtsch Arztebl Int. 2011., 108, 532-40.
- Labar B. Hematologija. Zagreb, Školska knjiga, 2017., str. 28-29., 32, 167, 169, 171-173.
- Lauer H.H, Rozing G.P. High performance capillary electrophoresis, Germany, Agilent Technologies, 2014., str. 5-7.
- Matišić D. Kapilarna zonska elektroforeza. U: Biokemijske metode u biomedicinskim istraživanjima. Lovrić J, Rogić D, urednice, Zagreb, Medicinska naklada, 2015., 107-115.
- Matišić D. Primjena automatiziranih elektroforetskih metoda visoke djelotvornosti u kliničkom laboratoriju, U: Elektroforeza hemoglobina kapilarnom zonskom elektroforezom. Matišić D, urednica, Zagreb, Medicinska naklada, 2011., str. 15-27.
- McKenzie S.B, Landis-Piowar K., Williams J.L. Clinical laboratory hematology. SAD, Pearson CSC, 2020., str 89-96., 267-271.
- Oyaert M, Van Laer C, Claerhout H, Vermeersch P, Desmet K, Pauwels S, Kiffer D. Evaluation of the Sebia miniCAP flex-piercing capillary electrophoresis for hemoglobinopathy testing, International Journal of Laboratory Hematology, 2015., 37, 420-425.
- Saračević A. Validacija i verifikacija metoda. U: Upravljanje kvalitetom laboratorijskog rada. Šimundić AM, Zagreb, Medicinska naklada, 2013., str. 7-20.
- Sebia, MiniCAP Hemoglobin (E), Ref. 2207. Upute proizvođača za Sebia miniCAP flex-piercing, instrukcijski list 2020/07
- Šimundić A.M., urednica, Upravljanje kvalitetom laboratorijskog rada. Priručnik za trajno usavršavanje. Zagreb, Medicinska naklada, 2013.
- Skoog D.A, West D.M, Holler F.J, Crouch S.R. Fundamentals of Analytical Chemistry. Belmont, SAD, Brooks/Cole, 2014., str. 935.
- Tietz. Fundamentals of Clinical Chemistry. St. Louis, Missouri, SAD, Saunders Elsevier, 2008., str. 102-103.
- Topić E, Primorac D, Janković S, Štefanović M i suradnici. Medicinska biokemija i laboratorijska medicina u kliničkoj praksi. Zagreb, Medicinska naklada, 2018., str. 91., 95-97., 102., 418., 421-424.

Vuljanić D. Usporedba kvantitativnih metoda - verifikacija, Seminar, kolegij: Evaluacija instrumenata postupaka i reagensa, Merlin 21/22, Zagreb, 2021.

Watson D.G. Pharmaceutical Analysis. Churchill Livingstone Elsevier, Edinburgh, 2012., str. 376-397.

Wilson K, Walker J. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. New York, SAD, Cambridge University Press, 2010. str. 433-434., 446.

9. SAŽETAK/SUMMARY

SAŽETAK

U medicinsko-biokemijskom laboratoriju svaki analitički uređaj prije puštanja u rutinski rad mora proći postupak verifikacije odnosno validacije kojim se procjenjuje njegova primjenjivost za predviđeni mjerni postupak. Najčešće se verificiraju analitičke karakteristike uređaja koje je proizvođač ostvario tijekom tvorničke validacije, preciznost, točnost, mjerni raspon, ali i usporedivost s eventualno prethodno korištenim sustavom kako bi se procijenio utjecaj promjene analitičkog sustava na kliničku odluku. Elektroforezom hemoglobina moguće je detektirati kvalitativne i kvantitativne poremećaje u sintezi globinskih lanaca te se danas u kliničkim laboratorijima dijagnostika hemoglobinopatija najčešće provodi koristeći automatiziranu metodologiju kapilarne zonske elektroforeze. Cilj ovog rada bio je verificirati analitičke karakteristike sustava miniCAP flex-piercing prije puštanja u rutinski rad. Sustav koristi dvije kapilare, u kojima se tijekom 8 minuta na 9600V pri pH 6,8 razdvajaju varijante hemoglobina. U zdravih odraslih ispitanika hemoglobin čine HbA i HbA₂, dok u novorođenčadi nalazimo i HbF. Verifikacija je provedena prema CLSI EP15-A3 dokumentu koristeći tri različita kontrolna uzorka koja su uključivala različite varijante hemoglobina (HbA, HbF, HbS, HbC i HbA₂). Ostvareni rezultati za preciznost i točnost u skladu su s navodima proizvođača. Usporedba rezultata sa sustavom koji se trenutno koristi u rutinskom radu, Capillarys 2, ukazala je na izvrsnu usporedivost rezultata. Manje konstantno odstupanje u vrijednostima HbF može se objasniti širokim rasponom vrijednosti koje su obuhvaćene ovom verifikacijom. Rezultati verifikacije ukazuju da ispitivani analitički sustav za kapilarnu elektroforezu hemoglobina, miniCAP flex piercing zadovoljava postavljene kriterije prihvatljivosti te se može koristiti u rutinskom laboratorijskom radu. Kao dodatna vrijednost korištenja ovog uređaja prepoznata je mogućnost provođenja analize iz začepljene primarne epruvete čime je unaprijeđena sigurnost tehničkog osoblja u laboratorijskim uvjetima.

SUMMARY

In a medical-biochemical laboratory, each analytical device must undergo a verification or validation procedure before being put into routine operation, which assesses its applicability for the intended measurement procedure. Most often, the analytical characteristics of the device that the manufacturer achieved during factory validation, precision, accuracy, measuring range, but also comparison with a possibly previously used system are verified in order to assess the impact of changing the analytical system on the clinical decision. With hemoglobin electrophoresis, it is possible to detect qualitative and quantitative disorders in the synthesis of globin chains, and nowadays in clinical laboratories diagnostics of hemoglobinopathy is most often carried out using the automated capillary zone electrophoresis. The aim of this study was to evaluate analytical performance of the miniCAP flex piercing system before putting it into routine operation. The system uses two capillaries, in which hemoglobin variants are separated for 8 minutes at 9600V and pH 6.8. In healthy adult subjects, hemoglobin consists of HbA and HbA₂, while in newborns we also find HbF. Evaluation was performed according to the CLSI EP15-A3 document using three different control samples that included different hemoglobin variants (HbA, HbF, HbS, HbC and HbA₂). The achieved results for precision and accuracy are in accordance with the manufacturer's specifications. Comparison of the results with the system currently used in routine work, Capillarys 2, indicated excellent correlation between results. A smaller constant deviation in HbF values can be explained by the wide range of values covered by this evaluation. Evaluation results show that the tested analytical system for capillary electrophoresis of hemoglobin, miniCAP flex piercing meets the set acceptance criteria and can be used in routine laboratory work. As an additional value of using this device, the possibility of conducting analysis from a blocked primary test tube was recognized, which improved the safety of technician in laboratory conditions.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Specijalna područja kliničke biokemije
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska
Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Zagreb
Kišpatićeva 12, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Verifikacija kapilarne elektroforeze hemoglobina na uređaju miniCAP flex-piercing

Nives Benček

SAŽETAK

U medicinsko-biokemijskom laboratoriju svaki analitički uređaj prije puštanja u rutinski rad mora proći postupak verifikacije odnosno validacije kojim se procjenjuje njegova primjenjivost za predviđeni mjerni postupak. Najčešće se verificiraju analitičke karakteristike uređaja koje je proizvođač ostvario tijekom tvorničke validacije, preciznost, točnost, mjerni raspon, ali i usporedivost s eventualno prethodno korištenim sustavom kako bi se procijenio utjecaj promjene analitičkog sustava na kliničku odluku. Elektroforezom hemoglobina moguće je detektirati kvalitativne i kvantitativne poremećaje u sintezi globinskih lanaca te se danas u kliničkim laboratorijima dijagnostika hemoglobinopatija najčešće provodi koristeći automatiziranu metodologiju kapilarne zonske elektroforeze. Cilj ovog rada bio je verificirati analitičke karakteristike sustava miniCAP flex-piercing prije puštanja u rutinski rad. Sustav koristi dvije kapilare, u kojima se tijekom 8 minuta na 9600V pri pH 6,8 razdvajaju varijante hemoglobina. U zdravih odraslih ispitanika hemoglobin čine HbA i HbA₂, dok u novorođenčadi nalazimo i HbF. Verifikacija je provedena prema CLSI EP15-A3 dokumentu koristeći tri različita kontrolna uzorka koja su uključivala različite varijante hemoglobina (HbA, HbF, HbS, HbC i HbA₂). Ostvareni rezultati za preciznost i točnost u skladu su s navodima proizvođača. Usporedba rezultata sa sustavom koji se trenutno koristi u rutinskom radu, Capillarys 2, ukazala je na izvrsnu usporedivost rezultata. Manje konstantno odstupanje u vrijednostima HbF može se objasniti širokim rasponom vrijednosti koje su obuhvaćene ovom verifikacijom. Rezultati verifikacije ukazuju da ispitivani analitički sustav za kapilarnu elektroforezu hemoglobina, miniCAP flex piercing zadovoljava postavljene kriterije prihvatljivosti te se može koristiti u rutinskom laboratorijskom radu. Kao dodatna vrijednost korištenja ovog uređaja prepoznata je mogućnost provođenja analize iz začepljene primarne epruvete čime je unaprijeđena sigurnost tehničkog osoblja u laboratorijskim uvjetima.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 49 stranica, 5 grafičkih prikaza, 22 tablice i 29 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Verifikacija, miniCAP flex-piercing, Capillarys 2, preciznost, točnost, usporedba dvije metode.

Mentor: **Dr. sc. Dunja Rogić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Dunja Rogić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Željka Vogrinc, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: srpanj 2022.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medical Biochemistry
Special areas of clinical biochemistry
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia
Department of Laboratory Diagnostics, University Hospital
Centre Zagreb
Kišpatićeva 12, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Evaluation of the Sebia MiniCAP Flex Piercing Capillary Electrophoresis System

Nives Benček

SUMMARY

In a medical-biochemical laboratory, each analytical device must undergo a verification or validation procedure before being put into routine operation, which assesses its applicability for the intended measurement procedure. Most often, the analytical characteristics of the device that the manufacturer achieved during factory validation, precision, accuracy, measuring range, but also comparison with a possibly previously used system are verified in order to assess the impact of changing the analytical system on the clinical decision. With hemoglobin electrophoresis, it is possible to detect qualitative and quantitative disorders in the synthesis of globin chains, and nowadays in clinical laboratories diagnostics of hemoglobinopathy is most often carried out using the automated capillary zone electrophoresis. The aim of this study was to evaluate analytical performance of the miniCAP flex piercing system before putting it into routine operation. The system uses two capillaries, in which hemoglobin variants are separated for 8 minutes at 9600V and pH 6.8. In healthy adult subjects, hemoglobin consists of HbA and HbA₂, while in newborns we also find HbF. Evaluation was performed according to the CLSI EP15-A3 document using three different control samples that included different hemoglobin variants (HbA, HbF, HbS, HbC and HbA₂). The achieved results for precision and accuracy are in accordance with the manufacturer's specifications. Comparison of the results with the system currently used in routine work, Capillarys 2, indicated excellent correlation between results. A smaller constant deviation in HbF values can be explained by the wide range of values covered by this evaluation. Evaluation results show that the tested analytical system for capillary electrophoresis of hemoglobin, miniCAP flex piercing meets the set acceptance criteria and can be used in routine laboratory work. As an additional value of using this device, the possibility of conducting analysis from a blocked primary test tube was recognized, which improved the safety of technician in laboratory conditions.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 49 pages, 5 figures, 22 tables and 29 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Evaluation, miniCAP flex-piercing, Capillarys 2, precision, accuracy, two method comparison

Mentor: **Dunja Rogić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Dunja Rogić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Željka Vogrinc, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Lidija Bach-Roжеcky, Ph.D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2022.