

Analitička procjena automatizirane metode određivanja sedimentacije eritrocita na analizatoru Alcor iSED®

Taradi, Ida

Professional thesis / Završni specijalistički

2023

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:228069>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-31**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Ida Taradi

**ANALITIČKA PROCJENA AUTOMATIZIRANE METODE ODREĐIVANJA
SEDIMENTACIJE ERITROCITA NA ANALIZATORU ALCOR iSED®**

Specijalistički rad

Zagreb, 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Ida Taradi

**ANALITIČKA PROCJENA AUTOMATIZIRANE METODE ODREĐIVANJA
SEDIMENTACIJE ERITROCITA NA ANALIZATORU ALCOR iSED®**

Specijalistički rad

Zagreb, 2023.

PSS studij: Medicinska biokemija i laboratorijska medicina

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Mirjana Mariana Kardum Paro, spec. med. biokemije

Specijalistički rad obranjen je dana 28.09.2023. na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu pred povjerenstvom u sastavu:

1. prof. dr. sc. József Petrik, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet,
2. izv. prof. dr. sc. Mirjana Mariana Kardum Paro, spec. med. biokemije, KB Merkur,
3. izv. prof. dr. sc. Marija Grdić Rajković, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet.

Rad ima 66 listova.

PREDGOVOR

Specijalistički rad je izrađen pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Mirjane Mariane Kardum Paro,
spec. med. biokemije u Kliničkom zavodu za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu
Kliničke bolnice Merkur.

SAŽETAK

Cilj istraživanja

Sedimentacija eritrocita je laboratorijska pretraga koja se najčešće koristi u postavljanju dijagnoze i praćenju upalnih, autoimunih i malignih bolesti. To je pretraga kod koje dolazi do taloženja eritrocita zbog različite gustoće eritrocita i plazme, a najčešće ukazuje na povećanu koncentraciju proteina akutne faze odnosno upalu (1).

Cilj istraživanja je u rutinski rad uvesti automatiziranu metodu za određivanje brzine sedimentacije na analizatoru iSED (Alcor Scientific, Smithfield, SAD) nakon provedbe verifikacije metode u Kliničkom zavodu za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu Kliničke bolnice Merkur akreditiranom prema nacionalnoj i međunarodnoj normi HRN EN ISO 15189, sukladno preporukama Međunarodnog odbora za standardizaciju u hematologiji (engl. *International Council for Standardization in Haematology*; ICSH). Postupak obuhvaća ispitivanje preciznosti, stabilnosti, prijenosa prethodnog uzorka povišene sedimentacije na uzorak snižene koji se analizira neposredno nakon (engl. *carryover*), usporedbu metode s referentnom metodom određivanja sedimentacije po Westergrenu, verifikaciju referentnih intervala, sudjelovanje u vanjskoj kontroli kvalitete neovisnog organizatora, korelaciju s upalnim parametrima i praćenje vremena izdavanja nalaza (engl. *turnaround time*, TAT) u odnosu na referentnu metodu (2).

Materijali i metode

U provedenom istraživanju analizirano je ukupno 704 humana uzorka ispitanika različitih dobnih skupina. Brzina sedimentacije eritrocita je određena iz uzoraka venske krvi

referentnom metodom po Westergrenu i automatiziranom metodom na analizatoru iSED.

Analizator iSED je potpuno automatizirani analizator za određivanje brzine sedimentacije eritrocita metodom fotometrijske reologije (3), dok je referentna metoda po Westergrenu koja se temelji na očitavanju visine stupca plazme iznad istaloženih eritrocita (4).

Ispitivanje preciznosti analizatora iSED je učinjeno sukladno smjernicama Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (engl. *Clinical and Laboratory Standards Institute; CLSI*) EP15-A2 i EP09-A3 (5-6). Usporedba brzine sedimentacije eritrocita između automatizirane i referentne metode je provedena na 704 humana uzoraka. Ispitivanje stabilnosti uzoraka je učinjeno u 10 uzoraka ispitanika, a ispitivanje potencijalnog prijenosa je napravljeno sukladno CLSI smjernicama H26-A2 (7). Verifikacija referentnih intervala provedena je sukladno CLSI smjernicama 28-A3c analizom 20 referentnih osoba ispitivane populacije (8). Sudjelovali smo u dva programa vanjske kontrole kvalitete koja su organizirana od strane dva neovisna organizatora vanjske kontrole kvalitete: Europskog društva za vanjsku procjenu kvalitete (engl. *European Society for External Quality Assessment; ESfEQA*) i Američkog udruženja patologa (engl. *College of American Pathologists; CAP*). Spearmanovim koeficijentom korelacije je ispitana korelacija podataka između sedimentacije eritrocita dobivene analizatorom iSED s brojem leukocita i koncentracijom fibrinogena i CRP-a. Praćeno je vrijeme izdavanja nalaza koristeći obje metode tijekom mjesec dana.

Rezultati

Koeficijent varijacije za ukupnu laboratorijsku preciznost automatiziranog analizatora

sedimentacije eritrocita Alcor iSED iznosio je 14% za područje normalnih razina primjenjivanog kontrolnog materijala, dok je za patološku razinu iznosio 3,1%. Usporedbom metoda između automatizirane i referentne metode za određivanje sedimentacije eritrocita na 704 uzoraka ispitanika koristeći Passing-Bablok regresijsku analizu je dobivena konstantna razlika između navedenih metoda. Analiza uzorka visoke sedimentacije eritrocita uzrokuje potencijalnu kontaminaciju od 4,1% na sljedeći uzorak. Referentni intervali dobiveni automatiziranom metodom su potvrđeni u odnosu na Westergrenovu referentnu metodu. Sudjelovanjem u vanjskoj kontroli kvalitete neovisnih organizatora je dokazano da su svi rezultati organizatora zadovoljeni u svim ciklusima. Brzina sedimentacije eritrocita i koncentracija fibrinogena imaju najviši Spearmanov koeficijent korelacije, slijedi korelacija s koncentracijom CRP-a, dok nije nađena statistički značajna korelacija s brojem leukocita. Uvođenje automatizirane metode za određivanje brzine sedimentacije eritrocita u rutinski rad skraćuje vrijeme od primitka uzorka do izdavanja nalaza 2,6 puta.

Zaključak

Ispitivana automatizirana metoda određivanja brzine sedimentacije eritrocita zadovoljava postavljene analitičke kriterije kvalitete te je prihvatljiva za rutinsku kliničku primjenu. Glavne prednosti uvođenja automatizirane metode određivanja sedimentacije eritrocita su: standardizacija, korištenje barkodiranih epruveta, veća točnost i reproducibilnost, brže vrijeme izdavanja rezultata pretrage, manja količina potrebnog uzorka za analizu, veća efikasnost u radu laboratorijskog osoblja i niži troškovi.

SUMMARY

Objectives

Erythrocyte sedimentation rate is a laboratory test that is mostly used in the diagnosis and monitoring of inflammatory, autoimmune and malignant diseases. It is a test in which erythrocytes are precipitated due to the different density of erythrocytes and plasma, and most often indicates an increased concentration of acute phase proteins, respectively inflammation (1).

The aim of the study is to introduce an automated method for determining the sedimentation rate on the analyzer iSED (Alcor Scientific, Smithfield, USA) in routine work by performing verification in the Department of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine of the Clinical Hospital Merkur accredited according to the national and international standard HRN EN ISO 15189, in accordance with the recommendations of the International Council for Standardization in Haematology (ICSH). The procedure includes examination of precision, stability, carryover of the previous sample of elevated sedimentation to the sample of low sedimentation that is analyzed immediately after, comparison of the method with the reference method of determining sedimentation according to Westergren, verification of reference intervals, participation in external quality control programs organised by an independent organizers, correlation with inflammatory parameters and monitoring the turnaround time (TAT) in relation to the reference method (2).

Patients and Methods

The iSED analyzer is a fully automated analyzer for determining the erythrocyte

sedimentation rate using the photometric rheology (3), while the reference method is the Westergren method, which is based on reading the height of the plasma column above the precipitated erythrocytes (4).

The precision test of the iSED analyzer was performed in accordance with the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) EP15-A2 and EP09-A3 (5-6). A comparison of the erythrocyte sedimentation rate between the automated and reference method was performed on 704 human samples. Sample stability testing was performed on 10 samples and potential carryover testing was made according to CLSI guidelines H26-A2 (7). The verification of reference intervals was performed according to CLSI guidelines 28-A3c by analyzing 20 reference persons of the studied population (8). We participated in two external quality control programs organized by the two independent organizers: European Society for External Quality Assessment (ESfEQA) and the College of American Pathologists (CAP). Spearman's correlation coefficient was used to test the correlation of data between erythrocyte sedimentation rate obtained by the iSED analyzer with the number of leukocytes and the concentration of fibrinogen and CRP. The turnaround time was monitored using both methods for one month.

Results

The coefficient of variation for the within-laboratory precision of the automated analyzer Alcor iSED which measures the erythrocyte sedimentation rate was 14% for the normal range of the used control material, while it was 3,1% for the pathological range. Comparison of the automated and reference method for determining the erythrocyte sedimentation rate on 704 human samples using Passing-Bablok regression analysis revealed

a constant difference between the methods. Analyzing a sample with high erythrocyte sedimentation rate causes a potential contamination of 4,1% to the next sample. The reference intervals obtained by the automated method were verified with the Westergren reference method. Participation in the external quality control program of independent organizers proved that all the results of the organizers were satisfied in all cycles. Erythrocyte sedimentation rate and concentration of fibrinogen have the highest Spearman correlation coefficient, followed by correlation with concentration of CRP, while no statistically significant correlation was found with the number of leukocytes. The introduction of an automated method for determining the sedimentation erythrocyte rate in routine work shortens the turnaround time by 2,6 times.

Conclusion

The tested automated method for determining the erythrocyte sedimentation rate meets the set analytical quality criteria and is acceptable for routine clinical use. The main advantages of introducing an automated method for determining erythrocyte sedimentation rate analysis are: standardization, use of barcoded test tubes, higher accuracy and reproducibility, shorter turnaround time, smaller amount of sample required for analysis, increased efficiency in the work of laboratory staff and lower costs.

SADRŽAJ

1. Uvod i pregled područja istraživanja	1
2. Hipoteza i cilj istraživanja	8
3. Materijali i metode	10
3.1 Materijal.....	10
3.2 Metode.....	10
3.2.1 Referentna metoda po Westergrenu.....	10
3.2.2 Metoda za automatizirano određivanje sedimentacije eritrocita na analizatoru iSED	11
3.2.3 Statistička analiza	13
3.2.4 Određivanje preciznosti	13
3.2.5 Usporedba ispitivanih analitičkih metoda	14
3.2.6 Ispitivanje stabilnosti.....	15
3.2.7 Ispitivanje prijenosa	15
3.2.8 Verifikacija referentnih intervala	16
3.2.9 Sudjelovanje u programima vanjske kontrole kvalitete	16
3.2.10 Korelacija automatizirane metode za određivanje brzine sedimentacije eritrocita s upalnim parametrima.....	17
3.2.11 Praćenje vremena izdavanja nalaza	18
4. Rezultati	19
4.1 Rezultati verifikacije metode za automatizirano određivanje sedimentacije eritrocita primjenom kontrolnih uzoraka	19
4.2 Rezultati usporedbe ispitivanih analitičkih metoda.....	20
4.2.1 Rezultati usporedbe ispitivanih analitičkih metoda u svim ispitivanim uzorcima	21
4.2.2 Rezultati usporedbe ispitivanih analitičkih metoda u ispitivanim uzorcima podijeljenim prema spolu ispitanika	23
4.2.3 Rezultati usporedbe ispitivanih analitičkih metoda u ispitivanim uzorcima s vrijednostima hematokrita unutar referentnog intervala	27
4.2.4 Rezultati usporedbe ispitivanih analitičkih metoda u ispitivanim uzorcima s vrijednostima sedimentacije eritrocita unutar referentnog intervala	29
4.3 Ispitivanje stabilnosti i prijenosa	31
4.4 Rezultati verifikacije referentnih intervala	32
4.5 Rezultati vanjske kontrole kvalitete	33
4.6 Rezultati korelacije metode za automatizirano određivanje brzine sedimentacije eritrocita s upalnim parametrima.....	34
4.7 Rezultati praćenja vremena izdavanja nalaza	36

5. Rasprava.....	37
6. Zaključci.....	42
7. Literatura.....	44
8. Životopis.....	Error! Bookmark not defined.

1. Uvod i pregled područja istraživanja

Sedimentacija eritrocita je laboratorijska pretraga koja se najčešće koristi u postavljanju dijagnoze i praćenju upalnih, autoimunih i malignih bolesti. To je pretraga kod koje dolazi do taloženja eritrocita zbog različite gustoće eritrocita i plazme, a najčešće ukazuje na povećanu koncentraciju proteina akutne faze odnosno upalu.

Sedimentacija eritrocita je mjera brzine kojom se eritrociti talože iz plazme. Zbog veće gustoće eritrocita i razlike u gustoći plazme i eritrocita, eritrociti se pod utjecajem sile gravitacije talože na dno epruvete potiskujući plazmu prema gore. U prvoj fazi taloženja eritrociti padaju na dno epruvete stvarajući valjkaste (engl. *rouleaux*) nakupine ili formacije koje zbog posebnog diskoidnog oblika podsjećaju na naslagane novčiće. U drugoj fazi taloženja eritrociti tvore agregate koji se talože iz otopine. Treća faza je faza pakiranja gdje se agregati eritrocita zbijaju na dnu epruvete (1).

Agregacija eritrocita ovisna je o električnom naboju. Naboj na membrani eritrocita je u fiziološkim uvjetima negativan zbog čega se međusobno odbijaju. Mnogi proteini plazme su pozitivnog naboja i stoga mogu neutralizirati negativni površinski naboj eritrocita što omogućuje stvaranje tzv. „rouleaux“ formacija. Stoga će brzina sedimentacije eritrocita ovisiti o sastavu i koncentraciji pojedinih proteina plazme. Povišena koncentracija proteina akutne faze (kao što su C-reaktivni protein (CRP), fibrinogen, protrombin, plazminogen ili γ -globulini) propaga stvaranje „rouleaux“ formacija koji se brže talože u odnosu na pojedinačne eritrocite. Upalni procesi u organizmu su povezani s promjenama u stvaranju proteina akutne faze. Fibrinogen kao najzastupljeniji protein akutne faze najviše utječe na brzinu sedimentacije eritrocita u odnosu na ostale proteine akutne faze. Prisutnost paraproteina u visokim koncentracijama što može biti prisutno u bolesnika s multiplim

mijelomom ili Waldenströmovom makroglobulinemijom također značajno utječe na povišenje brzine sedimentacije eritrocita. Na brzinu sedimentacije eritrocita utječe veličina i oblik eritrocita kao i njihova količina. Makrociti se brže talože, a mikrociti sporije u odnosu na eritrocite uobičajene veličine. Osim toga, što je koncentracija eritrocita viša, to je sedimentacija eritrocita niža. Također, eritrociti nepravilnog oblika otežano stvaraju valjkaste nakupine ili formacije, pa se sporije sedimentiraju (9-10).

Tijekom akutnog i kroničnog upalnog procesa dolazi do oslobađanja citokina (u najvećoj mjeri interleukina 6) u cirkulaciju. Jetra reagira povećanim stvaranjem proteina akutne faze, kao što je CRP koji je najčešće korišten biljeg akutnog upalnog odgovora (11). Sedimentacija eritrocita i određivanje koncentracije CRP-a su dvije najčešće korištene laboratorijske pretrage za evaluaciju upalnih stanja. Nakon zacjeljenja ozljede tkiva se koncentracija CRP-a smanjuje značajno brže nego brzina sedimentacije eritrocita. Potrebno je 3-7 dana kako bi se vrijednost vratila unutar referentnog intervala, dok je brzini sedimentacije potrebno do dva tjedna. Zbog navedenih razlika, koncentracija CRP-a se većinom koristi za praćenje akutnih upalnih stanja, dok se brzina sedimentacije eritrocita više koristi kod kroničnih upalnih stanja. Nadalje, za određivanje brzine sedimentacije potreban je svježi uzorak pune krvi, dok se koncentracija CRP-a može odrediti iz pohranjenog uzorka seruma ili plazme. Međutim, objema navedenim pretragama nedostaje specifičnost i osjetljivost i ni jedna se ne smije koristiti samostalno za dijagnozu bilo koje upalne bolesti (12). Bez obzira što se kontinuirano otkrivaju i istražuju novi upalni biomarkeri s višom dijagnostičkom osjetljivošću i specifičnošću, određivanje koncentracije CRP-a i sedimentacije eritrocita su i dalje najčešće korištene pretrage za početna ispitivanja prisutnosti upalnog stanja. Ovo se može objasniti niskom cijenom pretraga, jednostavnošću određivanja i dostupnosti u gotovo svim laboratorijima diljem svijeta. Meta-analiza istraživanja

dijagnostičke točnosti određivanja CRP-a i sedimentacije eritrocita pokazuje da obje pretrage jednako doprinose u procjeni upalnih stanja i da njihovo zajedničko određivanje povećava dijagnostičku točnost, osobito kada druga stanja ometaju pravilnu interpretaciju rezultata (13).

Iako brzina sedimentacije eritrocita nije specifična za određenu bolest, koristi se za postavljanje dijagnoze nekih bolesti kao i praćenje određenih upalnih bolesti ili terapijskih odgovora. Povišene vrijednosti nalaze se kod brojnih upalnih stanja, infekcija, infarkta miokarda, malignih i autoimunih bolesti, a fiziološki u osoba starije dobi i za vrijeme trudnoće (9). Kada je rezultat značajno povišen (veći od 100 mm/3,6 ks), ukazuje na prisutnost ozbiljne bolesti (prediktivna vrijednost veća od 95%) (14). Osim toga, životne navike također utječu na brzinu sedimentacije eritrocita. Konzumiranje alkohola, redovito vježbanje, pušenje, pretilost i slično zbog poticanja ili suzbijanja upale u organizmu utječu na rezultate sedimentacije i to treba uzeti u obzir kod interpretacije rezultata (15-16). Nedavna istraživanja ukazuju da bi, uz određivanje koncentracije CRP-a, i sedimentacija eritrocita mogla biti prediktivni biljeg akutnog kardiovaskularnog događaja uključujući ishemijsku bolest srca i moždani udar (17-20). Budući da se povišena sedimentacija eritrocita nalazi u brojnim kliničkim stanjima, besmislena je kao samostalna laboratorijska pretraga. Osim toga, neki bolesnici s malignim bolestima ili teškim infekcijama mogu imati normalne vrijednosti sedimentacije (9).

Određivanje brzine sedimentacije eritrocita se najčešće koristi za praćenje upalnog odgovora organizma u autoimunim bolestima, infekcijama ili tumorima u kombinaciji s ostalim pretragama koje ukazuju na povećanu upalnu aktivnost u organizmu (9-10).

Najčešća primjena sedimentacije je za praćenje aktivnosti reumatoidnih bolesti,

posebice reumatoidnog artritisa jer je najčešća bolest zglobova u svijetu (prevalencija 1-2%), a zajedno s koncentracijom CRP-a je najosjetljiviji biljeg aktivnosti bolesti. Uzrok reumatoidnih bolesti je imunološki proces uz nespecifičnu, kroničnu upalu. Postoji nekoliko dostupnih ljestvica za ocjenu aktivnosti bolesti koje uključuju najčešće zajedničko određivanje sedimentacije i koncentracije CRP-a. U smjernicama za postavljanje dijagnoze i praćenje tijeka nekih reumatoidnih bolesti (reumatoidni artritis, reumatična polimijalgija i arteritis divovskih stanica) je uključena brzina sedimentacije eritrocita kao jedan od kriterija za klasifikaciju bolesti (21-23). U dijagnostici reumatoidnog artritisa, sistemskog eritemskog lupusa i osteoartritisa koristi se kao pomoć u postavljanju dijagnoze, no važno je znati da može biti u slaboj korelaciji s kliničkim aspektima intenziteta navedenih oboljenja (24-25). Povišena brzina sedimentacije eritrocita je korisna i za postavljanje dijagnoze i praćenje bolesnika s osteomijelitisom. U slučaju dokazanog osteomijelitisa, može se koristiti za praćenje odgovora na terapiju ili pojave recidiva (26-27).

Istraživanja pokazuju da povišene vrijednosti sedimentacije eritrocita mogu biti važan dodatak u otkrivanju koronarnih bolesti (17-18), a također ukazuju na povezanost s količinom lokalne ozljede mozga u moždanom udaru, aterosklerozom i kratkoročnom ishodu bolesnika (19-20).

Osim navedenih bolesti, sedimentacija je povišena i u bolesnika s malignim bolestima, posebice u onih s prisutnim metastazama, i korelira s ukupnom lošom prognozom za nekoliko različitih malignih bolesti, uključujući rak dojke, prostate, kolorektalni karcinom, Hodgkinov limfom i kroničnu limfocitnu leukemiju (10). U istraživanjima metastatskog raka dojke, dokazano je kako sedimentacija eritrocita zajedno s određivanjem tumorskih biljega daje dodatnu informaciju prilikom postavljanja dijagnoze i praćenja bolesti

(9, 28). U bolesnika s kožnim melanomom je također dokazana povezanost povišene sedimentacije s metastaziranjem i lošijim preživljenjem, a potrebna su dodatna istraživanja kako bi se dokazala povezanost s prognozom bolesti (29).

Navedena stanja uzrokuju povišenje brzine sedimentacije eritrocita, ali postoje i stanja koja snizuju sedimentaciju. Njih je posebno važno razmotriti jer mogu uzrokovati pogrešnu dijagnozu ako utječu zajedno sa stanjima koja povisuju sedimentaciju. Policitemija, mikrocitoza, hemolitičke anemije i hemoglobinopatije mogu uzrokovati sniženu sedimentaciju eritrocita (30). Nadalje, učestala konzumacija alkohola je negativno povezana sa sedimentacijom eritrocita. Uzimanje određenih lijekova (valproična kiselina, statini, nesteroidni protuupalni lijekovi) može također sniziti vrijednost sedimentacije eritrocita (9).

S obzirom da se koncentracija CRP-a i sedimentacija eritrocita određuju u sličnim kliničkim stanjima, a koncentracija CRP-a je bolji marker akutne upale jer je osjetljiviji u odnosu na brzinu sedimentacije, očito je kako će CRP zadržati istaknutu poziciju u laboratorijskoj dijagnostici upalnih bolesti. Zato se postavlja pitanje o kliničkom smislu određivanja brzine sedimentacije zbog male specifičnosti. Međutim, pojavom novih automatiziranih metoda u kliničkim laboratorijima se ponovno popularizirala navedena pretraga. Uvođenje takvih analizatora poboljšava kontrolu kvalitete unutar laboratorija, smanjuje mogućnost pogreške i subjektivnost te povećava brzinu dostupnosti rezultata. Brzina sedimentacije eritrocita je i dalje uključena u popis od 25 najčešće određivanih pretraga u različitim bolnicama u svijetu (13).

Prema Međunarodnom odboru za standardizaciju u hematologiji (engl. *International Council for Standardization in Haematology*; ICSH) (2) i smjernicama Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (engl. *Clinical and Laboratory Standards Institute*; CLSI) zlatni

standard i referentna metoda za određivanje brzine sedimentacije je metoda po Westergrenu koja se temelji na očitavanju visine stupca plazme iznad istaloženih eritrocita (4). Najčešći uzrok lažno povišenih vrijednosti brzine sedimentacije eritrocita referentnom metodom po Westergrenu jesu povišena temperatura okoline (31), neprikladno razrjeđenje uzorka venske krvi ili položaj Westergrenove pipete (32), a značajan utjecaj na rezultate ima anemija (33) i hematokrit (34-35).

S obzirom na to da je Westergrenova metoda dugotrajna i podložna lažno povišenim vrijednostima, od 1990.-ih su dostupne nove, automatizirane metode za određivanje brzine sedimentacije eritrocita u različitim fazama njihovog taloženja, pa se rezultati dobiveni različitim metodama mogu razlikovati. Najčešće se automatizirane metode temelje na modifikaciji referentne metode po Westergrenu pri čemu se nastoji dobiti rezultat u što kraćem vremenu. Njihova najveća prednost je standardizacija postupka čime se povećava točnost i ponovljivost rezultata. Istraživanje koje je proveo ICSH pokazuje da 2/3 svih laboratorija u svijetu koristi automatiziranu metodu određivanja. Temeljem točnosti i ponovljivosti rezultata ispitivanja više od 10 različitih automatiziranih metoda, Međunarodni odbor za standardizaciju u hematologiji je izradio i objavio preporuke proizvođačima za validaciju novih automatiziranih metoda i preporuke korisnicima za njihov uvođenje u rutinski rad. Nedavna istraživanja pokazuju da su rezultati ispitivanja automatiziranih metoda usporedivi s rezultatima dobivenim referentnom metodom po Westergrenu. Mnoge automatizirane metode ne određuju sedimentaciju eritrocita, već izračunavaju matematički izvedenu brzinu taloženja mjerenjem agregata u ranim fazama nakupljanja eritrocita, odnosno stvaranja valjkastih nakupina ili formacija. Na proizvođačima i korisnicima je validacija i verifikacija novih automatiziranih metoda (2).

Analizator iSED (Alcor Scientific, Smithfield, SAD) je automatizirani analizator za određivanje brzine sedimentacije eritrocita metodom fotometrijske reologije (3).

Analitičke karakteristike analizatora iSED su opisane u nekoliko istraživanja u kojima su rezultati ispitivanja ovog analizatora uspoređeni s rezultatima drugih automatiziranih analizatora za određivanje sedimentacije eritrocita, no ne i s rezultatima ispitivanja dobivenim referentnom metodom po Westergrenu (36-38). Lapić I i sur. su ispitali analitičke karakteristike analizatora usporedivši ih s analitičkim karakteristikama referentne metode po Westergrenu i drugih analizatora za određivanje automatizirane sedimentacije eritrocita.

Glavna ograničenja ispitivanja su nedovoljno ispitana stabilnost uzoraka i utjecaj hematokrita na određivanje automatizirane sedimentacije eritrocita (39). U istraživanju Čičak H i sur. obuhvaćen je samo dio uzoraka s povišenim vrijednostima sedimentacije eritrocita, nije ispitan utjecaj hematokrita na određivanje automatizirane sedimentacije eritrocita kao ni utjecaj patofizioloških stanja ispitanika (40).

2. Hipoteza i cilj istraživanja

Hipoteza istraživanja je da je automatizirana metoda za određivanje sedimentacije eritrocita na analizatoru iSED (Alcor Scientific, Smithfield, SAD) usporediva s referentnom metodom po Westergrenu.

Cilj istraživanja je u rutinski rad uvesti automatiziranu metodu za određivanje sedimentacije eritrocita na analizatoru iSED nakon provedene verifikacije metode u Kliničkom zavodu za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu Kliničke bolnice Merkur akreditiranom prema nacionalnoj i međunarodnoj normi HRN EN ISO 15189 sukladno ICSH preporukama (2). Postupak verifikacije obuhvaća:

1. određivanje preciznosti analizatora iSED,
2. usporedbu ispitivanih analitičkih metoda (metoda za automatizirano određivanje sedimentacije eritrocita vs. referentna metoda određivanja sedimentacije eritrocita po Westergrenu),
3. ispitivanje stabilnosti uzoraka,
4. ispitivanje prijenosa (engl. *carryover*),
5. verifikaciju referentnih intervala,
6. korelaciju metode za automatizirano određivanje brzine sedimentacije eritrocita s upalnim parametrima,
7. sudjelovanje u programima vanjske procjene kvalitete neovisnih organizatora,
8. praćenje vremena izdavanja nalaza u odnosu na vrijeme izdavanja nalaza

referentnom metodom određivanja sedimentacije eritrocita po Westergrenu.

3. Materijali i metode

3.1 Materijal

U provedenom istraživanju analizirani su humani uzorci ispitanika različitih dobnih skupina (od 9 do 98 godina; medijan 62 godine). Ukupno su analizirana 704 uzorka, od kojih 357 od muškog i 347 od ženskog spola. Uzorci venske krvi uzorkovani su u prijemnoj ambulanti Kliničkoga zavoda za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu i analizirani u laboratoriju za hematologiju i koagulaciju. Brzina sedimentacije eritrocita je određena iz uzoraka venske krvi referentnom metodom po Westergrenu (epruveta s crnim čepom; natrijev citrat kao antikoagulans) i metodom za automatizirano određivanje brzine sedimentacije eritrocita na analizatoru iSED (ostatni uzorci pune krvi za analizu kompletne krvne slike; Vacutainer epruveta s ljubičastim čepom; K₃EDTA kao antikoagulans). Uzorci venske krvi nisu smjeli imati vidljiv ugrušak niti biti hemolizirani. Svi uzorci su analizirani unutar 4 sata od uzorkovanja.

3.2 Metode

3.2.1 Referentna metoda po Westergrenu

Referentna metoda za određivanje sedimentacije eritrocita je metoda po Westergrenu koja se temelji na očitavanju visine stupca plazme iznad istaloženih eritrocita. Uzorak venske krvi se uzorkuje u epruvetu (natrijev citrat kao antikoagulans) koja se nakon uzorkovanja lagano promiješa okretanjem. Epruvete se postavljaju okomito u odgovarajuće stalke (na sobnoj temperaturi, dalje od izvora svjetlosti i vibracija) nakon što se prethodno

dobro promiješaju okretanjem. Brzina sedimentacije eritrocita se očitava točno nakon sat vremena (zaporni sat se postavlja na alarm za 60 minuta) i određuje kao udaljenost od vrha plazme do gornjeg sloja eritrocita koju eritrociti prijeđu tijekom jednog sata (4). Referentne vrijednosti brzine sedimentacije eritrocita za određivanje sedimentacije eritrocita metodom po Westergrenu nalaze se u Tablici 1. (41).

Tablica 1. Referentne vrijednosti brzine sedimentacije eritrocita za određivanje sedimentacije eritrocita referentnom metodom po Westergrenu. (izvor: Harmonizacija laboratorijskih nalaza u području opće, specijalne i visokodiferentne medicinske biokemije (41)).

Pretraga/ analit	Preporučena metoda i/ili postupak I	Preporučena metoda i/ili postupak II	Jedinica	Referentni interval (RI)		
				Spol	Dob	RI
Brzina sedimentacije eritrocita (SE)	Modificirana metoda po Westergrenu (ICSH)	Automatizirana sedimentacija	mm/3,6 ks	muški,	1d.- 7g.	0-20
				ženski		
				muški	8-14 g.	2-21
				muški	15-19 g.	2-12
				muški	20-50 g.	2-13
				muški	> 50 g.	3-23
				ženski	8-19 g.	2-20
				ženski	20-50 g.	4-24
ženski	> 50 g.	5-28				

Legenda: ICSH=Međunarodni odbor za standardizaciju u hematologiji (engl. *International Council for Standardization in Hematology*), ks=kilosekunda

3.2.2 Metoda za automatizirano određivanje sedimentacije eritrocita na analizatoru iSED

Analizator iSED (Alcor Scientific, Smithfield, SAD) određuje brzinu sedimentacije eritrocita koristeći metodu fotometrijske reologije tijekom najkritičnije faze u agregaciji eritrocita, odnosno stvaranja valjkastih nakupina ili formacija. Određivanje sedimentacije

eritrocita započinje stavljanjem uzoraka pune krvi (K_3 EDTA kao antikoagulans) na predviđena mjesta u rotoru. Uzorci se prvo miješaju u analizatoru, a zatim započinje agregacija eritrocita. Mjeri se promjena intenziteta svjetlosti u ovisnosti o vremenu pri čemu je signal direktno proporcionalan agregaciji eritrocita i korelira s brzinom sedimentacije eritrocita. Matematičkim formulama se dobiveni signal prevodi u vrijednosti koje se mogu uspoređivati referentnom metodom po Westergrenu.

Raspon rezultata ispitivanja koji analizator može odrediti je 1-130 mm/3,6 ks, a kapacitet određivanja analizatora iznosi 180 uzoraka u jednom satu. Po određivanju se epruveta s uzorkom izbacuje iz uređaja na predviđeno mjesto za skupljanje uzoraka. Odmah se može u analizator staviti novi uzorak. Rezultati određivanja se prikazuju na ekranu analizatora i automatski se ispisuju (slika 1) (3).



Slika 1. Prikaz analizatora iSED (Alcor Scientific, Smithfield, SAD).

Za automatizirano određivanje brzine sedimentacije eritrocita na analizatoru iSED

korišteni su ostatni uzorci pune krvi (100 μ L) nakon analize kompletne krvne slike. Uključeni su uzorci ispitanika kojima je istovremeno zatražena analiza kompletne krvne slike i brzine sedimentacije te kojima je uzorkovana krv u dvije epruvete (antikoagulans natrijev citrat i K_3 EDTA). Minimalna količina potrebne pune krvi iznosila je 800 μ L, a uzorci nisu smjeli imati vidljiv ugrušak ili biti hemolizirani. Uzorci su analizirani unutar 4 sata od uzorkovanja. Svakodnevno se provodila unutarnja kontrola kvalitete, kao i preporučeni postupci održavanja analizatora.

Lažno povišene rezultate ispitivanja mogu uzrokovati mehaničke vibracije i visoka temperatura prostora, a snižene rezultate ispitivanja uzrokuju nepravilni oblici eritrocita, ugrušak u uzorku, višak antikoagulansa odnosno mali volumen uzorka, niska temperatura prostora i dugo stajanje uzorka na sobnoj temperaturi (3).

3.2.3 Statistička analiza

Rezultati ispitivanih analitičkih metoda obrađeni su statističkim programom MedCalc Statistical Software version 22.006. (MedCalc Software, Mariakerke, Belgija).

Za obradu, prikaz i usporedbu dobivenih podataka koristiti će se Blandt-Altman prikaz i Passing-Bablok regresijska analiza. $P < 0,05$ će predstavljati razinu statističke značajnosti dobivenih rezultata.

3.2.4 Određivanje preciznosti

Preciznost analizatora iSED je izračunata iz dobivenih vrijednosti kontrolnih uzoraka analiziranih u triplikatu kroz 5 dana sukladno CLSI smjernicama EP15-A2 User Verification of

Performance for Precision and Trueness; Approved guideline i EP09-A3 Measurment Procedure Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved guideline (5-6). Korišteni su komercijalni kontrolni uzorci SEDIROL (Alcor Scientific, Smithfield, SAD) koji se sastoje od stabiliziranih humanih eritrocita u dvije koncentracijske razine (L1 za normalno i L2 za patološko područje). Kriteriji prihvatljivosti korišteni za procjenu rezultata za preciznost su preuzeti iz rezultata vanjske kontrole kvalitete. Prema ESFEQA organizatoru vanjske kontrole kvalitete dozvoljeno odstupanje je $\pm 40\%$ u odnosu na ciljnu vrijednost, a kod organizatora CAP ± 3 standardna odstupanja od ciljne vrijednosti.

3.2.5 Usporedba ispitivanih analitičkih metoda

Usporedba ispitivanih analitičkih metoda (metode za automatizirano određivanje sedimentacije eritrocita vs. referentne metode za određivanje sedimentacije eritrocita po Westergrenu) provedena je na ukupno 704 humana uzorka (357 muškog i 347 ženskog spola, raspona godina od 9 do 98, medijan godina 62) sukladno CLSI smjernicama EP09-A3 Measurment Procedure Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved guideline (6).

U inicijalnom ispitivanju analizatora iSED prema preporuci proizvođača (3) i literaturnim podacima (4, 9-10, 33-41) pri odabiru humanih uzoraka za usporedbu metoda:

1. učinjena je usporedba ispitivanih analitičkih metoda u svim ispitivanim uzorcima (N=704),
2. učinjena je usporedba ispitivanih analitičkih metoda u ispitivanim uzorcima podijeljenim prema spolu ispitanika,

3. dodatno je učinjena usporedba ispitivanih analitičkih metoda u uzorcima s vrijednostima hematokrita unutar referentnog intervala (0,356-0,530 L/L) (N=159); hematokrit je izmjeren kao dio kompletne krvne slike na automatiziranom hematološkom brojaču (Sysmex XE5000, Sysmex, Kobe, Japan) akreditiranom prema nacionalnoj i međunarodnoj normi HRN EN 15189,
4. dodatno je učinjena usporedba ispitivanih analitičkih metoda u uzorcima (N=436) s vrijednostima sedimentacije eritrocita unutar referentnog intervala (< 20 mm/3,6 ks) (41) određene referentnom metodom po Westergrenu.

3.2.6 Ispitivanje stabilnosti

Stabilnost uzoraka je ispitana u 10 uzoraka (5 s vrijednostima sedimentacije unutar referentnog intervala (< 20 mm/3,6 ks) i 5 s vrijednostima sedimentacije iznad gornje granice referentnog intervala) (41). Uzorci su alikvotirani u dvije epruvete (jedna epruveta je pohranjena na sobnu temperaturu (18 do 25°C), a druga epruveta u hladnjak (2 do 8°C)) te su analizirane nakon 4, 6, 8 i 24 sata od uzorkovanja. Uzorci pohranjeni u hladnjaku (2 do 8°C) su prije analize stabilizirani tijekom 15 minuta na sobnu temperaturu.

3.2.7 Ispitivanje prijenosa

Ispitivanje potencijalnog prijenosa (engl. *carryover*) prethodnog uzorka povišene sedimentacije na uzorak snižene koji se analizira neposredno nakon je učinjeno sukladno CLSI protokolu H26-A2 Validation, Verification, and Quality Assurance of Automated Hematology Analyzers; Approved Standard (7). Analizirana su dva uzorka bolesnika pri čemu

je u jednom uzorku visoka vrijednost, a u drugom niska vrijednost sedimentacije eritrocita. Uzorak s visokom vrijednošću je analiziran u triplikatu (H1, H2 i H3), a nakon njega je analiziran uzorak s niskom vrijednošću također u triplikatu (L1, L2 i L3). Utjecaj prijenosa je izračunat prema formuli:

$$\text{Prijenos (carryover) (\%)} = ((L1-L3)/(H3-L3)) \times 100.$$

3.2.8 Verifikacija referentnih intervala

Verifikacija referentnih intervala provedena je prema CLSI protokolu 28-A3c Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline analizom 20 referentnih osoba ispitivane populacije (8). Referentnim osobama su smatrani ispitanici kojima su se vrijednosti svih analiziranih upalnih parametara (broj leukocita, koncentracije fibrinogena i C-reaktivnog proteina i brzina sedimentacije eritrocita određena referentnom metodom po Westergrenu) nalazili unutar pripadnih referentnih intervala. Ako se najviše 10% (2 od 20 ispitivanih uzoraka) rezultata ispitivanja nalazilo izvan definiranih pripadnih referentnih intervala, isti su u cijelosti primijenjeni na ispitivanu populaciju.

3.2.9 Sudjelovanje u programima vanjske kontrole kvalitete

Sudjelovanje u programima vanjske kontrole kvalitete neovisnih organizatora je preporučeno od strane Međunarodnog odbora za standardizaciju u hematologiji (2). Odabrani programi su specifični za ispitivanu automatiziranu metodu određivanja sedimentacije eritrocita:

a) određivanje brzine sedimentacije eritrocita na analizatorima Alcor iSED (engl. *Erythrocyte Sedimentation Rate on Alcor iSED Analyzers*) Europskog društva za vanjsku procjenu kvalitete (engl. *European Society for External Quality Assessment*; EsFEQA) i

b) brzina sedimentacije eritrocita (engl. *Erythrocyte Sedimentation Rate*; ESR) Američkog udruženja patologa (engl. *College of American Pathologists*; CAP).

U svakom od navedenih programa su analizirana dva ili tri uzorka suspendiranih stabiliziranih humanih eritrocita sukladno uputama neovisnih organizatora vanjske procjene kvalitete, a rezultati ispitivanja se prijavljuju pristupom mrežnoj stranici neovisnog organizatora putem koje se dobiva i ocjena sudjelovanja u svakom od ciklusa u odnosu na ostale sudionike.

3.2.10 Korelacija automatizirane metode za određivanje brzine sedimentacije eritrocita s upalnim parametrima

Za korelaciju podataka dobivenih automatiziranom metodom određivanja brzine sedimentacije eritrocita i broja leukocita te koncentracije fibrinogena i C-reaktivnog proteina korišten je Spearmanov koeficijent korelacije. U većine ispitanika (N=466) je broj leukocita određen u uzorku venske krvi pri analizi kompletne krvne slike na hematološkom brojaču (Sysmex XE5000, Sysmex, Kobe, Japan). U nekih su u sklopu obrade izmjerene i koncentracije fibrinogena (Sysmex CS2500 (Siemens, Norderstedt, Njemačka) (N=158) i C-reaktivnog proteina (Beckman Coulter AU680 (Beckman Coulter, Brea, SAD) (N=422).

3.2.11 Praćenje vremena izdavanja nalaza

S obzirom na to da postoji značajna razlika u vremenu izvođenja metode za automatizirano određivanje brzine sedimentacije eritrocita (rezultat unutar 20 sekundi) i referentne metode po Westergrenu (minimalno 60 minuta), praćeno je vrijeme od uzorkovanja i/ili primitka uzorka u laboratorij do izdavanja nalaza (engl. *turnaround time*; TAT) obiju metoda tijekom mjesec dana.

4. Rezultati

4.1 Rezultati verifikacije metode za automatizirano određivanje sedimentacije eritrocita primjenom kontrolnih uzoraka

Iz dobivenih su rezultata nakon analize komercijalnih kontrolnih uzoraka korištenjem analizatora iSED (Alcor, Scientific, Smithfield, SAD) prema CLSI protokolu EP15-A2 izračunate vrijednosti standardnih odstupanja (SO) i koeficijenata varijacije (KV) za preciznost u seriji (ponovljivost) i ukupnu laboratorijsku preciznost (prikazane u Tablicama 2 i 3).

Tablica 2. Prikaz izračunate preciznosti u seriji (ponovljivost) te skupnog standardnog odstupanja (SO) i koeficijenata varijacije (KV) kontrolnih uzoraka za normalno (Razina 1) i patološko (Razina 2) područje.

PONOVLJIVOST (PRECIZNOST U SERIJI, engl. <i>repeatability</i>)		
Kontrolni uzorci (Seditrol® Quality controls)	Standardno odstupanje (SO)	Koeficijent varijacije (KV %)
Razina 1, normalna razina (ciljna vrijednost 9 ± 7 mm/3,6 ks)	1,2	14
Razina 2, patološka razina (ciljna vrijednost 64 ± 26 mm/3,6 ks)	2,0	3,1

Tablica 3. Prikaz izračunate ukupne laboratorijske preciznosti te unutarlaboratorijskog

standardnog odstupanja (SO) i koeficijenta varijacije (KV) kontrolnih uzoraka za normalno (Razina 1) i patološko (Razina 2) područje.

UKUPNA LABORATORIJSKA PRECIZNOST (UNUTARLABORATORIJSKA PRECIZNOST, engl. <i>within-laboratory precision</i>)		
Kontrolni uzorci (Seditrol® Quality controls)	Standardno odstupanje (SO)	Koeficijent varijacije (KV %)
Razina 1, normalna razina (ciljna vrijednost 9±7 mm/3,6 ks)	1,2	13,3
Razina 2, patološka razina (ciljna vrijednost 64±26 mm/3,6 ks)	1,7	2,7

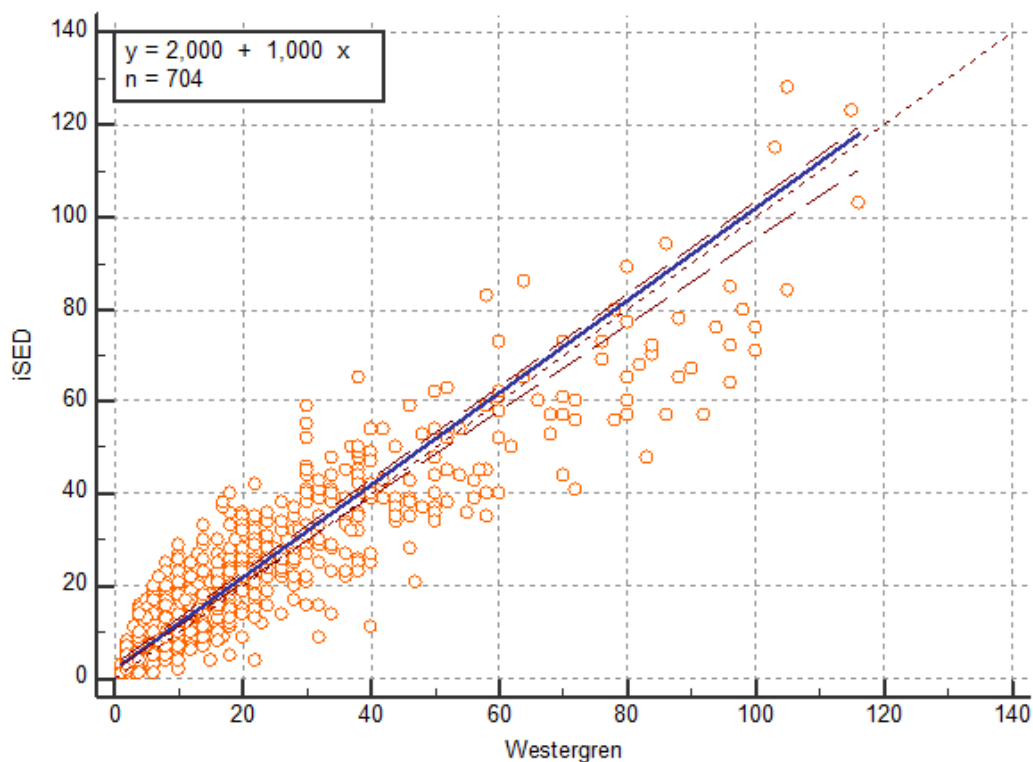
4.2 Rezultati usporedbe ispitivanih analitičkih metoda

Usporedba ispitivanih analitičkih metoda (metoda za automatizirano određivanje sedimentacije eritrocita vs. referentna metode za određivanje sedimentacije eritrocita po Westergrenu) provedena je Blandt-Altman i Passing-Bablok analizom na ukupno 704 uzoraka pune krvi.

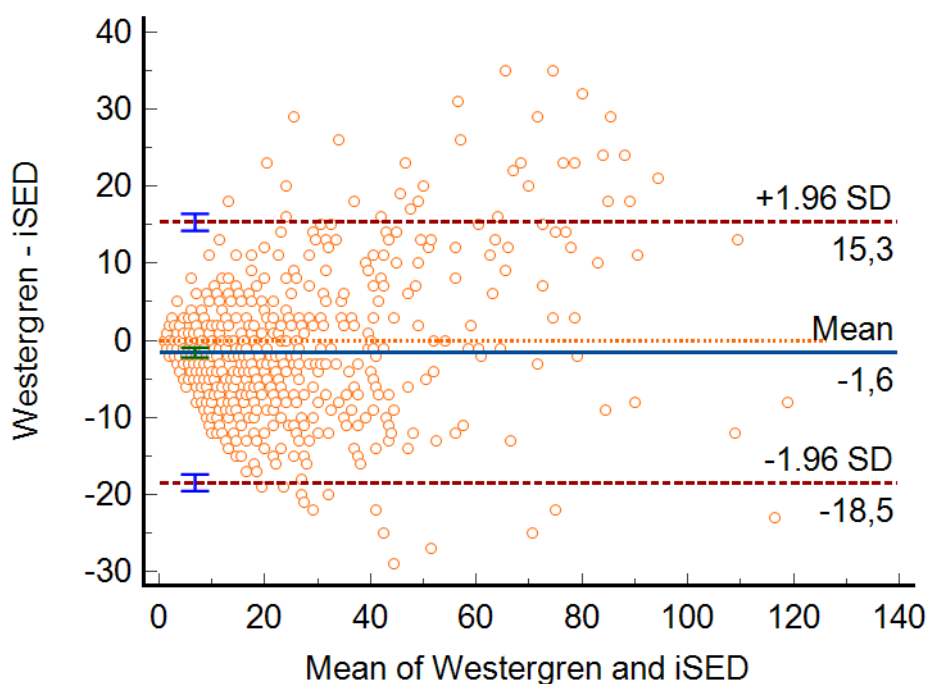
4.2.1 Rezultati usporedbe ispitivanih analitičkih metoda u svim ispitivanim uzorcima

Na Slikama 2.1 i 2.2 su prikazani rezultati usporedbe ispitivanih analitičkih metoda Passing-Bablok regresijskom analizom (Slika 2.1) i Blandt-Altman analizom (Slika 2.2) u svim ispitivanim uzorcima (N=704) venske krvi. U Tablici 4 su prikazani statistički podaci dobiveni Passing- Bablok regresijskom analizom.

Passing-Bablokovom regresijskom analizom je utvrđeno postojanje konstantne razlike između metoda, ali nije utvrđeno postojanje proporcionalne razlike. Blandt-Altmanovom analizom je utvrđena razlika od -1,6 (95%CI: -18,5-15,3).



Slika 2.1 Usporedba ispitivanih analitičkih metoda (metode za automatizirano određivanje brzine sedimentacije eritrocita i referentne metode po Westergrenu) u svim ispitivanim uzorcima (N=704) (Passing- Bablok regresijska analiza; regresijska linija obojana je plavo).



Slika 2.2 Usporedba ispitivanih analitičkih metoda (metode za automatizirano određivanje brzine sedimentacije eritrocita i referentne metode po Westergrenu) u svim ispitivanim uzorcima (N=704) (Blandt-Altman analiza; plava linija predstavlja srednje odstupanje (engl. *mean difference*), a isprekidane crvene linije ± 1.96 standardnog odstupanja).

Tablica 4. Statistički podaci (Passing-Bablok regresijska analiza; Spearmanov koeficijent korelacije, regresijska jednadžba, odsječak i nagib pravca te 95%-tni intervali pouzdanosti (CI)).

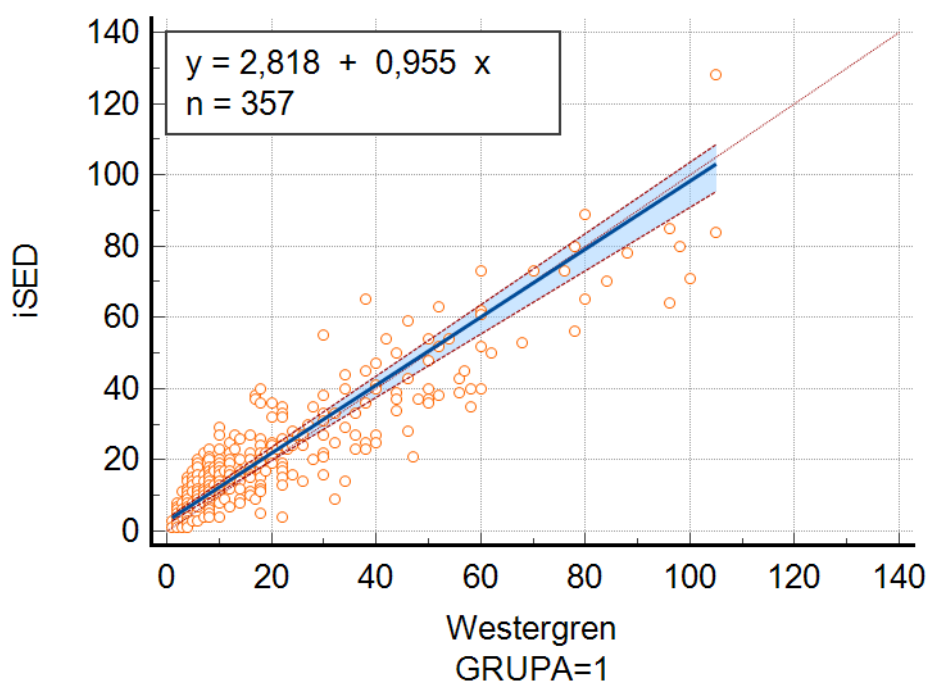
Regresijska jednadžba	$y=2,000+1,000x$
Odsječak na osi x	2,000 (95% CI: 2,000 - 3,400)
Koeficijent smjera pravca	1,000 (95%CI: 0,933 – 1,000)
Spearmanov koeficijent korelacije	0,885 (95%CI: 0,868-0,900)
Statistička značajnost	$P<0,0001$

4.2.2 Rezultati usporedbe ispitivanih analitičkih metoda u ispitivanim uzorcima podijeljenim prema spolu ispitanika

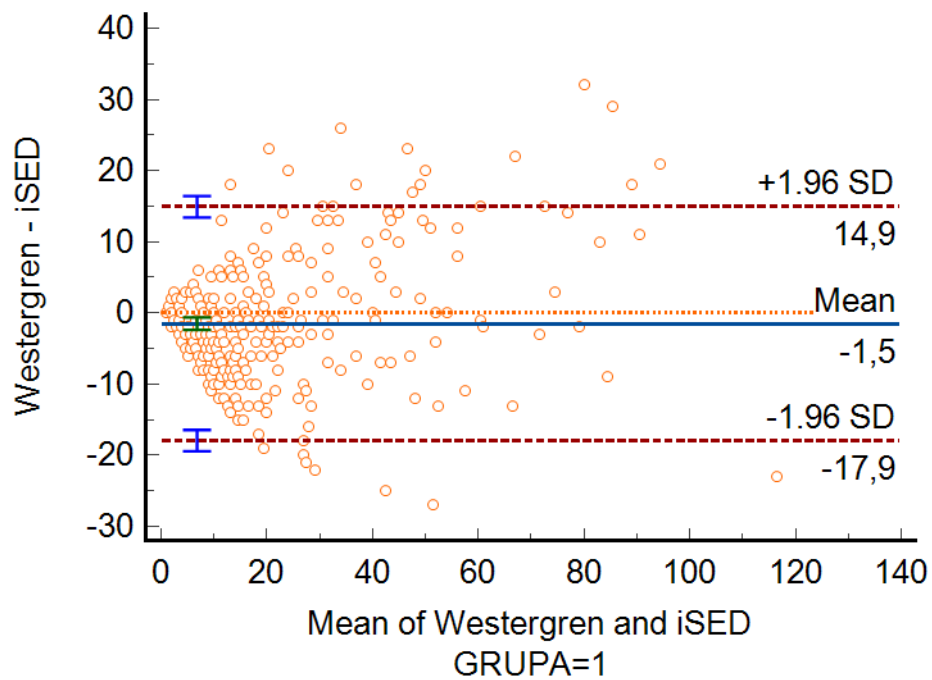
Na Slikama 3 i 4 su prikazani rezultati usporedbe ispitivanih analitičkih metoda Passing-Bablok regresijskom analizom i Blandt-Altman analizom u uzorcima muškog spola (N=357) (Slike 3.1 i 3.2) i u uzorcima ženskog spola (N=347) (Slike 4.1 i 4.2).

U Tablici 5 su prikazani statistički podaci dobiveni Pasing-Bablok analizom za ispitanike muškog spola, a u Tablici 6 za ispitanike ženskog spola.

Passing-Bablokovom regresijskom analizom je utvrđeno postojanje konstantne razlike između metoda prisutno za oba spola, ali nije utvrđeno postojanje proporcionalne razlike. Blandt-Altmanovom analizom je utvrđena razlika od -1,5 (95%CI: -17,9-14,9) za muški spol i -1,7 (95%CI: -19,1-15,7) za ženski spol.



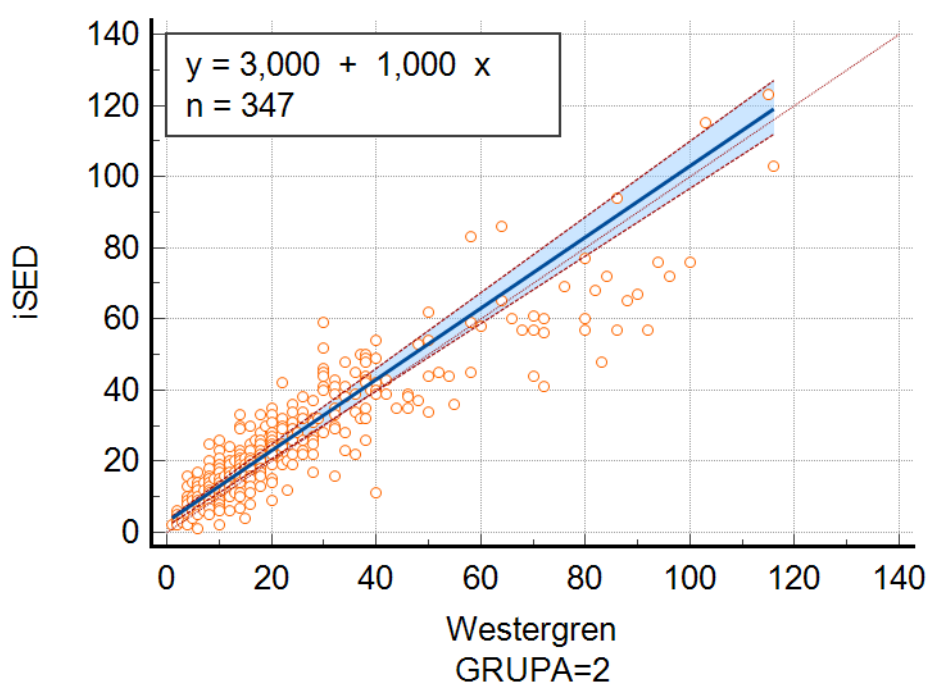
Slika 3.1 Usporedba ispitivanih analitičkih metoda (metode za automatizirano određivanje brzine sedimentacije eritrocita i referentne metode po Westergrenu) u uzorcima ispitanika muškog spola (N=357) (Passing-Bablok regresijska analiza; regresijska linija obojana je plavo).



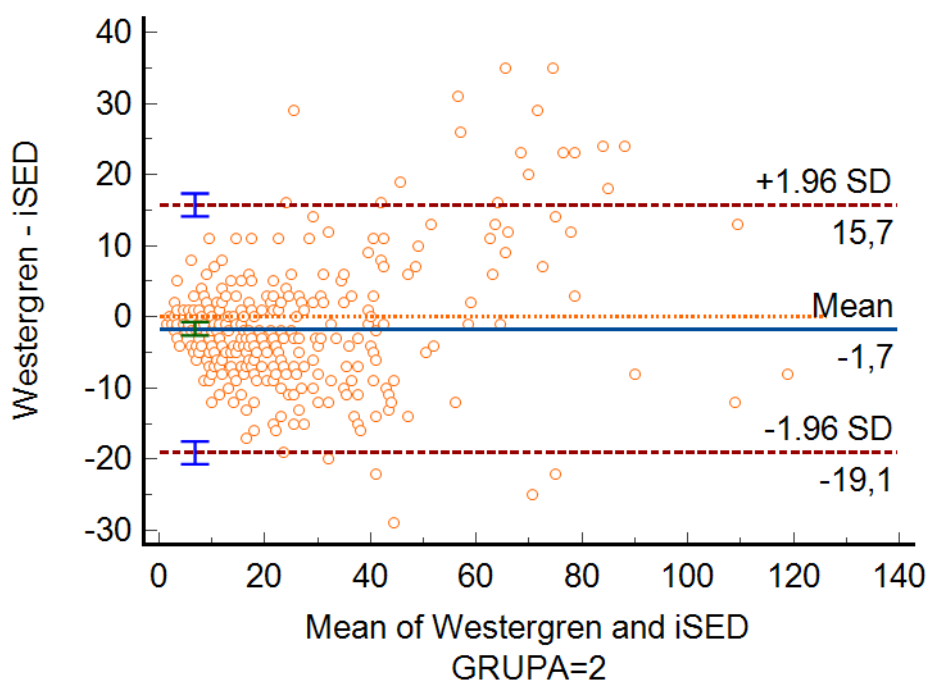
Slika 3.2 Usporedba ispitivanih analitičkih metoda (metode za automatizirano određivanje brzine sedimentacije eritrocita i referentne metode po Westergrenu) u uzorcima ispitanika muškog spola (N=357) (Blandt- Altman analiza; plava linija predstavlja srednje odstupanje (engl. *mean difference*), a isprekidane crvene linije granice ± 1.96 standardnog odstupanja).

Tablica 5. Statistički podaci (Passing-Bablok regresijska analiza; koeficijent korelacije, regresijska jednadžba, odsječak i nagib pravca te 95%-tni intervali pouzdanosti (CI)) za ispitanike muškog spola.

Regresijska jednadžba	$y = 2,818182 + 0,954545 x$
Odsječak na osi x	2,8182 (95% CI: 2,0000 - 3,5556)
Koeficijent smjera pravca	0,9545 (95%CI: 0,8889 - 1,0000)
Spearmanov koeficijent korelacije	0,863 (95%CI: 0,834 - 0,887)
Statistička značajnost	P<0,0001



Slika 4.1 Usporedba ispitivanih analitičkih metoda (metode za automatizirano određivanje brzine sedimentacije eritrocita i referentne metode po Westergrenu) u uzorcima ispitanika ženskog spola (N=347) (Passing-Bablok regresijska analiza; regresijska linija obojana je plavo).



Slika 4.2 Usporedba ispitivanih analitičkih metoda (metode za automatizirano određivanje brzine sedimentacije eritrocita i referentne metode po Westergrenu) u uzorcima ispitanika ženskog spola (N=347) (Blandt-Altman analiza; plava linija predstavlja srednje odstupanje (engl. *mean difference*), a isprekidane crvene linije granice ± 1.96 standardnog odstupanja).

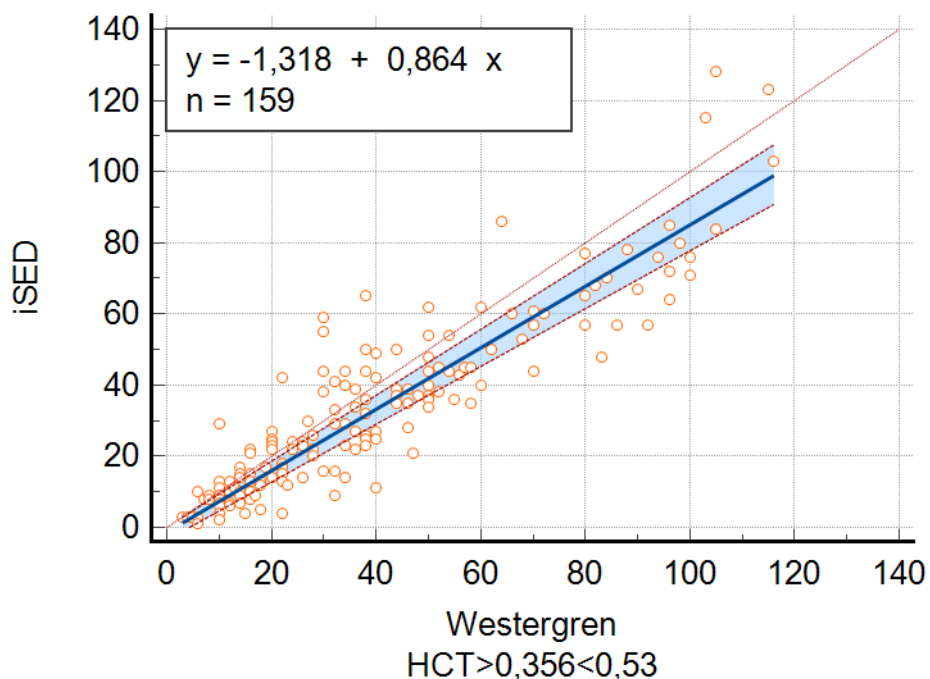
Tablica 6. Statistički podaci (Passing-Bablok regresijska analiza; koeficijent korelacije, regresijska jednadžba, odsječak i nagib pravca te 95%-tni intervali pouzdanosti (CI)) za ispitanike ženskog spola.

Regresijska jednadžba	$y = 3,000000 + 1,000000 x$
Odsječak na osi x	3,0000 (95% CI: 1,7037 - 3,5000)
Koeficijent smjera pravca	1,0000 (95%CI: 0,9500 - 1,0648)
Spearmanov koeficijent korelacije	0,901 (95%CI: 0,879 - 0,919)
Statistička značajnost	P<0,0001

4.2.3 Rezultati usporedbe ispitivanih analitičkih metoda u ispitivanim uzorcima s vrijednostima hematokrita unutar referentnog intervala

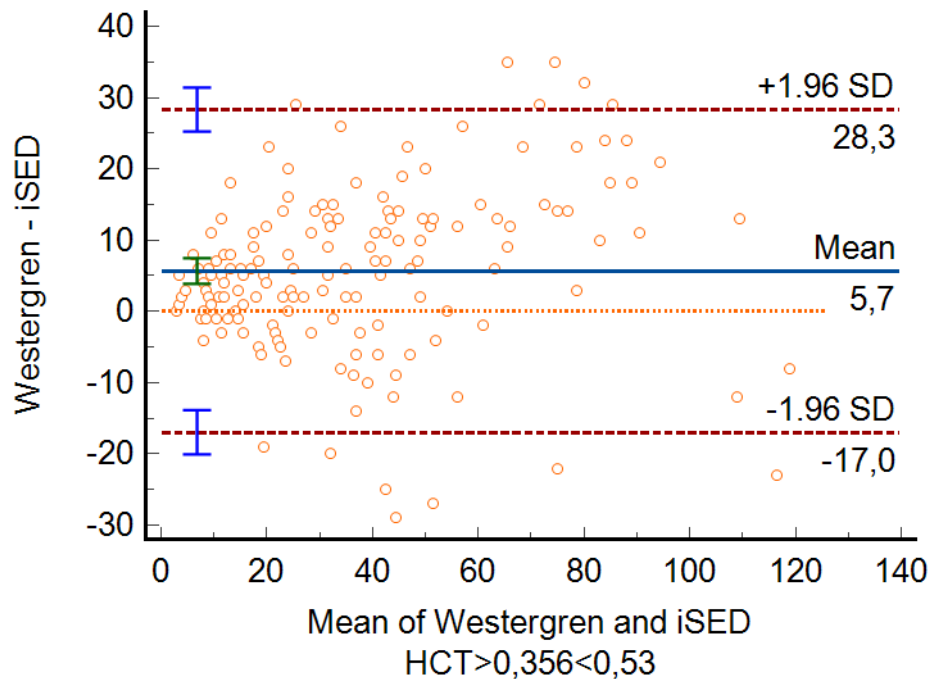
Slike 5.1 i 5.2 prikazuju rezultate dobivene Passing-Bablok i Blandt-Altman analizom u uzorcima ispitanika s vrijednostima hematokrita unutar referentnog intervala (N=159), a u Tablici 7 su prikazani statistički podaci dobiveni Pasing-Bablok analizom za navedene uzorke.

Passing-Bablokovom regresijskom analizom je utvrđeno postojanje proporcionalne razlike između ispitivanih metoda, ali nije utvrđeno postojanje konstante razlike. Blandt-Altmanovom analizom je utvrđena razlika od 5,7 (95%CI: -17,0-28,3).



Slika 5.1 Usporedba ispitivanih analitičkih metoda (metode za automatizirano određivanje brzine sedimentacije eritrocita i referentne metode po Westergrenu) u uzorcima ispitanika s vrijednostima hematokrita unutar referentnog intervala (N=159) (Passing-Bablok regresijska

analiza; regresijska linija obojana je plavo).



Slika 5.2 Usporedba ispitivanih analitičkih metoda (metode za automatizirano određivanje brzine sedimentacije eritrocita i referentne metode po Westergrenu) u uzorcima ispitanika s vrijednostima hematokrita unutar referentnog intervala (N=159) (Blandt-Altman analiza; plava linija predstavlja srednje odstupanje (engl. *mean difference*), a isprekidane crvene linije granice ± 1.96 standardnog odstupanja).

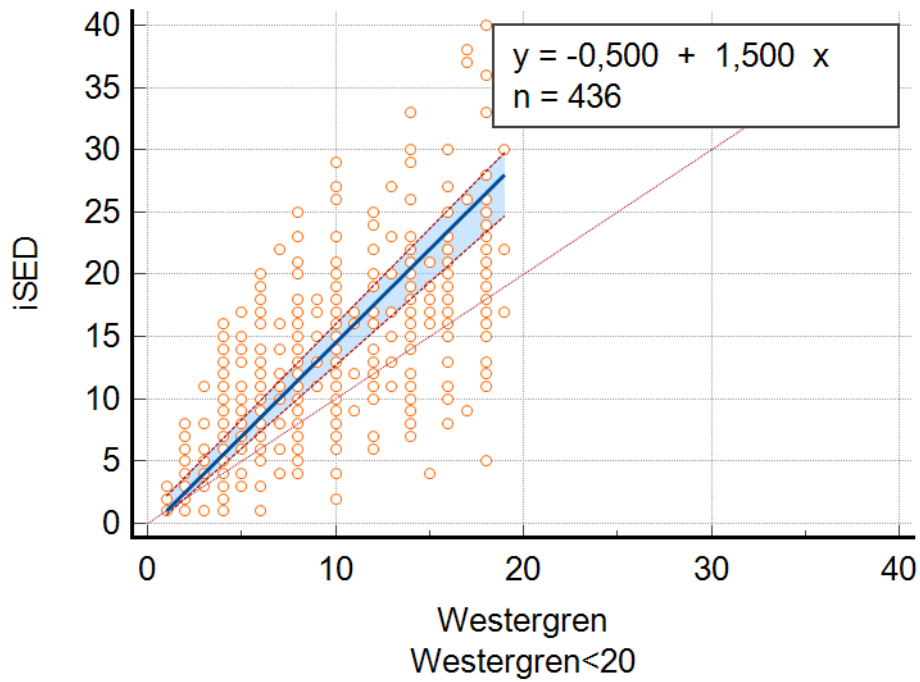
Tablica 7. Statistički podaci (Passing-Bablok regresijska analiza; koeficijent korelacije, regresijska jednadžba, odsječak i nagib pravca te 95%-tni intervali pouzdanosti(CI)) za ispitanike s vrijednostima hematokrita unutar referentnog intervala.

Regresijska jednadžba	$y = -1,318182 + 0,863636 x$
Odsječak na osi x	-1,3182 (95% CI: -3,4815 - 0,1250)
Koeficijent smjera pravca	0,8636 (95%CI: 0,8125 - 0,9259)
Spearmanov koeficijent korelacije	0,900 (95%CI: 0,866 - 0,926)
Statistička značajnost	P<0,0001

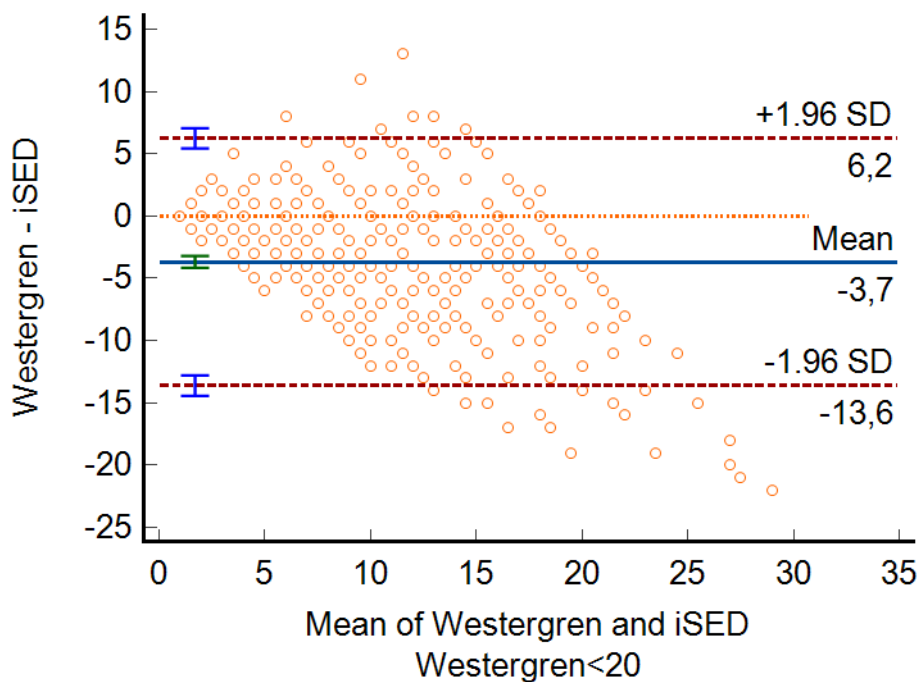
4.2.4 Rezultati usporedbe ispitivanih analitičkih metoda u ispitivanim uzorcima s vrijednostima sedimentacije eritrocita unutar referentnog intervala

Slike 6.1 i 6.2 prikazuju rezultate dobivene Passing-Bablok i Blandt-Altman analizom u uzorcima ispitanika s vrijednostima sedimentacije eritrocita unutar referentnog intervala (N=436), a u Tablici 8 su prikazani statistički podaci dobiveni Pasing-Bablok analizom za navedene uzorke.

Passing-Bablokovom regresijskom analizom je utvrđeno postojanje i proporcionalne i konstantne razlike između metoda. Blandt-Altmanovom analizom je utvrđena razlika od -3,9 (95%CI: -12,9-5,1).



Slika 6.1 Usporedba ispitivanih analitičkih metoda (metode za automatizirano određivanje brzine sedimentacije eritrocita i referentne metode po Westergrenu) u uzorcima ispitanika s vrijednostima sedimentacije eritrocita unutar referentnog intervala (N=436) (Passing-Bablok regresijska analiza; regresijska linija obojana je plavo).



Slika 6.2 Usporedba ispitivanih analitičkih metoda (metode za automatizirano određivanje brzine sedimentacije eritrocita i referentne metode po Westergrenu) u uzorcima ispitanika s vrijednostima sedimentacije eritrocita unutar referentnog intervala (N=436) (Blandt-Altman analiza; plava linija predstavlja srednje odstupanje (engl. *mean difference*), a isprekidane crvene linije granice ± 1.96 standardnog odstupanja).

Tablica 8. Statistički podaci (Passing-Bablok regresijska analiza; koeficijent korelacije, regresijska jednadžba, odsječak i nagib pravca te 95%-tni intervali pouzdanosti (CI)) za ispitanike s vrijednostima sedimentacije eritrocita unutar referentnog intervala.

Regresijska jednadžba	$y = -0,500000 + 1,500000 x$
Odsječak na osi x	-0,5000 (95% CI: -0,6333 - 0,6667)
Koeficijent smjera pravca	1,5000 (95%CI: 1,3333 - 1,5333)
Spearmanov koeficijent korelacije	0,721 (95%CI: 0,672 - 0,763)
Statistička značajnost	P<0,0001

4.3 Ispitivanje stabilnosti i prijenosa

Rezultati dobiveni ispitivanjem stabilnosti su prikazani u Tablici 9.

Tablica 9. Prikaz rezultata dobivenih ispitivanjem stabilnosti. Razlike su ispitane parnim t-testom. Statistički značajna razlika se smatra ako je $P < 0,05$. SO=standardno odstupanje, CI=interval pouzdanosti.

Uzorci (N=10)	Srednja vrijednost (±SO) (mm/h)	Srednja razlika (95% CI)	P vrijednost
Početna vrijednost	24 (±21)		
Pohrana na sobnoj temp.			
4h	29 (±18)	5,2000 (0,07688 do 10,3231)	0,0473
6h	28 (±16)	3,9000 (-4,4659 do 12,2659)	0,3191
8h	28 (±17)	4,2000 (-3,0468 do 11,4468)	0,2223
24h	20 (±20)	-3,8000 (-18,2369 do 10,6369)	0,5662
Pohrana u hladnjaku			
4h	15 (±12)	-9,1000 (-16,4143 do -1,7857)	0,0202
6h	14 (±12)	-10,0000 (-17,6006 do -2,3994)	0,0155
8h	14 (±11)	-10,6000 (-18,7786 do -2,4214)	0,0167
24h	15 (±11)	-8,8000 (-17,7144 do 0,1144)	0,0524

Izračunati utjecaj prijenosa (engl. *carryover*) uzrokuje potencijalnu kontaminaciju od 4,1% na sljedeći analizirani uzorak.

4.4 Rezultati verifikacije referentnih intervala

Od 20 referentnih osoba (11 muškog i 9 ženskog spola, medijan godina 61, od 9 do 94 godina) brzina sedimentacije određena automatiziranom metodom n analizatoru iSED je u svih 20 ispitanika bila unutar pripadnog referentnog intervala preuzetog iz Harmonizacije laboratorijskih nalaza u području opće, specijalne i visokodiferentne medicinske biokemije (41).

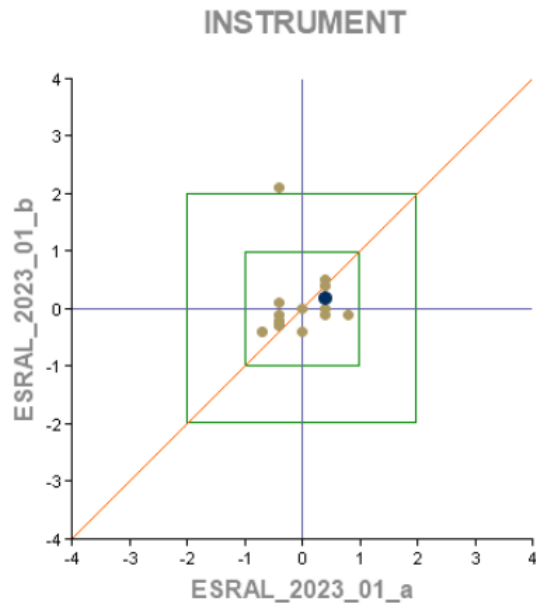
4.5 Rezultati vanjske kontrole kvalitete

Odstupanja dobivenih rezultata u odnosu na ciljne vrijednosti skupine su prikazani u Tablici 10, a na Slici 7 su grafički prikazani rezultati sudjelovanja u programu neovisnog organizatora vanjske procjene kvalitete ESfEQA. U programu neovisnog organizatora vanjske procjene kvalitete CAP sudjeluje znatno veći broj laboratorija (N=772-801) u odnosu na program neovisnog organizatora ESfEQA (N=26).

Svi kriteriji prihvatljivosti rezultata ispitivanja oba neovisna organizatora vanjske procjene kvalitete su zadovoljeni za sve uzorke u svim ciklusima navedenih programa.

Tablica 10. Rezultati sudjelovanja u programima neovisnih organizatora vanjske procjene kvalitete (EsfEQA, CAP) nakon analize distribuiranih uzoraka.

Organizator vanjske procjene kvalitete	Analizirani uzorci	Broj sudionika programa	Srednja vrijednost	Dobivena vrijednost	Standardno odstupanje (SO)	Bias (%)
CAP	CB-01	801	66,5	63	- 0,8	- 5,26
	CB-02	772	9,7	10	0,2	3,09
	CB-03	798	66,0	63	- 0,8	- 4,55
EsfEQA	ESRAL-01-a	26	11,95	13	2,67	8,79
	ESRAL-01-b	26	71,15	73	9,49	3,43



Slika 7. Grafički prikaz rezultata sudjelovanja u programu neovisnog organizatora vanjske procjene kvalitete ESFEQA (Youdenov dijagram).

4.6 Rezultati korelacije metode za automatizirano određivanje brzine sedimentacije eritrocita s upalnim parametrima

U Tablici 11 su prikazani Spearmanovi koeficijenti korelacije uz 95%-tne intervale pouzdanosti (CI) brzine sedimentacije eritrocite određene automatiziranom metodom s brojem leukocita (a), koncentracijama fibrinogena (b) i C-reaktivnog proteina (c).

Tablica 11.a) Spearmanov koeficijent korelacije uz 95%-tne intervale pouzdanosti (CI) između brzine sedimentacije određene iSED analizatorom i broja leukocita.

Varijabla Y	Brzina sedimentacije eritrocita izmjerena analizatorom iSED (mm/3,6 ks)
Varijabla X	Broj leukocita ($\times 10^9/L$)

Broj uzoraka	466
Spearmanov koeficijent korelacije	0,0667
Razina statističke značajnosti	P=0,1503
95%-tni interval pouzdanosti za Spearmanov koeficijent korelacije	-0,0242 do 0,157

Tablica 11. b) Spearmanov koeficijent korelacije uz 95%-tne intervale pouzdanosti (CI) između brzine sedimentacije određene iSED analizatorom i koncentracije fibrinogena.

Varijabla Y	Brzina sedimentacije eritrocita izmjerena analizatorom iSED (mm/3,6 ks)
Varijabla X	Koncentracija fibrinogena (g/L)

Broj uzoraka	158
Spearmanov koeficijent korelacije	0,541
Razina statističke značajnosti	P<0,0001
95%-tni interval pouzdanosti za Spearmanov koeficijent korelacije	0,421 do 0,643

Tablica 11. c) Spearmanov koeficijent korelacije uz 95%-tne intervale pouzdanosti (CI) između brzine sedimentacije određene iSED analizatorom i koncentracije C-reaktivnog proteina.

Variable Y	Brzina sedimentacije eritrocita izmjerena analizatorom iSED (mm/3,6 ks)
Variable X	Koncentracija CRP-a (mg/L)

Broj uzoraka	422
Spearmanov koeficijent korelacije	0,428
Razina statističke značajnosti	P<0,0001
95%-tni interval pouzdanosti za Spearmanov koeficijent korelacije	0,347 do 0,503

4.7 Rezultati praćenja vremena izdavanja nalaza

Usporedba vremena izdavanja nalaza određivanja brzine sedimentacije eritrocita automatiziranom i referentnom metodom je pokazala da je prosječno mjesečno vrijeme izdavanja nalaza metodom za automatizirano određivanje brzine sedimentacije 90 minuta u odnosu na prosječno mjesečno vrijeme dobiveno referentnom metodom po Westergrenu od 236 minuta.

Više od 60% nalaza brzine sedimentacije eritrocita automatiziranom metodom je izdano unutar 60 minuta.

5. Rasprava

Verifikacijom automatiziranog analizatora sedimentacije eritrocita Alcor iSED[®] dobiven je koeficijent varijacije za ukupnu laboratorijsku preciznost od 14% za područje normalnih razina primjenjivanog kontrolnog materijala, dok je za patološku razinu iznosio 3,1% što pokazuje da su dobiveni rezultati unutar jednog standardnog odstupanja oko ciljane vrijednosti definirane od strane proizvođača kontrolnog materijala Seditrol[®] Quality controls prema kojima su dozvoljeni koeficijenti varijacije za ukupnu laboratorijsku preciznost od 39% za normalnu razinu te 20% patološku razinu. Dobiveni rezultati su sukladni rezultatima dobivenih u ostalim istraživanjima (37-38 i 40), a jedino su Lapić i sur. (39) izmjerili značajno niže koeficijente varijacije na komercijalnim kontrolnim uzorcima. Viši koeficijenti za normalno područje se mogu objasniti nižim vrijednostima gdje mala razlika u broju uzrokuje veću statističku razliku, ali se ta razlika ne smatra klinički značajnom.

Usporedbom metoda između automatiziranog analizatora sedimentacije eritrocita Alcor iSED[®] i referentne metode za određivanje sedimentacije eritrocita po Westergrenu na 704 uzoraka pacijenata analizirana Passing-Bablokovom regresijskom analizom je pokazala konstantnu razliku između navedenih metoda, međutim nije utvrđeno postojanje proporcionalne razlike. Blandt-Altman analiza je pokazala da razlika u rezultatima iznosi -1,6 (95%CI: -18,5 - 15,3). Dobiveni rezultati su sukladni rezultatima dobivenih Bogdaycioglu i sur. gdje je također Passing-Bablokovom analizom nađena konstantna razlika, a Blandt-Altmanovom analizom viša razlika koja je iznosila 13 (95%CI: -35,7 - 61,6) (37). No, u istraživanju Lapić i sur. je Passing-Bablok analizom dobivena samo proporcionalna razlika, a Blandt-Altmanovom analizom pozitivno odstupanje od 8,1 (95% CI:7,0-9,3) (39). Nadalje je u ovom istraživanju dobiven viši Spearmanov koeficijent korelacije (0,885, P<0,0001) koji

pokazuje vrlo dobro slaganje rezultata u odnosu na Bogdaycioglu i sur. (0,76, $P < 0,0001$) (37). Gotovo identičan koeficijent korelacije su dobili Lapić i sur. (0,862, 95%CI: 0,838-0,882) (39). Navedene razlike se mogu objasniti korištenjem različitih metoda jer se brzina sedimentacije mjeri u različitim fazama.

Podjelom pacijenata prema spolu je Passing-Bablokovom analizom dobivena također samo konstantna razlika za oba spola, Blandt-Altmanovom analizom je nađena gotovo jednako negativno odstupanje (muški spol= -1,5, a ženski -1,7), a Spearmanov koeficijent korelacije pokazuje bolje slaganje rezultata ženskog spola (0,901, 95%CI: 0,879-0,919) u odnosu na muški spol (0,863, 95%CI: 0,834-0,887). U dosadašnjim istraživanjima nije rađena usporedba podijeljena prema spolu, a ove rezultate možemo objasniti utvrđenim razlikama po spolovima gdje žene imaju više vrijednosti sedimentacije (41). Osim toga, utjecaj na navedene rezultate je moguć i zbog različitih navika ili prisustva nekih bolesti koji nisu ispitani u ovom istraživanju, a utječu na rezultat (9-10).

Poznato je da na mjerenje sedimentacije eritrocita Westergrenovom metodom utječe između ostalog i anemija odnosno niske vrijednosti hematokrita (4, 33-35). S obzirom na to da analizator iSED mjeri sedimentaciju eritrocita u početnoj fazi, utjecaj hematokrita se smanjuje na najmanji mogući (3). Zbog toga su izdvojeni ispitanici s vrijednostima hematokrita unutar referentnog intervala (N=159) i napravljena je usporedba automatizirane i referentne metode. Passing-Bablok regresijskom analizom je dobivena proporcionalna razlika, a Blandt-Altmanovom analizom razlika od 5,7 (95%CI: -17-28,3). Spearmanov koeficijent korelacije je iznosio 0,900 (95%CI: 0,866-0,926) što pokazuje izvrsno slaganje rezultata. U istraživanju Lapić i sur. su dobiveni viši koeficijenti korelacije kod ispitanika s nižim vrijednostima hematokrita u odnosu na ispitanike s hematokritom unutar referentnog

intervala što pokazuje da hematokit nije ključan čimbenik koji doprinosi razlikama u navedenim metodama (39).

Kako bi sveli utjecaj svih čimbenika na rezultat na minimum, izdvojeni su ispitanici čije su vrijednosti sedimentacije eritrocita bile unutar referentnog intervala izmjerene referentnom metodom (N=363) i napravljene su usporedbe s automatiziranom metodom. Passing-Bablokova analiza je pokazala proporcionalnu i konstantnu razliku, a Blandt-Altman razliku od -3,9 (95%CI:-12,9-5,1). Koeficijent korelacije iznosi 0,684 (95%CI: 0,625-0,735) što pokazuje lošije slaganje rezultata u odnosu na cijelu skupinu. Ove razlike se mogu objasniti nižim vrijednostima sedimentacije gdje mala razlika uzrokuje veliku statističku razliku.

Stabilnost ispitana na 10 uzoraka ispitanika je pokazala da je statistički značajna razlika prisutna kod uzoraka pohranjenih u hladnjaku nakon 4, 6 i 8 sati, dok nakon 24 sata nije nađena statistički značajna razlika. Rezultati su pokazali da su značajno niže vrijednosti sedimentacije eritrocita kod uzoraka pohranjenih u hladnjaku u odnosu na uzorke koji su pohranjeni na sobnoj temperaturi. Navedene razlike se mogu objasniti promjenama u viskoznosti krvi što utječe na metodu fotometrijske reologije (3). Kod uzoraka pohranjenih na sobnoj temperaturi nije nađena statistički značajna razlika osim za uzorke nakon 4 sata stajanja. S obzirom na to da su Bogdaycioglu i sur. (37) dobili značajno više vrijednosti sedimentacije eritrocita nakon pohrane u hladnjaku, stabilnost uzoraka je potrebno ispitati na većem broju uzoraka. Također, ograničenje našeg ispitivanja je što su uzorci alikvotirani nakon analize sedimentacije eritrocita u svježim uzorcima, a nisu uzorkovane dodatne epruvete za pohranu.

Izračunati utjecaj prijenosa (engl. *carryover*) uzrokuje potencijalnu kontaminaciju od 4,1% na sljedeći analizirani uzorak. Dobiveni rezultat je sukladan rezultatima drugih

istraživanja Schapkaitz i sur. (2,9%) (36) i Lapić i sur. (3,2%) (39). Potvrđeno je da nema kontaminacije od prethodnog uzorka jer se ovaj rezultat smatra analitičkom varijacijom s obzirom na to da nije viši od najvišeg koeficijenta varijacije dobivenog verifikacijom.

Iako su potvrđeni referentni intervali dobiveni automatiziranom metodom u odnosu na Westergrenovu referentnu metodu, ipak je usporedbom dobivena konstantna razlika što znači da bi se neki rezultati sedimentacije eritrocita mogli drugačije klinički tumačiti, a time bi bila drugačija skrb za bolesnika. Zato se preporučuje izrada vlastitih referentnih intervala za određenu kombinaciju automatizirane metode eritrocita i populacije bolesnika.

Sudjelovanjem u programima vanjske kontrole kvalitete neovisnih organizatora (ESfEQA i CAP) je dokazano da su svi rezultati organizatora zadovoljeni u svim ciklusima, odstupanja u odnosu na druge laboratorije su minimalna i da su rezultati prihvatljivi za kliničku primjenu. S obzirom na to da se vanjska kontrola kvalitete ne radi u svježim humanim uzorcima nego stabiliziranim pripravcima humanih eritrocita, uzorci nisu komutabilni i ne postupa se s njima jednako kao s humanim uzorcima pune krvi stoga bi organizatori vanjske kontrole kvalitete trebali napraviti uzorak koji će biti komutabilan i imati jednaku pripremu kao i uzorak pune krvi bolesnika.

Brzina sedimentacije eritrocita izmjerena analizatorom iSED i koncentracija fibrinogena imaju najviši Spearmanov koeficijent korelacije (0,541, 95%CI=0,421-0,643), slijedi korelacija s koncentracijom CRP-a (0,428, 95%CI=0,347-0,503), dok nije nađena statistički značajna korelacija s brojem leukocita (0,067, 95%CI=-0,024-0,157). Bogdaycioglu i sur. su dobili viši koeficijent korelacije s koncentracijom CRP-a (0,643, $P < 0,0001$) (37). Poznato je da fibrinogen najviše utječe na sedimentaciju eritrocita jer neutralizira negativne naboje na površini eritrocita koji se u fiziološkim uvjetima odbijaju i opiru agregaciji (9-10).

Potrebno je više istraživanja s većim brojem ispitanika kako bi potvrdili dobivene rezultate.

Uvođenje automatizirane sedimentacije eritrocita u rutinski rad skraćuje vrijeme od primitka uzorka do izdavanja nalaza 2,6 puta. Tako liječnici dobivaju ranije informacije o brzini sedimentacije što ubrzava skrb o bolesniku i izbor dodatnih pretraga ili terapije.

6. Zaključci

Verifikacijom analizatora Alcor iSED® dobiveni su rezultati koji su prihvatljivi s obzirom na postavljene kriterije proizvođača kontrolnog materijala. Usporedbom rezultata između automatizirane analize sedimentacije eritrocita na analizatoru iSED® i referentne metode za određivanje sedimentacije eritrocita po Westergrenu analizom humanih uzoraka možemo primijetiti da su dobivene statistički značajne konstantne razlike. Dobiveni rezultati koreliraju s Kratz i sur. za 13 različitih automatiziranih analizatora sedimentacije eritrocita (2). S obzirom na to da automatizirani analizator mjeri samo početnu fazu sedimentacije eritrocita u odnosu na referentnu Westergren metodu, razlike između dviju metoda se mogu objasniti utjecajem anemije, hematokrita, fibrinogena ili paraproteina kao i različitom osjetljivošću i specifičnošću na različite faze bolesti, što uvjetuje nastavak ispitivanja u dijelu ocjene primjenjivanih referentnih intervala.

Referentna metoda po Westergrenu je jedna od najdugotrajnih i najzahtjevnijih manualnih pretraga u hematološkom laboratoriju. S obzirom na navedeno, prednosti uvođenja automatizirane analize sedimentacije eritrocita bile bi:

- a) standardizacija mjerenja sedimentacije eritrocita,
- b) korištenje barkodiranih epruveta pri čemu se rezultat automatski prebacuje u Laboratorijski informacijski sustav (manja mogućnost pogreške prilikom prepisivanja rezultata),
- c) veća točnost, reproducibilnost i brže vrijeme izdavanja nalaza,
- d) smanjenje količine potrebnog uzorka za analizu s obzirom na to da nije potrebno uzorkovati dodatnu epruvetu za određivanje brzine sedimentacije eritrocita,
- e) povećanje efikasnosti u radu laboratorijskog osoblja s obzirom na uštedu vremena,

f) niži troškovi.

Iz svega navedenog zaključujemo da ispitivana automatizirana metoda određivanja brzine sedimentacije eritrocita zadovoljava postavljene analitičke kriterije kvalitete te je prihvatljiva za rutinsku kliničku primjenu.

7. Literatura

1. McKenzie SB, Williams JL. Clinical Laboratory Hematology; Hematology procedures: Erythrocyte sedimentation rate (ESR). 3rd ed. Pearson, 2015; 797-8.
2. Kratz A, Plebani M, Peng M, Lee YK, McCafferty R, Machin SJ. ICSH recommendations for modified and alternate methods measuring the erythrocyte sedimentation rate. 2017, Wiley.
3. Operators Manual, iSED Erythrocyte sedimentation rate analyzer, Alcor Scientific, Cat. 112-00101.
4. Reference method for the erythrocyte sedimentation rate (ESR) test on human blood. Br J Haematol. 1973 May;24(5):671-3.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute, EP15-A2 User Verification of Performance for Precision and Trueness; Approved guideline (second edition), Wayne, PA, USA, 2006.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute, EP09-A3 Measurement Procedure Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved guideline (third edition), Wayne, PA, USA, 2013.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute, H26-A2 Validation, Verification, and Quality Assurance of Automated Hematology Analyzers; Approved Standard (second edition), Wayne, PA, USA, 2010.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute, 28-A3c Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline (third edition), Wayne, PA, USA 2010.
9. Tishkowski K, Gupta V. Erythrocyte Sedimentation Rate. [Updated 2023 Apr 23]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Dostupno

na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557485/> (Datum pristupa: 20.08.2023.)

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. Harrison M. Erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein. *Aust Prescr.* 2015 Jun;38(3):93-4
12. Litao MK, Kamat D. Erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein: how best to use them in clinical practice. *Pediatr Ann.* 2014 Oct;43(10):417-20.
13. Lapić I, Padoan A, Bozzato D, Plebani M. Erythrocyte Sedimentation Rate and C-Reactive Protein in Acute Inflammation. *Am J Clin Pathol.* 2020 Jan 1;153(1):14-29.
14. Petranović D, Zorić Č, Sever Prebilić M, Načinović Duletić A, Host, I. Sedimentacija eritrocita-algoritam obrade. *Medicina,* 2002, 38. (1-2), 37-39.
15. Alende-Castro V, Alonso-Sampedro M, Vazquez-Temprano N, Tuñez C, Rey D, García-Iglesias C, Sopeña B, Gude F, Gonzalez-Quintela A. Factors influencing erythrocyte sedimentation rate in adults: New evidence for an old test. *Medicine (Baltimore).* 2019 Aug;98(34):e16816.
16. Alende-Castro V, Alonso-Sampedro M, Fernández-Merino C, Sánchez-Castro J, Sopeña B, Gude F, Gonzalez-Quintela A. C-Reactive Protein versus Erythrocyte Sedimentation Rate: Implications Among Patients with No Known Inflammatory Conditions. *J Am Board Fam Med.* 2021 Sep-Oct;34(5):974-983.
17. Yayan J. Erythrocyte sedimentation rate as a marker for coronary heart disease. *Vasc Health Risk Manag.* 2012;8:219-23.
18. Andresdottir MB, Sigfusson N, Sigvaldason H, Gudnason V. Erythrocyte sedimentation rate, an independent predictor of coronary heart disease in men and women: The

- Reykjavik Study. *Am J Epidemiol.* 2003 Nov 1;158(9):844-51.
19. Zaremba J, Skrobański P, Losy J. Acute ischaemic stroke increases the erythrocyte sedimentation rate, which correlates with early brain damage. *Folia Morphol (Warsz).* 2004 Nov;63(4):373-6.
20. Singh AS, Atam V, Yathish BE, Das L, Koonwar S. Role of erythrocyte sedimentation rate in ischemic stroke as an inflammatory marker of carotid atherosclerosis. *J Neurosci Rural Pract.* 2014 Jan;5(1):40-5.
21. Aletaha D, Smolen JS. Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis: A Review. *JAMA.* 2018 Oct 2;320(13):1360-1372.
22. Dasgupta B, Cimmino MA, Kremers HM, Schmidt WA, Schirmer M, Salvarani C, Bachta A, Dejaco C, Duftner C, Jensen HS, Duhaut P, Poór G, Kaposi NP, Mandl P, Balint PV, Schmidt Z, Iagnocco A, Nannini C, Cantini F, Macchioni P, Pipitone N, Del Amo M, Espígol-Frigolé G, Cid MC, Martínez-Taboada VM, Nordborg E, Direskeneli H, Aydin SZ, Ahmed K, Hazleman B, Silverman B, Pease C, Wakefield RJ, Luqmani R, Abril A, Michet CJ, Marcus R, Gonter NJ, Maz M, Carter RE, Crowson CS, Matteson EL. 2012 Provisional classification criteria for polymyalgia rheumatica: a European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 2012 Apr;64(4):943-54.
23. Ponte C, Grayson PC, Robson JC, Suppiah R, Gribbons KB, Judge A, Craven A, Khalid S, Hutchings A, Watts RA, Merkel PA, Luqmani RA; DCVAS Study Group. 2022 American College of Rheumatology/EULAR Classification Criteria for Giant Cell Arteritis. *Arthritis Rheumatol.* 2022 Dec;74(12):1881-1889.
24. Keenan RT, Swearingen CJ, Yazici Y. Erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein levels are poorly correlated with clinical measures of disease activity in

- rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and osteoarthritis patients. *Clin Exp Rheumatol*. 2008 Sep-Oct;26(5):814-9.
25. Orr CK, Najm A, Young F, McGarry T, Biniiecka M, Fearon U, Veale DJ. The Utility and Limitations of CRP, ESR and DAS28-CRP in Appraising Disease Activity in Rheumatoid Arthritis. *Front Med (Lausanne)*. 2018 Aug 3;5:185.
26. Michail M, Jude E, Liaskos C, Karamagiolis S, Makrilakis K, Dimitroulis D, Michail O, Tentolouris N. The performance of serum inflammatory markers for the diagnosis and follow-up of patients with osteomyelitis. *Int J Low Extrem Wounds*. 2013 Jun;12(2):94-9.
27. Lavery LA, Ahn J, Ryan EC, Bhavan K, Oz OK, La Fontaine J, Wukich DK. What are the Optimal Cutoff Values for ESR and CRP to Diagnose Osteomyelitis in Patients with Diabetes-related Foot Infections? *Clin Orthop Relat Res*. 2019 Jul;477(7):1594-1602.
28. Cheung KL, Graves CR, Robertson JF. Tumour marker measurements in the diagnosis and monitoring of breast cancer. *Cancer Treat Rev*. 2000 Apr;26(2):91-102.
29. Tas F, Erturk K. Elevated erythrocyte sedimentation rate is associated with metastatic disease and worse survival in patients with cutaneous malignant melanoma. *Mol Clin Oncol*. 2017 Dec;7(6):1142-1146.
30. Damanhour GA, Jarullah J, Marouf S, Hindawi SI, Mushtaq G, Kamal MA. Clinical biomarkers in sickle cell disease. *Saudi J Biol Sci*. 2015 Jan;22(1):24-31.
31. Hu QL, Li ZJ, Lin L, Zhang L, Lv YJ, Wu LF, Chen MY. Effect of storage temperature and time on erythrocyte sedimentation rate. *Eur J Med Res*. 2022 May 28;27(1):76.
32. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Procedure for the Erythrocyte Sedimentation Rate (ESR) Test; Approved Standard (5th edn., H2-A5). Villanova, PA: CLSI; 2011.

33. Narang V, Grover S, Kang AK, Garg A, Sood N. Comparative Analysis of Erythrocyte Sedimentation Rate Measured by Automated and Manual Methods in Anaemic Patients. *J Lab Physicians*. 2020 Dec;12(4):239-243.
34. Fabry TL. Mechanism of erythrocyte aggregation and sedimentation. *Blood*. 1987 Nov;70(5):1572-6.
35. Higuchi M, Watanabe N. A rapid and accurate method for estimating the erythrocyte sedimentation rate using a hematocrit-corrected optical aggregation index. *PLoS One*. 2022 Jul 12;17(7):e0270977.
36. Schapkaitz E, RabuRabu S, Engelbrecht M. Differences in erythrocyte sedimentation rates using a modified Westergren method and an alternate method. *J Clin Lab Anal*. 2019;33:e22661.
37. Boğdaycioğlu N, Yilmaz FM, Sezer S, Oğuz E. Comparison of iSED and Ves-Matic Cube 200 Erythrocyte Sedimentation Rate Measurements With Westergren Method. *J Clin Lab Anal*. 2015 Sep;29(5):397-404.
38. Brenčić T, Juričić G, Honović L. Performance comparison of Westergren modified SRS 100/II and alternate iSED® method for erythrocyte sedimentation rate. *Int J Lab Hematol*. 2023 Feb;45(1):29-36.
39. Lapić I, Miloš M, Tosato F i sur. Analytical validation of the iSED automated analyzer for erythrocyte sedimentation rate. *Int J Lab Hematol*. 2020;42:109–15.
40. Čičak H, Šonjić P, Šimundić AM. Verification of automatic analysers Roller 20PN and iSED for measuring erythrocyte sedimentation rate. *Biochem Med (Zagreb)*. 2022 Feb 15;32(1):010708.
41. Stavljenić Rukavina A, Čvorišćec D (ur.). Harmonizacija laboratorijskih nalaza u području opće, specijalne i visokodiferentne medicinske biokemije; *Medicinska*

naklada, Zagreb, 2007.