

Usporedba spektrofotometrijskih metoda određivanja koncentracije hemoglobina, sadržaja i koncentracije hemoglobina u eritrocitima

Eržić, Ema

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:785894>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-28**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Ema Eržić

USPOREDBA

SPEKTROFOTOMETRIJSKIH METODA

ODREĐIVANJA KONCENTRACIJE

HEMOGLOBINA, SADRŽAJA I

KONCENTRACIJE HEMOGLOBINA U

ERITROCITIMA

Završni rad

Osijek, 2023.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Ema Eržić

USPOREDBA

SPEKTROFOTOMETRIJSKIH METODA

ODREĐIVANJA KONCENTRACIJE

HEMOGLOBINA, SADRŽAJA I

KONCENTRACIJE HEMOGLOBINA U

ERITROCITIMA

Završni rad

Osijek, 2023.

Rad je ostvaren u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Osijek.

Mentor rada: doc. dr. sc. Vatroslav Šerić, spec. med. biochem.

Rad ima 25 listova, 4 tablice i 6 slika.

ZAHVALA

Zahvaljujem svome mentoru i voditelju Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku, doc. dr. sc. Vatroslavu Šeriću, spec. med. biochem. na prenesenom znanju, stručnom vodstvu i pomoći tijekom izrade rada.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Krvna slika.....	1
1.2. Hemoglobin	1
1.2.1. Sadržaj i koncentracija hemoglobina u eritrocitima.....	1
1.2.2. Referentni intervali prema dobi i spolu.....	2
1.2.3. Dijagnostičko značenje određivanja hemoglobina i eritrocitnih konstanti	3
1.3. Interferencije u laboratorijskom radu	4
1.4. Kontrola kvalitete i komercijalni kontrolni uzorci krvi.....	5
1.5. Hematološki analizatori	5
1.5.1. Metode hematoloških analizatora	5
1.5.2. Hematološki analizator Advia 2120	6
1.5.3. Hematološki analizator Sysmex XN 1000	6
2. CILJ RADA	7
3. MATERIJAL I METODE	8
3.1. Ustroj studije.....	8
3.2. Ispitanici (materijal)	8
3.3. Metode	8
3.4. Statističke metode.....	8
4. REZULTATI.....	9
4.1. Hemoglobin	11
4.2. Sadržaj hemoglobina u eritrocitima (MCH).....	12
4.3. Koncentracija hemoglobina u eritrocitima (MCHC).....	14
5. RASPRAVA	17
6. ZAKLJUČAK	20
7. SAŽETAK.....	21
8. SUMMARY	22
9. LITERATURA	23
10. ŽIVOTOPIS	25

1. UVOD

1.1. Krvna slika

Kompletna krvna slika jedna je od najčešće primjenjivanih pretraga kojom se određuje koncentracija stanica pomoću hematoloških analizatora te predstavlja važnu ulogu u praćenju zdravstvenog stanja pacijenta. Uzorak krvi za analizu krvne slike uzima se standardnim postupcima vađenja krvi u sustav epruveta s vakuumom koji osigurava pravilan omjer antikoagulansa i krvi. Iz uzorka krvi dobivaju se različiti parametri krvne slike poput broja eritrocita, leukocita, retikulocita te trombocita, koncentracije hemoglobina, eritrocitnih konstanti i vrijednost hematokrita. Navedeni parametri dio su međulaboratorijskih kontrolnih uzoraka (1).

1.2. Hemoglobin

Hemoglobin je hemoprotein koji sadrži željezo, a nalazi se u eritrocitima. Sastoji se od četiri polipeptidna lanca i četiri molekule hema koje se vežu za polipeptidne lance te su sposobne vezati se s molekulom kisika. Hem je prostetička skupina koja sadrži atom željeza u sredini heterocikličkog prstena porfirina. Hemoglobin najvažniju ulogu ima u prijenosu kisika do stanica tkiva, a sudjeluje i u prijenosu ugljikovog dioksida iz tkiva u alveole. Tako nastao ugljikov dioksid prenosi se krvlju u pluća gdje se dalje uklanja iz organizma (2).

Hemoglobin odrasla čovjeka sastoji se od dva α lanca i dva β lanca, a hemoglobin novorođenčeta ima dva α i dva γ lanca. Postoje različite vrste hemoglobina, a označuju se slovima. U krvi odrasla čovjeka nalazi se hemoglobin A, odnosno adultni hemoglobin, a hemoglobin F nalazi se u fetalnoj krvi. Novorođenačka krv sadrži velike koncentracije hemoglobina, dok se vrijednosti hemoglobina odraslog čovjeka dosegnu nakon pubertetske faze (2).

1.2.1. Sadržaj i koncentracija hemoglobina u eritrocitima

MCH (engl. mean corpuscular hemoglobin) je eritrocitna konstanta koja označava sadržaj hemoglobina u eritrocitima, izražen u pikogramima. Predstavlja omjer koncentracije hemoglobina i broja eritrocita (1).

MCHC (engl. mean corpuscular hemoglobin concentration) je eritrocitna konstanta koja predstavlja prosječnu koncentraciju hemoglobina u gramima po jednoj litri eritrocita. Računa se kao omjer koncentracije hemoglobina i hematokrita (1).

1.2.2. Referentni intervali prema dobi i spolu

Rezultati mjerenja uzorka krvi uspoređuju se s referentnim intervalima koji pomažu u razlikovanju zdravog od bolesnog stanja (1). Referentni intervali ovise o dobi i spolu, a obuhvaćaju vrijednosti između gornjih i donjih referentnih granica dobivenih referentnim uzorkom. Referentni uzorak sastoji se od određenog broja referentnih osoba koje čine referentnu populaciju. Referentna osoba je osoba kod koje se ne može utvrditi nikakvo bolesno stanje. Dobiveni rezultati iz referentne populacije obuhvaćaju sva odstupanja koja bi mogla utjecati na interpretaciju nalaza. U svakom laboratoriju potrebno je odrediti referentne intervale za analite što je dugotrajan proces pa se najčešće koriste intervali preporučeni od proizvođača. Laboratoriji su dužni izvršiti provjeru referentnih intervala i procijeniti odgovaraju li populaciji bolesnika koju pokrivaju (3). Referentni intervali za MCH, MCHC i hemoglobin nalaze se u dolje navedenim tablicama.

Tablica 1. Referentni intervali za vrijednosti MCH, pribavljeno iz: (4)

Pretraga	Spol	Dob	Referentni interval	Jedinica
MCH *	Oba spola	1 - 14 d. †	31,1 - 37,8	pg
		15 - 30 d. †	29,7 - 34,6	
		31 d. † - 2 mj. ‡	28,6 - 32,9	
		3 mj. ‡ - 7 g. §	24,3 - 29,2	
		8 - 19 g. §	24,3 - 31,5	
		≥ 20 g. §	27,4 - 33,9	

* sadržaj hemoglobina u eritrocitima; † dob u danima; ‡ dob u mjesecima; § dob u godinama;

|| pikogrami

Tablica 2. Referentni intervali za vrijednosti MCHC, pribavljeno iz: (4)

Pretraga	Spol	Dob	Referentni interval	Jedinica
MCHC *	Oba spola	1 d. † - 7 g. ‡	300 - 350	g / L §
		8 - 19 g. ‡	304 - 346	
		≥ 20 g. ‡	320 - 345	

* koncentracija hemoglobina u eritrocitima; † dob u danima; ‡ dob u godinama; § gram po litri

Tablica 3. Referentni intervali za hemoglobin u gramima po litri, pribavljeno iz: (4)

Pretraga	Spol	Dob	Referentni interval	Jedinica
Hemoglobin	Oba spola	1 - 14 d.*	136 - 199	g / L §
	Oba spola	15 - 30 d.*	109 - 169	
	Oba spola	1 - 2 mj. †	90 - 144	
	Oba spola	3 - 5 mj. †	100 - 137	
	Oba spola	6 mj. † - 7 g. ‡	109 - 138	
	Muški	8 - 12 g. ‡	121 - 145	
	Muški	13 - 19 g. ‡	129 - 166	
	Muški	≥ 20 g. ‡	138 - 175	
	Ženski	8 - 19 g. ‡	118 - 149	
	Ženski	≥ 20 g. ‡	119 - 157	

* dob u danima; † dob u mjesecima; ‡ dob u godinama; § gram po litri

1.2.3. Dijagnostičko značenje određivanja hemoglobina i eritrocitnih konstanti

Najčešća bolesna stanja koja prate smanjene ili povećane koncentracije hemoglobina te MCH i MCHC su anemije i talasemije.

Anemija je bolesno stanje u kojemu je smanjen broj eritrocita u krvi i koncentracija hemoglobina. U radu su opisane anemije kod kojih hemoglobin i eritrocitne konstante igraju bitniju ulogu u dijagnostici. Anemije nastale poremećajem u sazrijevanju eritrocita su megaloblastična, sideropenična i sideroblastična. Megaloblastična anemija je uzrokovana manjkom folne kiseline ili poremećajem metabolizma kobalamina. Koncentracija hemoglobina je smanjena, MCH je povišen, a MCHC u granicama referentnog intervala. Sideropenična anemija karakterizirana je nedostatkom željeza u krvi, a koncentracije hemoglobina, MCH i MCHC su snižene. Sideroblastična anemija nastaje zbog poremećaja u sintezi hema.

Koncentracija hemoglobina je snižena, dok koncentracije MCH i MCHC mogu biti unutar referentnog intervala ili snižene (5).

Talasemije su nasljedni poremećaji globinskih lanaca koji nastaju mutacijama. Ovisno u kojem se lancu dogodila mutacija, dijelimo ih na α talasemiju te β talasemiju major i minor (5). α talasemije u sintezi fetalnog hemoglobina uzrokuju teški poremećaj koji završava fetalnim hidropsom. β talasemija major je karakterizirana gubitkom β lanaca, a posljedica je nasljeđivanja dviju različitih mutacija. β talasemija minor očituje se normalnom krvnom slikom i anemijom u ranoj fazi (1).

Mutacijom u β lancu globina nastaje bolest srpastih stanica koju karakterizira abnormalni oblik hemoglobina i srpasti oblik eritrocita. Prolaskom kroz kapilare srpasti eritrociti usporavaju protok krvi što dovodi do tromboza ili ishemijskog infarkta (5).

1.3. Interferencije u laboratorijskom radu

U laboratorijskom radu može doći do interferencija koje utječu na rezultate laboratorijskih nalaza. Interferencije su odstupanja istinitih vrijednosti analita koja su uzrokovana prisutnošću egzogenih ili endogenih tvari. Djelovanjem takvih tvari može doći do povišenih ili sniženih vrijednosti. Egzogene interferencije su u uzorak unesene izvana djelovanjem okoliša, a endogene interferencije su u uzorku u većoj koncentraciji zbog zdravstvenog stanja pacijenta. Također, interferencije mogu biti ovisne o metodi i analizatoru, stoga je bitno da proizvođač upozori na moguće interferencije (6). Među najčešćim interferencijama su lipemija, ikterija i hemoliza.

Lipemija predstavlja zamućenje uzorka koje je uzrokovano nakupljanjem lipoproteina. Čestice lipoproteina mogu apsorbirati svjetlost pa je lipemija česta kod uzoraka obrađenih spektrofotometrijskom metodom. Lipemija se u većini slučajeva može ukloniti iz uzorka centrifugiranjem, ekstrakcijom ili dilucijom (7).

Ikterija je endogena interferencija uzrokovana povišenom koncentracijom bilirubina u krvi. Ukoliko se radi o malim koncentracijama bilirubina, tada ikterija ne utječe značajno na rezultate. Određivanjem koncentracije konjugiranog bilirubina i ikteričnog indeksa razluči se o kojem stupnju ikterije se radi (8).

Hemoliza je razaranje stanične membrane i krvnih stanica prilikom kojeg dolazi do izlivanja izvanstanične tekućine, a nakon centrifugiranja plazma ili serum su crveno obojeni. Dijeli se na

hemolizu *in vitro* i *in vivo*. *In vitro* hemoliza nastaje najčešće zbog nepravilnog rukovanja s uzorkom poput naglog istiskivanja krvi u epruvetu. *In vivo* hemoliza odvija se u organizmu zbog duge kompresije. Interferencija ovisi o korištenom analizatoru, metodi i stupnju hemolize (2).

Standardizirane metode i postupci te provođenje kontrole kvalitete rada takve laboratorijske pogreške svode na minimum (6).

1.4. Kontrola kvalitete i komercijalni kontrolni uzorci krvi

Cilj kontrole kvalitete u laboratoriju je osigurati pouzdanost svakog rezultata dobivenog iz uzorka pacijenta. Kontrola kvalitete dijeli se na unutarnju i vanjsku (9).

Unutarnja kontrola kvalitete provodi se svakodnevno komercijalnim kontrolnim uzorcima s poznatim vrijednostima parametara. Za metode, analizatore i reagense deklarirani su poznati rezultati koji pokazuju točnost mjerenja. Ukoliko rezultat nije u zadanim rezultatima potrebno je ponoviti postupak mjerenja i kada dosegne traženu vrijednost mjeriti uzorke pacijenata (9).

Vanjska kontrola kvalitete radi se od strane ovlaštenih organizacija mjerenjem uzoraka nepoznate koncentracije, a cilj je dobiti rezultate jednake onima u referentnom laboratoriju. Za svaki analit se računa standardna devijacija te se tako određuju prihvatljiva odstupanja koja za hemoglobin iznose $\pm 5 \%$, za MCH $\pm 8 \%$ te za MCHC $\pm 12 \%$ (9).

1.5. Hematološki analizatori

Sastavni dio hematološkog laboratorija čini stanična analiza. Hematološki analizatori su olakšali brojanje i diferencijaciju stanica te ubrzali proces analize. Današnji hematološki analizatori koriste različite metode koje se temelje na raspršenju svjetlosti, električnoj impedanciji ili citokemiji. Uređaji imaju mogućnost analize kompletne krvne slike, ali i pojedinačnih analiza poput diferencijacije leukocita ili broja retikulocita (10).

1.5.1. Metode hematoloških analizatora

U ovom radu opisani su hematološki analizatori koji rade na principu spektrofotometrijske metode. Pomoću spektrofotometra mjeri se apsorbancija. Takvo mjerenje uključuje izvor

svjetlosti i detektor intenziteta svjetlosti te izdvajanje određene spektralne linije. Apsorbancija je proporcionalna koncentraciji produkta (10).

ICSH (*International Committee for Standardization in Haematology*) definira standardizirane metode koje uključuju referentne materijale i kalibratore. Postoji protokol za procjenu automatiziranih brojača krvnih stanica, a glavni cilj je pouzdanost i usklađenost rezultata (11). Preporučena referentna metoda za hemoglobin prema ICSH je metoda s hemoglobincijanidom. Upotrebom odgovarajućeg reagensa derivati hemoglobina reagiraju s hemoglobincijanidom te se mjerenjem na 546 nanometara dobiva određena vrijednost. Preporučeno je doziranje u bočicama od jantarnog stakla zbog toksičnog djelovanja cijanida. Iako je cijanid toksičan, metoda s hemoglobincijanidom je izuzetno točna te se zbog toga koristi kao referentna (12). Cijanid je smrtonosna kemikalija koja, ukoliko dođe do razvoja toksičnosti, smanjuje sposobnost organizma da koristi kisik. Osobe koje su bile izložene djelovanju cijanida mogu razviti oštećenje srca, živčanog sustava i mozga (13). Hematološki analizatori opisani u ovom radu, Advia 2120 i Sysmex XN 1000 razlikuju se u sastavu reagensa te u apsorbanciji pri kojoj se mjeri vrijednost produkta, također imaju mogućnost određivanja vrijednosti koristeći metodu bez uporabe cijanida što je velika prednost.

1.5.2. Hematološki analizator Advia 2120

Advia 2120 hematološki je analizator tvrtke Siemens. Što se tiče određivanja hemoglobina, uređaj može upotrebljavati imidazolni reagens bez cijanida. Mjerna reakcija hemoglobina sastoji se od dva koraka, to su liza crvenih krvnih stanica i nastanak oksidiranog oblika hemoglobina pri čemu nastaje ligand monoaquamonohidroksiferiporfirin. Koncentracija hemoglobina određena je spektrofotometrijski, apsorbancija se mjeri pri 645 nanometara (14).

1.5.3. Hematološki analizator Sysmex XN 1000

Sysmex XN 1000 hematološki je analizator tvrtke Sysmex koji u sastavu reagensa ima natrijev lauril sulfat, također bez cijanida. U uzorku hemoglobin postaje sulfatni derivat dodatkom natrijevog lauril sulfata. Mjeri se apsorbancija pri 555 nanometara te se tako očitava vrijednost nastalog produkta (15).

2. CILJ RADA

Cilj ovog rada je usporedbom rezultata dobivenih na dva hematološka analizatora s dvije verificirane spektrofotometrijske metode ispitati postoji li klinički značajna razlika u rezultatima te procijeniti mogu li se metode, odnosno analizatori koristiti naizmjenično u svakodnevnom radu laboratorija.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Ustroj studije

Studija je ustrojena kao presječna studija s podacima prikupljenim iz baze podataka u Bolničkom informacijskom sustavu (BIS).

3.2. Ispitanici (materijal)

Istraživanje je provedeno u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Osijek. U studiju je uključeno 50 uzoraka krvi nasumično odabranih pacijenata obrađenih na dva hematološka analizatora.

3.3. Metode

Podatci su prikupljeni iz baze podataka iz BIS-a. Uzorci krvi prikupljeni su standardnim postupcima vađenja krvi u EDTA epruvete te analizirani na dva hematološka analizatora, Sysmex XN 1000 i Advia 2120 s dvije verificirane spektrofotometrijske metode. Iz uzoraka krvi nasumičnih pacijenata bilježile su se vrijednosti hemoglobina, sadržaj hemoglobina u eritrocitima (MCH) i koncentracija hemoglobina u eritrocitima (MCHC). Uređaji se temelje na spektrofotometrijskim metodama pa je nužno odrediti apsorbanciju. Mjerenje apsorbancije navedenih parametara radilo se pri 555 nanometara za analizator Advia 2120, odnosno 645 nanometara za Sysmex XN 1000. Apsorbancija je proporcionalna vrijednosti parametara (14, 15).

3.4. Statističke metode

U statističkom programu MedCalc (inačica 22.009, MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgija) obrađuju se rezultati. Deskriptivna statistika rabi se za prikaz raspodjele. D' Agostino - Pearsonovim testom ispitana je normalnost raspodjele. Mann - Whitney testom testirana je razlika između metoda. Spearmanovim koeficijentom korelacije ispitana je povezanost varijabli. Za obradu i prikaz podataka rabi se Passing - Bablok regresijska analiza i Bland - Altman analiza. $P < 0,05$ predstavlja razinu značajnosti dobivenih rezultata (5).

4. REZULTATI

Izvršena su mjerenja koncentracije hemoglobina te sadržaja i koncentracije hemoglobina u eritrocitima u 50 uzoraka krvi obrađenih na dva hematološka analizatora.

Tablica 4. Rezultati određivanja hemoglobina, MCH i MCHC dobiveni mjerenjem dvjema metodama na dva hematološka analizatora (Sysmex i Advia)

Sysmex	Hemoglobin	MCH *	MCHC †	Advia	Hemoglobin	MCH *	MCHC †
1	121	28,3	313	1	123	27,9	310
2	119	27,8	316	2	118	27,9	313
3	96	28,2	312	3	97	27,8	306
4	149	29,4	326	4	152	30,1	327
5	158	31,7	333	5	161	32,4	340
6	133	26,3	306	6	136	26,8	308
7	122	29,9	323	7	123	30,2	321
8	93	30,6	324	8	96	30,4	330
9	99	25,6	318	9	101	26,1	326
10	87	25,3	315	10	90	25,9	325
11	107	30,8	315	11	109	30,7	319
12	133	30,3	316	12	136	31	324
13	125	31,3	336	13	126	31,6	333
14	136	29,4	345	14	138	29,2	338
15	126	32,4	332	15	127	32,4	327
16	97	27,6	314	16	97	27,5	315
17	110	28,7	348	17	113	29,1	351
18	121	28,9	334	18	120	28,7	332
19	137	29,5	343	19	136	29	332
20	101	33	333	20	104	32,5	329
21	98	29,7	325	21	100	29,7	326

* sadržaj hemoglobina u eritrocitima; † koncentracija hemoglobina u eritrocitima

Sysmex	Hemoglobin	MCH *	MCHC †	Advia	Hemoglobin	MCH *	MCHC †
22	120	26,4	315	22	119	25,7	305
23	155	29,7	348	23	156	29,6	337
24	148	28,5	329	24	148	29,2	333
25	144	29,7	349	25	145	30,3	346
26	124	30,2	346	26	123	30	340
27	147	29,1	348	27	147	28,9	341
28	147	30,4	339	28	149	30,3	331
29	113	25,5	328	29	115	25,9	322
30	144	30,6	331	30	145	30,6	325
31	110	29,7	326	31	112	29,9	327
32	66	14,7	264	32	69	14,8	265
33	138	36,6	325	33	139	36,6	320
34	147	31,1	335	34	147	31	320
35	97	30	329	35	99	29,6	329
36	80	25,3	315	36	82	25,6	321
37	62	34,1	343	37	65	34,2	346
38	88	19,6	312	38	88	19,6	305
39	89	27,8	303	39	91	27,6	306
40	80	33,6	302	40	81	33,6	311
41	94	30,9	328	41	98	30,9	322
42	99	29,6	319	42	101	29,4	317
43	78	28,8	317	43	80	28,6	315
44	96	22,5	290	44	97	22,4	299
45	83	39,2	324	45	87	40	321
46	92	24	297	46	94	24,3	308
47	94	33,3	337	47	95	32,8	331
48	94	27,3	290	48	96	27,3	301
49	139	31,9	333	49	134	31,6	330
50	123	29,6	310	50	120	29,3	314

* sadržaj hemoglobina u eritrocitima; † koncentracija hemoglobina u eritrocitima

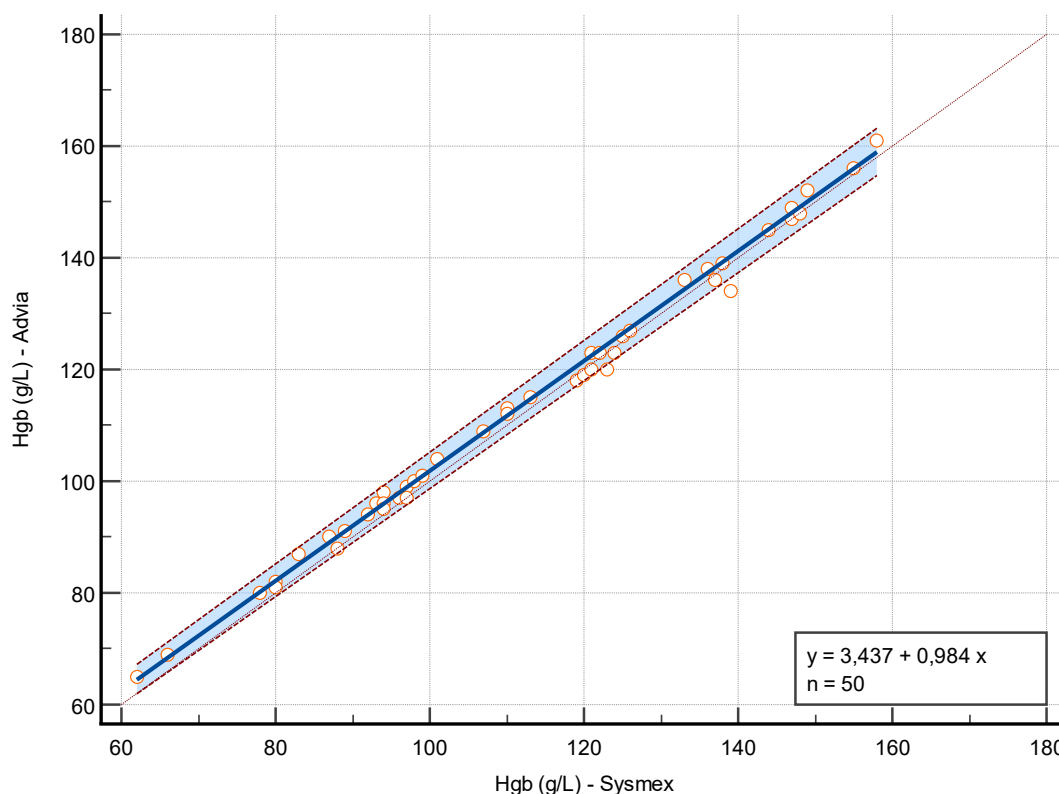
4.1. Hemoglobin

D'Agostino - Pearsonov test za vrijednosti hemoglobina pokazao je da raspodjela nije normalna ($P = 0,0005$).

Mann - Whitney testom utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika vrijednosti hemoglobina prilikom korištenja metode 1 na Sysmex analizatoru i metode 2 na Advia analizatoru ($P = 0,7432$).

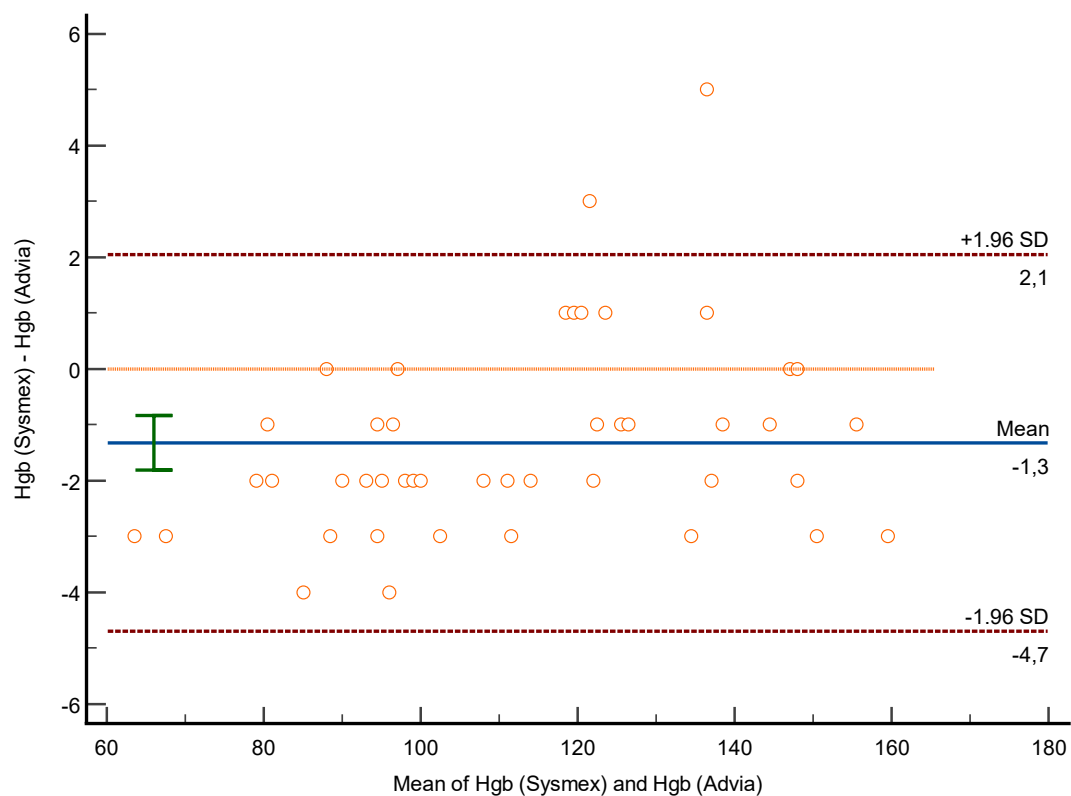
Spearmanovim koeficijentom korelacije pokazana je izvrsna povezanost između metoda prilikom određivanja hemoglobina ($\rho = 0,996$).

Rezultati Passing - Bablok regresijske analize pokazali su da postoji konstantno odstupanje (95 % CI, odnosno interval pouzdanosti 2 - 5,2), ali ne postoji proporcionalno odstupanje (95 % CI 0,97 - 1,0) između metoda prilikom određivanja koncentracije hemoglobina. Jednadžba pravca glasi: $y = 3,437 + 0,984 x$ (Slika 1.).



Slika 1. Passing - Bablok regresijska analiza između metoda prilikom određivanja hemoglobina (točke prikazuju vrijednosti, puna crta regresijski pravac, sitno isprekidana crta prikazuje idealan pravac, a isprekidane dvije crte prikazuju intervale pouzdanosti)

Navedeno je prikazano i Bland - Altman dijagramom (Slika 2.). Dva rezultata odstupaju, nalaze se iznad dozvoljene druge standardne devijacije ($+1,96$), a ostali su unutar granica standardnih devijacija ($\pm 1,96$).



Slika 2. Bland - Altman dijagram metode 1 i 2 prilikom određivanja vrijednosti hemoglobina (središnja puna linija predstavlja srednju vrijednost razlike, a gornja i donja isprekidana linija predstavlja granice prihvatljivosti definirane standardnom devijacijom)

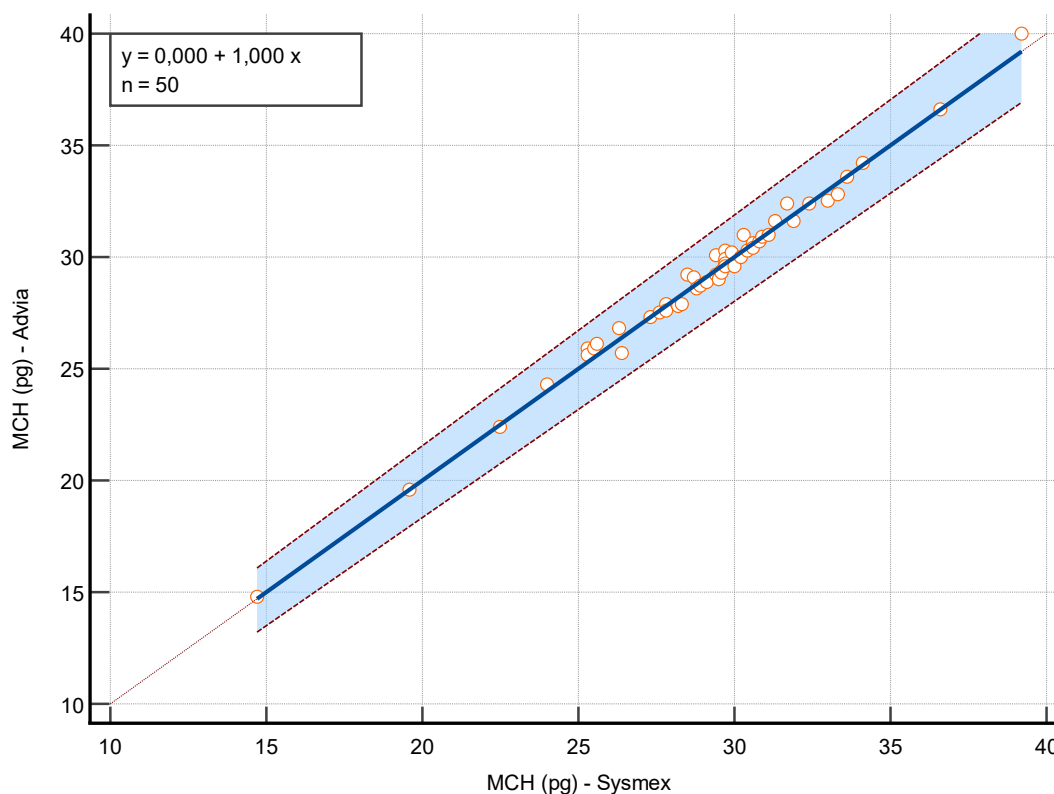
4.2. Sadržaj hemoglobina u eritrocitima (MCH)

Za MCH vrijednosti D' Agostino - Pearsonov test je pokazao da je raspodjela normalna ($P = 0,3244$).

Mann - Whitney test pokazao je da ne postoji statistički značajna razlika između metoda prilikom određivanja MCH ($P = 0,9615$).

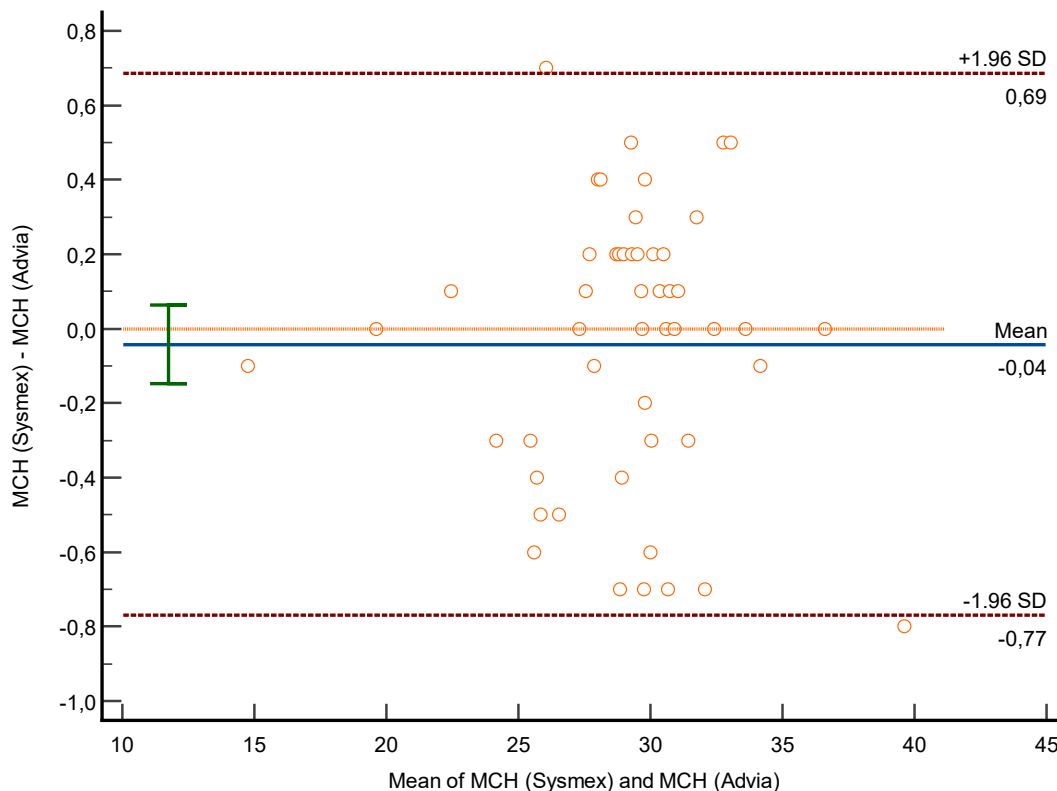
Spearmanovim koeficijentom korelacije pokazana je izvrsna povezanost između metoda prilikom određivanja MCH ($\rho = 0,986$).

Passing - Bablok regresijska analiza pokazala je da nema konstantnog (95 % CI - 1,016 - 0,898) niti proporcionalnog (95 % CI 0,968 - 1,03) odstupanja između metoda pri određivanju vrijednosti MCH. Jednadžba pravca glasi: $y = x$ (Slika 3.).



Slika 3. Passing - Bablok regresijska analiza između metoda prilikom određivanja MCH (točke prikazuju vrijednosti, puna crta regresijski pravac, sitno isprekidana crta prikazuje idealan pravac, a isprekidane dvije crte prikazuju intervale pouzdanosti)

Navedeno je prikazano i Bland - Altman dijagramom (Slika 4.). Jedan rezultat nalazi se ispod prve standardne devijacije (- 1,96), a drugi iznad druge standardne devijacije (+ 1,96).



Slika 4. Bland - Altman dijagram metode 1 i 2 prilikom određivanja vrijednosti MCH (središnja puna linija predstavlja srednju vrijednost razlike, a gornja i donja isprekidana linija predstavlja granice prihvatljivosti definirane standardnom devijacijom)

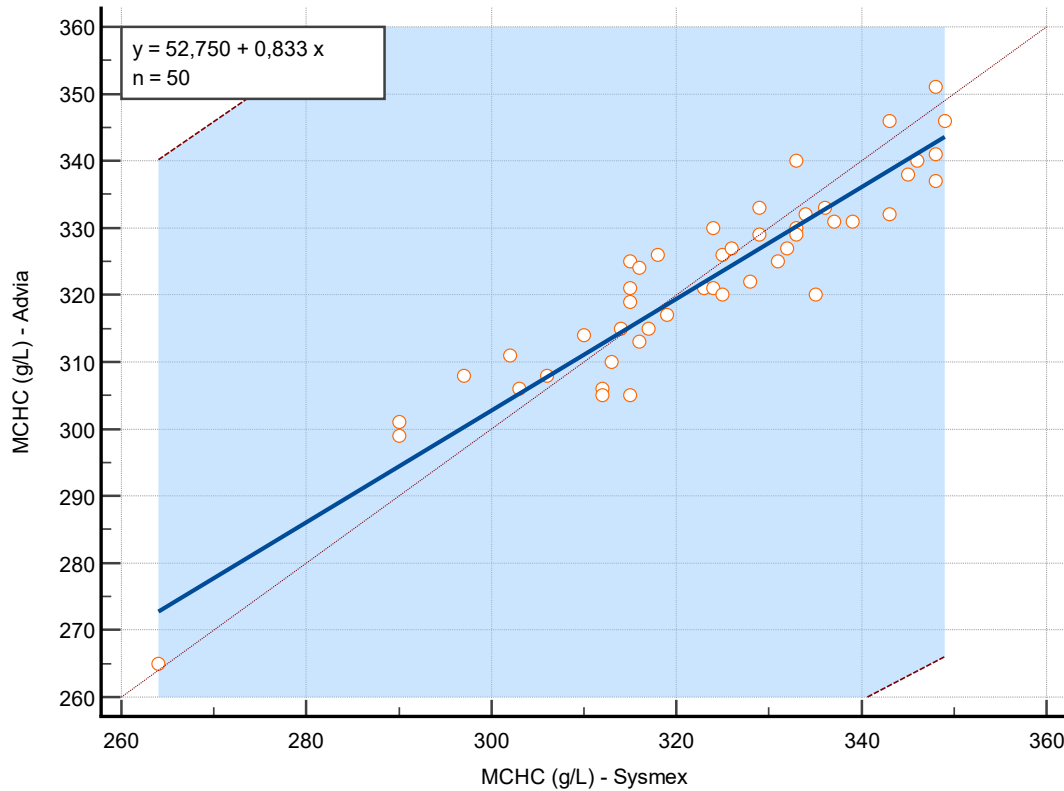
4.3. Koncentracija hemoglobina u eritrocitima (MCHC)

D' Agostino - Pearsonov test je za vrijednosti MCHC pokazao da je raspodjela normalna ($P = 0,7368$).

Mann - Whitney testom utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika vrijednosti MCHC ($P = 0,669$).

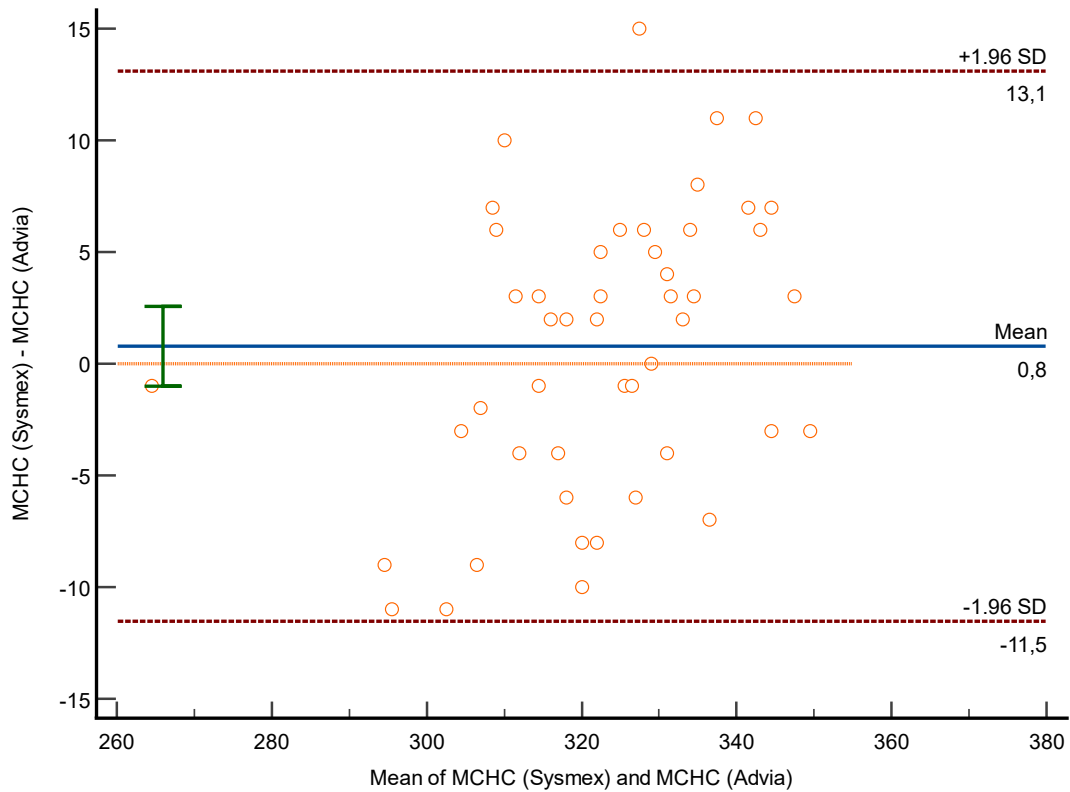
Spearmanovim koeficijentom korelacije pokazana je izvrsna povezanost između metoda prilikom određivanja MCHC ($\rho = 0,918$).

Passing - Bablok regresijska analiza pokazala je da između metoda kod određivanja vrijednosti MCHC postoji konstantno (95 % CI 14,42 – 89,61) kao i proporcionalno odstupanje (95 % CI 0,721 - 0,95). Jednadžba pravca glasi: $y = 52,75 + 0,83 x$ (Slika 5.).



Slika 5. Passing - Bablok regresijska analiza između metoda prilikom određivanja MCHC (točke prikazuju vrijednosti, puna crta regresijski pravac, sitno isprekidana crta prikazuje idealan pravac, a isprekidane dvije crte prikazuju intervale pouzdanosti)

Navedeno je prikazano Bland - Altman dijagramom (Slika 6.). Jedan rezultat nalazi se iznad druge standardne devijacije (+ 1,96).



Slika 6. Bland - Altman dijagram metode 1 i 2 prilikom određivanja vrijednosti MCHC (središnja puna linija predstavlja srednju vrijednost razlike, a gornja i donja isprekidana linija predstavlja granice prihvatljivosti definirane standardnom devijacijom)

5. RASPRAVA

Određivanje koncentracije hemoglobina te računskih parametara sadržaja (MCH) i koncentracije hemoglobina u eritrocitima (MCHC) značajno doprinosi praćenju zdravstvenog stanja pacijenta i otkrivanju raznih bolesnih stanja (1). Istraživanjem su vrijednosti mjerene na dva hematološka analizatora, Advia 2120 i Sysmex XN koji rade na principu dvije različite metode. Oba analizatora mogu istovremeno obavljati više funkcija, primjerice analizu kompletne krvne slike, diferencijaciju leukocita i analizu retikulocita, što je od velike važnosti u rutinskom radu laboratorija (14, 15).

U ovom radu cilj je bio provjeriti i usporediti mogu li se analizatori koristiti naizmjenično u rutinskom radu laboratorija. Za precizne rezultate, uzorci krvi prikupljeni su u epruvetu s antikoagulansom te su vrijednosti analizirane korištenjem najnovije tehnologije i automatiziranih hematoloških analizatora. Ispitana je normalnost raspodjele, postojanost statističke razlike te povezanost između dviju metoda na dva analizatora.

Ispitivanja normalnosti raspodjele D'Agostino - Pearsonovim testom pokazuju zadovoljavajuće rezultate za vrijednosti MCH i za MCHC, dok raspodjela rezultata za vrijednost hemoglobina nije normalna što omogućuje uočavanje mogućih grešaka u mjerenim vrijednostima. D'Agostino - Pearsonov test izračunava koliko se razlikuje svaka od vrijednosti iz zbroja odstupanja izračunom P vrijednosti, odnosno zadane razine značajnosti. Ako je P vrijednost veća od 0,05 radi se o normalno distribuiranim varijablama, dok varijable čija je P vrijednost manja nisu normalno distribuirane (5).

Utvrđivanje razine značajnosti Mann - Whitney testom između mjerenih vrijednosti pokazalo je da ne postoji statistički značajna razlika između metoda Sysmex XN 1000 i Advia 2120 hematoloških analizatora za hemoglobin, MCH i MCHC.

Koeficijent korelacije pokazuje nam kako su varijable međusobno povezane. Spearmanovim koeficijentom korelacije prikazana je izvrsna podudarnost varijabli, odnosno izvrsna podudarnost između metoda s obzirom da su koeficijenti korelacije izuzetno blizu savršenoj pozitivnoj povezanosti (5). Iako postoji visoka podudarnost varijabli, Spearmanov koeficijent korelacije nikako nije dovoljan za donošenje odluke o usporedivosti metoda jer ne ukazuje na konstantna ili proporcionalna odstupanja i zbog toga se ne koristi samostalno u analizi usporedivosti metoda (16).

Nakon mjerenja slijedi vizualni i statistički pregled rezultata kako bi se otkrilo postoje li ekstremne vrijednosti (engl. *outliers*) koje se javljaju kao pogreška prilikom upisivanja vrijednosti ili kao posljedica interferencija koje utječu na mjerenje (16).

Usporedba metoda temelji se na kvantifikaciji odstupanja i grafičkom prikazu, a interpretacija rezultata analize upućuje na to postoje li značajna odstupanja nekih od mjerenja. Usporedivost metoda na hematološkim analizatorima Advia 2120 i Sysmex XN ispitana je Bland - Altman analizom i Passing - Bablok regresijskom analizom. Bland - Altman analiza korištena je za procjenu slaganja između dvije metode na analizatorima Sysmex XN i Advia 2120. Bland - Altman analiza pokazala je odstupanja od srednje razlike izvan granica standardnih devijacija, ali većina rezultata nalazila se u granicama standardnih devijacija što se smatra pouzdanim rezultatima mjerenja jer se odstupanja nalaze u granicama prihvatljivosti (17).

Provedena je i kvantifikacija odstupanja pomoću Passing - Bablok regresijske analize. Prema jednadžbama pravca koje su dobivene Passing - Bablok regresijskom analizom slijedi da za hemoglobin 95 % - tni interval pouzdanosti za nagib pravca jednak je jedinici što ukazuje da ne postoji proporcionalno odstupanje, a 95 % - tni interval pouzdanosti za odsječak na osi y nije jednak nuli što ukazuje na postojanje konstantnog odstupanja između uspoređivanih metoda. Za MCH 95 % - tni interval pouzdanosti za nagib pravca sadrži jedinicu što ukazuje da ne postoji proporcionalno odstupanje, a 95 % - tni interval pouzdanosti za odsječak na osi y jednak je nuli što upućuje da ne postoji konstantno odstupanje. Za MCHC 95 % - tni interval pouzdanosti za nagib pravca ne sadrži jedinicu što upućuje na postojanje proporcionalnog odstupanja, a 95 % - tni interval pouzdanosti za odsječak na osi y ne sadrži nulu što ukazuje na postojanje konstantnog odstupanja između uspoređivanih metoda (18).

S obzirom na dobivene rezultate, između uspoređivanih metoda postoje odstupanja koja se nalaze u okviru dozvoljenih odstupanja za pojedine analite, za hemoglobin odstupanja iznose $\pm 5\%$, za MCH $\pm 8\%$ te za MCHC $\pm 12\%$ (9). Iz toga izvodi se zaključak da su metode usporedive iako postoje odstupanja koja su najvjerojatnije uzrokovana interferencijom te ih je premalo izvan granica standardnih devijacija da bi bila neprihvatljiva. Preporuka je ponoviti mjerenje za rezultate koji odstupaju, iako su interferencije moguće i zbog analizatora koji mjere na različitim valnim duljinama.

Prema smjernicama ICSH (International Committee for Standardization in Haematology) preporučena referentna metoda za određivanje koncentracije hemoglobina i ostalih parametara je metoda s hemoglobincijanidom, a ostale metode trebale bi biti uspoređivane s istom (12).

Prema Mansooru Saadu, metoda analizatora Sysmex XN koja se temelji na uporabi natrijevog lauril sulfata pokazala je pouzdane rezultate s prednošću netoksičnog reagensa te je pouzdanost metode jednaka pouzdanosti referentne metode s hemoglobincijanidom. Studije u Al - Kadhimiyji potvrdile su pouzdanost metode s natrijevim lauril sulfatom te jednako tako ukazale na rizik od toksičnosti uporabe cijanida, koja mora biti kontrolirana i u skladu sa sigurnosnim propisima (19). Za razliku od Sysmexa XN, analizator Advia 2120 ima mogućnost korištenja imidazolnog reagensa bez cijanida koji je jednako tako poželjan u rutinskom radu laboratorija (14).

Uz navedene performanse analizatora i dobivene rezultate može se zaključiti da odstupanja upućuju na to da postoje interferencije za 2 uzorka od njih 50 što nije dovoljno za neprihvatljivost mjerenja. Različitost analizatora koji mjere apsorbanciju na različitim valnim duljinama također doprinosi odstupanjima. S obzirom da su odstupanja premala da bi bila neprihvatljiva i da je većina rezultata unutar granica standardnih devijacija, metode su usporedive te se mogu koristiti naizmjenično u svakodnevnom radu laboratorija što olakšava i ubrzava proces analize uzoraka.

6. ZAKLJUČAK

Provedbom usporedbe metoda na različitim hematološkim analizatorima za određivanje koncentracije hemoglobina te sadržaja i koncentracije hemoglobina u eritrocitima mogu se izvesti zaključci:

- 1.) Usporedbom metoda na analizatorima Sysmex XN i Advia 2120 nije uočena statistički značajna razlika između izmjerenih vrijednosti.
- 2.) Passing - Bablok regresijskom analizom uočena su konstantna, ali ne i proporcionalna odstupanja između metoda kod koncentracije hemoglobina. Za vrijednosti MCH nisu uočena odstupanja, dok kod vrijednosti MCHC postoje i proporcionalna i konstantna odstupanja.
- 3.) Bland - Altman analiza je pokazala raspršene rezultate razlika metoda unutar granica standardnih devijacija uz odstupanja jednog do dva rezultata koja nisu značajna.

Konačno, radi se o različitim analizatorima koji rade na različitom principu te zbog toga postoje mogućnosti interferencija. Iako postoje odstupanja, ona su unutar granica prihvatljivosti te su metode usporedive i moguće ih je naizmjenično koristiti što olakšava i ubrzava proces analize uzoraka.

7. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Analiza krvne slike ima osnovnu ulogu u praćenju zdravstvenog stanja pacijenta. Određivanjem koncentracije eritrocita i hemoglobina te računskih parametara sadržaja i koncentracije hemoglobina u eritrocitima mogu se otkriti različita bolesna stanja pri čemu pomažu hematološki analizatori koji rade na različitim principima. Cilj istraživanja je utvrditi postoji li statistički značajna razlika i mogu li se uređaji naizmjenično koristiti u radu.

Nacrt studije: Presječno istraživanje.

Materijal i metode: Istraživanje obuhvaća 50 nasumično odabranih uzoraka krvi prikupljenih standardnim postupcima vađenja krvi te analizirani na dva hematološka analizatora. Passing - Bablok regresijskom analizom i Bland - Altman dijagramom ispitana je usporedivost metoda.

Rezultati: Izvrsna povezanost između metoda utvrđena je Spearmanovim koeficijentom korelacije. Mann - Whitney testom dobivene razine značajnosti odgovaraju zadanoj razini značajnosti $P < 0,05$ te ne postoji statistički značajna razlika. Passing - Bablok regresijska analiza uz određene intervale pouzdanosti pokazala je konstantno odstupanje za hemoglobin, te proporcionalno i konstantno odstupanje za MCHC, dok kod MCH nema odstupanja. Bland - Altman analiza prikazala je raspršenost rezultata od kojih su neki izvan granica standardnih devijacija.

Zaključak: Između metoda na različitim analizatorima dokazano je da su metode usporedive uz odstupanja koja nisu značajna te se mogu koristiti naizmjenično u rutinskom radu laboratorija.

Ključne riječi: analizator, hematologija, hemoglobin, koncentracija, usporedba

8. SUMMARY

Comparison of spectrophotometric methods for determining hemoglobin concentration, content and concentration of hemoglobin in erythrocytes

Objectives: Blood count analysis plays a fundamental role in monitoring the patient's health status. Determination of the concentration of erythrocytes and hemoglobin and computational parameters of hemoglobin content and concentration in erythrocytes with hematological devices that work on different principles, different disease conditions can be detected. The aim of the research is to determine whether there is a statistically significant difference and whether devices can be used interchangeably in operation.

Study design: A cross - sectional study.

Material and methods: The research includes 50 randomly selected blood samples collected by standard blood collection procedures and analyzed on two hematology analyzers. The comparability of the methods was tested using Passing - Bablok regression analysis and Bland - Altman diagram.

Results: The excellent connection between the methods was determined by Spearman's correlation coefficient. The significance levels obtained by the Mann - Whitney test correspond to the set significance level of $P < 0,05$, and there is no statistically significant difference. Passing - Bablok regression analysis with certain confidence intervals showed a constant deviation for hemoglobin, and a proportional and constant deviation for MCHC, while there is no deviation for MCH. Bland - Altman analysis showed a scatter of results, some of which are outside the limits of standard deviations.

Conclusion: Between the methods on different analyzers, it has been proven that the methods are comparable with deviations that are not significant and can be used interchangeably in the routine work of the laboratory.

Key words: analyzer, concentration, comparison, hematology, hemoglobin

9. LITERATURA

1. Labar B, Hauptmann E i sur. Hematologija. Zagreb: Školska knjiga; 2017.
2. Čvorišćec D, Čepelak I. Štrausova medicinska biokemija. Zagreb: Medicinska naklada; 2009.
3. Kolić V, Feher Turković L, Šegulja D, Matišić D. Referentni intervali u laboratorijskoj medicini. JAHS. 2017; 3 (1): 107 - 114.
<https://hrcak.srce.hr/file/270296>
4. Stavljenić Rukavina A, Čvorišćec D. Harmonizacija laboratorijskih nalaza u području opće medicinske biokemije. Zagreb: HKMB, Medicinska naklada; 2007.
5. Topić E, Primorac D, Štefanović M, Janković S i sur. Medicinska biokemija i laboratorijska medicina u kliničkoj praksi. Zagreb: Medicinska naklada; 2018.
6. Dimeski G. Interference testing. Clin Biochem. 2008; 29: 43 - 48.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2556582/>
7. Fernandez Prendes C, Castro MJ, Sanchez Navarro L, Rapun Mas L, Morales Indiano C, Arrobas Veilla T. Handling of lipemic samples in the clinical laboratory. Adv Lab Med. 2023; 4: 5 - 15. <https://doi.org/10.1515/almed-2022-0083>
8. Mainali S, Merril A, Krasowski M. Frequency of icteric interference in clinical chemistry laboratory tests and causes of severe icterus. Pract Lab Med. 2021; 27.
<https://doi.org/10.1016/j.dib.2021.107771>
9. Ćorić J. Kontrola kvalitete rada u laboratorijskoj medicini. Sarajevo: Dobra Knjiga; 2014.
10. Chhabra G. Recent trends in automated hematology analyzers. J Lab Physicians. 2018; 10: 15 - 6. https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/pdf/10.4103/JLP.JLP_124_17.pdf
11. Lewis S. Standardization and harmonization of the blood count: The role of International Committee for Standardization in Haematology (ICSH). Eur J Haematol. 1990; 45: 9 - 13. doi.org/10.1111/j.1600-0609.1990.tb01520.x
12. International Committee for Standardization in Haematology. Recommendations for reference method for haemoglobinometry in human blood (ICSH Standard EP 6 / 2: 1977) and specifications for international haemiglobincyanide reference preparation (ICSH Standard EP 6 / 3: 1977). J Clin Pathol. 1978; 31: 139 - 142.
<https://jcp.bmj.com/content/jclinpath/31/2/139.full.pdf>

13. U.S. Department of Health & Human Services. Cyanide: Exposure, Decontamination, Treatment. Dostupno na adresi:
<https://www.cdc.gov/chemicalemergencies/factsheets/cyanide.html>. Datum pristupa: 17. 8. 2023.
14. Advia Operator's guide. Erlangen: Siemens Healthcare; 2020.
15. Automated Hematology Analyzer XN series. Kobe: Sysmex Corporation; 2014.
16. Šimundić A. Upravljanje kvalitetom laboratorijskog rada. Zagreb: Medicinska naklada; 2013.
17. Gerke O. Reporting Standards for a Bland–Altman Agreement Analysis: A Review of Methodological Reviews. *Diag.* 2020; 10 (5): 334.
<https://doi.org/10.3390/diagnostics10050334>
18. Bilić-Zulle L. Comparison of methods: Pasing and Bablok regression. *Biochem Med.* 2011; 21 (1): 49 - 52. <http://dx.doi.org/10.11613/BM.2011.010>
19. Mansoor S, Musa R, Kudher M. An evaluation of haemoglobin determination using sodium lauryl sulfate. *Iraqi J Med Sci.* 2005; 4 (2): 187 - 196.
<https://www.iasj.net/iasj/download/b658c85ccfc8549d>

10. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci:

Ime i prezime: Ema Eržić

Datum i mjesto rođenja: 23. 11. 2001., Osijek, Republika Hrvatska

Adresa stanovanja: Kolodvorska 95, 31403 Široko Polje, Republika Hrvatska

Kontakt: + 385 91 591 8368

E-mail: ema.erzic@gmail.com

Obrazovanje:

2016. - 2020. I. gimnazija Osijek, smjer: opća gimnazija

2020. - 2023. Medicinski fakultet Osijek, Sveučilišni prijediplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika