

SEED Hematologia



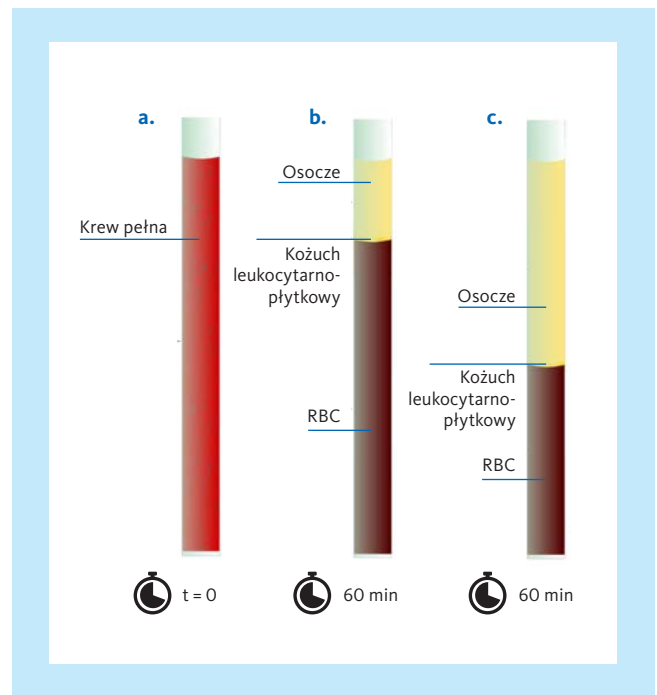
Wskaźnik sedymentacji krwinek czerwonych (OB)

Oznaczanie wskaźnika sedymentacji erytrocytów (ESR, ang. erythrocyte sedimentation rate, w Polsce znane jako OB) jest powszechnie wykonywanym testem laboratoryjnym. Jest czułym, niespecyficznym markerem stanu zapalnego, stosowanym jako wskaźnik ogólnej kondycji organizmu [1]. W połączeniu z wywiadem klinicznym i badaniem fizykalnym pacjenta może być użyteczny w diagnostyce, leczeniu oraz monitorowaniu przebiegu chorób autoimmunologicznych, ostrych i przewlekłych infekcji, a także chorób nowotworowych [2].

Oznaczenie OB, jak ukazano na ryc. 1, polega na pomiarze drogi opadania erytrocytów w krwi pełnej z dodatkiem antykoagulantu pod wpływem grawitacji, umieszczonej w pionowej rurce, w ciągu określonego czasu [2].

Pierwsze odkrycie OB

Odkrywcą wskaźnika sedymentacji krwinek czerwonych (OB) był polski lekarz, Edmund Faustyn Biernacki, który w 1897 roku ogłosił swoje odkrycie równocześnie w dwóch artykułach (w polskiej „Gazecie Lekarskiej” oraz w niemieckim „Deutsche Medizinische Wochenschrift”). W czerwcu 1987 roku (podczas posiedzenia Towarzystwa Lekarskiego Warszawskiego) Biernacki zaprezentował pięć najważniejszych wniosków, ukazujących kliniczne zastosowanie oznaczania OB [3]:



Ryc. 1 Oznaczanie OB [1]:

- Rozcieńczoną próbkę krwi umieszcza się w rurce Westergrena za pomocą aspiracji
- Prawidłowy wynik OB po 60 min; < 20 mm osocza
- Podwyższony wynik OB po 60 min; > 25 mm osocza

1. Wskaźnik sedymentacji erytrocytów jest różny u różnych osób.
2. W krwi ze zmniejszoną zawartością komórek, sedymentacja zachodzi szybciej.
3. Wskaźnik sedymentacji erytrocytów jest zależny od stężenia fibrynogenu w osoczu.
4. W chorobach przebiegających z gorączką (włączając gorączkę reumatyczną) i ze zwiększonym stężeniem fibrynogenu w osoczu, wskaźnik sedymentacji wzrasta.
5. W krwi pozbawionej fibrynogenu, proces sedymentacji erytrocytów zachodzi wolniej.

W 1906 roku Biernacki zmodyfikował metodę oznaczania, stosując kapilarną pipetę własnego projektu zwaną mikrosedymentorem, zastępując pierwotnie używany cylinder o wysokości 20 mm. Technika ta umożliwiła oznaczenie OB po pobraniu krwi włośniczkowej z opuszka palca. Jako antykoagulant zastosował roztwór szczawianu sodu. Siedem lat po śmierci Biernackiego, Fåhræus po analizie różnic czasu opadania erytrocytów w dwóch grupach kobiet: ciężarnych i niebędących w ciąży, wykorzystał OB jako potencjalny test ciąży.

Kolejnym naukowcem związanym z OB był szwedzki internista Alf Vilhelm Albertsson Westergren. Na podstawie oceny sedymentacji erytrocytów w krwi uzyskanej od pacjentów z gruźlicą płuc, Westergren przedstawił podobny opis zjawiska sedymentacji krwinek czerwonych jak te podane przez Biernackiego i Fåhræusa. Westergren do oznaczenia OB wykorzystał cytrynian sodu jako antykoagulant, a także zdefiniował zakresy referencyjne dla tego testu.

Mechanizm agregacji oraz sedymentacji czerwonych krwinek [1, 4]

Sedymentacja erytrocytów jest regulowana przez czynniki, które stymulują lub spowalniają agregację erytrocytów i sedymentację. Prawidłowe erytrocyty mają ujemny ładunek (ryc. 2) i odpychają się wzajemnie, co ogranicza szybkość sedymentacji. Duże cząstki opadają szybciej niż małe, więc czynniki zwiększające agregację wpływają na wzrost sedymentacji. Krwinki czerwone agregując tworzą formacje przypominające stosy monet – nazywane jest to rulonizacją erytrocytów.

Proces sedymentacji można podzielić na trzy etapy, ukazane na ryc. 3:

A. Faza rulonizacji erytrocytów (0 – 20 min)

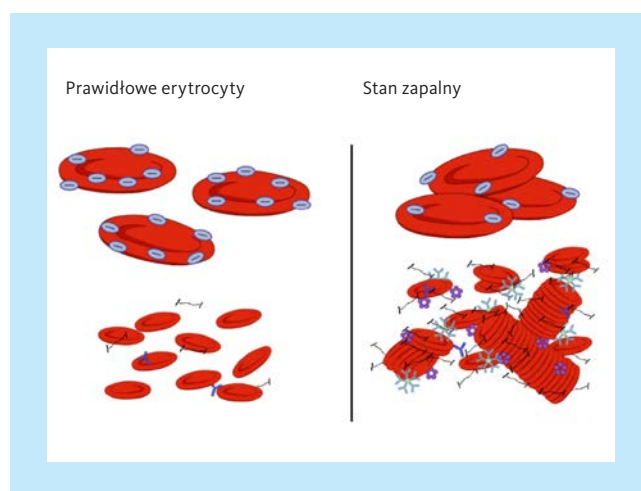
Krwinki czerwone zaczynają agregować i formować rulony. Obecność białek ostrej fazy sprzyja procesowi rulonizacji. W tej fazie nie zachodzi sedymentacja.

B. Faza sedymentacji (15 – 30 min)

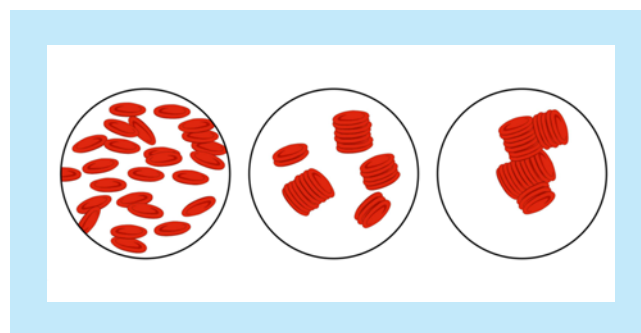
Agregaty krwinek czerwonych opadają na dno probówki ze stałą prędkością pod wpływem grawitacji. Duże agregaty opadają szybciej niż pojedyncze komórki lub małe agregaty erytrocytarne. Opadające agregaty indukują ruch osocza w górę, co spowalnia proces sedymentacji.

C. Faza skompresowania erytrocytów (25 – 60 min)

Szybkość sedymentacji spada do zera, a erytrocyty zostają upakowane na dnie probówki.



Ryc. 2 Charakterystyka czerwonych krwinek
Prawidłowo: erytrocyty posiadają ujemny ładunek; niski wskaźnik sedymentacji.
Stan zapalny: utrata ładunku ujemnego przez erytrocyty; zachodzi sedymentacja stymulowana przez czynniki zwiększające rulonizację erytrocytów (fibrynogen, CRP, immunoglobulina).



Ryc. 3 Rulonizacja erytrocytów: w warunkach obniżonego lub zahamowanego przepływu krwi erytrocyty zaczynają przylegać do siebie tworząc rulony, które następnie łączą się, w trójwymiarowe agregaty.

Test OB wymaga standaryzacji procedur [5]

■ Pobranie krwi

Próbkę krwi należy pobrać przez nakłócie żyły i natychmiast wymieszać z antykoagulantem (EDTA). Próbka nie powinna być zhemolizowana, ani posiadać skrzepu – może to zafałszować wynik i spowodować odrzucenie próbki.

■ Czas w jakim należy wykonać test

Stabilne wyniki testu OB odnotowywano po pobraniu i przechowywaniu krwi do 24 godzin w temperaturze 24 °C. Jeżeli to możliwe, próbkę należy przechowywać w temperaturze pokojowej, a badanie wykonać do 4 godzin po pobraniu. Jeśli wymagane jest dłuższe niż czterogodzinne oczekiwanie, próbkę należy umieścić w lodówce (nie dłużej niż na 24 godziny), a oznaczenie wykonać po 15 minutowym ogrzewaniu próbki w temperaturze pokojowej.

■ Przygotowanie próbki

Mieszanie próbki krwi jest szczególnie ważne dla uzyskania powtarzalnych wyników. Dla standardowych probówek (10 – 13 x 75 mm, 5 ml krwi, w których pęcherz powietrza zajmuje co najmniej 20 % objętości probówki) należy wymieszać próbkę poprzez wykonanie przynajmniej 12 pełnych obrotów, zwracając uwagę czy pęcherzyk powietrza przemieszcza się do dna probówki. Niestandardowe probówki, szczególnie węższe, mogą wymagać wykonania więcej niż 12 pełnych obrotów podczas mieszania – ilość tą należy określić. Mieszanie należy zakończyć tuż przed wykonywaniem oznaczenia OB. Probki przechowywane w temperaturze lodówki, powinny pozostawać w temperaturze pokojowej przez co najmniej 15 minut przed mieszaniem i wykonaniem oznaczenia OB.

■ Przygotowanie zawiesiny komórek

Przed przeniesieniem krwi do pipety Westergrena, próbkę pobraną na EDTA należy rozcieńczyć w stosunku 4:1 sterylnym odwodnionym cytrynianem trisodowym o stężeniu 100 – 136 mmol/l. Roztwór soli fizjologicznej również jest dopuszczalny (o tym samym współczynniku rozcieńczenia 4:1).

■ Użycie pipety

Rozcieńczoną i pozbawioną pęcherzyków próbkę krwi zaaspirować do czystej i suchej pipety Westergrena napełniając ją do poziomu „0”. Wypełnioną pipetę umieścić w temperaturze 18 – 25 °C, pionowo, w miejscu pobawionym wibracji, przeciągu i światła słonecznego.

■ Odczytanie wyniku testu

Po upływie 60 ± 1 minut należy odczytać odległość (wyrażoną w milimetrach) od menisku wklęsłego osocza do szczytu kolumny zsedymetowanych krwinek czerwonych. Należy uważać, aby nie włączyć do odczytu leukocytów (kożuch leukocytarno-płytkowy). Następnie zapisać wartość liczbową. W rzadkich przypadkach granica między osoczem a erytrocytami może być zamazana, co uniemożliwia odczyt – przyczyna tego zjawiska jest nieznaną.

■ Raportowanie wyniku testu

Wynik wyrażany jest w milimetrach – jako odległość jaką pokonały opadające erytrocyty na dno probówki w ciągu jednej godziny (tylko taki przedział czasowy jest dopuszczalny). Zapis wyniku oznaczenia OB ma postać 1 godzina = x mm. Taki zapis podkreśla fakt, że test mierzy odległość po upływie określonego czasu.

OB: wymagania dotyczące wykorzystywanych materiałów [5]

Pipeta (rurka) powinna być bezbarwna i mieć wystarczającą długość – przynajmniej 200 mm. Zachowanie tych parametrów zapewniają oryginalne, szklane pipety 300 mm typu Westergrena. Skala sedymentacji może być zaznaczona na pipecie lub przylegać do pipety oraz powinna mieć wyraźnie zaznaczone linie w odstępach co 1 mm (do 200 mm od dna). Jeżeli skala jest oddzielona od pipety, musi być częścią stojaka podtrzymującego pipetę, co zapewnia precyzyjne oraz powtarzalne ułożenie pipety i skali względem siebie. Jeżeli odczyt pomiaru jest optoelektroniczny, zaznaczenie skali nie jest konieczne. Średnica pipet sedymentacyjnych dla oznaczeń OB metodą Westergrena nie powinna być mniejsza niż 2,55 mm. Nie określono maksymalnej objętości pipety, z wyjątkiem tego, że należy zminimalizować wymaganą objętość krwi. Średnica pipety powinna być stała (w granicy 5%) na całej długości, a jej wewnętrzna część powinna być cylindryczna (bezwzględna zmiana średnicy nieprzekraczająca 0,1 mm). Pipety mogą być szklane (wielokrotnego użytku) lub plastikowe. Plastikowe pipety nie powinny wykazywać właściwości adhezyjnych względem komórek krwi i nie powinny uwalniać plastyfikatorów oddziałujących na sedymentację. Pipety wielokrotnego użytku po wylaniu krwi należy umyć zimną wodą, namoczyć w środku dezynfekującym przez 1 godzinę, a następnie dokładnie przepłukać wodą destylowaną i suszyć w cieplarni w 37 °C przez godzinę.

Podczas oznaczenia rurka powinna stać nieruchomo w pozycji pionowej – pomocne są stelaże lub stojaki poziomujące, zapewniające pozostanie pipety w zakresie ± 2 stopni od pionu.

Oznaczenie OB: wybrana metoda rutynowa

Obecnie zalecane metody pracy są takie same jak metody wystandaryzowane [5]. Jednakże jako metody pracy dopuszczalne są też inne procedury, w tym oparte o analizatory automatyczne.

Znaczenie kliniczne OB

OB jest czułym, niespecyficznym markerem stanu zapalnego, który w połączeniu z wywiadem klinicznym i badaniem fizykalnym, stosowany jest jako wskaźnik ogólnej kondycji fizycznej [6]. Istnieje liniowa zależność pomiędzy stężeniem fibrynogenu a wynikami OB, dlatego stany ze wzrostem stężenia fibrynogenu we krwi powodują zwiększenie wartości OB.

Reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) oraz inne choroby autoimmunologiczne

Reumatoidalne zapalenie stawów jest przewlekłym stanem zapalnym o nieznanym etiologii, w którym następuje symetryczne niszczenie stawów przez działanie czynników autoimmunologicznych. Amerykańskie Kolegium Reumatologiczne (ACR), ustanowiło kryteria diagnostyki RZS [7]. OB może wspomagać proces diagnostyczny RZS, natomiast nie może być stosowany jako jedyny wskaźnik RZS. Wytyczne ACR opisują zastosowanie OB jako pomocniczy parametr w diagnozowaniu oraz monitorowaniu pacjentów z RZS. OB jest także przydatny w monitorowaniu toczenia rumieniowatego układowego (SLE), natomiast wykazuje wątpliwą wartość kliniczną w miopatii zapalnej lub spondyloartrzapalnej.

Zapalenie tętnicy skroniowej i polimialgia reumatyczna (PMR)

OB jest prawie zawsze podwyższone w zarówno przypadku zapalenia tętnicy skroniowej jak również w polimialgii reumatycznej. W zapaleniu tętnicy skroniowej może przekraczać 100 mm/godzinę. Należy jednak podkreślić, że OB mieszczące się w zakresie wartości referencyjnych nie powinno wykluczać diagnozy u osób z objawami sugerującymi zapalenie tętnicy skroniowej lub/i polimialgię reumatyczną (niewielka część pacjentów cierpiących na te schorzenia ma

prawidłowe wartości OB). Jeżeli u pacjenta obserwuje się objawy kliniczne zapalenia tętnicy skroniowej, jak ból głowy z chromaniem żuchwy, zalecana jest biopsja tętnicy, nawet jeśli OB nie jest podwyższone.

Szczyk młogi i inne paraproteinemie

Wzrost OB jest pomocny w rozpoznawaniu tych stanów, jednak diagnoza jest zależna od spełnienia kryteriów takich jak wzrost białek monoklonalnych, wyniku elektroforezy białek osocza, zwiększonego odsetka plazmocytoz w szpiku, jak również zmian kostnych. Należy pamiętać, że głównym czynnikiem różnicującym powinna być ilość plazmocytoz w szpiku, ponieważ plazmocytoza szpiku kostnego wynosząca 20% lub więcej jest czynnikiem predykcyjnym dla szczyka młogi.

Inne zastosowania

Badania kliniczne sugerują możliwą przydatność oceny wartości OB w stanach patologicznych, takich jak np. bakteryjne zapalenie ucha środkowego, ostre krwipochodne zapalenie kości u dzieci, niedokrwiłość sierpowatokrwinkowa, zapalenie narządów miednicy mniejszej, rak prostaty, stosowanie dożylnych leków przeciwgorączkowych, choroba wieńcowa i udar mózgu.

Znacząco podwyższone OB (> 100 mm/h) wskazuje na poważne zaburzenia, zwłaszcza infekcję, kolagenowe schorzenie naczyń, złośliwe nowotwory lub chorobę nerek. W większości przypadków objawy choroby podstawowej są jawne klinicznie. Natomiast u mniej niż 2% pacjentów z podwyższonymi wartościami OB, nie można znaleźć jednoznacznej przyczyny tego stanu, zazwyczaj umożliwia to dopiero połączenie wyniku z wywiadem klinicznym, badaniem fizykalnym oraz innymi badaniami laboratoryjnymi.

Wartości referencyjne [5]

Zakresy referencyjne powinny być ustalane zgodnie z lokalnymi rekomendacjami [8]. Z uwagi, że wartość OB wzrasta wraz z wiekiem, należy wyznaczyć osobne zakresy dla każdej dekady życia dorosłych mężczyzn i kobiet. Na wartość OB i wartości referencyjne mają wpływ także: stężenie hemoglobiny (HGB), leki, cykl menstruacyjny,

Tabela 1 Średnie wartości referencyjne dla metody Westergrena oznaczania OB (mm/h)

Wiek (lata)	Mężczyźni	Kobiety	Górna granica dla mężczyzn	Górna granica dla kobiet
18 – 30	3,1	5,1	< 7,1	< 10,7
31 – 40	3,4	5,6	< 7,8	< 11,0
41 – 50	4,6	6,2	< 10,6	< 13,2
51 – 60	5,6	9,4	< 12,2	< 18,6
61 – 70	5,6	9,4	< 12,7	< 20,2
ponad 70	5,6	10,1	< 30	< 35

cięża oraz palenie tytoniu. W tabeli 1. przedstawiono przykładowe zakresy referencyjne, które mogą stanowić odniesienie przy ustalaniu własnych wartości referencyjnych.

Czynniki fizjologiczne i kliniczne zmniejszające wartość OB [1]

Czerwienicę cechuje zwiększona proporcja krwinek czerwonych we krwi, co fałszywie zaniża OB. Nadkrwistość może być spowodowana zarówno zwiększoną ilością erytrocytów, jak również zmniejszoną objętością osocza. Nieprawidłowości erytrocytów mogą wpływać także na rulonizację, agregację i szybkość sedymentacji. Mikrocyty i krwinki o nieregularnym kształcie wolniej sedymentują i obniżają wartość OB. Również zmniejszenie ilości białek osocza, w tym fibrynogenu wpływa na spadek OB.

Czynniki fizjologiczne i kliniczne zwiększające wartość OB

Wartości OB są wyższe dla kobiet niż dla mężczyzn i wzrastają z wiekiem [1]. Cięża zwiększa OB. Podczas fazy ostrej zapalenia wytwarzane są makrocząsteczkowe białka osocza, zwłaszcza fibrynogen, które zmniejszają ilość ujemnych ładunków na erytrocytach, co sprzyja rulonizacji krwinek czerwonych. Paraproteiny obecne są u pacjentów ze szpiczakiem mnogim oraz makroglobulinemią Waldstroma. Są to dodatnio naładowane makrocząsteczki, które zmniejszają ilość ujemnych ładunków na erytrocytach i zwiększają ich rulonizację.

Wysokie stężenia białka zwiększają lepkość osocza, co spowalnia proces sedymentacji. Wpływ fibrynogenu i paraprotein na ujemne ładunki krwinek czerwonych (zwiększenie rulonizacji) jest silniejszy niż wpływ zwiększonej lepkości osocza, co w rezultacie powoduje wzrost OB.

W niedokrwistościach liczba erytrocytów jest zmniejszona co zwiększa rulonizację. Obniżony hematokryt (HCT) wpływa na przepływ osocza w górę, dzięki czemu krwinki czerwone szybciej sedymentują. W makrocytozie erytrocyty zmieniają kształt, zmniejszając stosunek powierzchni do objętości – co prowadzi do szybszej sedymentacji.

Źródła błędów

Wartości OB mogą być fałszywie wyższe lub niższe z przyczyn mechanicznych [9]:

- Stężenie EDTA wyższe niż zalecane – OB jest fałszywie obniżone.

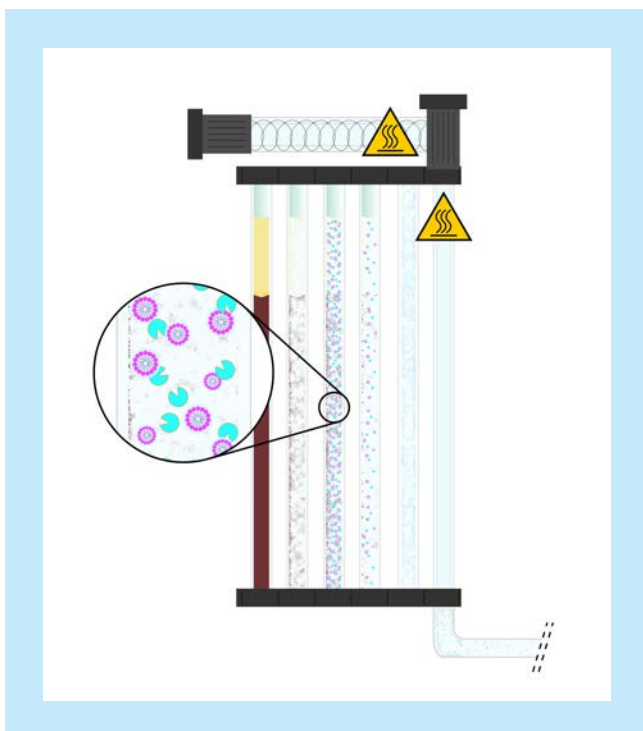
- Antykoagulanty takie jak szczawian sodu i potasu oraz heparyna powodują obkurczanie się erytrocytów – fałszywie dodatni wynik OB.
- Czas pomiaru OB jest dłuższy niż 60 minut – wynik fałszywie zawyżony. Czas pomiaru krótszy niż 60 minut – wynik fałszywie obniżony.
- Znaczny wzrost (lub spadek) temperatury w pomieszczeniu, prowadzi do wzrostu (lub zmniejszenia) wartości OB.
- Pochylenie rurki do oznaczania OB zwiększa uzyskany wynik.
- Pęcherzyki powietrza powodują, że wynik pomiaru OB jest nieprawidłowy.
- Skrzep obecny w próbce uniemożliwia prawidłowe oznaczenie OB.

Innowacje techniczne w zakresie oznaczania OB

W ostatnich latach opracowano różnorodne metody wykonywania oznaczenia wskaźnika sedymentacji erytrocytów, które usprawniają wykonanie oryginalnej metody Westergrena i zmniejszają narażenie na kontakt z materiałem zakaźnym. Dostępne są zautomatyzowane metody, które skracają czas wykonania oznaczenia i czas uzyskania wyniku [1].

W oryginalnej metodzie Westergrena, wynik oznaczenia OB odczytywany jest po 60 minutach, co istotnie ogranicza przebieg pracy w laboratorium. Badanie porównujące odczyty wyników OB po 30 i 60 minutach dla metody Westergrena, przeprowadzone na szerokim zakresie próbek, wykazało, że odczyty po 30 minut silnie korelują z odczytami odpowiednich próbek po 60 minutach (współczynnik korelacji $r = 0,984$). Oznacza to, że odczyty OB po 30 minutach można wiarygodnie ekstrapolować na odpowiedni odczyt wartości OB po 60 minutach.

Analizatory Starrsed ESR firmy RR Mechatronics to automatyczne analizatory ESR, które wykorzystują referencyjną metodę Westergrena zgodnie z zaleceniami CLSI. Analizatory Starrsed wykonują w pełni zautomatyzowane pomiary OB w 30 lub 60 minut. Wstępne mieszanie, pipetowanie i rozcieńczanie cytrynianem sodu, wyjściowych próbek krwi pełnej pobranej na EDTA, jest w pełni zautomatyzowane, co zapewnia dokładność i oszczędza czas oznaczenia, ograniczając działania do umieszczenia próbki w analizatorze. Analizator zawiera wbudowany czytnik kodów kreskowych, który automatycznie identyfikuje i rejestruje próbki krwi. Użycie specjalnie zaprojektowanej igły do pobierania próbek, minimalizującej uszkodzenie korka, umożliwia wielokrotne pobieranie krwi z tej samej probówki.



Ryc. 4 Rurki są czyszczone z wykorzystaniem detergentów i enzymów proteazowych. Wnętrze rurek jest suszone i dezynfekowane powietrzem, które przeszło przez element grzewczy.

Prawidłowe umieszczenie analizatora Starssed gwarantuje pozycję pionową próbki, środowisko wolne od wibracji oraz ochronę przed światłem słonecznym i przeciągiem. Analizatory Starssed używają światła podczerwonego do odczytywania wyników oznaczenia OB, a czytnik optyczny w połączeniu z wbudowanymi algorytmami może wykrywać granicę pomiędzy osoczem a krwinkami nawet w próbkach z zatartą granicą. Zakres korekcji temperatury do 18,3 °C umożliwia wiarygodną interpretację wyniku oznaczenia.

Analizatory Starssed wykorzystują wystandaryzowane szklane próbki wielokrotnego użytku, wykonywane i testowane w specjalny sposób. Probówki są czyszczone za pomocą detergentów i enzymów proteazowych (ryc. 4), płukane i suszone po każdym cyklu, co zapewnia, że próbki są czyste przed użyciem. Minimalizuje to ryzyko zagrożenia biologicznego oraz koszty eksploatacji.

Wnioski

Wskaźnik sedymentacji erytrocytów zgodnie ze złotym standardem Westergrena jest użytecznym wskaźnikiem ogólnego stanu organizmu oraz markerem stanu zapalnego. Nowoczesne, w pełni zautomatyzowane metody sprawiły, że oznaczenie OB jest jeszcze bardziej dokładne i bezpieczne w porównaniu do manualnej metody Westergrena.

Wszystkie nowe przyrządy i metodologie należy jednak zweryfikować poprzez porównanie ich wyników z wystandaryzowaną procedurą, a podawane wyniki powinny być zgodne z zakresami wartości referencyjnych dla metody Westergrena.

Źródła

- [1] **Meatronics RR. (2016):** A classic, gold standard: The Westergren method for ESR measurement. WP-001, rev.004a
- [2] **Brigden M. (1999):** Clinical Utility of the Erythrocyte Sedimentation Rate. *American Family Physician*. 1; 60(5) : 1443 – 1450
- [3] **Grzybowski A et al. (2011):** Who Discovered the Erythrocyte Sedimentation Rate? *The Journal of Rheumatology*. 38; 1521 – 1522. <http://www.jrheum.org/content/38/7/1521.3> (accessed on 15. 7. 2016)
- [4] **Fabry T. (1987):** Mechanism of Erythrocyte Aggregation and Sedimentation. *Blood*. Vol 70, No 5, 1572 – 1576. <http://www.bloodjournal.org/content/70/5/1572> (accessed on 15. 7. 2016)
- [5] **Clinical and Laboratory Standards Institute (2011):** H02 – A5: Procedures for the Erythrocyte Sedimentation Rate Test. Approved Standard – Fifth Edition
- [6] **Saadeh C. (1998):** The erythrocyte sedimentation rate: old and new clinical applications. *South Med J*. Mar. 91(3) : 220 – 225
- [7] <http://www.rheumatology.org/Practice-Quality/Clinical-Support/Clinical-Practice-Guidelines/Rheumatoid-Arthritis> (accessed on 19. 9. 2016)
- [8] **Sysmex Educational Enhancement and Development (April 2015):** Reference ranges – and what Sysmex can offer. (http://www.sysmex-europe.com/fileadmin/media/f100/SEED/Sysmex_SEED_Reference_ranges_and_what_Sysmex_can_offer.pdf)
- [9] <http://site.iugaza.edu.ps/akhudair/files/Erythrocyte-Sedimentation-Rate.ppt> (accessed on 23. 8. 2016)