

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

DENIS FUEKAŠ

MAGISTRSKA NALOGA
MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA
BIOMEDICINA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO

DENIS FUEKAŠ

**PRIMERJAVA DVEH REAGENČNIH KOMPLETOV ZA
DOLOČITEV AKTIVNOSTI NIZKOMOLEKULARNEGA
HEPARINA Z NAČINOM ZAVIRANJA AKTIVNEGA FAKTORJA X
NA VZORCIH BOLNIKOVI, KI PREJEMAJO
ANTIKOAGULACIJSKO ZDRAVLJENJE**

**COMPARISON OF TWO ASSAYS FOR DETERMINING THE
ACTIVITY OF LOW-MOLECULAR-WEIGHT HEPARINS BASED
ON THE INHIBITION OF ACTIVE FACTOR X IN PATIENTS
RECEIVING ANTICOAGULANT THERAPY**

MAGISTRSKA NALOGA

Magistrsko nalogo sem opravljal v Specializiranem hematološkem laboratoriju kliničnega oddelka za hematologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana pod mentorstvom doc. dr. Irene Zupan Preložnik, spec. int. in somentorstvom doc. dr. Tadeja Pajiča, spec. med. biokem. Pripravo vzorcev in spektroskopske meritve sem opravil na Oddelku za laboratorijsko diagnostiko v Splošni bolnišnici Murska Sobota.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Ireni Zupan Preložnik, spec. int. in somentorju doc. dr. Tadeju Pajiču, spec. med. biokem za vse nasvete in pomoč pri izdelavi magistrske naloge. Predstojnici Oddelka za laboratorijsko diagnostiko Splošne bolnišnice Murska Sobota Valeriji Cvetko Weiss spec. med. biokem. in kolektivu se zahvaljujem, da so mi izvedbo naloge omogočili. Zahvaljujem se tudi družini za spodbudo in podporo v času nastajanja naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom doc. dr. Irene Zupan Preložnik, spec. int. in somentorstvom doc. dr. Tadeja Pajiča, spec. med. biokem.

Denis Fuckaš

KAZALO VSEBINE	I
POVZETEK	V
SEZNAM OKRAJŠAV	IX
1 UVOD	1
1.1 Hemostaza	1
1.1.1 Primarna hemostaza	1
1.1.2 Sekundarna hemostaza	2
1.2 Heparin	5
1.2.1 Zgodovina heparina	5
1.2.2 Nefrakcionirani in nizkomolekularni heparin	6
1.2.3 Mehanizem delovanja heparina	7
1.2.4 Terapevtska uporaba heparina in monitoring	8
1.2.5 Metode določanja	11
2 NAMEN IN HIPOTEZE	13
3 MATERIALI IN METODE	14
3.1 Vzorci	14
3.1.1 Priprava vzorcev za določitev merilne natančnosti metod	14
3.1.2 Priprava vzorcev za izvedbo primerjave metod za določanje aktivnosti NMH	14
3.1.3 Priprava vzorcev za določitev meje slepega vzorca	14
3.1.4 Priprava vzorcev za preverjanje in določanje meje detekcije	14
3.2 Preiskovanci	15
3.3 Aparature	15
3.4 Reagenti	16
3.5 Principi metod	18
3.5.1 Določitev aktivnosti NMH z reagenčnim kompletom Stago STA Liquid ANTI-Xa	19
3.5.2 Določitev aktivnosti NMH z reagenčnim kompletom Siemens Berichrom Heparin	19
3.6 Merilna natančnost metod, primerjava metod, preverjanje in določitev meje slepega vzorca in meje detekcije ter statistično vrednotenje rezultatov	20
3.6.1 Merilna natančnost metod	20
3.6.2 Primerjava metod	21
3.6.3 Preverjanje in določitev meje slepega vzorca in meje detekcije metod	23
4 REZULTATI	25

4.1	Merilna natančnost metod	25
4.1.1	Ocena merilne natančnosti metode določanja aktivnosti heparina z reagenti in kontrolnimi materiali proizvajalca Stago	25
4.1.2	Ocena merilne natančnosti metode določanja aktivnosti heparina z reagenti in kontrolnimi materiali proizvajalca Siemens	28
4.2	Primerjava metod	30
4.3	Preverjanje in določitev meje detekcije metod	34
4.3.1	Reagenčni komplet Stago STA Liquid Anti-Xa	34
4.3.2	Reagenčni komplet Siemens Berichrom Heparin	35
5	DISKUSIJA	37
5.1	Merilna natančnost metod	37
5.2	Primerjava metod	39
5.3	Določitev in preverjanja meje detekcije	40
5.4	Zaključek	42
6	SKLEPI	43
7	LITERATURA	44

SEZNAM SLIK

Slika 1. Koagulacijska kaskada in uravnavanje koagulacije (povzeto po literaturi 9)	5
Slika 2. Strukturne variante heparina in pentasaharidno zaporedje odgovorno za vezavo na AT (Povzeto po literaturi 6).....	6
Slika 3. Kompleks AT/heparin inhibira delovanje serinski proteaz. Z največjo afiniteto se veže na FIIa in FXa (Povzeto po literaturi 6).	8
Slika 4. Inhibicija trombina s polisaharidno verigo iz vsaj 18. monosaharidov in inhibicija Xa s pentasaharidnim zaporedjem (Povzeto po literaturi 6).....	8
Slika 5. Shema metode določanja aktivnosti heparina (povzeto po literaturi Siemens).....	12
Slika 6. Analizator Compact Max, Diagnostika Stago, Francija.....	16
Slika 7. Analizator BCS-XP, Siemens, Nemčija	16

SEZNAM TABEL:

Tabela 1. Tveganje za GVT pri različnih posegih in priporočena tromboprofilaksa (povzeto po literaturi 4).	9
Tabela 2. Najpogosteje uporabljeni NMH v SBMS.	10
Tabela 3. NMH uporabljeni pri preiskovancih in jakosti podane v mednarodnih enotah (IE) z aplikacijo na 12 oz. 24ur.....	15
Tabela 4. Stabilnost reagentov proizvajalca Siemens.	18
Tabela 5. Statistične formule za izračun merilne nenatančnosti (enosmerna ANOVA).	21
Tabela 6. Statistični podatki meritev Stago NMH nizke kontrole.....	26
Tabela 7. Statistični podatki meritev Stago NMH visoke kontrole.....	27
Tabela 8. Statistični podatki meritev Siemens NMH nizke kontrole.	29
Tabela 9. Statistični parametri Berichrom Heparin NMH visoka kontrola.....	30
Tabela 10. Opisni statistični podatki merjenja aktivnosti heparina v plazmi z metodo Siemens Berichrom Heparin (Siemens BCS-XP) in metodo Stago STA Liquid Anti-Xa (Stago Compact Max).....	32
Tabela 12. Vrednosti vzorce z nizko vsebnostjo NMH v petih ponovitvah (IE/mL). Reagenčni komplet Siemens Berichrom Heparin	36

SEZNAM GRAFOV:

Graf 1: Razpršenost podatkov v/med serijami meritev Stago NMH nizke kontrole.....	26
Graf 2: Razpršenost podatkov v/med serijami meritev Stago NMH visoke kontrol.....	27
Graf 3: Razpršenost podatkov v/med serijami Siemens NHM nizke kontrole.....	29
Graf 4: Razpršenost podatkov v/med serijami meritev Siemens NMH visoke kontrole.....	30
Graf 5: Regresijska premica Passing-Bablok med primerjanima metodama na analizatorju SiemensBCS-XP in Stago Compact Max za analit heparin.	31
Graf 6: Bland-Altman	33

POVZETEK

Heparin so odkrili pred 100 leti. Zaradi njegovih antikoagulacijskih lastnosti so ga že v štiridesetih letih dvajsetega stoletja uspešno uporabljali pri zdravljenju in preprečevanju venskih tromboembolizmov. Njegov učinek temelji na povečanju zaviralnega učinka antitrombina na serinske proteaze koagulacijske kaskade, predvsem na aktivirani faktor II (FIIa) in aktivirani faktor X (FXa). To lastnost heparina uporabljamo tudi za določanje njegove aktivnosti v citratni plazmi bolnika, kjer merimo zaviralni učinek kompleksa antitrombin-heparin na FXa, ki je k reakcijski zmesi dodan v presežku. Preostali FXa hidrolizira kromogeni substrat, na katerega je vezan kromofor, ki se ob cepitvi sprosti v raztopino in jo obarva. Spektrofotometrično izmerimo absorbanco raztopine. Ta je obratno sorazmerna zaviralni aktivnosti kompleksa antitrombin-heparin na FXa.

V začetku so za preprečevanje in zdravljenje venskih tromboembolizmov uporabljali nefrakcionirani heparin. To je heterogena mešanica negativno nabitih glikozaminglikanov s povprečno molekulsko maso 15000 g/mol. Kasneje so iz nefrakcioniranega heparina z gelsko filtracijo ali s kontrolirano encimsko ali kemično depolimerizacijo pridobili nizkomolekularni heparin s povprečno molekulsko maso 5000 g/mol. Njegova uporaba se je razširila predvsem zaradi predvidljivejših farmakoloških lastnosti v primerjavi z nefrakcioniranim heparinom. Nizkomolekularni heparin je med najpogosteje uporabljenimi zdravili nasploh. Redno spremljanje antikoagulacijskega učinka NMH z laboratorijskimi preiskavami načeloma ni potrebno, razen pri določenih stanjih in boleznih.

V okviru magistrske naloge smo verificirali in primerjali dve analizni metodi za določitev aktivnosti nizkomolekularnega heparina v citratni plazmi bolnikov. Obe metodi merita zaviralni učinek kompleksa antitrombin-heparin na FXa. Pri eni metodi k reakcijski zmesi dodamo še dekstran sulfat in antitrombin.

Obema metodama smo določili merilno natančnost metod (ponovljivost v seriji in med serijami meritev) in dokazali, da je ta v intervalu, ki ga navajata proizvajalca. Za obe metodi smo določili mejo slepega vzorca in na podlagi te preverili mejo detekcije, ki jo navajata proizvajalca (Stago: 0,10 IE/mL). Pri Siemensovi metodi smo mejo detekcije določili sami in znaša 0,15 IE/mL (Siemens: 0,05 IE/mL).

Pri 47 vzorcih preiskovancev, ki so bili na antikoagulacijskem zdravljenju z nizkomolekularnimi heparini smo določili aktivnost nizkomolekularnega heparina. Rezultate smo primerjali s Spearmanovo korelacijo, regresijo po Passing-Babloku, ki vključuje Cusumov test linearnosti, ter te predstavili grafično z Bland-Altmanovim diagramom. Čeprav smo pri Spearmanovi korelacijski analizi rezultatov dobili visok korelacijski koeficient (Rho je 0,94), je regresija Passing-Bablok z enačbo regresijske premice ($Y = 0,038 + 0,81x$) s 95% intervalom zaupanja za odsek na osi Y (-0,014 do 0,073) in za naklon premice (0,71 do 0,92) pokazala proporcionalno razliko med metodama. Tudi analiza Bland-Altman nakazuje, da metodi nista skladni, razlika se povečuje proti večjim aktivnostim nizkomolekularnega heparina v plazmi bolnika.

V času nastajanja magistrskega dela smo na Oddelku za laboratorijsko diagnostiko v Splošni bolnišnici Murska Sobota eno izmed metod že uvedli v rutinsko uporabo, saj je preiskava nujno potrebna pri določenih stanjih in boleznih.

ABSTRACT

This year marks 100 years since the discovery of heparin. Because of its anticoagulant action, heparin was used to treat and prevent venous thromboembolism as early as in the 1940s. The basis for the anticoagulant action of heparin lies in its ability to bind to and enhance the inhibitory activity of antithrombin against several serine proteases of the coagulation system, particularly factors IIa and Xa. This characteristic of heparin is also used for evaluating the activity of heparin in citrate plasma, namely by measuring the inhibitory effect of antithrombin-heparin complex on FXa, which is added to the reaction mixture in excess. The remaining FXa hydrolyses the chromogenic substrate, to which the chromophore is attached. The chromophore is released into the solution and colors the solution. The absorbance of the solution is measured spectrophotometrically. The absorbance is inversely proportional to the inhibitory effect of the antithrombin-heparin complex on FXa.

In the early years, the unfractionated heparin, which is a heterogeneous mixture of negatively charged glycosaminoglycans (mean molecular weight approximately 15000 g/mol), has been used for the prophylaxis and the treatment of venous thromboembolism. Later, the low-molecular-weight heparin (mean molecular weight approximately 5000 g/mol), which is produced from unfractionated heparin by gel filtration or enzymatic or chemical depolymerization, became a more preferable drug because of its predictable pharmacological properties. Low-molecular-weight heparins are one of the most frequently used drugs. Usually, routine monitoring of the anticoagulant effect is not necessary in the treatment with low-molecular-weight heparins, except in certain conditions and diseases.

The purpose of the thesis was to verify and compare two different assays for measuring the activity of the low-molecular-weight heparins in patients' citrate plasma. Both assays measure the inhibitory effect of the antithrombin-heparin complex on FXa, but they differ when used with the addition of exogenous antithrombin and dextran sulfate.

We have parallel analyzed 47 samples from patients who received low-molecular-weight heparins with both assays to measure the activity of the low-molecular-weight heparins. The results were compared with Spearman's correlation, Passing-Bablok regression including the Cusum test for linearity, and presented graphically using Bland-Altman plots.

Although Spearman's correlation coefficient showed a significantly high correlation ($Rho = 0,94$), the Passing-Bablok regression (line equation $Y = 0,038 + 0,81x$) with 95% CI for the Y-intercept of -0,014 to 0,073 and a slope of 0,71 to 0,92 revealed a proportional difference between both methods. The Bland-Altman analysis also suggests that these two methods are not compatible.

For both methods, we have set the imprecision (repeatability and between series imprecision) and have proven that the imprecision did not exceed the one claimed by the manufacturer. We have also determined the limit of the blank sample for both methods, and based on this, we have confirmed the limits of detection given by the manufacturer ($LoD = 0,10$ IU/mL by Stago). For the Siemens method, we had to determine the limit of detection ourselves ($LoD = 0,15$ IU/mL).

During the time the master's thesis was being completed, we have already implemented one of the assays in routine practice at the Department for Laboratory Diagnostics in Murska Sobota General Hospital because of its necessity in certain conditions and diseases.

SEZNAM OKRAJŠAV

PF4	trombocitni faktor 4 (platlet factor 4)
MM	molekulska masa
AT	antitrombin III
vWF	von Willebrandov faktor
TF	tkivni faktor, tkivni tromboplastin
HMWK	visokomolekularni kininogen
TFPI	inhibitor zunanje poti tkivnega faktorja
SBMS	Splošna bolnišnica Murska Sobota
AT	antitrombin III
PC	protein C
PS	protein S
aPTT	aktivirani parcialni tromboplastinski čas
UH	nefrakcionirani heparin (Unfractionated heparin)
NMH	nizkomolekularni heparin
MI	miokardni infarkt
VTE	venska tromboembolija
HIT	z heparinom inducirana trombocitopenija
GVT	globoka venska tromboza
PE	pljučna embolija
IV	intravenozno
SC	subkutano
pNA	paranitroanilin
DS	dekstran sulfat
LoD	meja detekcije (Limit of Detection)
LoB	meja slepega vzorca (Limit of Blank)
LoQ	meja kvantifikacije (Limit of Quantification)
SD	standardni odklon
CV%	koeficient variacije

1 UVOD

1.1 Hemostaza

Izraz hemostaza (grško, haimo iz haima, haimatos kar pomeni kri in status za stoječ) zajema vse procese in reakcije, ki prispevajo k učinkovitemu ustavljanju krvavitve (2). Sistem hemostaze, ki v normalnih razmerah omogoči učinkovito zaustavljanje krvavitve, sestavljajo trombociti, koagulacijske in fibrinolitične beljakovine, inhibitorji koagulacije in fibrinolize in žilna stena (1). Proces zaustavljanja krvavitve se prične takoj, ko je zaradi poškodbe, kirurškega posega ali bolezni prekinjena površina endotelijskih celic v žili. Kri pride v stik s subendotelijskim slojem žile. Na tem mestu nastane trombocitni čep, razen tega nastane tudi vazokonstrikcija. To imenujemo primarna hemostaza. Sekundarna hemostaza pa je posledica reakcij v koagulacijskem sistemu, ki privedejo do nastanka fibrina. Fibrinska vlakna učvrstijo trombocitni čep, tako se lahko zaustavijo tudi krvavitve iz večjih žil. Primarna in sekundarna hemostaza potekata hkrati in povezano (1).

1.1.1 Primarna hemostaza

Za učinkovito primarno hemostazo sta potrebna normalno število in funkcija trombocitov. Ko nastaja trombocitni strdek, pride do sprememb trombocitov: adhezije (vezava za subendotelijsko tkiva žilne stene), agregacije (medsebojno zlepljanje trombocitov), sekrecije (iz gostih telesc, zrnca alfa in lizosomov), sprostijo se arahidonati (1).

1.1.1.1 Adhezija trombocitov

V fizioloških pogojih se trombociti ne lepijo na nepoškodovano žilno steno zaradi antitrombotičnih lastnosti endotelija (2). Pri poškodbi pride do vezave ligandov kot so von Willebrandov faktor (vWF), fibrinogen in fibronektin na specifične membranske glikoproteinske receptorje. Tako je za adhezijo trombocitov pomemben GPIIb/IX na površini trombocita, ki je receptor za vWF na endotelijskih celicah.

1.1.1.2 Agregacija in sekrecija trombocitov

Za agregacijo trombocitov je odgovoren receptor GP IIb/IIIa. S pomočjo tega se preko molekule fibrinogena povežeta dva sosednja trombocita (1). Neaktivirani trombociti imajo diskoidno obliko. Pri aktiviranju pa postanejo sferični in dobijo psevdopodije, pride tudi do prerazporeditve zrnca v sredino trombocita in sekrecijo le teh (2). Fosfolipaza A₂ katalizira sproščanje arahidonske kisline iz fosfolipidov v membrani trombocita. Aktivirajo jo

kolagen, trombin in adrenalin. Del nastale arahidonske kisline pretvori ciklooksigenaza v tromboksan A₂. Ta povzroči sekrecijo in agregacijo trombocitov ter vazokonstrikcijo (1). Aspirin in nekateri nesteroidni antirevmatiki zavrejo aktivnost ciklooksigenaze (1).

1.1.2 Sekundarna hemostaza

Sočasno z nastajanjem trombocitnega strdka nastaja fibrin. Fibrin nastane po zaporedju reakcij, ki jih skupno imenujemo koagulacija krvi. Koagulacijski sistem sestavljajo beljakovine (koagulacijski faktorji), ki jih po dogovoru označujemo z rimskimi številkami. Za aktivirano obliko koagulacijskega faktorja, rimski številki dodamo črko a (npr. FVIIIa) (1).

Koagulacijski faktorji so v krvnem obtoku, le F III (tkivni tromboplastin, tkivni faktor-TF) je transmembranski protein in je na površini številnih celic, ki normalno niso v stiku s krvjo. Niso ga našli na endotelijskih celicah *in vivo*, zato če ne pride do poškodbe endotelija, kri ne pride v stik s TF (1). Večina koagulacijskih beljakovin nastane v jetrih, nekatere pa tudi v makrofagih, megakariocitih, trombocitih, endotelijskih celicah. V krvnem obtoku so v neaktivni obliki. Koagulacijske beljakovine so proencimi in kofaktorji. Samo pretvorba proencima v encim ne zadošča, da bi reakcija tekla; potreben je kofaktor ki nima encimskih lastnosti (1). Opazovanja Macfarlanda oz. Daviesa in Retnoffa so vodila do opisa koagulacije kot zaporedja reakcij, kjer v eni reakciji nastane proteaza, ki je potrebna za drugo reakcijo (Teorija kaskad oz. slapov) (1).

Na osnovi začetnih opazovanj in raziskav so ugotovili dve poti, po katerih lahko pride do koagulacije plazme *in vitro*. To sta intrinzična in ekstrinzična pot koagulacije.

1.1.2.1 Intrinzična ali notranja pot koagulacije.

Reakcijo sproži stik koagulacijskih beljakovin s tujo, negativno nabito površino (npr. steklo, kaolin) (1). Pot se začne z aktivacijo FXII in FXI v procesu imenovanem kontaktna aktivacija (2). FXII se aktivira z delno proteolizo. Za reakcijo sta potrebna kalikrein in visokomolekularni kininogen (HMWK- high molecular weight kininogen). Faktorji notranje poti FXII, FXI, FIX in FX, se aktivirajo drug za drugim. FVIIIa skupaj s fosfolipidi in kalcijem pospeši aktivacijo FX v FXa. V tej reakciji sodeluje FIXa kot encim, FVIIIa pa kot kofaktor. FVIIIa nima kofaktorske aktivnosti, dokler ga v aktivno obliko ne pretvori trombin (FIIa). S krvavitvami je povezano samo pomanjkanje FXI, ne

pa tudi FXII, prekalikreina ali HMWK, kar kaže na to, da mehanizem kontaktne aktivacije pospešuje koagulacijo, ni pa bistveno potreben za normalno hemostazo (2).

1.1.2.2 Ekstrinzična ali zunanja pot koagulacije.

Koagulacija *in vitro* se lahko začne tudi po stiku plazme z izvlečkom zunajžilnih tkiv, ki so bogata s fosfolipidi, ob prisotnosti kalcijevih ionov. Ker reakcijo sproži stik z beljakovinami, ki niso v krvi, so to imenovali ekstrinzična pot koagulacije (1). Zunanja pot poteka preko FVII, ki se veže s tkivnim faktorjem kot kofaktorjem. Tkivni faktor tvori skupaj s fosfolipidi tkivni tromboplastin. FVII je v manjših koncentracijah vedno prisoten v krvi, kar vodi do pospeševanja aktivacije koagulacije. FVIIa aktivira FIX in FX. FVIIa, FX in TF ustvarijo pospeševalno zanko, ki omogoča visoke aktivnosti FXa v kratkem času (2). FXa sproži pretvorbo protrombina (FII) v trombin (FIIa) ob prisotnosti FVa in kalcijevih ionov. Za pretvorbo protrombina v trombin je potrebna negativno nabita celična površina s fosfolipidi. Gama karboksi-glutaminska konca molekul FII in FXa se povežeta prek kalcijevih ionov na fosfolipide na površini celic. FVa omogoči, da sta molekuli pravilno prostorsko razporejeni. Trombin je tako končni encim koagulacijske kaskade. Fibrin nastane zaradi delovanja trombina na fibrinogen (FI), za reakcijo so potrebni kalcijevi ioni (1). Fibrinogen je glikoprotein in je dimer. Sestavljen je iz treh parov polipeptidnih verig (α , β in γ), ki so povezane z disulfidnimi verigami. Trombin najprej odcepi z verige α fibrinopeptid A in z verige β fibrinopeptid B. Pri odcepitvi fibrinopeptida A pride v fibrinskem monomeru do konformacijske spremembe, ki omogoči polimerizacijo z drugimi fibrinskimi monomeri v fibrin. Fibrin premreži aktivirani FXIII. Premreženje je transpeptidacija- kovalentna vezava med dvema verigama γ ali α dveh sosednjih molekul (2).

Koagulacijo delimo na notranjo in zunanjo pot samo zaradi lažjega razumevanja, dejansko pa *in vivo* ta delitev ne obstaja. Koagulacija se verjetno aktivira po ekspresiji tkivnega faktorja na površini celic ali po sproščanju le-tega iz endotelijskih celic v subendotelij (2). Faktorji notranje poti so sekundarno udeleženi pri aktivaciji koagulacije kot pozitivna povratna zanka. Zaporedno aktiviranje koagulacijskih faktorjev in pozitivna povratna zanka notranje poti pomembno povečata potencial notranjega dražljaja ob poškodbi žilne stene. Poleg tega se koagulacijski faktorji, ki krožijo po krvi, koncentrirajo na površinah, kar povzroči pomembno lokalno povečanje posameznih faktorjev (npr. učinek FXa se

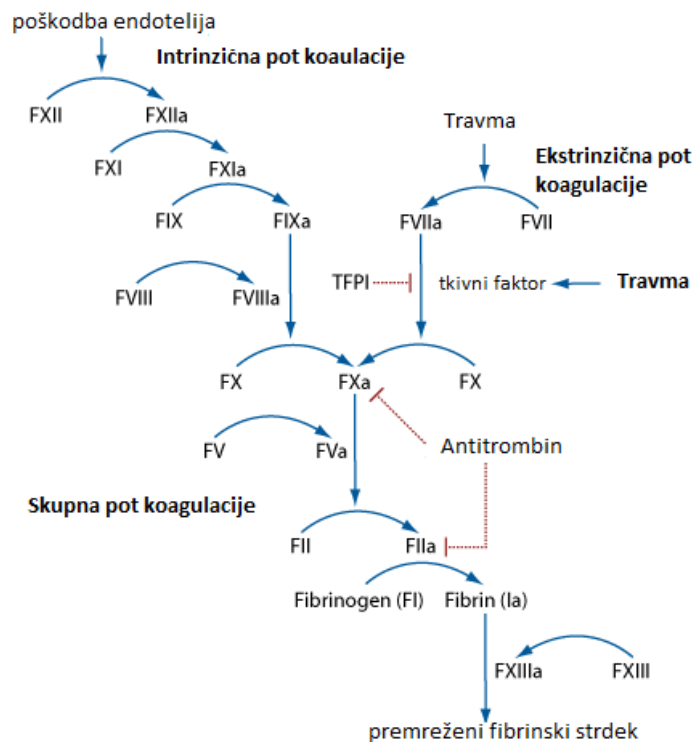
300.000- krat poveča kadar se nahaja v kompleksu s protrombinom, FVa, fosfolipidi in kalcijem) (2).

1.1.2.3 Uravnavanje koagulacije

Delovanje koagulacijskega sistema uravnava učinkoviti inhibitorji aktivnih encimov, npr. antitrombin, protein C in S. Njihovo delovanje je zlasti pomembno v krvnem obtoku. Zdrava jetra lahko odstranjujejo aktivirane koagulacijske faktorje. Po drugi strani krvni tok zmanjšuje koncentracijo reaktantov na mestu dogajanja, kjer je v začetku le majhna količina proencima aktivirana v encim. In končno se koagulacijski faktorji adsorbirajo na aktivne površine celic, da je nastajanje krvnega strdka normalno omejeno na mesto poškodbe (1).

Antitrombin III (AT) je eden glavnih inhibitorjev koagulacije. Zavira delovanje serinskih proteaz kot so trombin, FXa, FIXa, FXIa (1). AT sorazmerno počasi zavira serinske proteaze, če pa je prisoten heparin se hitrost zaviranja močno poveča. Kadar pa je trombin vezan na fibrin, tedaj ga ne more zavreti niti AT, niti kompleks AT-heparin (2). Aktivacijo zunanje poti zavira inhibitor zunanje poti tkivnega faktorja (TFPI- tissue factor pathway inhibitor). TFPI izražajo endotelijske celice. Neposredno zavira FXa tako, da tvori kvartarni kompleks s FVIIa in tkivnim faktorjem. Zaviralni učinek TFPI lahko povečamo s heparinom, ker ta pospešuje sproščanje TPFI iz endotelijskih celic (2).

Najvažnejši zaviralni mehanizem koagulacije je negativna povratna zanka proteina C (PC), ki vključuje protein S (PS) in trombomodulin. PC in PS se sintetizirata v jetrih in sta odvisna od vitamina K. PC se skupaj s trombinom veže na receptor na površini endotelijskih celic - na trombomodulin (aktivacija PC). Aktivirani PC je encim, ki s kofaktorjem PS cepi FVa in FVIIIa. PC lahko deluje samo po aktivaciji s trombinom. Tako trombin po eni strani deluje v pozitivni povratni zanki in pospešuje koagulacijo z aktivacijo FV, FVIII in FIX. Preko PC pa sodeluje v negativni povratni zanki (2).



Slika 1. Koagulacijska kaskada in uravnavanje koagulacije (povzeto po literaturi 9)

1.2 Heparin

1.2.1 Zgodovina heparina

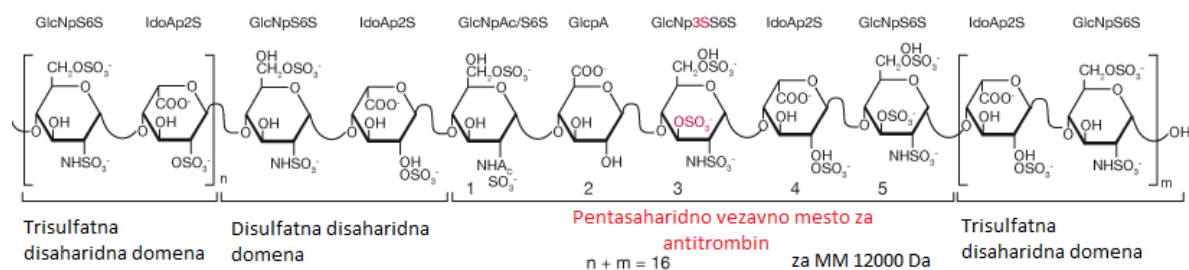
Leta 1916 je študent medicine na Univerzi John Hopkins, Jay McLean, prišel do nenavadnega in nepričakovanega odkritja. Med raziskovalnim delom, kjer so iskali prokoagulacijske fosfolipide je naletel na srčno in jetrno frakcijo, ki ste imeli nasprotni, torej antikoagulanten učinek (4). Poimenoval ga je heparin, kar izhaja iz latinske besede hepar in pomeni jetra. Prvič so ga v terapiji uporabili okrog leta 1940. Pridobili so ga z ekstrakcijo mukoze svinjskega črevesa (7). Ta postopek se je v osnovi ohranil do danes. V 70 letih 20. stoletja so raziskovalci začeli razvijati tehnike, s katerimi bi zmanjšali širok razpon molekulske mase heparina, in s tem stranke učinke. Johnson in sodelavci so uporabili gelsko filtracijo in ločili heparin na štiri skupine glede na molekulsko maso (MM). Johnson in sodelavci so ugotovili, da se z zmanjšanjem molekulske mase, skrajša aktivirani parcialni tromboplastinski čas (aPTT), medtem ko so frakcije heparina z manjšo MM obdržale zmožnost inhibicije FXa (4). Ta ugotovitev je vodila do številnih študij, s ciljem najti antikoagulant z zmožnostjo preprečitve tvorbe strdkov, brez pojavljanja pretiranih krvavitev.

1.2.2 Nefrakcionirani in nizkomolekularni heparin

Heparin je heterogena mešanica negativno nabitih glikozaminoglikanov. Molekulska masa nefrakcioniranega heparina (UH- Unfractionated heparin) znaša od 3000 do 30000, v povprečju nekje med 15000-18000. To ustreza polimerom, sestavljenim iz približno 45-50 monosaharidov (3). Močan negativen naboj, ki ga imajo molekule z veliko molekulsko maso, povzroča nespecifično vezavo UH na plazemske proteine in krvne ter endotelijske celice, kar ima za posledico zmanjšan antikoagulantni učinek UH (3).

Ker je mnogo plazemskih proteinov iz skupine reaktantov akutne faze, predvsem pri stanjih kot so venska tromboembolija, miokardni infarkt (MI) oziroma po kirurških posegih, prihaja do različnih vrednosti teh proteinov v plazmi. To lahko vodi v prenizko doziranje heparina in različne odzive na heparin pri posameznih preiskovancih. Prav tako se heparin veže na trombocitni faktor 4 (PF4- platelet faktor 4) in na visokomolekularni von Willebrandov faktor, ki ga izločajo aktivirani trombociti ali endotelijske celice (7). Zaradi velike afinitete heparina za PF4 se lahko pojavlja s heparinom inducirana trombocitopenija (HIT- heparin induced thrombocytopenia). Vezava heparina povzroči strukturno spremembo PF4, kar protitelesa prepoznajo kot tuj protein. Novonastala IgG protitelesa tvorijo komplekse s PF4 in heparinom, ki se nahajajo na trombocitih in povzročijo aktivacijo trombocitov preko Fc receptorjev na membrani trombocitov (7). V končni fazi pride zaradi pospešene aktivacije in odstranjevanja trombocitov do trombocitopenije. HIT je definirana kot 50% ali večje zmanjšanje števila trombocitov po petem dnevu terapije s heparinom, brez drugega znanega dejavnika za trombocitopenijo, in se po ukinitvi terapije s heparinom znova povrne na prvotno vrednost (7).

Kot komplikacija pri neprekinjeni uporabi heparina daljši od 3 mesecev se pri približno v 2-3% pojavi osteoporoza (7).

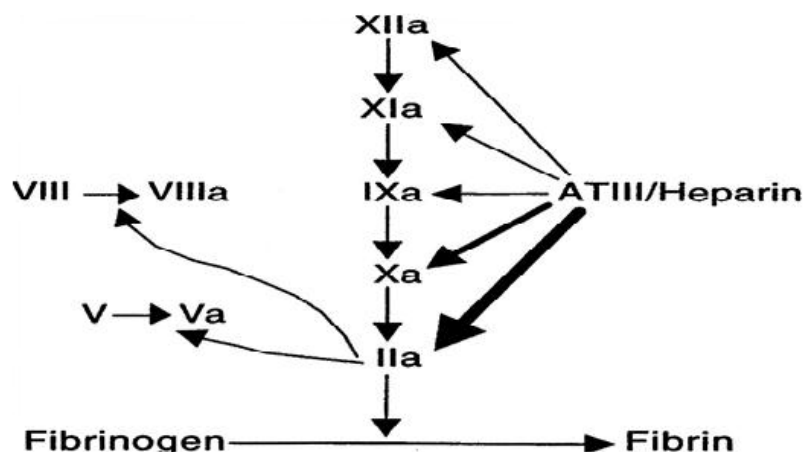


Slika 2. Strukturne variante heparina in pentasaharidno zaporedje odgovorno za vezavo na AT (Povzeto po literaturi 6).

Nizkomolekularni heparini (NMH) so derivati UH. Pripravljeni so s filtracijo ali s kontrolirano encimsko ali kemično depolimerizacijo UH, tako da dobimo fragmente s povprečno molekulsko maso 5000. Ker se za pripravo uporabljajo različne metode, NMH niso enaki. Tako se za posamezne NMH podajajo razmerja Xa:IIa. Nižja razmerja pomenijo večji vpliv na inhibicijo trombina in s tem na teste koagulacije in obratno (7). Pri NMH nespecifične vezave na proteine niso tako pogoste in iz telesa se izločajo le preko ledvic., medem ko se UH v glavnem izloča preko retikuloendotelne sistema saj se z veliko afiniteto veže na endotelijske celice. Te lastnosti NMH pripomorejo k temu, da so v primerjavi z UH bolj predvidljivi antikoagulantni in v redkih primerih povzročajo HIT (3).

1.2.3 Mehanizem delovanja heparina

Mehanizem delovanja heparina so skozi leta raziskovali različni znanstveniki. Prelomna odkritja so bila odkritje dejstva, da heparin za svoje antikoagulacijsko delovanje potrebuje kofaktor v plazmi in odkritje AT (7). Mehanizem vezave na AT sta raziskovala Lindahl in Rosemberg. Izkazalo se je, da se heparin veže na lizinski ostanek v molekuli AT. To povzroči konformacijsko spremembo v argininskem aktivnem centru AT in s tem posledično mnogokratno poveča njegov antikoagulantni učinek (7). AT je tako zmožen kovalentne vezave na serinske proteaze in s tem ireverzibilne inhibicije aktivnosti serinskih proteaz, ki sodelujejo v koagulacijski kaskadi; primarno FXa in trombina (IIa) (Slika 3.). Heparin se veže na AT s specifičnim pentasaharidnim zaporedjem. Pri inaktivaciji FXa zadostuje specifična vezava pentasaharidnega zaporedja prisotnega v UH in NMH na AT. Inaktivacija trombina (IIa) pa je posledica vezave kompleksa heparin-AT na trombin, za kar je potrebna daljša polisaharidna veriga sestavljena iz vsaj 18 monosaharidov (Slika 4.) (3).



Slika 3. Kompleks AT/heparin inhibira delovanje serinskih proteaz. Z največjo afiniteto se veže na FIIa in FXa (Povzeto po literaturi 6).



Slika 4. Inhibicija trombina s polisaharidno verigo iz vsaj 18. monosaharidov in inhibicija Xa s pentasaharidnim zaporedjem (Povzeto po literaturi 6).

1.2.4 Terapevtska uporaba heparina in monitoring

Tveganje za pojav venske tromboembolije (VTE) (globoka venska tromboza in pljučna embolija) je večje pri hospitaliziranih pacientih z akutnim obolenjem, travmo ali po operativnem posegu. Paciente je pred operativnimi posegi potrebno opredeliti glede tveganja za VTE glede na faktorje tveganja. To so: starost (>75), debelost, varice, predhodna VTE, kongenitalna ali pridobljena trombofilija, travma, maligna obolenja, respiratorna obolenja (kronično obstruktivna pljučna bolezen), obolenja srca in MI, hematološka obolenja (diseminirani plazmocitom, mieloproliferativne neoplazme), hude infekcije, nosečnost, oralna kontracepcija, nepokretnost, hospitalizacija (zaradi travme, operativnega posega...). (4). Upoštevati je potrebno, da so pri različnih operativnih posegih tveganja za pojav VTE različna. Tako je pri velikih ortopedskih operacijah večja pojavnost VTE kot npr. pri žilnih operacijah (Tabela 1.).

Rutinska antitrombotična profilaksa s heparinom zmanjšuje obolevnost, smrtnost in stroške zdravljenja, pri pacientih s tveganjem za globoko vensko trombozo (GVT) in pljučno embolijo (PE), kar poudarjajo številna mednarodna priporočila (American Collegae of Chest Physicians, 2008) (4).

Prav tako se heparin tradicionalno uporablja pri zdravljenju spontanih ali iatrogenih venskih in arterijskih tromboembolij. Terapija s heparinom pri pojavu tromboembolij dokazano zmanjšuje smrtnost, prav tako pa zmanjšuje tveganje za nastanek strdkov pri miokardnem infarktu, nestabilni angini pectoris in koronarni angioplastiki. Aplikacija heparina je lahko le parenteralna, torej: intravenozna (IV) ali subkutana (SC), odvisno od kliničnih indikacij (3).

Tabela 1. Tveganje za globoko vensko trombozo pri različnih posegih in priporočena tromboprofilaksa (povzeto po literaturi 4).

Tveganje	Tveganje za GVT brez profilakse (%)	Tromboprofilaksa
Nizko -mali operativni poseg pri pokretnem pacientu (pokreten pacient)	<10	Profilaksa ni potrebna.
Srednje -ginekološki in urološki operativni poseg (nepokreten pacient)	10-40	NMH s.c., fondaparinux
Visoko -artroplastija kolka ali kolena -operativni poseg pri zlomu kolka	40-80	NMH s.c., fondaparinux ali peroralni VKA (INR 2-3)

Legenda: s.c.- subkutano; VKA– vitamin K antagonisti, fondaparinux– sintezni pentasaharid

Za preprečevanje in zdravljenje tromboz se lahko uporabljajo različne formulacije heparinov, od UH, ki je mešanica sulfoniranih glikozaminoglikanov s širokim razponom v MM, preko različnih NMH s povprečno MM 4000 – 5000, do sinteznih pentasaharidov, ki selektivno zavirajo aktivnost Xa. V naši primerjavi so preiskovanci prejeli NMH, ki so navedeni v Tabeli 2. in se uporabljajo za:

- Preprečevanje tromboemboličnih zapletov v splošni in ortopedski kirurgiji in pri internističnih bolnikih z velikim tveganjem (respiratorna insuficienca in/ali okužba dihal in/ali srčno popuščanje), ki so hospitalizirani in se zdravijo v enoti intenzivne terapije.
- Zdravljenje VTE (proksimalna globoka venska tromboza in/ali pljučna embolija).
- Podaljšano zdravljenje simptomatske VTE in dolgotrajno preprečevanje njene ponovitve pri bolnikih z rakom.
- Nestabilna bolezen koronarnih arterij (nestabilna angina pectoris in miokardni infarkt brez zobca Q v EKG-ju).
- Preprečevanje koagulacije v zunajtelesnem sistemu v času hemodialize in hemofiltracije pri bolnikih z akutno odpovedjo ledvic ali kronično ledvično insuficienco.
- Zdravljenje akutnega miokardnega infarkta z dvigom intervala ST, vključno z bolniki, ki bodo zdravljeni konzervativno ali s poznejšo perkutano koronarno intervencijo.
- Preprečevanje in zdravljenje VTE v nosečnosti.

Po anatomsko-terapevtsko-kemični klasifikaciji, UH in NMH spadajo v skupino pripravkov za zdravljenje krvi in krvotvornih organov, antitrombotike, heparinska skupina.

Tabela 2. Najpogosteje uporabljeni nizkomolekularni heparini v Splošni bolnišnici Murska Sobota.

Ime NMH	Proizvajalec	Učinkovina	Povprečna molekulska masa	klasifikacija ATC	Razmerje Xa:IIa
Clexane	Sanofi-Aventis S.A., Španija	Na-enoksaparinat	4500	B01AB05	3.8:1
Fragmine	Pfeizer, Belgija	Na-dalteparinat	4000-6000	B01AB04	2.7:1
Fraxiparine	GSK Pharmaceutical, Poljska	Ca-nadroparinat	4300	B01AB06	3.6:1

Terapevtski monitoring je potreben pri IV terapiji, v primeru SC terapije pa spremljanje terapije s heparinom ni nujno potrebno. Prav tako se v današnji medicinski praksi rutinski

monitoring heparina zmanjšuje zaradi zamenjave UH z NMH, saj je slednji bolj predvidljiv in se pojavlja manj komplikacij ter je tako antikoagulant izbire (3). Terapijo z UH spremljamo z aPTT in anti-Xa. Pri terapiji z NMH spremembe pri aPTT ne zaznamo oz. je minimalna, zato se pri tem poslužujemo določanja aktivnosti anti-Xa. Rutinsko monitoringa ne izvajamo, razen pri krvavitvah, sumu na akumulacijo pri zmanjšanem delovanju ledvic, pri otrocih in nosečnicah.

1.2.5 Metode določanja

Za spremljanje terapije s heparini se uporabljajo naslednje metode:

- ⊗ aPTT- aktivirani parcialni tromboplastinski čas
- ⊗ nevtralizacija s protamin sulfatom
- ⊗ inhibicija FXa; s kromogeno detekcijo ali merjenjem nastanka strdka
- ⊗ Inhibicija FIIa; s kromogeno detekcijo ali merjenjem nastanka strdka

Med naštetimi je aPTT, zaradi svoje preprostosti, hitrosti in nizkih stroškov, še zmeraj metoda izbire za spremljanje UH. Vendar je metodo težko standardizirati in zahteva intaktnost proteinov celotne kaskade koagulacije za točne meritve aktivnosti heparina. Prav tako naletimo na oviro pri pacientih s lupusnimi antikoagulantni in antifosfolipidnim sindromom, ki imajo aPTT podaljšan.

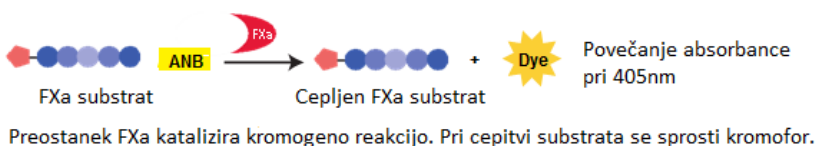
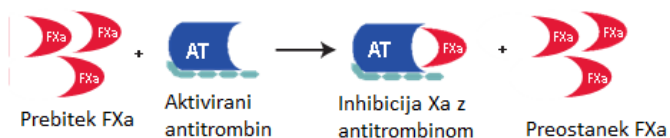
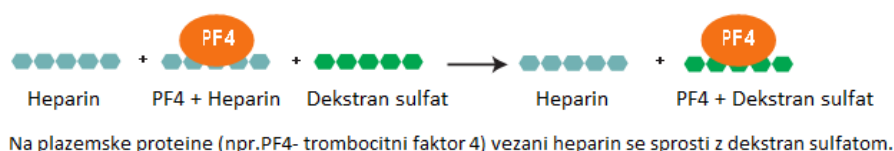
Kot smo že omenili se pri terapiji z UFH ali NMH inhibitorni učinek AT na Xa poveča, kar lahko merimo z metodami, ki temeljijo na osnovi nastanka strdka ali pogosteje s kromogenimi metodami. Za spremljanje terapije z NMH, fondaparinom in novejšimi zaviralci Xa se najpogosteje uporablja kromogena metoda inhibicije Xa. Vse kromogene metode temeljijo na metodi opisani po Teien-u in sodelavcih (7). In sicer se heparin v vzorcu veže z AT in nastane kompleks heparin-AT, ki inhibira Xa. Ta se v reagenčno zmes doda v prebitku. Preostala aktivnost Xa se meri tako, da dodamo za Xa občutljiv in visoko specifičen substrat. Kot produkt nastane *para*-nitroanilin (pNA), katerega absorbanco merimo pri 405 nm. Količina pNA je obratno sorazmerna z aktivnostjo heparina v plazmi. Razlike med posameznimi metodami so v času inkubacije, uporabljenem redčitvenem pufru, dodatku eksogenega AT in uporabi dekstran sulfata (DS) v pufru, ki zmanjša vpliv PF4 na heparin. Metode so lahko eno ali dvostopenjske in z njimi lahko merimo aktivnost UH ali NMH z uporabo ustrezne kalibracijske krivulje (7). Ta se izdelava s kalibratorji s točno določeno aktivnostjo heparina. Pri enostopenjski reakciji se eksogeno AT ne dodaja. Metoda temelji na kompetitivni inhibiciji. Xa se doda mešanici plazme in substrata, kar povzroči potek dveh sočasnih reakcij:

- Hidroliza substrata katalizirana z Xa
- Inhibicija Xa s kompleksom heparin-AT

Ko reakcija doseže ravnovesje, je količina nastalega produkta obratno sorazmerna koncentraciji heparina v testirani plazmi.

Pozorni moramo biti v primeru prisotnosti interferenc, da te ne presegajo maksimalnih koncentracij, ki jih še dovoljuje proizvajalec določene metode, za bilirubin, hemoglobin in trigliceride.

Priporočene vrednosti za anti-Xa so odvisne od vrste heparina, odmerka, odmerjanja in indikacije. Če preiskovanec ne prejema heparina je njegova anti-Xa koncentracija 0 oziroma nedoločljiva. Za določitev heparina v plazmi vzamemo vzorce 3-4 ure po aplikaciji, takrat, ko je koncentracija le-tega najvišja.



Slika 5. Shema metode določanja aktivnosti heparina (povzeto po literaturi Siemens).

2 NAMEN IN HIPOTEZE

Namen:

- V redno delo Oddelka za laboratorijsko diagnostiko, Splošna bolnišnica Murska Sobota, želimo vpeljati analizno metodo določanja aktivnosti NMH v plazmi.
- Primerjati želimo analizno metodo določanja aktivnosti NMH proizvajalca Siemens z analizno metodo proizvajalca Stago. Meritve bomo opravili na dveh različnih analizatorjih. Za primerjavo analiznih metod bomo uporabili vzorce preiskovancev, ki so prejeli NMH. Skladnost analiznih metod bomo ovrednotili s statističnim testom, z regresijo po Passing-Babloku, in rezultate prikazali z Bland-Altmanovim grafom.
- Analizni metodi bomo delno validirali. Na kontrolnih materialih proizvajalca bomo določili merilno natančnost posamezne analizne metode. Merilno natančnost analizne metode bomo določili s ponovljivostjo v seriji in med serijami meritev ter rezultate primerjali z rezultati proizvajalca.
- Preveriti želimo mejo detekcije obeh analiznih metod, ki jo navaja proizvajalec reagenčnega kompleta za merjenje aktivnosti NMH v plazmi. Za ta namen bomo uporabili plazme zdravih preiskovancev in bolnikov, ki prejemajo NMH.

Hipoteze:

Domnevamo, da:

- bodo rezultati primerjave analiznih metod skladni in da ne bomo ugotovili razlik med analiznima metodama določitve aktivnosti NMH v plazmi,
- bodo rezultati merilne natančnosti za določanje aktivnosti NMH v plazmi primerljivi z navedbami proizvajalca,
- bo rezultat meje detekcije obeh analiznih metod v skladu z navedbami proizvajalca.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Vzorci

3.1.1 Priprava vzorcev za določitev merilne natančnosti metod

Za določanje merilne natančnosti metod smo uporabili kontrolni material obeh proizvajalcev z nizko in visoko vsebnostjo NMH. Merilno natančnost smo določili po postopku, opisanem v poglavju 3.7.

Kontrolni material proizvajalca Siemens (Berichrom Heparin LMW Control 1 in 2) smo pripravili po navodilih, kot je opisano v poglavju Reagenti. Raztopljen kontrolni material smo razdelili v alikvote in zamrznili pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pred uporabo smo alikvote odmrznili. Kontrolni material smo inkubirali v vodni kopeli pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 min (Thermo Sceintific, Heraeus, Nemčija). Analize smo izvedli v roku dveh ur po inkubaciji.

Kontrolni material proizvajalca Stago (STA Quality HBPM/LMWH) smo prav tako pripravili po navodilih, kot je opisano v poglavju Reagenti, vendar alikvotiranje in zamrzovanje ni bilo potrebno. Proizvajalec namreč navaja daljšo stabilnost kontrolnega materiala (7 dni).

3.1.2 Priprava vzorcev za izvedbo primerjave metod za določanje aktivnosti NMH

Za primerjavo metod z regresijo Passing-Bablok (poglavje 3.7) smo uporabili citratno plazmo preiskovancev, ki so prejeli NMH. Odvzem krvi je bil izveden v epruvete z antikoagulantom natrijevim citratom (0,109 M Na-citrat) v razmerju ena enota antikoagulanta in devet enot krvi. Odvzem se je izvršil 3 - 4 ure po aplikaciji NMH. Vzorce krvi smo v roku ene ure po odvzemu krvi centrifugirali ($2500 \times g$; 15 minut) (Multifuge 1S Heraeus, Nemčija). Plazmo smo odpipetirali in zamrznili pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pred analizo smo zamrznjene vzorce inkubirali pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 minut in jih analizirali v roku dveh ur po inkubaciji.

3.1.3 Priprava vzorcev za določitev meje slepega vzorca

Za določanje meje slepega vzorca (Limit of Blank, LoB) smo uporabili citratno plazmo preiskovancev, ki niso dobili NMH, pripravljeno in shranjeno po enakem postopku kot pri vzorcih, uporabljenih za primerjavo metod.

3.1.4 Priprava vzorcev za preverjanje in določanje meje detekcije

Za določitev meje detekcije (Limit of Detection, LoD) smo uporabili citratno plazmo preiskovancev po aplikaciji NMH in jo po potrebi redčili z normalno plazmo

preiskovancev, ki NMH niso prejeli. Vzorci so bili pripravljeni in shranjeni po enakem postopku kot pri vzorcih uporabljenih za primerjavo metod.

3.2 Preiskovanci

Za primerjavo metod za določanje aktivnosti NMH z regresijo Passing-Bablok smo uporabili vzorce preiskovancev, ki so bili hospitalizirani v Splošni bolnišnici Murska Sobota in so prejeli NMH. Odvzem krvi je bil izveden 3-4 ure po aplikaciji NMH. 25 preiskovancev je prejelo zdravilo natrijev enoksaparinat (Clexane, Sanofi-Aventis) v jakosti 4000, 6000 ali 8000 mednarodnih enot (IE), 13 natrijev dalteparinat (Fragmine, Pfizer) v jakosti 2500, 5000 ali 7500 IE in 9 kalcijev nadroparinat (Fraxiparine, Glaxo Smith Kline) v jakosti 2850 ali 5700 IE na 12 oziroma 24 ur (Tabela 3.). Za primerjavo metod smo uporabili 47 vzorcev. Mediana starosti bolnikov je bila 70 let, minimum 29 in maksimum 89 let. Od 47 preiskovancev je bilo 35 moških in 12 žensk. Jakost zdravila je podana v mednarodnih enotah anti-Xa (IE) v skladu s prvim mednarodnim standardom za nizkomolekularne heparine.

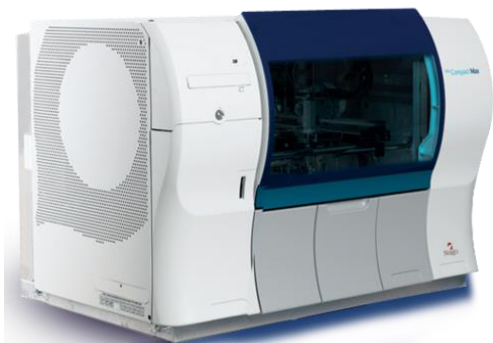
Tabela 3. NMH uporabljeni pri preiskovancih in jakosti podane v mednarodnih enotah (IE) z aplikacijo na 12 oz. 24ur.

NMH	Fragmine 12/h			Clexane 12/h			Fraxiparine 12/h	
Odmerek (IE)	2500	5000	7500	4000	6000	8000	2850	5700
Št. Preiskovancev	2	3	8	12	7	1	1	1
NMH				Clexane 24/h			Fraxiparine 24/h	
Odmerek (IE)				4000	6000	8000	2850	5700
Št. preiskovancev				3	2	0	0	7

3.3 Aparature

Vzorcem smo vzporedno določali aktivnost NMH na avtomatiziranih analizatorjih Compact Max, proizvajalca Diagnostika Stago, Francija in BCS-XP, proizvajalca Siemens, Nemčija. Oba analizatorja sta opremljena s čitalnikom črtnih kod, s katerim prepoznata reagente oz. vzorce, ki se vstavljajo v zato namenjena stojala. Po izbiri testa analizator z vzorčnim pipetorjem odmeri določen volumen plazme, z reagenčnim pipetorjem pa potrebne reagente in te prenese v reakcijske kivete. Tu po inkubaciji poteče reakcija in ko ta doseže ravnovesje, sledi merjenje obarvanega produkta pri valovni dolžini 405 nm. Izmerjen signal se s pomočjo kalibracijske krivulje pretvori v koncentracijo oz. aktivnost analita.

Pred začetkom dela je potrebno opraviti vzdrževanje sistema po navodilih proizvajalca. Sledi izdelava kalibracijske krivulje za določitev aktivnosti NMH s kalibratorji s točno določeno koncentracijo NMH in nato kontrola kakovosti s kontrolnim materialom v dveh koncentracijskih območjih. Odstopanje od srednje vrednosti in meje sprejemljivosti določi proizvajalec kontrol. Za oba postopka smo uporabili tovarniško pripravljene reagente, ki so predstavljeni v podpoglavju Reagenti.



Slika 6. Analizator Compact Max, Diagnostika Stago, Francija



Slika 7. Analizator BCS-XP, Siemens, Nemčija

3.4 Reagenti

Za določanje aktivnosti NMH smo na analizatorju **Compact Max** proizvajalca **Diagnostika Stago** uporabili reagenčni komplet **Stago STA Liquid ANTI-Xa** (Diagnostika Stago, Francija REF: 00311), ki je sestavljen iz:

- **Reagent 1:** kromogeni substrat CBS 02.44, koncentracija je 4,5 $\mu\text{mol/mL}$
- **Reagent 2:** goveji faktor FXa, aktivnost je 1,0 IE/mL

Reagenta sta pripravljena za uporabo in stabilna 7 dni v hlajenem delu analizatorja in 3 mesece pri temperaturi 2-8 °C. Razen tega smo potrebovali še naslednje reagente, ki niso vključeni v reagenčni komplet:

- Pufer: STA Owren-Koller (REF 00360); Pufer, pH 7,35, pripravljen za uporabo
- Kalibrator: STA Multi Hep Calibrator (REF 00348); humana plazma z različnimi koncentracijami NMH (Reagent 1, 2, 3)
- Kontrolni material: STA Quality HBPM/LMWH (REF 00686); humana plazma, ki vsebuje točno določeno aktivnost NMH. Kontrolni material z nizko (Reagent 1) in visoko (Reagent 2) vsebnostjo NMH.

Kalibrator in kontrolo smo raztopili v 1 mL destilirane vode in inkubirali pri sobni temperaturi 30 minut. Pred uporabo smo kalibrator in kontrolni material premešali s krožnimi gibi. Reagenta sta stabilna 4 ure v hlajenem delu analizatorja in 7 dni pri temperaturi 2-8 °C.

Za določanje aktivnosti NHM smo na analizatorju **BCS-XP** proizvajalca **Siemens** uporabili reagenčni komplet **Berichrom Heparin** (Siemens, Nemčija REF: OWLD), ki je sestavljen iz:

- **reagent Faktor Xa** liofilizirana humana plazma, ki vsebuje tris (hidroksimetil) aminometan (TRIS), NaCl, etilendiamintetraocetno kislino (EDTA) in natrijev azid (<1 g/L).
- **reagent Dekstran sulfat**, liofiliziran, koncentracija v delovni raztopini: 0,02g/l
- **reagent ATIII**, humani liofiliziran, koncentracija v delovni raztopini: 1 IE/mL, natrijev azid (<1 g/L).
- **Substrat**, liofiliziran, koncentracija v delovni raztopini: 4 mmol/l Z-D-Leu-Gly-Arg-ANBA-metil amid (ANBA je 5-amino-2-nitrobenzojska kislina).

Razen tega smo potrebovali še naslednje reagente, ki niso vključeni v reagenčni komplet:

- Kalibrator: Berichrom Heparin LMW Calibrator (Ref.: OPLA03); liofiliziran, vsebuje 1.4 IE/mL NMH (lot, ki smo ga uporabili) v zapufrani humani plazmi
- Kontrolni material 1: Berichrom Heparin LMW Control 1 (Ref.: OPCD03); liofilizirana, vsebuje ≤ 0.5 IE/mL NMH v zapufrani humani plazmi
- Kontrolni material 2: Berichrom Heparin LMW Control 2 (Ref.: OPCB03); liofilizirana, vsebuje ≤ 1.0 IE/mL NMH v zapufrani humani plazmi
- Normalna plazma: Standard Plazma (Ref.: ORKL17); humana plazma

- Čistilno sredstvo: Cleaner SCS (Ref.: OQCD03)
- destilirana voda

Priprava in stabilnost reagentov

- REAGENT FX DILUENT smo raztopili v 10 mL destilirane vode.
- REAGENT FX smo raztopili v 10 mL REAGENT FX DILUENT-a in ga 15 minut mešali, da je raztopina postala homogena, ne da bi se reagent ob tem penil.
- REAGENT ATIII smo raztopili v 1 mL destilirane vode.
- SUBSTRAT smo raztopili v 2 mL destilirane vode.
- Berichrom Heparin LMW Calibrator, Berichrom Heparin LMW Control 1 in 2 ter reagent STANDARD PLAZMA smo raztopili v 1 mL destilirane vode in ga narahlo premešali, da se reagent ni penil. Nato smo ga inkubirali pri temperaturi 15-25 °C za najmanj 30 minut. Tik pred uporabo smo ga ponovno narahlo premešali.

Stabilnost posameznih reagentov, ki sestavljajo reagenčni komplet, in kontrolnega materiala je prikazana v Tabeli 4.

Tabela 4. Stabilnost reagentov proizvajalca Siemens.

Temperatura	<i>FXa</i> REAGENT	<i>ATIII</i> REAGENT	<i>SUBSTRATE</i> Reagent	Berichrom Heparin LMW Control 1, 2	Berichrom Heparin LMW Calibrator
2-8°C	2 tedna	2 tedna	6 tednov	48 ur	48 ur
<-20°C	2 meseca	2 meseca	6 mesecev	4 tedne	4 tedne
15-25°C	3dni	1 teden	2 tedna	24 ur	4 ure

3.5 Principi metod

Pri merjenju aktivnosti NMH izkoriščamo encimsko aktivnost prostega FXa, ki je v prebitku in iz substrata, prisotnega v reakcijski zmesi, tvori obarvan produkt, katerega merimo. Količina produkta je obratnosorazmerna z aktivnostjo (koncentracijo) heparina. Aktivost podamo v IE/mL.

3.5.1 Določitev aktivnosti NMH z reagenčnim kompletom Stago STA Liquid ANTI-Xa
Predlagana metoda je enostopenjska reakcija, kjer po dodatku FXa potečeta dve reakciji: hidroliza substrata (CBS) v reakcijski zmesi in inhibicija FXa s kompleksom heparin-AT. Po času, ko kompetitivna reakcija doseže ravnovesje, merimo količino nastalega *p*-nitroanilina pri 405 nm (obarvan produkt, ki ga tvori prosti FXa iz substrata). Ta je obratno sorazmerna s koncentracijo heparina v vzorcu.

3.5.2 Določitev aktivnosti NMH z reagenčnim kompletom Siemens Berichrom Heparin Dekstran sulfat (DS) sprosti nespecifično vezan heparin (npr. vezan na PF4). Prosti heparin se veže na AT iz vzorca in nastane kompleks. Kompleks AT-heparin se veže na FXa in ga inaktivira. FXa se v reagentu nahaja v presežku, zato preostali FXa katalizira kromogeni substrat, pri čemer nastaja obarvani produkt, katerega absorbanco merimo pri 405nm. Reagenčni komplet vsebuje AT, ki se dodaja v reagenčno zmes, kar naj bi bilo pomembno pri eventualnem zmanjšani aktivnosti AT pri preiskovancih, bodisi zaradi fizične oz. funkcijske pomanjkljivosti.

Heparin (vezan) + DS $\longrightarrow$ DS (vezan) + heparin (prost)

FX-a + AT (prebitek) + heparin $\longrightarrow$ FX-a-AT-heparin + FX-a (preostanek)

Kromogeni substrat + FX-a (preostanek) $\longrightarrow$ obarvan produkt

3.6 Merilna natančnost metod, primerjava metod, preverjanje in določitev meje slepega vzorca in meje detekcije ter statistično vrednotenje rezultatov

3.6.1 Merilna natančnost metod

Za obe metodi smo določili ponovljivost v seriji meritev (ponovljivost), vmesno in celokupno merilno natančnost ter vrednosti primerjali s podatki ki jih navaja proizvajalec. To smo izvedli s kontrolnim materialom proizvajalcev v dveh koncentracijskih območjih. Vsak kontrolni vzorec smo testirali 5 dni zaporedoma vsak dan v petih ponovitvah (25 meritev). Merilno natančnost smo ovrednotili s pomočjo enosmerne analize variance (one-way ANOVA, Analysis of Variance). Za ta namen smo uporabili tabelo programa Microsoft Excel (povzeto po literaturi 30 in 31), ki je vsebovala formule za tovrstno analizo (Tabela 5). Določili smo merilno natančnost znotraj serije, vmesno in celokupno merilno natančnost metod. Pridobili smo tudi statistične izračune za srednjo vrednost vseh meritev (Mean), srednjo vrednost meritev v seriji (group mean), standardni odklon (SD) in predstavili merilno natančnost metode kot koeficient variacije (CV%) po formulah 1, 2, 3.

Srednja vrednost $\bar{x}$:
$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (1)$$

n – število podatkov; X_i – posamezne vrednosti spremenljivke

Standardni odklon SD:
$$\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n x_i - (\bar{x})}{N - 1}} \quad (2)$$

Koeficient variacije CV%:
$$SD \frac{SD}{\bar{x}} \quad (3)$$

Merilno natančnost znotraj ene serije (angl. Repeatability, within-series imprecision) smo določili pri takih pogojih, kjer nismo uvajali nobenih načrtovanih sprememb v sistem (meritve v istem dnevu). Vmesno merilno natančnost (angl. Intermediate imprecision) smo določili tako, da smo uvedli načrtovane spremembe. V našem primeru so bile to meritve izvedene ob različnih dnevih. Od dobljenega rezultata vmesne merilne natančnosti smo odšteli merilno natančnost ene serije meritev in to uporabili za izračun celokupne merilne natančnosti (očiščena vmesna merilna natančnost). Celokupna merilna natančnost (angl. Total or intra-laboratory variance) je vsota merilne natančnosti znotraj ene serije in

očiščene vmesne merilne natančnosti. Rezultat ponovljivosti in celokupne merilne natančnosti za obe ravni kontrolnih materialov smo primerjali z rezultati, ki jih navaja proizvajalec za kontrolni material in preiskavo. Primerjavo smo izvedli v predpripravljeni tabeli (program »Imprecision by ANOVA«) tako, da smo v ustrezne celice tabele vnesli vrednost standardnega odklona (SD) za celokupno merilno natančnost (»Claimed intralab SD«), ki jo navaja proizvajalec. Primerjavo smo napravili z uporabo statistike χ^2 s stopnjo tveganja $(1 - \alpha)$ 5%. Vse potrebne formule za izračun, je tabela že vsebovala. V tabeli se, odvisno od tega, če je celokupna varianca manjša, izpiše sklep »Sprejeto« (»Accept«) oz. »Preglej« (»Review«), če je ta večja od vrednosti, navedene s strani proizvajalca.

Tabela 5. Statistične formule za izračun merilne natančnosti (enosmerna ANOVA).

	Vsota kvadratov (SS)	Prostostne stopnje	Varianca (MS)
<i>V seriji</i>	$SS_{between} = \sum_{i=1}^k n_i \times (\bar{x}_i - \bar{\bar{x}})^2$	<i>k-1</i>	$\frac{SS_{bet}}{(K - 1)}$
<i>Med serijami</i>	$SS_{within} = \sum_{i=1}^n (n_i - 1) \times s_i^2$	<i>N-k</i>	$\frac{SS_{within}}{(N - k)}$
<i>Celokupno</i>	$(N - 1) \times Var(x)_i$	<i>N-1</i>	/

Legenda: N je število meritev, $\bar{x}_i$ srednja vrednost serij, $\bar{\bar{x}}$ srednja vrednost vseh meritev, k število serij in Var(x) ocena variance iz rezultatov

3.6.2 Primerjava metod

Vzorci plazme, ki je vsebovala NMH smo vzporedno testirali z obema metodama. Statistične analize smo izvedli s pomočjo statističnega programa MedCalc verzija 13.1.0.0 (Mariakerke, Belgija). Iz meritev smo določili minimalno in maksimalno vrednost, aritmetično sredino, mediano, standardni odklon in standardno napako srednje vrednosti. Določili smo korelacijo med metodama tako, da smo izračunali Spearmanov koeficient korelacije, ki je merilo za povezanost med spremenljivkama in lahko zavzame vrednosti od -1 do 1 (0 pomeni da povezave ni, 1 močna povezanost).

Metodi smo primerjali z regresijo Passing-Bablok (28), ki vključuje tudi Cusumov test linearnosti. Regresijo Passing-Bablok lahko uporabimo le v primerih z linearno

povezanostjo in z visoko korelacijo med spremenljivkama. Rezultati so neodvisni od razvrstitve spremenljivk na os X ali Y .

Cusumov test linearnosti se uporablja za oceno prileganja linearnega modela s podatki. Uporablja se izključno za testiranje možnosti uporabe regresije Passing-Bablok in nima nadaljnje zveze z primerjanjem metod. Majhna P vrednost ($P < 0,05$) kaže na to, da linearna zveza ne obstaja in regresije Passing-Bablok ne moremo uporabiti za primerjavo metod.

V programu MedCalc pridobimo naslednje parametre regresije Passing-Bablok: enačbo regresijske premice Passing-Bablok, sistemske razlike (odsek na osi Y je merilo za sistemske razlike med metodama), proporcionalne razlike (naklon premice je merilo za proporcionalne razlike med metodama), slučajna razlika (rezidualni standardni odklon (RSD) je mera za slučajno razliko med metodama) in rezultat validacije linearnega modela (Cusumov test linearnosti). Naklon premice in odsek na osi Y sta podana s 95% intervalom zaupanja. Metodi sta skladni, če nagib in odsek na osi Y vključuje 1 ali 0. Kriterij za nagib je, da 95 % interval zaupanja vključuje 1. Kriterij za odsek na osi Y je, da 95 % interval zaupanja vključuje 0. V našem primeru smo izbrali različico, kjer je razlika navpična na premico (perpendicular residual) in ne na os Y.

Pri slučajni razliki pričakujemo, da 95 % slučajnih razlik leži znotraj intervala -1.96 RSD do +1.96 RSD. Če je interval večji, potem metodi morda nista primerljivi.

Dodatno pridobimo še podatke o velikosti vzorca (število primerjanih parov) in opisno statistiko (minimum, maksimum, aritmetično sredino, mediano, SD, standardno napako aritmetične sredine).

Primerjavo rezultatov meritev smo prikazali tudi z grafično analizo Bland-Altman. Pri tej analizi v graf vnašamo razliko v vrednostih meritev med metodama proti povprečju vrednosti meritev obeh metod. Graf je uporaben za odkrivanje povezav med razlikami in povprečjem vrednosti meritev metod, sistemskih napak in možnih osamelih vrednosti.

Pri vseh statističnih testih smo izbrali 5% stopnjo tveganja ($\alpha = 0,05$). Kadar je bila vrednost signifikance večja od 0,05 ($P > 0,05$) smo privzeli ničelno hipotezo, da med parametroma ni statistične razlike. V primeru da je bila vrednost signifikance manjša od 0,05 ($P < 0,05$), pa smo zavrnilo ničelno hipotezo ter sprejeli alternativno, ki pravi, da med skupinama obstajajo statistične povezave.

3.6.3 Preverjanje in določitev meje slepega vzorca in meje detekcije metod

Mejo slepega vzorca (Limit of Blank; LoB) in mejo detekcije (Limit of Detection; LoD) določitve NMH v citratni plazmi bolnikov, ki jo navajata proizvajalca, smo preverili v skladu z referenco (5). V skladu z referenco (5) smo upoštevali, da je napaka tipa I in tipa II 5 % (Napaka tipa I, $\alpha = 5$; Napaka tipa II, $\beta = 5$). Napaki tipa I (napaka α) je definirana kot dogodek, ko slepi vzorec preseže 95. percentil v porazdelitvi rezultatov za slepe vzorce in ga lahko označimo kot vzorec, ki vsebuje zaznavno količino analita. Če kot mejo uporabimo 95. percentil, je verjetnost za tak dogodek 5%. Prav tako se pri vzorcih z nizko vsebnostjo NMH lahko pojavijo vrednosti pod to mejo. Tako lahko to opredelimo kot vzorec, ki ne vsebuje zaznavne količine analita. To je napaka tipa II (napaka β).

a.) Določitev meje slepega vzorca (LoB; Limit of Blank)

Za metodo, kjer aparat poda vrednost nič za vse meritve, ki so pod meritvijo, ki označuje kalibrator nič v kalibracijski krivulji, smo uporabili neparametrično statistiko izračuna meje slepega vzorca. Ustrezen percentil za izračun meje slepega vzorca je

$$p = (100 - \alpha) = 95.$$

Meritve smo razvrstili v niz glede na njihovo naraščajočo vrednost. Mejo slepega vzorca smo izračunali po formuli:

LoB = Rezultat na poziciji $[N_B(p/100) + 0,5]$ (8). Če dobljena vrednost ni celo število, potem se izvede linearna interpolacija. N_B je število meritev slepih vzorcev.

Za metodo, kjer aparat poda negativno vrednost za vse meritve, ki so pod meritvijo, ki označuje kalibrator nič v kalibracijski krivulji, smo uporabili parametrično statistiko izračuna meje slepega vzorca. Mejo slepega vzorca smo izračunali po formuli:

$$\text{LoB} = x + 1,645 \times \text{SD} \quad (4)$$

Oznaka x pomeni srednjo vrednost slepih vzorcev, SD pomeni standardni odklon.

b.) Preverjanje in določitev meje detekcije (LoD, Limit of detection)

V skladu z referenco (5) smo preverili mejo detekcije, ki jo za metodi navajata proizvajalca. Postopek smo izvedli tako, da smo pet dni zapored testirali štiri različne vzorce (20 meritev) z nizko vsebnostjo NMH v plazmi, ki je bila tik nad navedeno mejo detekcije. Preverili smo kakšen delež rezultatov presega mejo slepega vzorca (5). Delež rezultatov mora biti večji kot je spodnja 95% meja zaupanja za opazovani delež rezultatov,

ki presegajo mejo slepega vzorca s pričakovanim deležem $1-\beta$, to je 95% (za 20 meritev je to več kot 85%). Če zadostimo temu kriteriju, potem potrdimo mejo detekcije, ki jo navaja proizvajalec.

Ko meje detekcije, ki jo navaja proizvajalec nismo potrdili, smo sami postavili mejo detekcije in jo nato po zgoraj opisanem postopku ponovno preverili. Za ta namen smo vzeli 4 vzorce z nizko vsebnostjo NMH v plazmi in jih testirali 3-krat dnevno pet dni zapored (60 meritev). Za določitev meje detekcije je potrebno, da vrednosti meritev NMH v vzorcu presegajo vrednost meje slepega vzorca vendar ne za več kot štiri krat. Iz rezultatov smo izračunali SD_s in vzorce testirali na enakost varianc. Za to smo uporabili test F in testirali vsako skupino meritev vzorcev med seboj. Za izračun meje detekcije (LoD) smo uporabili enačbo (5):

$$LoD = LoB + c_\beta SD_s \quad (5)$$

$$c_\beta = 1.645/(1-1/4 \times f) \quad (6)$$

$$f = N - K$$

$$SD_s^2 = (n_1SD_{s1}^2 + n_2SD_{s2}^2 + n_3SD_{s3}^2 + \dots n_nSD_{sn}^2)/(n_1 + n_2 + n_3 + \dots n_n) \quad (7)$$

$$n_n = N_n - 1$$

n_n je število prostostnih sopenj pri vzorcu n in N_n je število meritev izvedenih na vzorcu n . SD_s je ocena standardne deviacije pri porazdelitvi vzorcev z nizko vsebnostjo analita in se izračuna po formuli (7). c_β je izpeljan iz 95. percentila standardne normalne porazdelitve. Uporabi se zaradi napake pri oceni za standardno deviacijo populacije σ_s . Če število meritev (N) ni premajhno ($N > 60$), potem enačba za c_β velja in je f število prostostih stopenj, K pa število vzorcev. Po določitvi LoD, je to potrebno še preveriti po zgoraj navedenem postopku za preverjanje LoD.

4 REZULTATI

4.1 Merilna natančnost metod

Oceno merilne natančnosti smo izvedli po postopku, opisanem v poglavju 3.6. Uporabili smo eksperimentalni model 5×5 , ki vključuje pet ponovitev v seriji, eno serijo na dan, pet dni (povzeto po literaturi 30 in 31). Iz dobljenih rezultatov smo napravili ocene ponovljivosti, vmesne in celokupne merilne natančnosti metod, ki smo jih določili s pomočjo enosmerne analize variance, to je s statističnim testom ANOVA. Uporabili smo predloge, objavljene na spletu (31).

4.1.1 Ocena merilne natančnosti metode določanja aktivnosti heparina z reagenti in kontrolnimi materiali proizvajalca Stago

4.1.1.1 Ocena merilne natančnosti kontrolnega materiala z nizko koncentracijo nizkomolekularnega heparina

V tabeli 6. so predstavljeni statistični podatki meritev aktivnosti Stago NMH nizke kontrole, ki so bili dobljeni kot je opisano v poglavju 3.6. Vseh 25 meritev je bilo znotraj mej odstopanj, ki jih je podal proizvajalec. Ciljna vrednost, ki jo je določil proizvajalec za kontrolni material z nizko vsebnostjo heparina (Stago NMH nizka kontrola, Stago STA Quality HBPM/LMWH (REF 00686; LOT: 112151) Reagent 1), je bila 0,82 IE/mL. Meji odstopanja sta bili 0,69 – 0,95 IE/mL, SD 0,04.

Ponovljivost rezultatov meritev NMH v kontrolni plazmi je bila SD 0,030 in CV je bil 3,5%

Celokupna merilna natančnost naših meritev je bila SD 0,037 in je manjša od SD 0,04, vrednosti SD, ki jo je proizvajalec navedel za ta kontrolni material.

Proizvajalec reagenta STA Liquid Anti-Xa (kat. št.: 00311; naveden v poglavju *Materiali in metode, Reagenti*) je v procesu validacije metode z uporabo kontrolnih materialov Stago z nizko vsebnostjo NMH pridobil in podal sledeče rezultate za ponovljivost in celokupno merilno natančnost metode:

Pri vrednosti heparina 0,88 IE/mL je določil:

- SD za natančnost znotraj serije 0,027 oz. CV 3,0% in

- SD za celokupno varianco 0,031 oz. CV 3,5%.

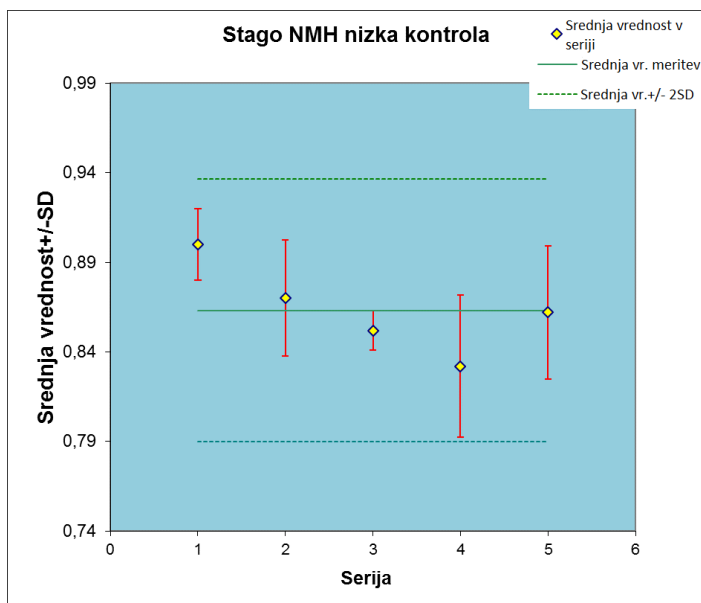
Naši rezultati so bili pri povprečni vrednosti heparina 0,86 IE/mL:

- SD za natančnost znotraj serije je bila 0,030 oz. CV je bil 3,5% ,
- SD za celokupno varianco je bila 0,037 oz. CV je bil 4,3%.

Odstopanja, ki smo jih dobili, so nekoliko višja od navedb proizvajalca.

Tabela 6. Statistični podatki meritev Stago NMH nizke kontrole.

Število meritev (N)	25	
Število serij	5	
Srednja vrednost vseh meritev	0,86	
Srednja vrednost serij meritev	0,86	
SD	0.03	
CV%	3.5	
	SD	CV %
Ponovljivost	0,030	3.5
Vmesna natančnost	0.021	2.4
Celokupna varianca	0.037	4.3



Graf 1: Razpršenost podatkov v/med serijami meritev Stago NMH nizke kontrole

Legenda: SD- standardni odklon, CV- koeficient variacije

4.1.1.2 Ocena merilne natančnosti kontrolnega materiala z visoko koncentracijo nizkomolekularnega heparina

V tabeli 7. so predstavljeni statistični podatki meritev aktivnosti Stago NMH visoke kontrole, ki so bili dobljeni kot je opisano v poglavju 3.6. Vseh 25 meritev je bilo znotraj mej odstopanj, ki jih je podal proizvajalec. Ciljna vrednost, ki jo je določil proizvajalec za kontrolni material z visoko vsebnostjo NMH (Stago NMH visoka kontrola, STA Quality HBPM/LMWH (REF 00686, LOT: 112151) Reagent 2), je bila 1,53 IE/mL. Meji odstopanja sta bili 1,29 – 1,74 IE/mL in SD 0,08.

Ponovljivost rezultatov meritev NMH v kontrolni plazmi je bila SD 0,045 in CV je bil 2,9%

Celokupna merilna natančnost naših meritev je bila SD 0,058 in je manjša od SD 0,08, vrednosti SD, ki jo je proizvajalec navedel za ta kontrolni material.

Proizvajalec reagenta STA Liquid Anti-Xa (kat. št.: 00311; naveden v poglavju *Materiali in metode, Reagenti*) je v procesu validacije metode z uporabo kontrolnih materialov Stago z visoko vsebnostjo NMH pridobil in podal sledeče rezultate za ponovljivost in celokupno merilno natančnost metode:

Pri povprečni vrednosti heparina 1,50 IE/mL je določil:

- SD za natančnost znotraj serije 0,057 oz. CV 3,8%
- SD za celokupno varianco 0,072 oz. CV 4,8%

Naši rezultati so bili pri povprečni vrednosti heparina 1,57 IE/mL:

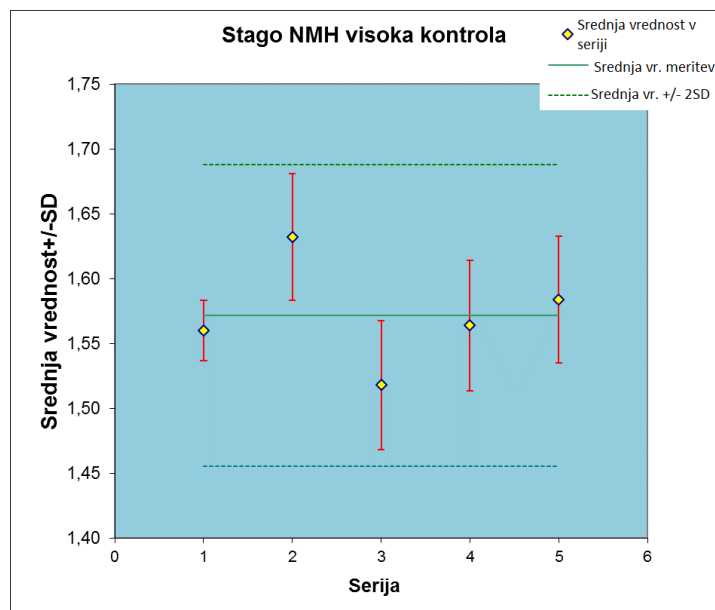
- SD za natančnost znotraj serije je bila 0,045 oz. CV je bil 2,5%
- SD za celokupno varianco je bila 0,058 oz. CV je bil 3,7%

Odstopanja, ki smo jih dobili, so nižja od navedb proizvajalca.

Tabela 7. Statistični podatki meritev Stago NMH visoke kontrole.

Število meritev (N)	25	
Število serij	5	
Srednja vrednost meritev	1.57	
Srednja vrednost serij	1.57	
SD	0.04	
CV%	2.5	
	SD	Cv%
Natančnost v seriji	0,045	2.9
Vmesna natančnost	0.036	2.3
Celokupna varianca	0.058	3.7

Legenda: SD- standardni odklon, CV- koeficient variacije



Graf 2: Razpršenost podatkov v/med serijami meritev Stago NMH visoke kontrole

4.1.2 Ocena merilne natančnosti metode določanja aktivnosti heparina z reagenti in kontrolnimi materiali proizvajalca Siemens

4.1.2.1 Ocena merilne natančnosti kontrolnega materiala z nizko koncentracijo nizkomolekularnega heparina

V tabeli 8. so predstavljeni statistični podatki meritev aktivnosti Siemens NMH nizke kontrole, ki so bili dobljeni kot je opisano v poglavju 3.6. Vseh 25 meritev je bilo znotraj mej odstopanj, ki jih je podal proizvajalec. Ciljna vrednost za kontrolni material z nizko vsebnostjo heparina (Siemens NMH nizke kontrole, Berihrom Heparin LMW Control 1 (Ref.: OPCD03; LOT: 534223), je bila 0,41 IE/mL. Meji odstopanja sta bili 0,26 – 0,56 IE/mL in SD 0.05.

Ponovljivost rezultatov meritev NMH v kontrolni plazmi je bila SD 0,014 in CV je bil 3,4%

Celokupna merilna natančnost naših meritev je bila SD 0,02 in je manjša od SD 0,05, vrednosti SD, ki jo je proizvajalec navedel za ta kontrolni material.

Proizvajalec reagenta Berichrom Heparin (kat. št.: OWLD; naveden v poglavju *Materiali in metode, Reagenti*) je v procesu validacije metode z uporabo kontrolnih materialov Siemens z nizko vsebnostjo NMH pridobil in podal sledeče rezultate za ponovljivost in celokupno merilno natančnost metode:

Pri povprečni vrednosti heparina 0,50 IE/mL je določil:

- SD za natančnost znotraj serije 0,020 – 0,035 oz. CV 3,8 – 7,0%
- SD za celokupno varianco 0,035 – 0,036 oz. CV 6,9 – 7,1%

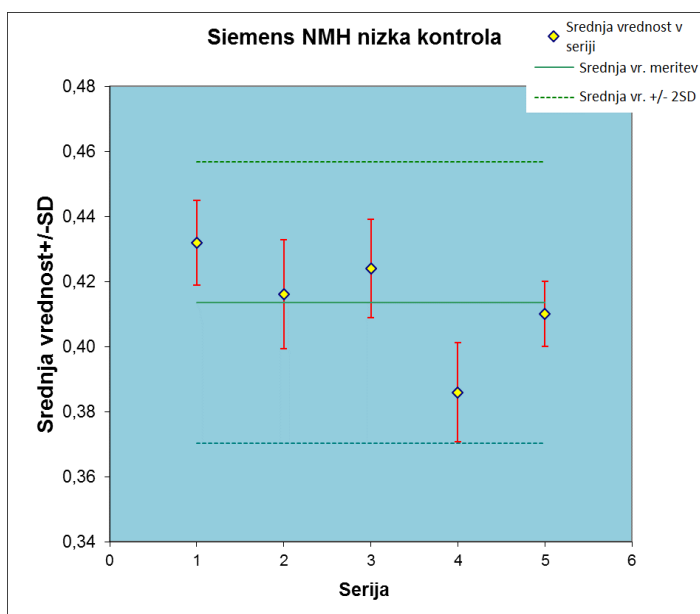
Naši rezultati so bili pri povprečni vrednosti heparina 0,41 IE/mL:

- SD za natančnost znotraj serije je bila 0,014 oz. CV je bil 3,4%
- SD za celokupno varianco je bila 0,022 oz. CV je bil 5,2%

Odstopanja, ki smo jih dobili, so nižja od navedb proizvajalca.

Tabela 8. Statistični podatki meritev Siemens NMH nizke kontrole.

Število meritev (N)	25	
Število serij	5	
Srednja vrednost meritev	0.41	
Srednja vrednost serij	0.41	
SD	0.01	
CV%	3.4	
	SD	CV%
Natančnost v seriji	0,014	3.4
Vmesna natančnost	0.016	3.9
Celokupna varianca	0.022	5.2



Graf 3: Razpršenost podatkov v/med serijami Siemens NMH nizke kontrole

Legenda: SD- standardni odklon, CV- koeficient variacije

4.1.2.2 Ocena merilne natančnosti kontrolnega materiala z visoko koncentracijo nizkomolekularnega heparina

V tabeli 9. so predstavljeni statistični podatki meritev aktivnosti Siemens NMH visoke kontrole, ki so bili dobljeni kot je opisano v poglavju 3.6. Vseh 25 meritev je bilo znotraj mej odstopanj, ki jih je podal proizvajalec. Ciljna vrednost za kontrolni material z visoko vsebnostjo heparina (Siemens NMH visoke kontrole, Berihrom Heparin LMW Control 2 (Ref.: OPCD03; LOT: 534124), je bila 0,82 IE/mL. Meji odstopanja sta bili 0,62 – 1,02 IE/mL in SD 0,07.

Ponovljivost rezultatov meritev NMH v kontrolni plazmi je bila SD 0,026 in CV je bil 3,2%

Celokupna merilna natančnost naših meritev je bila SD 0,026 in je manjša od SD 0,07, vrednosti SD, ki jo je proizvajalec navedel za ta kontrolni material.

Proizvajalec reagenta Berichrom Heparin (kat. št.: OWLD; naveden v poglavju *Materiali in metode, Reagenti*) je v procesu validacije metode z uporabo kontrolnih materialov

Siemens z nizko vsebnostjo NMH pridobil in podal sledeče rezultate za ponovljivost in celokupno merilno natančnost metode:

Pri povprečni vrednosti heparina 0,50 IE/mL je določil:

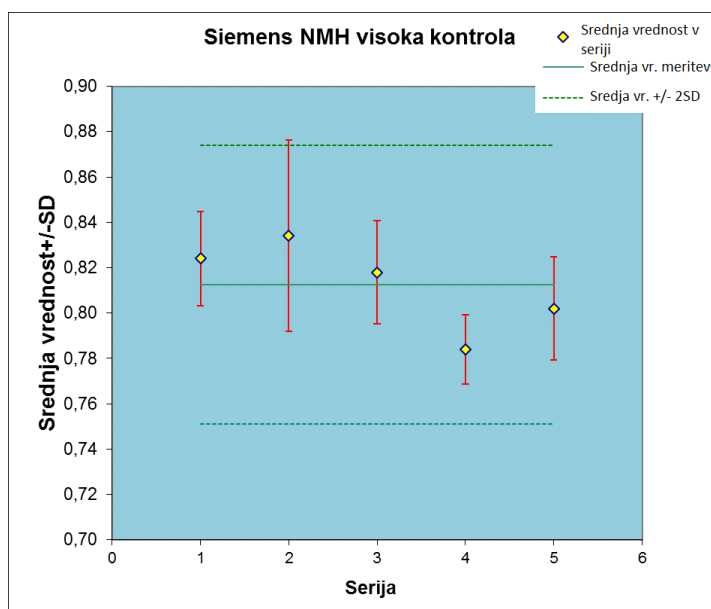
- SD za natančnost znotraj serije 0,020 – 0,035 oz. CV 3,8 – 7,0%
- SD za celokupno varianco 0,035 – 0,036 oz. CV 6,9 – 7,1%

Naši rezultati so bili pri povprečni vrednosti heparina 0,81 IE/mL:

- SD za natančnost znotraj serije je bila 0,026 oz. CV je bil 3,2%
- SD za celokupno varianco je bila 0,031 oz. CV je bil 3,8% kar je nižje od navedb proizvajalca

Tabela 9. Statistični podatki meritev Siemens NMH visoke kontrole

Število meritev (N)	25	
Število serij	5	
Srednja vrednost meritev	0.81	
Srednja vrednost serij	081	
SD	0.02	
CV%	3.2	
	SD	CV %
Natančnost v seriji	0,026	3.2
Vmesna natančnost	0.016	1.9
Celokupna varianca	0.031	3.8



Graf 4: Razpršenost podatkov v/med serijami meritev Siemens NMH visoke kontrole

Legenda: SD- standardni odklon, CV- koeficient variacije

4.2 Primerjava metod

Z obema metodama smo vzporedno določili aktivnost NMH v 47 vzorcih preiskovancev, ki so prejeli NMH (poglavja 3. *Materiali in metode*, 3.1 *Vzorci* in 3.2 *Preiskovanci*). 60% vzorcev je imelo aktivnost NMH pod 0,50 IE/mL, 34% med 0,50 in 1,00 IE/mL in v 6% vzorcev je aktivnost NMH presegla 1,00 IE/mL. Primerjavo metod smo napravili kot je opisano v poglavju 3.6. Metodi smo primerjali z regresijo Passing-Bablok, ki vključuje tudi Cusumov test linearnosti. Cusumov test linearnosti, ki je bil napravljen na regresiji

Passing-Bablok, je pokazal, da ni statistično značilne razlike od linearnosti za analit heparin ($P=0,39$), zato lahko uporabimo regresijo Passing-Bablok.

Metodi sta skladni, če nagib in odsek na osi Y vključuje 1 ali 0 (kriterij za nagib: 95 % interval zaupanja vključuje 1; kriterij za odsek na osi Y: 95 % interval zaupanja vključuje 0).

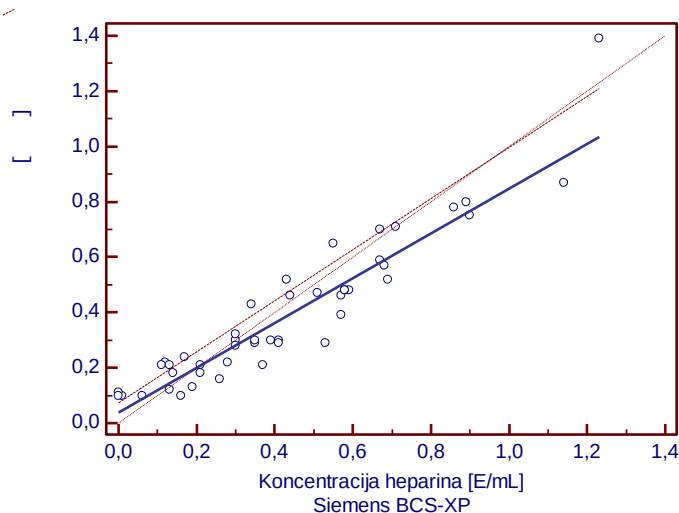
Iz primerjave smo izvzeli vzorec 33, ker na aparatu Siemens BCS XP nima določene vrednosti (nad 1,27 IE/mL).

Spearmanov korelacijski koeficient primerjave rezultatov koncentracije heparina, dobljenih na analizatorjih Siemens BCS-XP in Stago Compact Max je **0,94** ($N=46$; $P<0,0001$).

Enačba regresijske premice Passing-Bablok je bila

$$Y = 0,038 + 0,81x$$

Opomba: uporabili smo razliko (rezidual), ki je navpična na premico (perpendicular residual) in ne na os Y.



Graf 5: Regresijska premica Passing-Bablok med primerjanima metodama na analizatorju SiemensBCS-XP in Stago Compact Max za analit heparin.

Naklon in odsek na osi Y in njun 95 % interval zaupanja dobljen z regresijo Passing-Bablok za analit heparin je:

-odsek na osi Y (Intercept A) in 95 % interval zaupanja (95 % CI): **0,038** (95 % CI od -0,014 do 0,073) (sistematska razlika)

-naklon premice (B) in 95 % interval zaupanja (95 % CI): **0,81** (95% CI od 0,71 do 0,92) (proporcionalna razlika).

Rezultat:

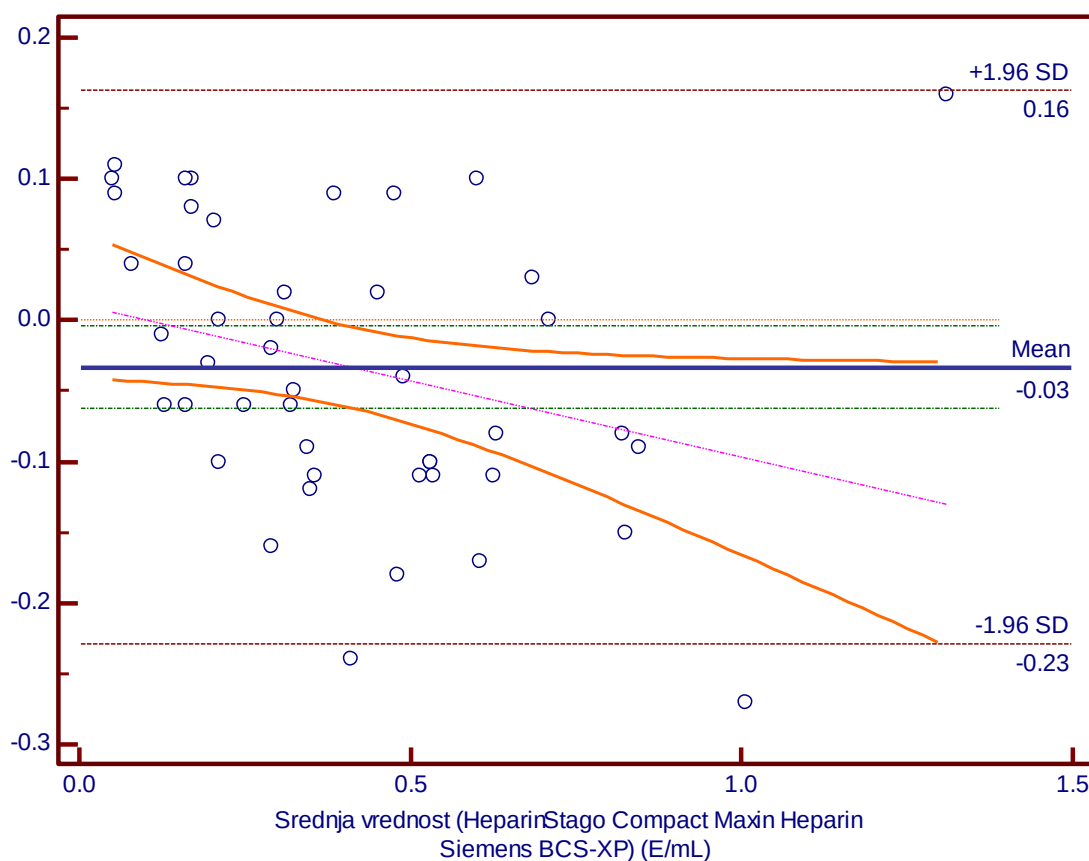
Tabela 10. Opisni statistični podatki merjenja aktivnosti heparina v plazmi z metodo Siemens Berichrom Heparin (Siemens BCS-XP) in metodo Stago STA Liquid Anti-Xa (Stago Compact Max)

Spremenljivka X	Siemens_BCS_XP Siemens BCS-XP
Spremenljivka Y	Stago_Compact_Max Stago Compact Max

Število vzorcev	46
-----------------	----

	Spremenljivka X	Spremenljivka Y
Najnižja vrednost	0,0000	0,1000
Najvišja vrednost	1,2300	1,3900
Aritmetična sredina	0,4237	0,3907
Mediana	0,3800	0,3000
Standardna deviacija	0,2904	0,2616
Standardna napaka srednje vrednosti	0,04281	0,03858

Čeprav je Spearmanova korelacijska analiza rezultatov za analit heparin med obema analizatorjema pokazala, da smo dobili visok korelacijski koeficient, je regresija Passing-Bablok pokazala proporcionalno razliko med metodama. Tudi analiza Bland-Altman nakazuje, da metodi nista skladni v območju merjenja pri večjih aktivnostih NMH v plazmi bolnikov.



Graf 6: Bland-Altman

Legenda:

modra polna črta – črta, ki prikazuje srednjo vrednost (mean) razlik med rezultati aktivnosti heparina, napravljenega na aparatu Stago Compact Max in aktivnosti heparina, napravljenega na aparatu Siemens BCS-XP) v IE/mL

svetlo rjava črta, črtkana – črta enakosti med metodama

zelena črta, črtkana - 95 % interval zaupanja za srednjo vrednost razlik; če črta enakosti ni v tem intervalu, potem najverjetneje obstaja značilna sistematična razlika med metodama.

temnorjava črta, črtkana – srednja vrednost razlik $\pm 1.96 \times$ standardna deviacija razlik

roza črta, črtkana – regresijska premica razlik; črta pomaga pri detekciji proporcionalnih razlik.

svetlo rjava polna krivulja – 95 % interval zaupanja regresijske premice razlik.

4.3 Preverjanje in določitev meje detekcije metod

Postopki in formule, po kateri smo določili mejo slepega vzorca in mejo detekcije oziroma postopek za preverjanje navedene meje detekcije, so opisani v poglavju 3.6.

4.3.1 Reagenčni komplet Stago STA Liquid Anti-Xa

Mejo slepega vzorca smo določili tako, da smo štirim slepim vzorcem določili aktivnost NMH, 3-krat dnevno, pet dni zapored. Tako smo izvedli 60 meritev. Iz rezultatov smo izračunali povprečno vrednost slepih vzorcev in SD. Povprečna vrednost slepih vzorcev je bila 0,749 OD/min, kar po enačbi kalibracijske krivulje zavzame koncentracijo -0,03 IE/mL. SD je bila 0,04.

Mejo slepega vzorca smo, zaradi normalne porazdelitve rezultatov, izračunali po formuli (4), navedeni v poglavju 3.6 in je znašala 0,04 IE/mL.

Mejo detekcije, ki jo navaja proizvajalec, smo preverili tako, da smo štirim vzorcem z nizko vsebnostjo NMH, pet dni zapored določili aktivnost NMH. Tako smo izvedli 20 meritev.

Proizvajalec navaja mejo detekcije 0,10 IE/mL. Zato smo za vzorce, ki smo jih testirali uporabili 4 vzorce z enako vrednostjo oziroma nekoliko nad vrednostjo 0,10 IE/mL. Rezultate vzorcev z nizko vsebnostjo NMH smo primerjali s postavljeno mejo slepega vzorca (Tabela 11.).

17 od 20 vzorcev je presegalo mejo slepega vzorca ($LoB = 0,04 \text{ IE/mL}$), kar je 85%. Torej je bil delež rezultatov večji kot je spodnja 95% meja zaupanja za opazovani delež rezultatov, ki presegajo mejo slepega vzorca s deležem $1 - \beta$. V tem primeru smo lahko mejo detekcije, navedeno s strani proizvajalca, potrdili.

Tabela 11. Rezultati aktivnosti NMH pri vzorcih z nizko vsebnostjo NMH v 5 ponovitvah, uporabljeni pri postopku preverjanja meje detekcije (IE/mL). Reagenčni komplet Stago STA Liquid Anti-Xa.

Vzorec	LoD B	LoD C	LoD D	LoD 1
IE/mL				
Replikat				
1	0,05	0,13	0,1	0,05
2	0,04	0,08	0,07	0,07
3	0	0,08	0,02	0,09
4	0,06	0,03	0,05	0,05
5	0,05	0,06	0,06	0,07

Legenda: LoD B, C, D, 1 so vzorci uporabljeni pri preverjanju LoD s pripadajočimi aktivnostmi NMH v replikatih.

4.3.2 Reagenčni komplet Siemens Berichrom Heparin

Štirim slepim vzorcem smo določili aktivnost NMH 3-krat dnevno pet dni zapored, tako da smo izvedli 60 meritev. Iz rezultatov smo po postopku in formuli (8), navedeni v poglavju Statistična obdelava rezultatov, določili mejo slepega vzorca LoB, saj v tem primeru rezultati niso normalno porazdeljeni (porazdelitev rezultatov je asimetrična, saj analizator za negativne vrednosti poda vrednost 0). Ker dobljena vrednost ni celo število (rezultat na poziciji = 57,5), smo izvedli linearno interpolacijo vrednosti med 57. in 58. pozicijo. Tako je meja slepega vzorca LoB znašala 0,06 IE/mL.

Proizvajalec navaja mejo detekcije 0,05 IE/mL, kar je pod mejo slepega vzorca, ki smo jo določili. Zato v tem primeru te meje nismo mogli preveriti, ampak smo mejo detekcije morali postaviti sami.

Mejo detekcije smo določili tako, da smo štirim vzorcem z nizko vsebnostjo NMH, 3-krat dnevno, pet dni zapored, določili aktivnost NMH. Tako smo izvedli 60 meritev. Vrednosti vzorcev, ki smo jih uporabili, so presegale vrednost LoB, vendar ne za več kot 4-krat.

F-test, s katerim smo testirali posamezne skupine meritev različnih vzorcev, je pokazal, da ni značilne statistične razlike za enakost varianc pri posameznih vzorcih z nizko vsebnostjo NMH.

Zato smo lahko iz rezultatov po formuli (5), opisani v poglavju Statistično vrednotenje rezultatov, določili LoD. Za to smo potrebovali še SD_s (ocena SD iz večih vzorcev z nizko vsebnostjo analita), ki smo jo izračunali iz meritev vzorcev z nizko vsebnostjo NMH po formuli (7) in $c\beta$, ki se vpelje zaradi napake pri oceni za standardno deviacijo populacije σ_s . (6).

- SD_s je bila 0,0342
- $C\beta$ je bila 1,6523

Glede na to, da nismo imeli na razpolago enake serije reagenta, smo morali postopek za določitev meje slepega vzorca ponoviti. Tako znaša meja slepega vzorca z novim lotom 0,09 IE/mL in meja detekcije 0,15 IE/mL.

Določeno LoD smo nato še preverili po postopku za preverjanje meje detekcije, kjer smo štirim vzorcem z nizko vsebnostjo NMH določili aktivnost NMH pet dni zapored. Rezultate aktivnost NMH pri teh vzorcih smo primerjali s postavljenjo LoB. LoB (0,09 IE/mL) presega 20 od 20. vzorcev, kar je 100% (Tabela 12.). Torej je delež rezultatov večji kot je spodnja 95% meja zaupanja za opazovani delež rezultatov, ki presegajo mejo slepega vzorca s deležem $1 - \beta$. Zato smo lahko mejo detekcije, ki smo jo določili, potrdili.

Tabela 112. Vrednosti vzorcev z nizko vsebnostjo NMH v petih ponovitvah (IE/mL). Reagenčni komplet Siemens Berichrom Heparin .

Vzorec	LoD 1	LoD 2	LoD 3	LoD 4
Replikat				
1	0,29	0,23	0,25	0,17
2	0,13	0,12	0,21	0,22
3	0,14	0,17	0,11	0,12
4	0,21	0,2	0,1	0,1
5	0,23	0,23	0,15	0,14

Legenda: LoD 1, 2, 3, 4 so vzorci uporabljeni pri preverjanju LoD s pripadajočimi aktivnostmi NMH v replikatih.

5 DISKUSIJA

V redno delo Oddelka za laboratorijsko diagnostiko, Splošna bolnišnica Murska Sobota, želimo vpeljati analizno metodo določanja aktivnosti NMH v plazmi. Dve analizni metodi smo delno validirali, tako da smo določili merilno natančnost posamezne analizne metode (ponovljivost v seriji in med serijami meritev) ter rezultate primerjali z rezultati proizvajalca. Primerjali smo analizno metodo določanja aktivnosti NMH proizvajalca Siemens z analizno metodo proizvajalca Stago, za kar smo uporabili vzorce preiskovancev, ki so prejeli NMH. Skladnost analiznih metod smo ovrednotili z regresijo po Passing-Babloku in rezultate prikazali z Bland-Altmanovim grafom. Preverili smo mejo detekcije analizne metode, ki jo navaja proizvajalec reagenčnega kompleta za merjenje aktivnosti NMH v plazmi. Za ta namen smo uporabili plazme zdravih preiskovancev in bolnikov, ki prejemajo NMH.

5.1 Merilna natančnost metod

Preden smo pristopili k primerjavi metod smo želeli verificirati posamezno metodo z eksperimentalnim modelom 5×5 . Za določanje merilne natančnosti metod smo uporabili kontrolni material z dvema ravnema aktivnosti heparina, kar nam omogoča zanesljivejšo oceno merilne natančnosti metode, kot če bi uporabili samo eno raven.

Ugotovili smo, da je bilo pri obeh analiznih metodah vseh 25 meritev za obe ravni aktivnosti heparina kontrolnega materiala v intervalu, ki ga za kontrolni material podajata proizvajalca. To je bil prvi kazalec, da aparata in metodi za določanje heparina delujeta skladno z navedbami proizvajalca.

Rezultat za celokupno merilno natančnost posameznega kontrolnega materiala, ki smo ga dobili z navedenim postopkom, smo primerjali z rezultatom celokupne merilne natančnosti, ki ga je navedel proizvajalec kontrolnega materiala za naš testni sistem.

Ugotovili smo da so izračunane celokupne variance v vseh primerih v intervalu, ki ga navaja proizvajalec. Tako lahko zaključimo, da so podane vrednosti varianc realne in jih

lahko potrdimo z upoštevanjem navodil proizvajalcev glede rokovanja in skladiščenja uporabljenih reagentov.

Nato smo primerjali ponovljivost v seriji in celokupno merilno natančnost, ki smo ju določili iz meritev kontrolnega materiala, z vrednostmi, ki jih za merilno natančnost reagenčnega kompleta pri določeni povprečni vrednosti vzorca navaja proizvajalec.

Glede na predstavljena odstopanja meritev kontrolnih materialov, smo lahko metodo Siemens Berichrom Heparin na analizatorju Siemens BCS-XP verificirali, saj je bila določena celokupna varianca za kontrolni material na obeh nivojih v intervalu, ki ga navaja proizvajalec za kontrolni material. Prav tako sta bili določena ponovljivost in celokupna varianca manjši od navedb proizvajalca za reagent Siemens Berichrom Heparin. Siemens za podatke ponovljivosti v seriji in celokupno varianco reagenta navaja le eno koncentracijsko območje (0,50 IE/mL). To je v območju nizke kontrole Berichrom Heparin NMH, kjer je odstopanje, ki smo ga določili, v intervalu, določenem s strani proizvajalca.

Prav tako smo lahko, glede na predstavljena odstopanja meritev kontrolnih materialov, verificirali metodo Stago STA Liquid Anti-Xa na analizatorju Stago Compact Max, saj je bila določena celokupna varianca za kontrolni material na obeh nivojih v intervalu, ki ga navaja proizvajalec za kontrolni material. Ponovljivost in celokupna varianca, ki smo jo določili za kontrolni material z visoko vsebnostjo NMH je bila manjša od navedb proizvajalca za reagent Stago STA Liquid Anti-Xa. Za kontrolni material z nizko vsebnostjo NMH pa je ta na meji odstopanja in bi bilo potrebno postopek ponoviti, oziroma uporabiti drug model določanja merilne natančnosti metode.

Odstopanja pri naših rezultatih so v vseh primerih nižja od navedb proizvajalcev, razen za Stago NMH nizko kontrolo, kjer smo dobili nekoliko višje odstopanje, kot ga za to koncentracijsko območje navaja proizvajalec. Odstopanje je majhno (SD za merilno natančnost znotraj serije je bila 0,030 oz. CV je bil 3,5% namesto 0,027 oz. CV 3,0% kot to navaja proizvajalec in SD za celokupno varianco je bila 0,037 oz. CV je bil 4,3% namesto 0,031 oz. CV 3,5%), zato smo zaključili, da smo uspešno verificirali metodo. V prihodnje pa bi lahko v takšnih primerih v analizo vključili več meritev in tako dobili nižje odstopanje. Zanesljivost testa ANOVA se namreč poveča z večanjem števila meritev, saj je število prostostnih stopenj ključnega pomena pri oceni statističnih parametrov. Drugi

razlog za ugotovljeno odstopanje je lahko tudi v tem, da je proizvajalec v procesu validacije uporabil model določanja merilne natančnosti 22×2 (po priporočilih CLSI EP5-A2; 22 dni dve meritvi na dan, kar je 44 meritev skupno). Tretji vzrok za odstopanje bi lahko bilo tudi neprimerno rokovanje s kontrolnimi vzorci oz. reagentom, vendar smo reagente pripravili po navodilih proizvajalca. Prav tako do odstopanja ni moglo priti zaradi slabše stabilnosti reagentov, saj je odstopanje pri drugem nivoju kontrole (Stago NMH visoka kontrola) nižje od navedb proizvajalca.

5.2 Primerjava metod

Pri primerjavi metod smo najprej določili Spearmanov korelacijski koeficient Rho in s Cusumovim testom preverili moč povezave in linearnost. Dobra korelacija in linearnost sta namreč ključnega pomena pri primerjavi metod z regresijo Passing-Bablok. Glede na to da gre za močno povezanost med obema metodama (Rho je 0,94) in da je Cusumov test pokazal, da ni statistično značilne razlike od linearosti med rezultati meritev obeh metod ($P = 0,39$), smo regresijo Passing-Bablok lahko uporabili za primerjavo. Močna povezava rezultatov med metodama in odsotnost signifikantne razlike od linearosti za analit heparin nam omogoča, da zanesljivo potrdimo neskladnost med metodama v določenem območju.

Obe metodi temeljita na enakem principu zaviranja faktorja Xa. Vendar obstajate dve bistveni razliki. Metoda proizvajalca Siemens vključuje dodatek dekstran sulfata v reakcijskem pufru, kar zmanjša vpliv PF4, in lahko sprosti nespecifično vezan NMH. Druga razlika je v tem, da pri metodi proizvajalca Siemens, dodamo v reakcijsko zmes tudi eksogeni AT.

Ostajajo različna mnenja glede tega ali je dodajanje eksogenega AT smiselno. Po eni strani naj se AT nebi dodajal, saj le endogeno prisoten AT v plazmi preiskovanca predstavlja dejanski funkcijski odgovor *in vivo*. Po drugi strani pa se zagovarja dejstvo, da naj morebitna pomanjkljivost AT ne bi bila omejujoči dejavnik pri določanju NMH. Le če je AT intakten lahko izmerimo absolutno aktivnost NMH, ki je v plazmi. Vendar pa so študije pokazale, da pri nivojih med 35 in 130% normale aktivnosti AT, eksogeno dodajanje AT nima nobenega vpliva na aktivnost heparina (7).

Kot pri vseh testih koagulacije, je tudi pri metodah za določanje anti-Xa pri terapiji z NMH pomemben pravilen odvzem krvi. Nepravilnosti oz. težaven odvzem lahko vodijo v aktivacijo trombocitov in posledično sproščanje PF4. UH se z visoko afiniteto veže na PF4, pri NMH je ta sicer manjša, vendar vseeno lahko pride do podcenitve aktivnosti učinkovine zaradi nespecifične vezave. Pri tem naj bi bil pomemben dekstran sulfat, ki nespecifično vezan UH in NMH sprosti in ga naredi zmožnega za reakcijo. Dilema se pojavi pri NMH, saj pri tem ni nespecifične vezave v tolikšni meri kot pri UH. Zato težko napovemo koliko dodatek DS prispeva k višjim vrednostim rezultatov, na račun nespecifične vezave. Lahko pa razliki v principu metod vplivata na to, da smo ugotovili proporcionalno razliko med metodama, ki se večja z večanjem aktivnosti heparina v plazmi.

5.3 Določitev in preverjanja meje detekcije

Preverjanje meje detekcije smo opravili po literaturi 5 in kot je opisano v poglavju 3.6. Ta vključuje priporočilo, da za zagotavljanje reprezentativnosti meritev slepih vzorcev in vzorcev z nizko vrednostjo analita, v našem primeru NMH, uporabimo več različnih vzorcev in testiranje teh opravimo ob različnih dnevih. To je boljše kot uporaba enega vzorca oz. vzorca plazme, sestavljenega iz plazm več darovalcev (»pool« plazme). Na ta način zagotovimo pogoje, ki so enaki pogojem pri rednem delu in v analizo vključimo tudi interference, ki nastanejo zaradi različnosti vzorcev in meritev ob različnih dnevih.

Za reagenčni komplet Stago smo določili LoB (0,04 IE/mL) in potrdili LoD (0,10 IE/mL), navedeno s strani proizvajalca. Glede na to, da analizator pri slepih vzorcih podaja tudi negativne vrednosti, smo LoB določili po parametrični metodi za normalno porazdelitev slepih vzorcev. Ta metoda naj bi bila, po navedbah literature 5, bolj zanesljiva za določitev LoB, kot neparametrična metoda.

Pri Siemensu gre za nesimetrično porazdelitev rezultatov slepih vzorcev saj analizator ne podaja negativnih vrednosti za slepe vzorce, zato smo LoB določili po neparametrični metodi. Vrednost LoB, ki je zanašala 0,06 IE/mL, je presegla vrednost LoD, ki je bila določena s strani proizvajalca (0,05 IE/mL). Iz tega razloga smo sami določili LoD po postopku, ki je opisan v poglavju 3.6. Glede na to, da reagenčnega kompleta iste serije nismo imeli na voljo, smo morali ponoviti določitev LoB. Z drugo serijo reagenčnega

kompleta smo dobili vrednost LoB še nekoliko višjo od prvotno določene. LoB je znašala 0,09 IE/mL. LoD pa je znašala 0,15 IE/mL in je bila pričakovano višja od LoD, ki jo navaja proizvajalec.

Po navodilih iz literature 5 smo uporabili štiri različne vzorce z nizko vsebnostjo NMH in iz rezultatov 60. meritev določili LoD. F-test, s katerim smo testirali posamezne skupine meritev različnih vzorcev, je pokazal, da ni značilne statistične razlike za enakost varianc pri posameznih vzorcih z nizko vsebnost NMH. To je bil kriterij, da smo LoD lahko določili po formuli (5); poglavje 3.6. Izračunali smo še oceno SD iz večih vzorcev z nizko vsebnostjo NMH (SD_s je bila 0,0342) in končno določili LoD. Določena LoD (0,15 IE/mL) je pričakovano veliko višja od vrednosti, ki jo navaja proizvajalec (0,05 IE/mL). Določeno LoD smo nato še preverili po postopku za preverjanje LoD, opisanem v literaturi (5). Glede na to, da je vseh 20 meritev vzorcev z nizko vrednostjo NMH preseglo LoB, smo to lahko potrdili.

Razlog za razliko v LoD, ki smo jo ugotovili, je lahko v načinu določanja LoD. Nekateri proizvajalci za določanje LoD in tudi mejo kvantifikacije (LoQ) uporabijo le meritve slepih vzorcev (5). Na podlagi teh meritev izračunajo srednjo vrednost in SD. SD nato pomnožijo z ustreznim faktorjem in prištejejo srednjo vrednost slepega vzorca. Tako se določi prag za prisotnost analita, kar se potem povzame kot LoD. Po tradicionalni definiciji, ki se uporablja v analizi kemiji, se za določitev LoQ uporabi faktor 10 ($10 \times SD$) in za LoD 2-3. Sistem ima dve pomanjkljivosti: predpostavitev, da so slepi vzorci in vzorci z nizko vrednostjo analita normalo in simetrično porazdeljeni in da so SD slepih vzorcev in vzorcev z nizko vsebnostjo analita enake. Napaka pri tem modelu je v tem, da ta model ne razlikuje med navidezno oziroma dejansko koncentracijo analita. Torej, vzorec z dejansko vrednostjo analita točno pri LoD ima le 50% možnost da bo interpretiran kot vzorec z vsebnostjo analita. Posledica tega je ta, da so navedene vrednosti LoD in LoQ pogosto postavljene prenizko.

Kljub uporabi dveh kompletov različnih serij smo dvakrat določili višjo vrednostjo LoB, kot je LoD navedena s strani proizvajalca. Verjetno bi bila LoB nekoliko nižja, če bi analizator podajal tudi negativne vrednosti in bi lahko uporabili parametrični način določitve LoD. Da je postavljena vrednost LoD proizvajalca Siemens postavljena nizko pa morda nakazuje tudi dejstvo, da je ta pri proizvajalcu Stago višja (0,10 IU/mL). Priporočene vrednosti za profilaktično zdravljenje (0,20-0,40 IE/mL) za NMH presegajo

LoD za več kot 4-krat in natančna meja detekcije v tem primeru morda ni klinično pomembna. Pomembnejša postane, ko želimo pri bolniku pred posegom ugotoviti ali je zdravljenje z NMH izzvenelo in se poseg lahko opravi.

Zato je pomembno, da laboratorij preveri LoD, ki jo navaja proizvajalec in v primeru odstopanja postavi lastno LoD.

5.4 Zaključek

- Primerjava metod s statističnim testom Passing-Bablok, kot tudi graf Bland-Altman je pokazala da metodi nista skladni in da med njima obstaja proporcionalna razlika, ki se veča z višanjem aktivnosti NMH v plazmi. Tako hipoteze, da sta metodi skladni ne moremo potrditi. Vzrok razlik bi lahko bilo dodajanje DS in AT v reagenčno zmes pri metodi proizvajalca Siemens. Dilema glede uporabe eksogenega AT ostaja, vendar trendi nakazujejo, da se dodajanje AT opušča. V prihodnje bi bilo smiselno primerjati še reagenčni komplet novejši generacije proizvajalca Siemens, ki eksogenega AT ne uporablja.
- Rezultati merilne natančnosti za določanje aktivnosti NMH v plazmi so primerljivi z navedbami obeh proizvajalcev. Zaključimo lahko, da je zanesljivost obeh metod dobra.
- Pri proizvajalcu Stago smo uspešno potrdili mejo detekcije analizne metode. Pri proizvajalcu Siemens pa je meja detekcije glede na določeno mejo slepega vzorca postavljena prenizko. Zato je priporočljivo, da vsak laboratorij postavi lastno mejo detekcije analizne metode. Prav tako proizvajalec pri novejši generaciji reagenčnega kompleta navaja višjo mejo detekcije analizne metode (0,10 IE/mL).

Na osnovi rezultatov merilne natančnosti, primerjave metod in potrditve oziroma določitve meje detekcije analiznih metod menimo, da obe metodi izpolnjujeta pogoje za uvedbo v redno delo. V času nastajanja naloge smo metodo proizvajalca Siemens že uvedli v rutinsko uporabo. K temu je v veliki meri pripomoglo dejstvo, da smo imeli analizator tega proizvajalca že v rutinski uporabi za ostale teste koagulacije. S tem je odpadel strošek povezave analizatorja v laboratorijski informacijski sistem, ki ni zanemarljiv.

6 SKLEPI

- ⊗ V redno delo Oddelka za laboratorijsko diagnostiko, Splošna bolnišnica Murska Sobota, smo uspešno vpeljati analizno metodo določanja aktivnosti NMH v plazmi.
- ⊗ Primerjava metod s statističnim testom Passing-Bablok, kot tudi graf Bland-Altman je pokazala, da metodi nista skladni in da med njima obstaja proporcionalna razlika, ki se večja z višanjem aktivnosti NMH v plazmi, čeprav je Spearmanova korelacijska analiza rezultatov med metodama pokazala zelo dobro korelacijo.
- ⊗ Rezultati merilne natančnosti (ponovljivost v seriji in med serijami meritev) za določanje aktivnosti NMH v plazmi so primerljivi z navedbami obeh proizvajalcev.
- ⊗ Za reagenčni komplet Stago smo določili mejo slepega vzorca (0,04 IE/mL) po parametrični metodi in potrdili mejo detekcije (0,10 IE/mL), navedeno s strani proizvajalca. Za Siemens smo mejo slepega vzorca določili po neparametrični metodi, kjer je vrednost LoB (0,06 IE/mL) presegala mejo detekcije (0,05 IE/mL), ki jo navaja proizvajalec. Tu smo mejo detekcije določili sami (0,15 IE/mL).

7 LITERATURA

1. Kocijančič A, Mrevlje F, Štajer D: Interna medicina, 3. izdaja, Littera picta, Ljubljana 2005: 1109-1115.
2. Stegnar M, Prepoznavanje motenj hemostaze z laboratorijskimi metodami, Klinični oddelek za žilne bolezni, Interna klinika, Klinični center Ljubljana, Ljubljana 2005: 11-51.
3. Lehman C, Frank E: Laboratory Monitoring of Heparin Therapy: Partial Tromoplastin Time or Anti-Xa Assay?, Labmadicine, Volume 40, 2009: 47-51.
4. Lever R, Mulloy B, Page C: Heparin - A Century of Progress, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2012: 4-18, 66-69, 180-206.
5. Protocols for determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline, EP17-A Vol.24 No.34.
6. http://www.heparinscience.com/structure_heparin.html, dostopno julij 2015
7. Kitchen S, Olson J, Preston E: Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis, Blackwell Publishing Ltd, 2009: 170-178.
8. http://journal.publications.chestnet.org/article.aspx?articleid=1079426&issueno=1_suppl&rss=1&ssource=mfc , dostopno avgust 2015.
9. Sung A: Advances in Clotting Factors: From Bench to Bedside, The hemophilia Report Vol. 1, 2014: 11-16.
10. Maličev E, Dovč-Drnovšek T, Rožman P: Serološke in funkcijske preiskave pri diagnosticiranju trombocitopenije, povzročene s heparinom (HIT), Zdravniški vestnik, februar 2012: 149-158.
11. Mani H, Wagner C, Lindhoff-Last E: Influence of New Anticoagulants on Coagulation Tests, Siemens Healthcare Diagnostics Inc., 2011.
12. Pernod G, Albaladejo P, Godier A in sod.: Management of major bleeding complications and emergency surgery in patients on long-term treatment with direct oral anticoagulants, trombin or factor Xa-inhibitors: Proposal of the Workin Group on Perioperative Haemostasis (GIHP) – March 2013, Elsevier Masson, 2013: 383-393.
13. Yoneda M, Brosnan J, Norris L, Bonnar J: The effect of LMWH (tinzaparin) on coagulation and fibrinolytic activation in pregnant women at risk of thrombosis, Elsevier Ltd., 2005: 283-289..

14. Greer I, Hunt B: Low molecular weight eparin in pregnancy: current issues, British Journal of Haematology, Blackwell Publishing Ltd., 2004: 593-601.
15. Bara L, Planes A, Savama M: Occurrence of thrombosis and haemorrhage, relationship with anti-Xa, anti-IIa activities, and D-dimer plasma levels in patients receiving a low molecular weight heparin, enoxaparin or tinzaparin, to prevent deep vein thrombosis after hip surgery, British Journal of Haematology, Blackwell Science Ltd., 1999: 230-240.
16. Lehman C, Rettmann J, Wilson L, Markewitz B: Comparative Performance of Three Anti-Factor Xa Heparin Assays in Patients in a Medical Intensive Care Unit Receiving Intravenous, Unfractionated Heparin, Am J Clin Pathol, 2006: 416-421.
17. Maddineni J, Walenga J, Jeske W in ed: Product individuality of Commercially Available Low-Molecular-Weight Heparins and Their Generic Versions Therapeutic Implications, Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis Vol. 12, Sage Publications, 2006: 267-276.
18. Greaves M: Limitations of the Laboratory Monitoring of Heparin Therapy, Schattauer GmbH, Stuttgart, 2002: 163-164.
19. Amirkhosravi A, Mousa SA, Amaya M, Francis JL: Antimetastatic effect of tinzaparin, a low-molecular-weight heparin, J Thromb Haemost 2003; 1: 1972-6
20. Sanfelippo MJ, Tillema VB: Automated Assay for Fondaparinux (Arixtra) on the Dade Behring BCS XP, Am J Clin Pathol, 2009; 608-612 .
21. <http://www.trombo.net/docs/SPCClexane.pdf> dostopno junij 2015.
22. <http://www.trombo.net/docs/SPCFragmin.pdf> dostopno junij 2015.
23. <http://www.trombo.net/docs/SPCFraxiparine.pdf> dostopno junij 2015.
24. Literatura Diagnostica Stago: www.stago.com
25. Literatura Siemens: www.siemens.com/diagnostics
26. <http://www.biochemia-medica.com/2011/21/49> dostopno december 2015.
27. https://www.medcalc.org/manual/passing-bablok_regression.php dostopno december 2015 .
28. <https://www.medcalc.org/manual/note-passingbablok.php> ,dostopno december 2015.
29. <https://www.medcalc.org/manual/blandaltman.php> ,dostopno december 2015
30. http://www.acb.org.uk/whatwedo/science/best_practice/measurement_verification.aspx dostopno januar 2016.

31. http://www.acb.org.uk/docs/default-source/committees/scientific/guidelines/measurement-verification/Measurement_verification_final_090608.pdf?sfvrsn=0.