

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SARA MOČNIK

**VPELJAVA DOLOČANJA AKTIVNOSTI FAKTORJA VIII Z
NAČINOM TURBIDIMETRIJE, SINTETIČNIMI FOSFOLIPIDI,
DELCI SILIKE IN IONI KALCIJA**

**INTRODUCING THE DETERMINATION OF ACTIVITY OF
FACTOR VIII WITH TURBIDIMETRY, SYNTHETIC
PHOSPOLIPIDS, SILICA PARTICLES AND CALCIUM IONS**

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo sem opravljala v Specializiranem hematološkem laboratoriju kliničnega oddelka za hematologijo, Interna klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, pod mentorstvom doc. dr. Uroša Mlakarja dr. med. in somentorstvom asist. mag. Tadeja Pajiča univ. dipl. ing. kem. ing. spec. med. biokem.

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Urošu Mlakarju dr. med. in somentorju asist. mag. Tadeju Pajiču univ. dipl. ing. kem. ing. spec. med. biokem. za vodenje, strokovno pomoč in svetovanje pri izdelavi diplomske naloge.

Še posebno se zahvljujem družini in Boštjanu za podporo v času študija ter vsem, ki so mi pomagali pri izdelavi diplomskega dela.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Uroša Mlakarja dr. med. in somentorstvom asist. mag. Tadeja Pajiča univ. dipl. ing. kem. ing. spec. med. biokem.

POVZETEK

Hemofilija A je dedna motnja v koagulaciji krvi, pri kateri je znižana aktivnost koagulacijskega faktorja VIII. Laboratorijsko preiskavo, določitev aktivnosti koagulacijskega faktorja VIII, opravimo pri sumu na pridobljeno ali prirojeno pomanjkljivo aktivnost koagulacijskega faktorja VIII, ko ugotovimo podaljšan parcialni tromboplastinski čas in pri spremljanju zdravljenja s pripravki koagulacijskega faktorja VIII.

Preiskavo je potrebno izvajati na način, ki zagotavlja dolgoročno kakovost rezultatov, na katere pa lahko vpliva več različnih faktorjev. Reagenti, ki se uporabljajo za določitev aktivnosti faktorja VIII niso vsi enako občutljivi, poleg tega na preiskavo lahko vpliva tudi izbira načina detekcije nastanka strdka, ki je v laboratorijih za hemostazo običajno nefelometrična ali turbidimetrična. V okviru mojega diplomskega dela smo zato izvedli primerjavo vrednosti aktivnosti faktorja VIII, dobljenih s pomočjo različnih reagentov na posameznem aparatu.

V Specializiranem hematološkem laboratoriju kliničnega oddelka za hematologijo v Ljubljani rutinsko določajo aktivnost faktorja VIII na aparatu ACL 9000 z nefelometričnim načinom zaznave strdka in z uporabo treh reagentov: APTT SP s sintetičnimi fosfolipidi in delci silike, faktor VIII deficitne plazme z znanim pomanjkanjem faktorja VIII in kalcijevimi ioni. Sodobnejši aparat ACL TOP za meritev nastanka strdka uporablja turbidimetrični način. Po proizvajalčevem zagotovilu je nov reagent APTT SynthASil s sintetičnimi fosfolipidi in delci silike zelo občutljiv na pomanjkanje faktorja VIII. Za primerjalno metodo smo v primeru aparata ACL 9000 uporabili določitev aktivnosti faktorja VIII z reagentom APTT SP in v primeru aparata ACL TOP smo uporabili določitev aktivnosti faktorja VIII z reagentom APTT SynthASil. Zanimala nas je tudi primerjava izsledkov aktivnosti faktorja VIII, dobljenih z uporabo posameznega reagenta na obeh aparatih. Za primerjalno metodo smo v primeru reagenta APTT SP in APTT SynthASil uporabili določitev aktivnosti faktorja VIII na aparatu ACL 9000.

V raziskavo smo vključili 17 zdravih preiskovancev, 10 bolnikov z von Willebrandovo boleznijo, 14 s hemofilijo A in 7 preiskovancev brez znane diagnoze. Vsem smo v dvojniku (dva-krat) določili aktivnost faktorja VIII, z dvema različnima reagentoma, na dveh različnih aparatih, v meritvenem območju od 0 do 2.50 E/mL aktivnosti faktorja VIII in v 6 delovnih dneh.

Na podlagi statistične obdelave podatkov z linerano regresijo smo ugotovili:

1. Da je aparat ACL 9000 primeren za določanje aktivnosti faktorja VIII z reagentom APTT SP.
2. Da je aparat ACL TOP primeren za določanje aktivnosti faktorja VIII z reagentom APTT SynthASil.

VSEBINA

1. UVOD	- 10 -
1.1 HEMOSTAZA	- 10 -
1.1.2. PRIMARNA HEMOSTAZA	- 10 -
1.1.3. SEKUNDARNA HEMOSTAZA	- 11 -
1.1.3.1. Notranja ali intrinzična pot koagulacije <i>in vitro</i>	- 12 -
1.1.3.2. Zunanja ali ekstrinzična in skupna pot koagulacije <i>in vitro</i>	- 12 -
1.1.3.3. Potek koagulacije <i>in vivo</i>	- 14 -
1.2. INHIBICIJA KOAGULACIJE	- 15 -
1.3. FIBRINOLIZA	- 16 -
1.4. MOTNJE KOAGULACIJE KRVI	- 17 -
1.5. FAKTOR VIII	- 21 -
1.5.1. DOLOČITEV FAKTORJA VIII	- 22 -
2. NAMEN DELA	- 25 -
3. MATERIALI IN METODE	- 26 -
3.1. PREISKOVANCI	- 26 -
3.2. ODVZEM VZORCEV	- 26 -
3.3. APARATURE IN PRIBOR	- 27 -
3.4. METODE IN REAGENTI	- 27 -
3.5. PRIPRAVA REAGENTOV	- 28 -
3.6. DOLOČITEV AKTIVNOSTI FAKTORJA VIII NA APARATIH ACL 9000 IN ACL TOP	- 29 -
3.7. STATISTIČNI POSTOPKI	- 30 -
4. REZULTATI	- 32 -
4.1. PONOVLJIVOST REZULTATOV KONTROLNIH MATERIALOV PRI DOLOČITVI AKTIVNOSTI FAKTORJA VIII	- 34 -
4.2. PONOVLJIVOST REZULTATOV KALIBRACIJSKIH KRIVULJ PRI DOLOČITVI AKTIVNOSTI FAKTORJA VIII	- 35 -
4.3. PRIMERJAVA VREDNOSTI AKTIVNOSTI FAKTORJA VIII DOBLJENIH S POMOČJO RAZLIČNIH REAGENTOV NA POSAMEZNEM APARATU	- 37 -
4.4. PRIMERJAVA VREDNOSTI AKTIVNOSTI FAKTORJA VIII DOBLJENIH NA RAZLIČNIH APARATIH IN S POSAMEZNM REAGENTOM	- 41 -

4.5. SKLADNOST VREDNOSTI AKTIVNOSTI FAKTORJA VIII DOBLJENIH NA RAZLIČNIH APARATIH IN Z RAZLIČNIMI REAGENTI _____	- 45 -
5. RAZPRAVA _____	- 46 -
6. SKLEPI _____	- 48 -
7. LITERATURA _____	- 49 -
8. PRILOGE _____	- 50 -

KAZALO SLIK

Slika 1: Koagulacija <i>in vitro</i> [3] _____	- 13 -
Slika 2: Koagulacija <i>in vivo</i> [3] _____	- 14 -
Slika 3: Dedovanje hemofilije [5] _____	- 19 -
Slika 4: Primerjava vrednosti aktivnosti faktorja VIII z reagentoma APTT SP in APTT SynthASil na aparatu ACL 9000 _____	- 37 -
Slika 5: Bias (pristranost) aktivnosti faktorja VIII na aparatu ACL 9000 med reagentoma APTT SP in APTT SynthASil _____	- 38 -
Slika 6: Primerjava vrednosti aktivnosti faktorja VIII z reagentoma APTT SynthASil in APTT SP na aparatu ACL TOP _____	- 39 -
Slika 7: Bias (pristranost) aktivnosti faktorja VIII na aparatu ACL TOP med reagentoma APTT SynthASil in APTT SP _____	- 40 -
Slika 8: Primerjava vrednosti aktivnosti faktorja VIII z reagentom APTT SP na aparatih ACL 9000 in ACL TOP _____	- 41 -
Slika 9: Bias (pristranost) aktivnosti faktorja VIII z reagentom APTT SP med aparatoma ACL 9000 in ACL TOP _____	- 42 -
Slika 10: Primerjava vrednosti aktivnosti faktorja VIII z reagentom APTT SynthASil na aparatih ACL 9000 in ACL TOP _____	- 43 -
Slika 11: Bias (pristranost) aktivnosti faktorja VIII z reagentom APTT SynthASil med aparatoma ACL 9000 in ACL TOP _____	- 44 -

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Mednarodna nomenklatura koagulacijskih faktorjev [3] _____	- 11 -
Preglednica II: Klinična razvrstitev hemofilije A [4] _____	- 18 -
Preglednica III: Številčna porazdelitev preiskovancev po območjih _____	- 33 -
Preglednica IV: Ponovljivost vrednosti aktivnosti faktorja VIII v seriji 6-ih določitev na aparatu ACL 9000 z reagentoma APTT SP in APTT SynthASil _____	- 34 -
Preglednica V: Ponovljivost vrednosti aktivnosti faktorja VIII v seriji 6-ih določitev na aparatu ACL TOP z reagentoma APTT SP in APTT SynthASil _____	- 35 -
Preglednica VI: Ponovljivost rezultatov aktivnosti faktorja VIII v seriji 6-ih določitev izdelave kalibracijskih krivulj za določitev aktivnosti faktorja VIII na aparatih ACL 9000 in ACL TOP z reagentom APTT SP _____	- 35 -
Preglednica VII: Ponovljivost rezultatov aktivnosti faktorja VIII v seriji 6-ih določitev izdelave kalibracijskih krivulj za določitev aktivnosti faktorja VIII na aparatih ACL 9000 in ACL TOP z reagentom APTT SynthASil _____	- 36 -
Preglednica VIII: Število preiskovancev z vrednostjo faktorja VIII v različnih meritvenih območjih _____	- 45 -

SEZNAM OKRAJŠAV

AT	Antitrombin
DIK	Diseminirana intravaskularna koagulacija
FVIII:C	Koagulacijska aktivnost faktorja VIII
GpI/GpIX	Glikoproteinski receptorji
GpIIb/IIIa	Glikoproteinski receptorji
HMWK	Kininogen velike molekularne mase
PAI-1	Plazmin aktivator inhibitor 1
PC	Protein C
PS	Protein S
TFPI	Inhibitor tkivnega faktorja
TAFI	Inhibitor fibrinolize
t-PA	Plazminogeni aktivator
u-PA	Urokinaza
vWb	Von Willebrandova bolezen
vWf	Von Willebrandov faktor

1. UVOD

1.1 HEMOSTAZA

Sistem hemostaze, ki v normalnih razmerah omogoči učinkovito zaustavljanje krvavitve, sestavljajo trombociti, koagulacijske in fibrinolitične beljakovine, inhibitorji koagulacije in fibrinolize ter žilna stena [1,2,3].

Krvavitev se začne zaustavljati takoj, ko je zaradi poškodbe, kirurškega posega ali bolezni prekinjena žila in endotelijske celice v žili. Kri pride v stik z subendotelijskim slojem žile. Na tem mestu nastane trombocitni čep. Govorimo o primarni hemostazi. Sekundarna hemostaza, to je nastajanje fibrina na mestu poškodbe, je posledica reakcij v koagulacijskem sistemu. Vlakna fibrina učvrstijo trombocitni čep, zato se ustavi krvavitev tudi iz večjih žil. Primarna in sekundarna hemostaza potekata hkrati in povezano. Sočasno je aktivirana tudi fibrinoliza in razgradnja strdka [3].

1.1.2. PRIMARNA HEMOSTAZA

Primarna hemostaza je proces nastanka trombocitnega strdka na mestu poškodbe žilne stene, pri tem sodelujejo trombociti in žilna stena.

Za normalno in učinkovito primarno hemostazo je pomembno normalno število trombocitov ter njihova funkcija.

Trombociti sodelujejo v procesu primarne hemostaze s tremi dogodki: z adhezijo (sprijemanje trombocitov na subendotelijska tkiva žilne stene), agregacijo (medsebojno zlepljanje trombocitov) in sekrecijo iz zrn v citoplazmi (gostih teles, zrn alfa in lizosomov) [1].

Motnje primarne hemostaze so posledica spremenjenega števila trombocitov in njihovega delovanja ter spremenjenih žil. Lahko so dedne ali pridobljene, posledica pa je krvavitev ali tromboza [3]. Dedne motnje so redke. Najpogosteje so posledica nepravilnosti membrane trombocitov, na katerih ni glikoproteinskih receptorjev GpIb/IX ali GpIIb/IIIa, ki sodelujejo pri adheziji in agregaciji trombocitov. Prisotne so krvavitve iz sluznic.

Pridobljene motnje funkcije trombocitov so pogosti vzroki za motnje primarne hemostaze. Navadno gre za pomanjkljivosti trombocitne sekrecije zaradi jemanja aspirina, ki zavira delovanje ciklooksigenaze in tako prepreči nastajanja tromboksana A₂. Ta je pomemben pri agregaciji trombocitov [3].

1.1.3. SEKUNDARNA HEMOSTAZA

Sekundarna hemostaza poteka sočasno s primarno. Ko nastaja trombocitni strdek, nastaja tudi fibrin po zaporedju encimskih reakcij, ki jih imenujemo koagulacija krvi. Koagulacijski sistem sestavljajo beljakovine koagulacijski faktorji, prekalikrein, kininogen z veliko molekulno maso (HMWK), lipoproteini in kalcijevi ioni. Po dogovoru koagulacijske beljakovine, tj. koagulacijske faktorje (F), označimo z rimskimi številkami. Za aktivirano obliko koagulacijskega faktorja dodamo rimski številki črko a, npr. FVa (preglednica I) [3].

Preglednica I: Mednarodna nomenklatura koagulacijskih faktorjev [3]

Oznaka	Ime
I	fibrinogen
II	protrombin
III	tkivni faktor, tkivni tromboplastin
IV	kalcij
V	proakcelerin, labilni faktor, globulin Ac
VI	ne obstaja
VII	prokonvertin, stabilni faktor
VIII	antihemofilni globulin, antihemofilni faktor A
IX	Christmasov faktor, antihemofilni faktor B
X	Stuart-Prowerjev faktor, Stuartov faktor
XI	antihemofilni faktor C
XII	Hagemanov faktor
XIII	fibrin stabilizirajoči faktor, Laki-Lorandov faktor

Večina koagulacijskih faktorjev se nahaja v krvnem obtoku in so v neaktivni obliki. FIII (tkivni tromboplastin, tkivni faktor, TF) je sestavina celičnih membran, je transmembranski glikoprotein in je na površini številnih celic, ki niso v stiku s krvjo. Večina koagulacijskih beljakovin nastane v jetrih, nekatere pa tudi v makrofagih, megakariocitih in endotelijskih celicah. Faktorji so proencimi (FXII, FXI, FX, FIX, FVII, FII) in kofaktorji (FV, FVIII). Da reakcija poteče, ni potrebna le pretvorba proencima v encim, ampak je potreben tudi kofaktor, ki nima lastnosti encima. Ta omogoči: encimsko prepoznavo substrata, večjo učinkovitost in specifičnost encima ter potek reakcije le na površini celic [3].

Koagulacijo plazme *in vitro* razložimo po dveh poteh: intrinzični in ekstrinzični. S tem konceptom koagulacije (teorija kaskad) si lahko razložimo laboratorijske podatke, ne pa dogodke, ki se zgodijo *in vivo*.

1.1.3.1. Notranja ali intrinzična pot koagulacije *in vitro*

Notranja pot se začne z aktiviranjem FXII in FXI na subendotelijskih strukturah v procesu, ki ga imenujemo kontaktna aktivacija. FXII se aktivira z delno proteolizo. Za reakcijo sta potrebna kalikrein in kininogen z veliko molekulno maso (HMWK). Faktorji notranje poti (FXII, FXI, FIX in FX), se aktivirajo drug za drugim. FVIIIa skupaj s fosfolipidi in kalcijevimi ioni pospeši aktivacijo FX v FXa. V tej reakciji je FIXa encim, FVIIIa pa kofaktor. FVIIIa nima kofaktorskih aktivnosti, dokler ga v aktivno obliko ne pretvori trombin [1].

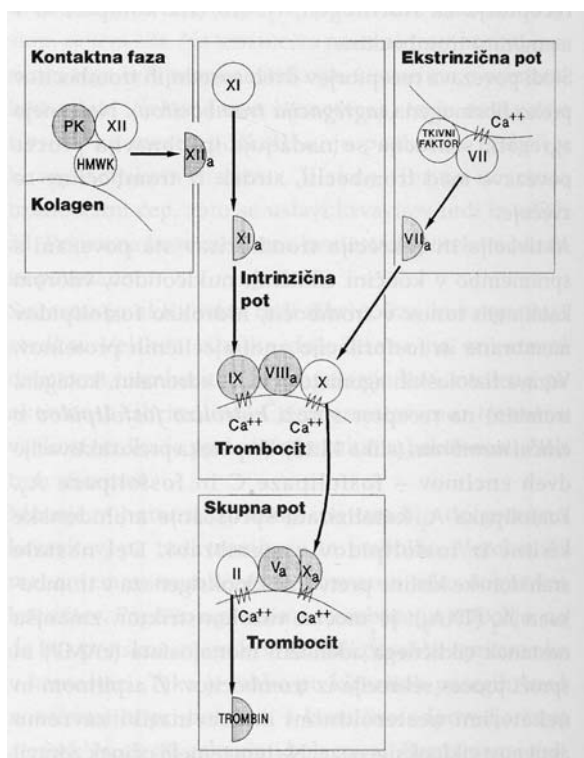
1.1.3.2. Zunanja ali ekstrinzična in skupna pot koagulacije *in vitro*

Zunanja pot poteka preko FVII, ki se veže s tkivnim faktorjem. Tkivni faktor tvori skupaj s fosfolipidi tkivni tromboplastin. FVII je v majhnih koncentracijah vedno prisoten v krvi, kar vodi do pospeševanja aktivacije koagulacije. FVIIa aktivira FIX in FX. Skupaj s FXa in tkivnim faktorjem se stvarja pospeševalna zanka, ki omogoča visoke aktivnosti FXa v kratkem času. FXa skupaj s FVa predstavlja tako imenovani protrombinazni kompleks-encimski kofaktorski kompleks, ki pretvarja FII (protrombin) v FIIa (trombin) [1].

Faktor Xa tako nastane po 2 poteh:

- po intrinzični poti FXIIa katalizira pretvorbo FXI v FXIa, ta pa aktivira FIX. Šele zatem FIXa aktivira FX.
- po ekstrinzični poti s katalitičnim kompleksom TF + FVIIa.

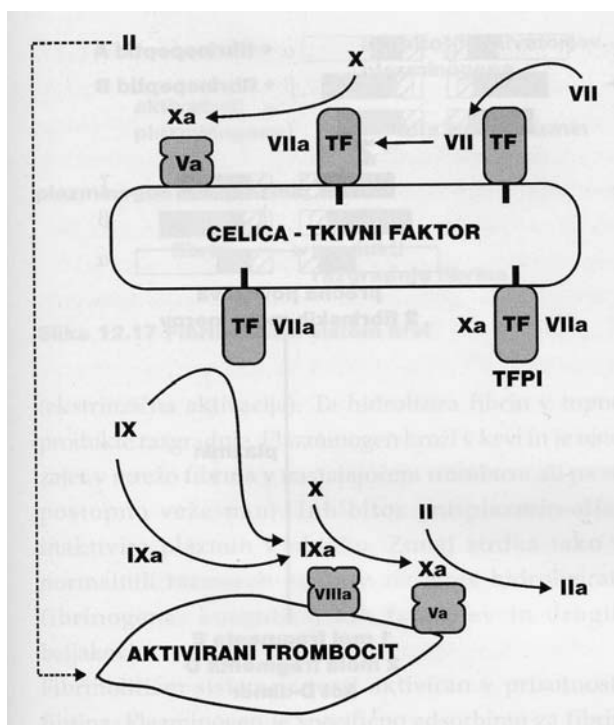
Fibrinogen je glikoprotein in je dimer. Sintetizira se v jetrih. Vsak od obeh dimerov je sestavljen iz treh verig: α s peptidom A, β s peptidom B in γ . Te so povezane med seboj z disulfidnimi vezmi. Trombin najprej odcepi peptid A in nato B. Tako nastanejo monomeri fibrina, ki polimerizirajo v polimere fibrina ter predstavljajo ogrodje strdka. FXIIIa katalizira nastanek vezi med stranskimi verigami in tako dobimo netopen fibrin. Fibrinogen je glavna sestavina strdkov. Fibrinogen ima tudi vlogo pri agregaciji trombocitov. Ti se povežejo preko fibrinogena, ki je vezan na receptorski glikoproteinski kompleks GpIIb/IIIa na dveh sosednjih trombocitih. Ko fibrin izpolni svojo vlogo, se razgradi v procesu fibrinolize. Pri patoloških stanjih imenujemo ta proces tromboliza (razgradnja tromba) [1].



Slika 1: Koagulacija *in vitro* [3]

1.1.3.3. Potek koagulacije *in vivo*

In vivo se koagulacija začne takrat, ko se tkivni faktor (TF) pojavi na površini poškodovanih celic. Na TF se veže FVIIa. Kompleks TF+FVIIa aktivira FX in FIX. Delovanje FXa je omejeno na površino celic, ker ga antitrombin v krvnem obtoku inaktivira. FXa s FVa povzroči nastanek trombina, vendar le v manjših količinah, ki pa so zadostne za aktivacijo trombocitov, FV, FVIII, FXI. Z aktivacijo trombocitov se začne tudi njihova sekrecija. Aktivnost kompleksa FVIIa+TF+FXa zavre inhibitor tkivnega faktorja (TFPI, tissue factor pathway inhibitor). Na površino aktiviranega trombocita se veže FIXa in tako aktivira FXa (kofaktor je FVIIIa). Aktivirani FX povzroči aktivacijo velikih količin trombina (kofaktor je FVa), posledica je nastanek fibrina, ki učvrsti trombocitni strdek. Za večino reakcij so potrebni kalcijevi ioni [3].



Slika 2: Koagulacija *in vivo* [3]

1.2. INHIBICIJA KOAGULACIJE

Delovanje koagulacijskega sistema uravnava učinkoviti inhibitorji aktivnih encimov, npr. antitrombin, protein C in S. Njihovo delovanje je zlasti pomembno v krvnem obtoku, saj omogočajo, da je nastajanje krvnega strdka omejeno na mesto poškodbe.

Antitrombin (AT) je eden glavnih inhibitorjev koagulacije. Zavira delovanje serinskih proteaz, tj. encimov z aminokislino serin v aktivnem delu molekule, kot so trombin, FXa, FIXa, FXIa. AT se počasi veže s temi encimi. Če je prisoten heparin, je zaviranje močno povečano. Kadar je trombin vezan na fibrin, AT ne more delovati nanj zaviralno niti v kompleksu s heparinom.

Trombin, ki se veže na trombomodulin, receptor v membrani endotelijske celice, aktivira protein C (PC). Aktivna oblika PC cepi kofaktorja FVa in FVIIIa in tako zavre nastanek trombina. Za sintezo PC v jetrih je potreben vitamin K. Aktivirani PC lahko zveča fibrinolizo, ker se veže v kompleks s plazminogen aktivator inhibitorjem-1 (PAI-1) in zavre ta inhibitor.

Protein S (PS) je kofaktor za protein C. Izločajo ga trombociti in endotelijske celice. V plazmi ga je prostega 40 %, vezanega na C4b protein komplementnega sistema pa 60 %. Vezani PS je neaktiven [1,3].

Inhibitor za FVIIa + tkivni faktor (TFPI, tissue factor pathway inhibitor) je proteaza v plazmi, ki se sintetizira v endotelijskih celicah. Ta inhibitor je z razliko od drugih inhibitorjev bivalenten, veže se na TF + FVIIa in FXa. Za njegovo aktivnost je vezava na FXa nujna. Ker FXa nastane zaradi delovanja TF + FVIIa, pomeni ta inhibitor negativno povratno zanko v sistemu. Zaviralni učinek se poveča ob prisotnosti heparina. Ta pospešuje sproščanje TFPI. Približno 10% TFPI je shranjenega na trombocitih in se sprošča ob njihovi stimulaciji [1,3].

Ostali zaviralci koagulacije so še alfa 1-antitripsin, C1 inhibitor, in alfa 2-makroglobulin [3].

Podedovano ali pridobljeno pomanjkanje ali pomanjkljiva aktivnost inhibitorjev, kot so AT, protein C, protein S in drugih ima lahko za posledico trombofilijo (nagnjenost k trombozi). Trombofilija se lahko pojavi tudi zaradi bolezni in različnih fizioloških stanj, npr. nosečnost, rak ali po operaciji. Takrat večinoma z laboratorijskimi preiskavami ne ugotovimo sprememb v hemostazi [1,2,3].

1.3. FIBRINOLIZA

To je fiziološki mehanizem, ki razgrajuje fibrinske strdke in omejuje njihovo širjenje po tem, ko so že opravili svojo fiziološko vlogo. Fibrinoliza pomaga pri ponovni vzpostavitvi prehodnosti žil in nastane kot odgovor na poškodbo žile. Aktivira se sočasno s koagulacijo [1,3].

Endotelijske celice sprostijo tkivni aktivator plazminogena (t-PA), ki aktivira plazminogen v plazmin (ekstrinzična aktivacija). Ta hidrolizira fibrin v topne produkte razgradnje. Plazminogen kroži v krvi in je nato zajet v mrežo fibrina v nastajajočem trombusu ali pa se postopno veže nanj. Inhibitor alfa₂-antiplazmin inaktivira plazmin v obtoku. Zunaj strdka tako v normalnih razmerah plazmin ne more hidrolizirati fibrinogena, koagulacijskih faktorjev in drugih beljakovin [3].

Plazminogen je specifično adsorbiran na fibrin in fibrinogen prek lizina. Ker ima fibrin specifična mesta za vezavo aktivatorjev plazminogena, fibrinogen jih nima, je le malo plazminogena aktiviranega brez fibrina. Fibrinolitični sistem je torej aktiviran v prisotnosti fibrina. Drugi aktivator plazminogena je urokinaza (u-PA), ki nastane v epiteljskih celicah ledvičnih tubulov in se izloči v sečila. Intrinzični aktivatorji plazminogena, npr. FXII, prekalkrein imajo v fizioloških razmerah majhen pomen [1,3].

Aktivacijo plazminogena posredno zavira inhibitor t-PA, tj. PAI-1 (plazminogen aktivator inhibitor-1). PAI-1 pa inaktivira protein C v aktivirani obliki in zato vpliva na fibrinolizo. Inhibitorji plazmina, kot je alfa₂-antiplazmin in inhibitor fibrinolize, ki ga aktivira trombin (TAFI, thrombin-activable fibrinolysis inhibitor), prav tako prispevata k regulaciji fibrinolize [1,3].

Plazmin lahko razgradi fibrinogen in fibrin v t.i. razgradne produkte. Plazmin razgradi fibrinogen v fragment X, peptid B in zunanji končni del verige A alfa. Zatem z asimetrično cepitvijo fragmenta X nastane večji Y in manjši D, iz fragmenta Y pa končno D in E. Plazmin razgradi fibrin brez prečnih povezav. Nastanejo podobni produkti kot pri razgradnji fibrinogena, le da nimajo peptida A in peptida B, ker ju je že odcepil trombin.

Fibrin s prečnimi povezavami (po delovanju FXIII) je sestavljen iz velikega števila polimerov, posamezne podenote so kovalentno povezane.

Plazmin naključno cepi vezi med posameznimi podenotami, tako da nastanejo različno veliki deli molekule fibrina. Ti so lahko naprej razgrajeni v D-dimere in produkte E [1,3].

Pri obsežnih poškodbah tkiva in nekaterih rakavih boleznih se v krvni obtok sprosti velika količina t-PA in urokinaze (u-PA). Inhibitor alfa₂-antiplazmin ne inaktivira v celoti nastalega plazmina. Posledica je, da plazmin razgradi fibrinogen, fibrin, FV in FVIII. Zato nastane nagnjenost h krvavitvam ali krvavitve.

Dedne motnje fibrinolize so redke. Zmanjšana aktivnost fibrinolize je morda povezana s trombozo [3].

1.4. MOTNJE KOAGULACIJE KRVI

Pridobljene motnje koagulacije krvi nastanejo zaradi različnih vzrokov.

Pomanjkanje faktorjev II, VII, IX, X lahko nastane zaradi pomanjkanja vitamina K, ali pri zdravljenju s kumarini, pri jetrnih boleznih in zaradi zvečanega odstranjevanja koagulacijskega faktorja. Faktorji II, VII, IX, X, ki nastanejo v hepatocitih, imajo na N-končnem delu molekule gamakarboksi-glutamat. Ta nastane iz glutaminske kisline s karboksilacijo. Karboksilacija je motena, če ni vitamina K. Koagulacijski faktorji, ki tako nastanejo, se ne vežejo za fosfolipide in kalcijeve ione, kar je nujno za njihovo delovanje.

Kumarini so po zgradbi podobni vitaminu K in tekmujejo z njim za isti receptor. Motijo delovanje reduktaz vitamina K, ki reducirajo oksidirani vitamin K. Redcirani vitamin K je potreben za normalen potek karboksilacije faktorjev protrombinskega kompleksa, sicer nastanejo funkcijsko neustrezne koagulacijske beljakovine.

Kumarine uporabljamo za antikoagulacijsko zdravljenje. Pri predoziranju zdravila lahko nastanejo krvavitve, ki ogrozijo življenje.

Pri cirozi, hepatitisu, zasevkih v jetrih je lahko zmanjšano nastajanje koagulacijskih beljakovin. Do zvečanega odstranjevanja FX lahko pride pri amiloidozi, bolezni za katero je značilno odlaganje monoklonskega imunoglobulina. FX se veže na fibrile amiloida.

Pomanjkanje FIX je lahko posledica nefrotičnega sindroma in Gaucherjeve bolezni. Vzrok za pomanjkanje FIX pri hudi proteinuriji ni pojasnjen. Pri Gaucherjevi bolezni se FIX veže za glukocerebrozide.

Bolezen je posledica dednega pomanjkanja encima glukocerebrozidaze v lizosomih makrofagov. Zaradi tega se glukocerebrozid kopiči v makrofagih jeter, vranice in kostnega mozga. V obeh primerih ponavadi ni krvavitv.

Diseminirana intravaskularna koagulacija (DIK) je zaplet v poteku številnih bolezni. Zanj so značilne tromboze v območju malih žil, moten obtok krvi v predelu mikrocirkulacije, okvara tkiv in organov zaradi ishemije. Zaradi porabljanja trombocitov in koagulacijskih beljakovin nastane motnja v strjevanju krvi in krvavitve. Klinična slika je pestra, znaki se prepletajo z znaki bolezni, ki je sprožila DIK [4].

Med **dednimi motnjami strjevanja krvi** sta najpogostejši hemofilija A in B. Dedujeta se s spolnim kromosomom X, zato se pojavljata skoraj samo pri moških (slika 3). Ženske so prenašalke. Pri ženskah se pojavi, če je oče hemofilik in mati prenašalka ali pri nepravilnostih kromosoma X [4].

Hemofilija A ali klasična hemofilija je dedna motnja koagulacije krvi pri kateri je znižana aktivnost koagulacijskega faktorja VIII. Posledica je nagnjenost h krvavitvam ali krvavitve, odvisno od stopnje zmanjšane aktivnosti FVIII. Za bolezen so značilni hematomi in krvavitve v sklepe. Stopnja motnje je pri vseh članih ene družine enaka in se v življenju ne spreminja. S kliničnega vidika ločimo hudo, srednje hudo in lahko obliko hemofilije A (preglednica II).

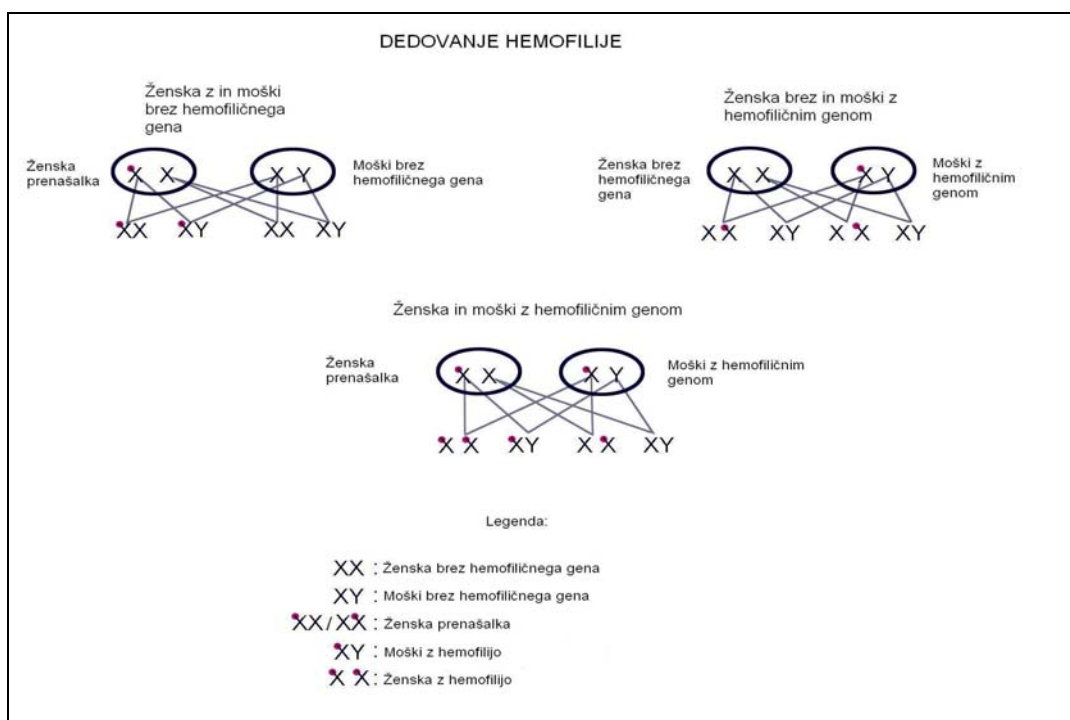
Preglednica II: Klinična razvrstitev hemofilije A [4]

Huda oblika	Aktivnost FVIII je do 1 % (do 0.01 E/mL). Spontane krvavitve v otroštvu v sklepe, mišice in druge krvavitve.
Srednje huda oblika	Aktivnost FVIII je 1 do 5 % (0.01 do 0.05 E/mL). Krvavitve po poškodbi, po operacijah, občasne spontane krvavitve v sklepe.
Lahka oblika	Aktivnost FVIII je 6 do 60 % (0.06 do 0.60 E/mL). Krvavitve po poškodbi, po operacijah, spontane krvavitve redko.

Bolniki s **hudo obliko** hemofilije imajo krvavitve brez posebnega vzroka, že po fizioloških poškodbah ob običajnih aktivnostih. Prisotne so krvavitve v sklepe in mišice. Posledica so poškodbe sklepov (hemofilična artropatija) in mišic z invalidnostjo, lahko že v otroštvu. Smrt zaradi krvavitve je redka, razen ko gre za krvavitev v možgane ali v možganske ovojnice.

Pri bolnikih s **srednje hudo obliko** hemofilije se krvavitve pojavijo po poškodbi in le redko brez posebnega vzroka. Poškodbe sklepov in mišic so manj izrazite, krvavitve tudi niso tako pogoste kot pri hudi obliki hemofilije.

Pri **lahki obliki** hemofilije so krvavitve redke in le po poškodbi ali po operaciji. Bolezen pogosto spoznamo šele ob operaciji in poškodbi, ko je krvavitev neustavljiva.



Slika 3: Dedovanje hemofilije [5]

Hemofilija B ali Christmasova bolezen, je dedna motnja v koagulaciji krvi zaradi znižane aktivnosti FIX. Prenaša se enako kot hemofilija A. Posledice so nagnjenost h krvavitvam in krvavitve.

Von Willebrandova bolezen (vWb) je skupina dednih motenj hemostaze zaradi motene sinteze von Willebrendovega faktorja (vWf). Zmanjšana je tudi aktivnost FVIII. Osnovno pri vWb je motnja v funkciji endotelijske celice in posledično trombocita, torej motnja primarne hemostaze, medtem ko je motnja sekundarne hemostaze samo pridružena. Posledica je lahko nagnjenost h krvavitvam ali krvavitve.

VWf je plazemski glikoprotein, ki ga izločajo endotelijske celice in megakariociti. Potreben je za adhezijo trombocitov na endotelij in za agregacijo trombocitov. FVIII se veže z vWf in ima tako posledično veliko daljše preživetje v krvnem obtoku kot nevezani FVIII, ker ga vWf varuje pred proteolizo. Kompleks FVIII + vWf se veže na površino trombocitov. Tako je FVIII blizu drugim koagulacijskim faktorjem, da lažje nastane trombin.

VWb se deduje avtosomno dominantno. Gen za vWf je na kromosomu 12. Ker ima gen za vWb različno prodornost in ekspresijo, je težko razlikovati med zdravimi in obolelimi potomci staršev z vWb. Po drugi strani pa so lahko pri članih iste družine znaki vWb in rezultati laboratorijskih preiskav različni. Sklepamo, da ne gre za eno samo gensko motnjo in eno samo bolezen.

Obstajajo trije tipi vWb, ki jih ločimo na osnovi laboratorijskega preiskovanja.

Tip I je najpogostejši (70 %), deduje se avtosomno dominantno. Krvavitve običajno niso hude. Večinoma gre za blago do zmerno zmanjšanje vWf v plazmi. Aktivnost FVIII je znižana.

Tip II je manj pogost kot tip I (10 do 15 %), dedovanje je avtosomno dominantno. Krvavitve so bolj pogostne kot pri tipu I in trajajo dolgo. Za ta tip je značilna normalna ali skoraj normalna koncentracija funkcijsko neustreznega vWf v plazmi.

Tip III je zelo redek. Ta zelo huda oblika vWf je recesivna, bolniki so običajno potomci staršev, ki imata blago obliko tipa I. Nekateri označijo ta podtip kot **podtip I S** (s = severe). Podeduje se lahko enaka nepravilnost vWf od obeh staršev (homozigoti) ali pa druga nepravilnost vsakega od staršev (dvojni heterozigoti). Prisotne so hude krvavitve iz sluznic. Aktivnost FVIII je lahko tako znižana, da so krvavitve enake kot pri hemofiliji (npr. v sklepe) [3].

Dedna pomanjkanja ostalih faktorjev koagulacije I, II, V, VII, X, XI, XII, XIII so zelo redka. Prisotne so lahko spontane krvavitve in krvavitve po poškodbah [1,4].

1.5. FAKTOR VIII

Gen za FVIII (*F8*) je lociran na daljši ročici kromosoma X (X28q). Sestavlja ga 26 eksonov in 25 intronov, dolžina gena je 186 kilo baznih parov. Sintetizira se v jetrih kot glikoprotein z eno polipeptidno verigo s 2332 aminokislinami in približno molekulsko maso 285 000 D. Polipeptidna veriga je zgrajena iz treh domen A, domene B in dveh domen C, ki si v verigi sledijo v naslednjem vrstnem redu: (NH₂) A1-A2-B-A3-C1-C2 (COOH) [6,7].

V procesu sekrecije iz celic je FVIII podvržen proteolitičnim procesom. V krvi kroži kot dimer sestavljen iz težke (A1-A2-B) in lahke verige (A3-C1-C2), ki se ne-kovalentno veže v kompleks z vWf. Vezava v kompleks ščiti FVIII pred inaktivacijo z aktiviranim proteinom C, FIXa in FXa in omogoči sprostitev FVIII iz kompleksa na mestu poškodbe žile. Razpolovna doba vezanega FVIII v kompleks z vWf je od 8 do 12 ur. V odsotnosti vWf je obstoj FVIII zelo skrajšan, razpolovna doba je 2 uri. Po poškodbi žile se tvori aktiviran FVIII zaradi delovanja trombina in FXa. Aktiviran FVIII je hetero-trimer (A1/A2/A3-C1-C2), ki se sprosti iz kompleksa z vWf in se veže na aktivirano površino trombocitov. Karboksi-terminalna domena C2 je vključena v vezavo FVIII na vWf ali na površino aktiviranih trombocitov. FVIIIa se inaktivira spontano s sprostitvijo domene A2 iz hetero-trimera ali z proteolitičnim delovanjem aktiviranega proteina C [6,7].

FVIIIa je kofaktor za FIXa, ki katalizira pretvorbo FX v FXa. Nastajanje FXa je ob prisotnosti s trombinom aktiviranega FVIII močno zvečano. V odsotnosti FVIIIa je nastajanje strdka počasno. Posledica je dolgotrajna krvavitev in slabo celjenje ran [3].

Faktor VIII je reaktant akutne faze. Povečano aktivnost zasledimo tudi v nosečnosti in po telesni vadbi. Posledica okvare gena za FVIII je znižano nastajanje FVIII ali nastajanje strukturno nepravilne molekule FVIII z odsotno koagulacijsko aktivnostjo (hemofilija A). Funkcijo molekule FVIII lahko dokažemo s koagulacijskimi preiskusi, strukturno nenormalno molekulo pa z imunokemičnimi preiskusi.

Pri hudi in srednje hudi hemofiliji je podaljšan aktivirani parcialni tromboplastinski čas (APTČ). Izid preiskave je lahko normalen, če je aktivnost FVIII več kot 30 %. APTČ je presejalna preiskava s katero ocenimo notranjo pot koagulacije.

Z njo odkrivamo pomanjkljivo aktivnost faktorjev koagulacije te poti (FVIII, FIX, FXI, FXII), prekalikreina in kininogena z veliko molekulno maso. Preiskus izvedemo tako, da citratno plazmo (trinatrijev citrat; 0.105-0.109 mol/L) preiskovanca inkubiramo z optimalno količino fosfolipidov (sintetični fosfolipidi, kefalin) in aktivatorjem kontaktne faze, ki je lahko celit, elagična kislina ali delci silike. Aktivirata se FXII in FXI. Po dodatku ionov kalcija merimo čas do nastanka strdka. Izsledok podamo v sekundah [1,8]. Čas do nastanka strdka lahko izmerimo z načinom turbidimetrije ali nefelometrije. Pri turbidimetriji merimo prepustnost svetlobe skozi vzorec, ki pade na detektor, ki je glede na vir svetlobe nameščen pod kotom 180°.

Pri nefelometriji merimo intenzivnost razpršene svetlobe vzorca. Detektor je glede na vir svetlobe nameščen pod kotom 90°.

1.5.1. DOLOČITEV FAKTORJA VIII

Aktivnost FVIII določimo s specifičnim koagulacijskim preiskusom ali s preiskusom na osnovi kromogenega substrata.

Koagulacijsko aktivnost FVIII (FVIII:C) lahko določimo s koagulacijskim preiskusom v eni ali dveh stopnjah. Najpogosteje za določitev aktivnosti FVIII uporabljamo koagulacijski preiskus v eni stopnji. Preiskus je zasnovan na spremenjenem aktiviranem parcialnem tromboplastinskem času (APTČ). Za preiskus uporabimo plazmo z ugotovljenim pomanjkanjem FVIII (liofilizirana deficitna plazma, FVIII aktivnost < 1%). Aktivnosti drugih koagulacijskih faktorjev so v deficitni plazmi normalne. APTČ deficitne plazme je podaljšan.

1.5.1.1. Določitev aktivnosti faktorja VIII v eni stopnji

Test napravimo tako, da deficitni plazmi dodamo razredčeno plazmo preiskovanca (1/5) in določimo APTČ. V primeru, da plazma preiskovanca vsebuje FVIII, pride do korekcije APTČ deficitne plazme. Stopnjo korekcije podaljšanega APTČ po dodajanju plazme preiskovanca deficitni plazmi primerjamo z korekcijo, ki nastane po dodatku plazme znane koncentracije FVIII (referenčna plazma).

Pripravimo več redčitev referenčne plazme in izvedemo APTČ. Vrednosti APTČ so odvisne od koncentracije FVIII redčene referenčne plazme. Napravimo umeritveni diagram.

Linearno povezavo med vrednostmi dobimo s pretvorbo vrednosti za koncentracijo FVIII in APTČ v logaritemske vrednosti. Aktivnost FVIII plazme preiskovanca odčitamo iz krivulje in izrazimo aktivnost FVIII v mednarodnih enotah (E) na mL (E/mL).

1 E je po dogovoru določena kot aktivnost, ki je prisotna v 1 mL normalne plazme, dobljene z združitvijo več normalnih plazem zdravih preiskovancev (pool: vsaj 50 preiskovancev starih od 18 do 65 let) [9]. Običajno preiskus določitve FVIII:C v plazmi preiskovanca opravimo pri treh redčitvah (1/1, 1/2, 1/4) in izsledek podamo kot povprečje dobljenih rezultatov, če je zagotovljen pogoj, da je premica skozi točke vrednosti časa do nastanka strdka redčitev plazme preiskovanca vzporedna z kalibracijsko krivuljo. Če so v plazmi prisotni lupusni antikoagulanti, ki podaljšajo čase preiskusov na osnovi fosfolipidov, še posebej APTČ, ali inhibitorji za FVIII, potem opravimo še več redčitev plazme preiskovanca. Pri večjih redčitvah je vpliv zaviralcev manjši. Točen izsledek lahko podamo v primeru, če pri vsaj dveh redčitvah plazme preiskovanca dobimo enaka izsledka za FVIII:C.

Ne-vzporedno premico dobimo tudi, če so v plazmi preiskovanca prisotni antikoagulanti kot je heparin ali inhibitorji trombina kot je lepirudin. V teh primerih je metoda izbora določitve aktivnosti FVIII preiskus s kromogenim substratom [9].

Komercialno dostopni reagenti za APTČ se lahko razlikujejo v analitični občutljivosti za pomanjkanje koagulacijskih faktorjev, zato je za določitev aktivnosti posameznih faktorjev koagulacije pomembna skrbna izbira reagenta.

1.5.1.2. Določitev aktivnosti faktorja VIII v dveh stopnjah

Koagulacijsko aktivnost FVIII (FVIII:C) lahko določimo tudi s koagulacijskim preiskusom v dveh stopnjah. V prvi stopnji serum zdravega dajalca in razredčeno plazmo preiskovanca inkubiramo s fosfolipidi in ioni kalcija. Nastanek protrombinaznega kompleksa je sorazmeren koncentraciji FVIII. V drugi stopnji vzorčimo nastalo mešanico v normalno plazmo in merimo čas do nastanka strdka. Za preiskavo ne potrebujemo dragih reagentov, preiskava ni občutljiva na predčasno aktivacijo koagulacijskim faktorjev v vzorcu, ki lahko vpliva na izsledok v eno-stopenjskem preiskusu, vendar zanjo ni komercialnih reagentov, ki bi omogočili avtomatizacijo preiskave. Večinoma se namesto nje uporablja preiskava s kromogenim substratom [9].

1.5.1.3. Določitev aktivnosti faktorja VIII s kromogenim substratom

Kromogeni substrati so večinoma tripeptidi, podobni naravnim substratom. Oponašajo zaporedje aminokislin naravnih substratov na mestu, ki jih encim cepi. Na sintetični peptid je vezan kromofor, običajno *p*-nitroanilin (pNa), ki po hidrolizi obarva raztopino. Absorbenco obarvane raztopine izmerimo spektrofotometrično in je sorazmerna aktivnosti encima. Aktivnost encima v neznanem vzorcu odčitamo iz umeritvene krivulje, ki smo jo pripravili z vzorci znanih aktivnosti encima [1,8].

Določitev aktivnosti FVIII s kromogenim substratom temelji na zmožnosti FVIII, da deluje kot kofaktor pri aktivaciji FX z FIXa. V prvi stopnji preiskusa inkubiramo plazmo preiskovanca, ki vsebuje FVIII, s fosfolipidi, ioni kalcija, aktiviranim FIX (FIXa) in neaktiviranim FX. Nastali aktivni FX je sorazmeren koncentraciji FVIII v plazmi preiskovanca. V drugi stopnji v preiskusu nastali FXa cepi kromogeni substrat. Sprosti se pNa. Absorbenco obarvane raztopine izmerimo spektrofotometrično pri 405 nm, koncentracijo FVIII v plazmi preiskovanca odčitamo iz umeritvenega diagrama [9].

2. NAMEN DELA

V Specializiranem hematološkem laboratoriju kliničnega oddelka za hematologijo v Ljubljani rutinsko določajo aktivnost faktorja VIII na aparatu ACL 9000 z nefelometričnim načinom zaznave strdka in z uporabo reagentov APTT SP s sintetičnimi fosfolipidi in delci silike, faktor VIII deficitne plazme z znanim pomanjkanjem faktorja VIII in ioni kalcija. Sodobnejši aparat ACL TOP za meritev nastanka strdka uporablja turbidimetrični način. Po proizvajalčevem zagotovilu je reagent APTT SynthASil s sintetičnimi fosfolipidi in delci silike zelo občutljiv na pomanjkanje faktorja VIII (navodila za APTT SynthASil, junij 2006) in je najprimernejši za določitev aktivnosti FVIII na aparatu ACL TOP.

Namen naloge je:

1. Vpeljati določitev aktivnosti faktorja VIII na aparat ACL TOP.
2. Primerjati vrednosti aktivnosti faktorja VIII, ki jih bomo dobili na 4 načine: z uporabo aparatov ACL 9000 in ACL TOP ter dveh vrst reagentov: APTT SP in APTT SynthASil.

Analizo vzorcev bomo izvedli po navodilih za izvedbo primerjave metod in aparatov NCCLS EP9-A [10], pri čemer bomo v analizo vključili vsaj 40 vzorcev, ki jih bomo analizirali v dvojniku v časovnem obdobju 6 delovnih dni. Vsak dan bomo analizirali serijo 8 vzorcev in sicer v zaporedju od 1 do 8 ter dvojnik v zaporedju od 8 do 1. Na omenjeni način bomo analizirali testno in primerjalno metodo v roku 2 ur v celotnem meritvenem območju od 0 do 2.50 E/mL aktivnosti faktorja VIII. Izsledke bomo ovrednotili s pomočjo metode linearne regresije.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. PREISKOVANCI

V raziskavo smo vključili 48 preiskovancev, 26 žensk in 22 moških. Povprečna starost preiskovancev je bila 45.25, mediana 43.5, razpon od 20 do 77 let. Povprečna starost žensk je bila 45.27, mediana 43 let. Povprečna starost moških je bila 45.23, mediana 44 let.

V analizo smo vključili 24 zdravih preiskovancev, 10 bolnikov z von Willebrandovo boleznijo, 14 s hemofilijo A in 7 preiskovancev brez znane diagnoze.

Kri 24 zdravih oseb smo dobili od sodelavcev iz Specializiranega hematološkega laboratorija ali KO za hematologijo, Interna klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana. Kri 14 bolnikov s hemofilijo A, 10 bolnikov z von Willebrandovo boleznijo in 7 bolnikov brez znane diagnoze smo dobili iz Hematološke ambulante kliničnega oddelka za hematologijo, UKC Ljubljana, ko so prišli na redni pregled.

Od preiskovancev smo dobili ustni pristanek pred pričami. Rezultati raziskave niso vplivali na zdravljenje bolnikov. Izvedeni postopki so bili v skladu z načeli Helsinške deklaracije o biomedicinskih raziskavah na človeku (1975).

3.2. ODVZEM VZORCEV

Vzorci smo odvzeli v 4.5 mL epruveto z 0.105 M trinatrijev citratom. Plazmo smo pridobili s centrifugiranjem pri 3000 obratih (Heraeus, Multifuge 3S/3S-R) 15 minut na 4°C. Preiskave smo opravili iz sveže ali zamrznjene plazme, ki je bila shranjena pri -20°C.

3.3. APARATURE IN PRIBOR

- aparat ACL TOP (Instrumentation Laboratory) je sodoben, popolnoma avtomatiziran koagulacijski analizator, namenjen za rutinske ter specialne preiskave za oceno hemostaze. Na njem lahko izvedemo koagulacijske preiskuse, preiskave z uporabo kromogenih substratov in avtomatizirane imunske preiskave z uporabo lateks delcev. Aparat izmeri čas, ki je potreben, da nastane strdek z načinom turbidimetrije. Strdek se tvori, ko se fibrinogen pretvarja v fibrin. Zaradi nastanka strdka se spremeni optična gostota vzorca. Na fotodetektorju, ki je nameščen pod kotom 180° glede na vir svetlobe, z valovno dolžino 671 nm merimo prepuščeno svetlobo. Vir svetlobe je LED dioda (LED, Light emitting diode). Prepustnost svetlobe se zmanjšuje, ko se začne tvoriti fibrinski strdek. Spremeni se električni signal iz fotodetektorja. Ta signal se naprej obdela s serijo algoritmov, ki omogoči določitev časa nastanka strdka [11,12,13].
- aparat ACL 9000 (Instrumentation Laboratory) je računalniško voden analizator na katerem lahko izvedemo koagulacijske preiskave, preiskave z uporabo kromogenih substratov in avtomatizirane imunske preiskave z uporabo lateks delcev. Čas do nastanka strdka izmeri z načinom nefelometrije pri valovni dolžini 660 nm. Meri se intenzivnost razpršene svetlobe. Detektor je glede na vir svetlobe nameščen pod kotom 90° . Vir svetlobe je LED dioda. Pri nastanku strdka narašča intenzivnost razpršene svetlobe [14].
- centrifuga Heraeus, multicentrifuge 3S/3S-R
- pipete, epruvete, kivete

3.4. METODE IN REAGENTI

Koagulacijsko aktivnost FVIII (FVIII:C) smo določili s koagulacijskim preiskusom v eni stopnji. Uporabili smo dva različna reagenta za določitev aktivnosti faktorja VIII proizvajalca Instrumentation Laboratory, Italija: APTT SP in APTT SynthASil.

Uporabili smo tudi referenčno (kalibracijsko) plazmo, plazmo z ugotovljenim pomanjkanjem FVIII (FVIII deficitna plazma), ione kalcija, normalno in specialno kontrolno plazmo z znano nižano koncentracijo FVIII (specialna kontrola 2).

Determinacijski koeficient (r^2) kalibracijske krivulje koagulacijskega preiskusa aktivnosti FVIII z reagentom APTT SP in reagentom APTT SynthASil na aparatu ACL 9000 pridobimo z metodo linearne regresije po pretvorbi dobljenih vrednosti v logaritemske.

3.5. PRIPRAVA REAGENTOV

APTT SP: reagent je pripravljen za uporabo. Vsebuje: sintetične fosfolipide, mikronizirano siliko, kalcijev klorid in manj kot 0.1% natrijevega azida. Reagent je stabilen 2 dni pri 15°C ali 15 dni pri 2 – 8°C. (kataloška številka: 0020006300, HemosIL™, Instrumentation Laboratory).

CaCl₂ SP: reagent je pripravljen za uporabo. Koncentracija je 0.025 mol/L. Reagent je stabilen 15 dni pri 2 – 8°C. (Kataloška številka: 0020006300, HemosIL™, Instrumentation Laboratory).

APTT SynthASil: reagent je pripravljen za uporabo. Vsebuje: sintetične fosfolipide, koloidno siliko, kalcijev klorid in manj kot 0.1% natrijevega azida. Reagent je stabilen 30 dni pri 2 – 8°C ali 3 dni pri 15°C. (Kataloška številka: 0020006810, HemosIL™, Instrumentation Laboratory).

CaCl₂ SynthASil: Reagent je pripravljen za uporabo. Koncentracija je 0.025 mol/L. Reagent je stabilen 30 dni pri 2 – 8°C. (Kataloška številka: 0020006910, HemosIL™, Instrumentation Laboratory).

Faktor VIII deficitna plazma: raztopimo jo v 1 mL destilirane vode, pustimo na sobni temperaturi 30 minut. Med raztapljanjem plazmo večkrat rahlo premešamo. Raztopljena plazma je stabilna 4 ure pri 2 – 8°C. (FVIII Deficient plasma, kataloška številka: 0008466450, HemosIL™, Instrumentation Laboratory).

Kalibracijska plazma: raztopimo jo v 1 mL destilirane vode, pustimo na sobni temperaturi 30 minut. Med raztapljanjem plazmo večkrat rahlo premešamo. Raztopljena plazma je stabilna 4 ure pri 2 – 8°C. (Calibration plasma, kataloška številka: 0020003700, HemosIL™, Instrumentation Laboratory).

Normalna plazma: raztopimo jo v 1 mL destilirane vode, pustimo na sobni temperaturi 30 minut. Med raztapljanjem plazmo večkrat rahlo premešamo. Raztopljena plazma je stabilna 8 ur pri 2 – 8°C. (Normal control, kataloška številka: 0020003110, HemosIL™, Instrumentation Laboratory).

Specialna kontrolna plazma z znano znižano koncentracijo FVIII: (specialna kontrola 2): raztopimo jo v 1 mL destilirane vode, pustimo na sobni temperaturi 30 minut. Med raztapljanjem plazmo večkrat rahlo premešamo. Raztopljena plazma je stabilna 8 ur pri 2 – 8°C. (Special test control level 2, kataloška številka: 0020012000, HemosIL™, Instrumentation Laboratory)

Raztopina za redčenje: je pripravljena za uporabo. Vsebuje manj kot 0.1% natrijevega azida (Factor diluent, kataloška številka: 0009757600, HemosIL™, Instrumentation Laboratory)

3.6. DOLOČITEV AKTIVNOSTI FAKTORJA VIII NA APARATIH ACL 9000 in ACL TOP

Po navodilih programa v aparatu smo na določena mesta vstavili reagenta APTT SP ali APTT SynthASil, ione kalcija, neredčeno kalibracijsko plazmo, kalibracijsko plazmo redčeno 1/15 (100 µl plazme in 1.5 mL faktor diluenta), FVIII deficitno plazmo in raztopino za redčenje (faktor diluent). Po izvedenem preiskusu je aparat avtomatsko izrisal umeritveno premico. Umeritveno premico smo sprejeli, če je bil determinacijski koeficient r^2 večji od 0.98.

S kontrolnimi materiali smo izvedli postopek notranjega zagotavljanja kakovosti rezultatov, pri čemer smo uporabili normalno plazmo in specialno kontrolno 2. Če so bile vrednosti po izvedenem preiskusu v mejah ± 3 -kratne vrednosti standardnega odklona od ciljne vrednosti, ki jo predpiše proizvajalec za kontrolni material in aparat, in ki jih pridobimo iz razpona dovoljenih vrednosti v proizvajalčevih navodilih, smo nadaljevali z analizo vzorcev plazme preiskovancev. Če vrednosti niso bile znotraj predpisanih meja, smo postopek ponovili.

Vzorci plazme preiskovancev smo analizirali v dvojniku v časovnem obdobju 6 delovnih dni. Vsak dan smo analizirali serijo 8 vzorcev. Osem vzorcev plazme smo zaporedoma vstavili v nosilec za epruvete. Izvedli smo preiskusa: najprej z reagentom APTT SP in nato z reagentom APTT SynthASil ter ostalimi reagenti, ki so potrebni za določitev aktivnosti FVIII. Vzorce v nosilcu za epruvete smo prerazporedili v obratnem vrstnem redu in ponovili preiskus. Na omenjeni način smo analizirali testno in primerjalno metodo v roku 2 ur [10].

3.7. STATISTIČNI POSTOPKI

Za statistično analizo podatkov smo uporabili statistični program STATISTICA for Windows, Release 4.3, Copyright© StatSoft, Inc. 1993.

Statistična metoda, ki smo jo uporabili, je bila linearna regresija (metoda najmanjših kvadratov).

Najprej smo posebej za primerjalno (PM) in testno metodo (TM) ocenili vizuelno predstavitev ubežnikov s pomočjo regresijske kontrolne karte. Podatki na x-osi so bili povprečna vrednost dvojnikov (PM povp. ali TM povp.), na y-osi pa razlika med dvojnikoma (PM1 – PM2 ali TM1 – TM2). Ubežnike smo določili na osnovi povprečne vrednosti razlike med dvojnikoma. Vrednosti večje od ± 3 SD smo opredelili kot ubežnik in jih izločili iz analize. Postopek smo ponovili. Analizo smo ustavili, ko nismo dobili nobenega ubežnika več.

Nato smo naredili vizuelno predstavitev ubežnikov med testno in primerjalno metodo. Na x-osi so bile povprečne vrednosti testne metode (TM povp.), na y-osi je bil prikazan bias (pristranost) povprečne vrednosti testne in primerjalne metode (TM povp. – PM povp.). Ubežnike smo določili na osnovi povprečne vrednosti BIAS-a.

Vrednosti večje od ± 3 SD smo opredelili kot ubežnik in jih izločili iz analize. Postopek smo ponovili. Analizo smo ustavili, ko nismo več dobili ubežnikov.

Sledila je analiza korelacijskih ubežnikov (rezidualov) ter njihov prikaz v grafu ubežnikov. Razlike, ki so bile nad mejo ± 3 SD smo izbrisali in ponovili postopek. Ko ni bilo nobenega ubežnika več, smo naredili regresijsko premico brez ubežnikov [10]. Če je bila vrednost naklona premice linearne regresije (b) med 0.85 in 1.15 in vrednost determinacijskega koeficienta r^2 nad ali enako 0.95, je to pomenilo značilno primerljivost testne in primerjalne metode [10].

4. REZULTATI

V Specializiranem hematološkem laboratoriju kliničnega oddelka za hematologijo v Ljubljani rutinsko določajo aktivnost faktorja VIII na aparatu ACL 9000 z nefelometričnim načinom zaznave strdka in z uporabo reagentov APTT SP, faktor VIII deficitne plazme z znanim pomanjkanjem faktorja VIII in kalcijevimi ioni (poglavje 3.6.). Sodobnejši aparat ACL TOP za meritev nastanka strdka uporablja turbidimetrični način. Po proizvajalčevem zagotovitvi je reagent APTT SynthASil zelo občutljiv na pomanjkanje faktorja VIII (navodila za APTT SynthASil, junij 2006). Zato smo želeli:

1. Vpeljati določitev aktivnosti faktorja VIII na aparat ACL TOP.
2. Primerjati vrednosti aktivnosti faktorja VIII, ki jih bomo dobili na 4 načine: z uporabo aparatov ACL 9000 in ACL TOP ter dveh vrst reagentov: APTT SP in APTT SynthASil.

Analizo vzorcev smo izvedli po navodilih za izvedbo primerjave metod in aparatov NCCLS EP9-A [10].

Določitev aktivnosti faktorja VIII smo izvedli z reagentoma APTT SP ali APTT SynthASil, faktor VIII deficitno plazmo z znanim pomanjkanjem faktorja VIII ter kalcijevimi ioni na aparatih ACL 9000 in ACL TOP kot je opisano v poglavju 3.6. Na vsakem aparatu smo po proizvajalčevem navodilu za posamezen aparat naredili umeritveni diagram. Izvedli smo meritev aktivnosti faktor VIII kontrolnega materiala: normalne plazme in specialne kontrole 2 (poglavje 3.6.). Izsledke smo odčitali iz umeritvenega diagrama.

Tako testna kot primerjalna metoda morata biti v mejah kontrole kvalitete skozi ves eksperiment. Če so bile vrednosti aktivnosti faktorja VIII kontrol v območju, kot jih je predpisal proizvajalec za posamezen aparat in reagent, smo nadaljevali z analizo vzorcev.

V merilno območje smo zajeli celotno klinično pomembno območje aktivnosti faktorja VIII, ki je bilo v razponu kot kaže preglednica III. V tabeli so navedene aktivnosti faktorja VIII, ki smo jih določili z rutinsko metodo določanja aktivnosti faktorja VIII na aparatu ACL 9000 in z uporabo reagentov APTT SP, faktor VIII deficitne plazme z znanim pomanjkanjem faktorja VIII in kalcijevimi ioni.

Preglednica III: Številčna porazdelitev preiskovancev po območjih

Vrednost aktivnosti faktorja VIII (E/mL)	Do 0.01	Od 0.011 do 0.05	Od 0.051 do 0.10	Od 0.11 do 0.50	Od 0.51 do 1.20	Nad 1.20
Število preiskovancev (N=48)	3	2	3	7	24	9

V analizo smo vključili 24 zdravih preiskovancev, 10 bolnikov z von Willebrandovo boleznijo, 14 s hemofilijo A in 7 preiskovancev brez znane diagnoze. Analizirali smo jih v dvojniku v časovnem obdobju 6 delovnih dni. Vsak dan smo analizirali serijo 8 vzorcev in sicer v zaporedju od 1 do 8 ter dvojnik v zaporedju od 8 do 1. Na omenjeni način smo analizirali testno in primerjalno metodo v roku 2 ur.

Rezultate smo statistično ovrednotili z metodo linearne regresije (poglavje 3.7.).

Vrednost naklona premice linearne regresije (b) med 0.85 in 1.15 in vrednost determinacijskega koeficienta (r^2) nad ali enako 0.95, je pomenila statistično značilno primerljivost testne in primerjalne metode [10].

4.1. PONOVLJIVOST REZULTATOV KONTROLNIH MATERIALOV PRI DOLOČITVI AKTIVNOSTI FAKTORJA VIII

Meritev aktivnosti faktorja VIII kontrolnega materiala, normalne plazme in specialne kontrole 2, smo izvedli vsak dan, na aparatih ACL 9000 in ACL TOP z reagenti APTT SP ali APTT SynthASil, faktor VIII deficitno plazmo z znanim pomanjkanjem faktorja VIII in kalcijevimi ioni.

Vrednosti aktivnosti faktor VIII kontrolnega materiala so bile z omenjenimi načini merjenja (poglavje 3.6.) vsakokrat v območjih, ki jih navaja proizvajalec kontrolnega materiala za dani aparat in reagent.

Izračunali smo determinacijski koeficient vrednosti aktivnosti faktorja VIII v seriji 6-ih določitev za posamezen kontrolni material in aparat. Vrednosti prikazujeta preglednici IV in V.

Vse vrednosti aktivnosti faktorja VIII so bile v mejah, ki jih je predpisal proizvajalec za posamezen reagent in za posamezen aparat. Te meje so za aparat ACL 9000 za normalno plazmo od 0.72 do 1.12 E/mL in za specialno kontrolo 2 od 0.19 do 0.39 E/mL. Za aparat ACL TOP so bile meje za normalno plazmo od 0.67 do 1.07 E/mL in za specialno kontrolo 2 od 0.11 do 0.31 E/mL.

Vrednost koeficienta variacije za normalno plazmo pod 12 % in za specialno kontrolo 2 pod 17 % je pomenila zelo dobro ponovljivost vrednosti aktivnosti faktorja VIII med 6 določitvami za posamezen kontrolni material in aparat [15].

Preglednica IV: Ponovljivost vrednosti aktivnosti faktorja VIII v seriji 6-ih določitev na aparatu ACL 9000 z reagentoma APTT SP in APTT SynthASil

ACL 9000				
	Povp. FVIII E/mL (APTT SP)	%CV	Povp. FVIII E/mL (APTT SynthASil)	%CV
Normalna plazma (N=6)	0,86	4,8	0,84	1,4
Specialna kontrola 2 (N=6)	0,26	11,8	0,29	6,2

Povp. – povprečna vrednost

Preglednica V: Ponovljivost vrednosti aktivnosti faktorja VIII v seriji 6-ih določitev na aparatu ACL TOP z reagentoma APTT SP in APTT SynthASil

ACL TOP				
	Povp. FVIII E/mL (APTT SP)	%CV	Povp. FVIII E/mL (APTT SynthASil)	%CV
Normalna plazma (N=6)	0,85	2,0	0,84	3,8
Specialna kontrola 2 (N=6)	0,22	6,0	0,22	4,1

Povp. – povprečna vrednost

4.2. PONOVLJIVOST REZULTATOV KALIBRACIJSKIH KRIVULJ PRI DOLOČITVI AKTIVNOSTI FAKTORJA VIII

Z uporabo kalibracijske plazme smo na vsakem aparatu po proizvajalčevem navodilu za posamezen aparat naredili umeritveni diagram za določitev aktivnosti faktorja VIII v vzorcih. Ponovljivost rezultatov aktivnosti faktorja VIII v seriji 6-ih določitev izdelave kalibracijskih krivulj za določitev aktivnosti faktorja VIII prikazujeta preglednici VI in VII. V tabelah pomeni »redčitve«, redčitev kalibracijske plazme z znano vrednostjo aktivnosti faktorja VIII za posamezen aparat z raztopino za redčenje (faktor diluent).

V seriji 6-ih določitev je za reagent APTT SP za aparat ACL 9000 znašal determinacijski koeficient 0.997, koeficient variacije 0.4% za aparat ACL TOP pa je bila vrednost determinacijskega koeficieta 0.996 in koeficient variacije 0.4%.

Preglednica VI: Ponovljivost rezultatov aktivnosti faktorja VIII v seriji 6-ih določitev izdelave kalibracijskih krivulj za določitev aktivnosti faktorja VIII na aparatih ACL 9000 in ACL TOP z reagentom APTT SP

ACL 9000 (N=6)			ACL TOP (N=6)		
Redčitve kalibracijske plazme (FVIII, E/mL)	Povp. (APTT SP (s))	%CV	Redčitve kalibracijske plazme (FVIII, E/mL)	Povp. (APTT SP (s))	%CV
0,890	48,2	1,4	0,81	55,7	1,0
0,445	57,8	1,9	0,405	64,3	0,7
0,223	68,0	1,0	0,203	71,7	0,7
0,056	85,2	2,5	0,101	81,0	0,9
0,028	95,6	2,3	0,051	89,9	1,8
0,014	105,1	2,7	/	/	/

Povp. – povprečna vrednost
s - sekunde

V seriji 6-ih določitev je za reagent APTT SynthASil za aparat ACL 9000 zanšal determinacijski koeficient 0.998, koeficient variacije 0.3% za aparat ACL TOP pa je bila vrednost determinacijskega koeficieta 0.999 in koeficienta variacije 0.1%.

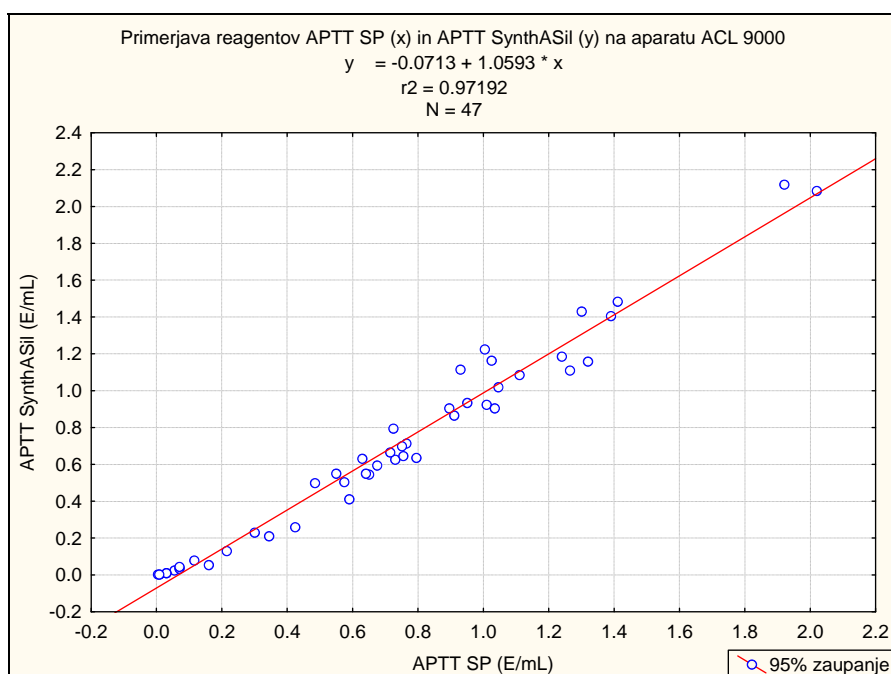
Preglednica VII: Ponovljivost rezultatov aktivnosti faktorja VIII v seriji 6-ih določitev izdelave kalibracijskih krivulj za določitev aktivnosti faktorja VIII na aparatih ACL 9000 in ACL TOP z reagentom APTT SynthASil

ACL 9000 (N=6)			ACL TOP (N=6)		
Redčitve kalibracijske plazme (FVIII, E/mL)	Povp. (APTT SynthASil (s))	%CV	Redčitve kalibracijske plazme (FVIII, E/mL)	Povp. (APTT SynthASil (s))	%CV
/	/	/	121,5	51,4	0,7
0,890	50,8	2,3	0,810	56,9	1,0
0,445	57,9	1,9	0,405	66,7	0,9
0,223	65,2	1,5	0,203	76,8	1,3
0,056	80,9	2,1	0,081	89,9	1,6
0,028	89,7	1,4	0,040	99,3	2,2
0,014	98,5	2,5	0,016	111,3	1,4
/	/	/	0,0	130,9	4,2

Povp. – povprečna vrednost
s - sekunde

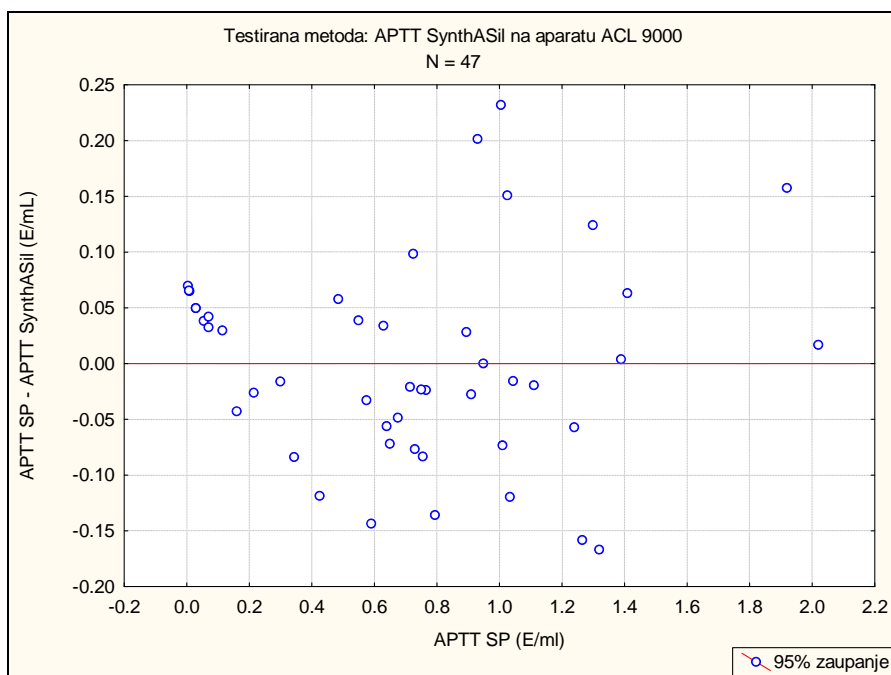
4.3. PRIMERJAVA VREDNOSTI AKTIVNOSTI FAKTORJA VIII DOBLJENIH S POMOČJO RAZLIČNIH REAGENTOV NA POSAMEZNEM APARATU

Slika 4 prikazuje primerjavo vrednosti aktivnosti faktorja VIII, dobljenih z reagentoma APTT SP in APTT SynthASil na aparatu ACL 9000. Število točk, ki smo jih uporabili za analizo linearne regresije je bilo 47. Izločili smo enega ubežnika, ki je bil nad mejo ± 3 standardnega odklona (SD) srednje vrednosti aktivnosti faktorja VIII. Dobili smo enačbo premice brez ubežnikov, ki je bila $y = -0.0713 + 1.0593 * x$. Vrednost determinacijskega koeficienta $r^2 = 0.97$. Izsledki kažejo na dobro determinacijo vrednosti aktivnosti faktorja VIII, dobljenih z reagentoma APTT SP in APTT SynthASil na aparatu ACL 9000.



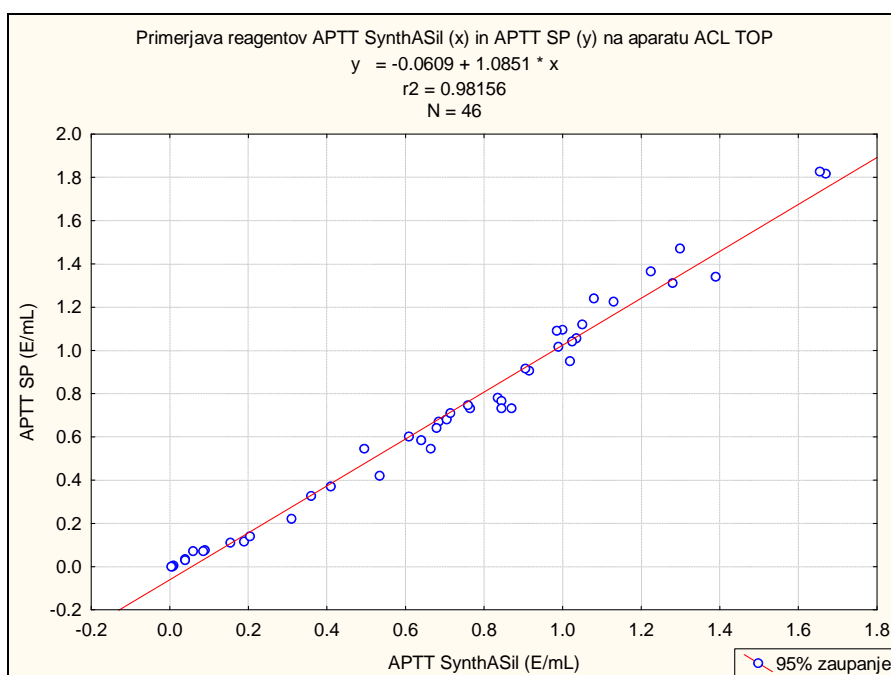
Slika 4: Primerjava vrednosti aktivnosti faktorja VIII z reagentoma APTT SP in APTT SynthASil na aparatu ACL 9000

Slika 5 prikazuje bias (pristranost) aktivnosti faktorja VIII na aparatu ACL 9000 med reagentoma APTT SP in APTT SynthASil. Iz rezultatov je razvidno, da je v nizkem območju do približno 0.10 E/mL bias (pristranost) pozitiven, kar kaže, da so vrednosti aktivnosti faktorja VIII dobljene z reagentom APTT SynthASil nižje od dobljenih vrednosti aktivnosti faktorja VIII z reagentom APTT SP. V ostalem območju vidnih odstopanj ni.



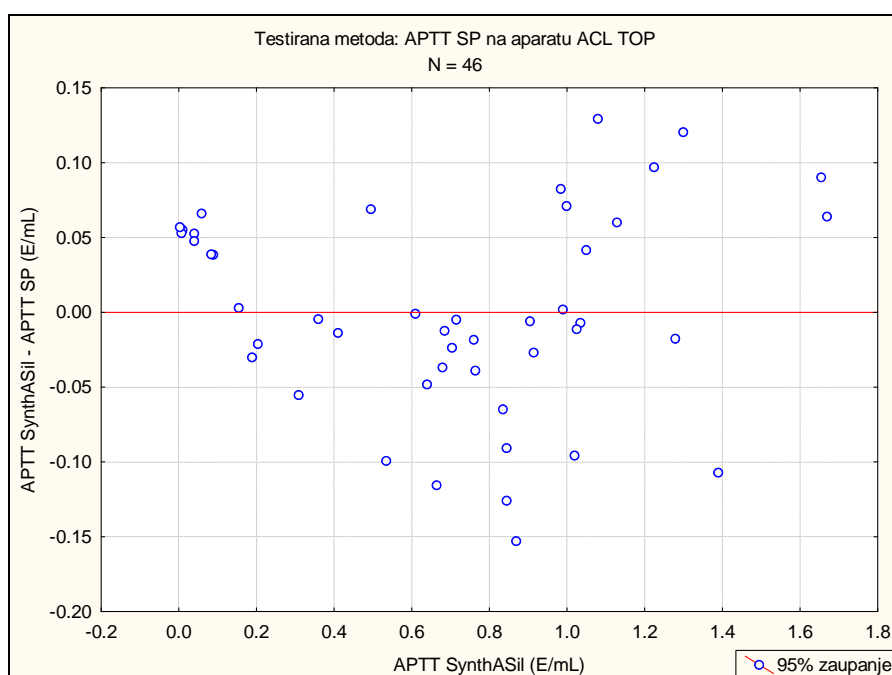
Slika 5: Bias (pristranost) aktivnosti faktorja VIII na aparatu ACL 9000 med reagentoma APTT SP in APTT SynthASil

Slika 6 prikazuje primerjavo vrednosti aktivnosti faktorja VIII, dobljenih z reagentoma APTT SynthASil in APTT SP na aparatu ACL TOP. Število točk, ki smo jih uporabili za regresijo je bilo 46. Izločili smo dva ubežnika, ki sta bila nad mejo ± 3 SD srednje vrednosti aktivnosti faktorja VIII. Dobili smo enačbo premice brez ubežnikov in sicer $y = -0.0609 + 1.0851 * x$. Vrednost determinacijskega koeficienta $r^2 = 0.98156$. Izsledki kažejo na zelo dobro determinacijo vrednosti aktivnosti faktorja VIII, dobljenih z reagentoma APTT SynthASil in APTT SP na aparatu ACL TOP.



Slika 6: Primerjava vrednosti aktivnosti faktorja VIII z reagentoma APTT SynthASil in APTT SP na aparatu ACL TOP

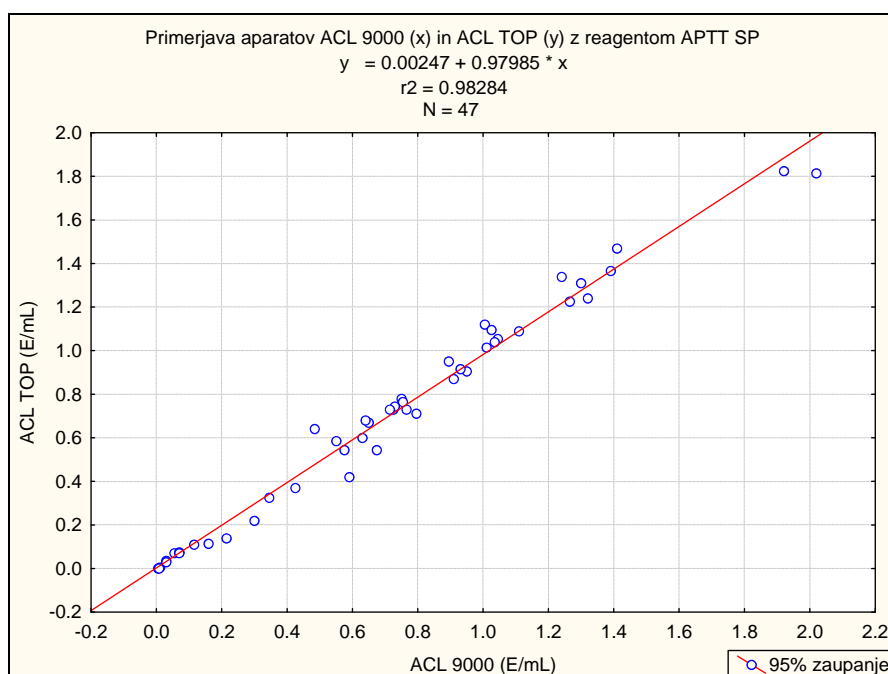
Slika 7 prikazuje bias (pristranost) aktivnosti faktorja VIII na aparatu ACL TOP med reagentoma APTT SynthASil in APTT SP. Iz rezultatov je razvidno, da je v nizkem območju do približno 0.10 E/mL bias (pristranost) pozitiven, kar kaže, da so vrednosti aktivnosti faktorja VIII dobljene z reagentom APTT SynthASil višje od dobljenih vrednosti aktivnosti faktorja VIII z reagentom APTT SP. V območju od 0.2 do 1.0 E/mL je bias (pristranost) med reagentoma APTT SynthASil in APTT SP večinoma negativen. To pomeni, da so vrednosti aktivnosti faktorja VIII dobljene z reagentom APTT SynthASil nižje od dobljenih vrednosti aktivnosti faktorja VIII z reagentom APTT SP. V ostalem območju vidnih odstopanj ni.



Slika 7: Bias (pristranost) aktivnosti faktorja VIII na aparatu ACL TOP med reagentoma APTT SynthASil in APTT SP

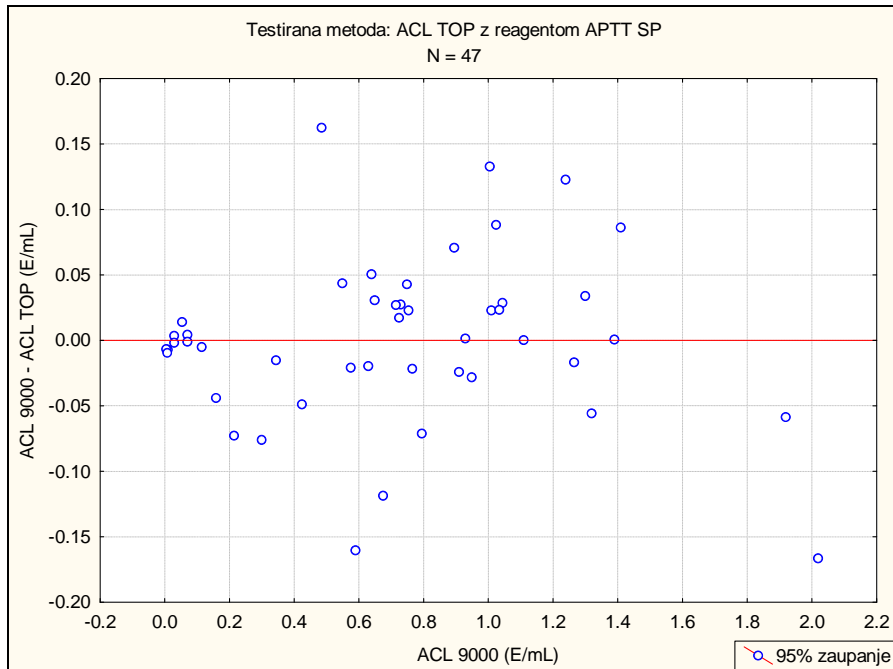
4.4. PRIMERJAVA VREDNOSTI AKTIVNOSTI FAKTORJA VIII DOBLJENIH NA RAZLIČNIH APARATIH IN S POSAMEZNM REAGENTOM

Slika 8 prikazuje primerjavo vrednosti aktivnosti faktorja VIII, dobljenih z reagentom APTT SP na dveh aparatih ACL 9000 in ACL TOP. Število točk, ki smo jih uporabili za regresijo je bilo 47. Izločili smo enega ubežnika, ki je bil nad mejo ± 3 SD srednje vrednosti aktivnosti faktorja VIII. Dobili smo enačbo premice brez ubežnikov $y = 0.00247 + 0.97985 * x$. Vrednost determinacijskega koeficienta $r^2 = 0.98$. Izsledki kažejo na zelo dobro determinacijo vrednosti aktivnosti faktorja VIII, dobljenih z reagentom APTT SP na aparatih ACL 9000 in ACL TOP.



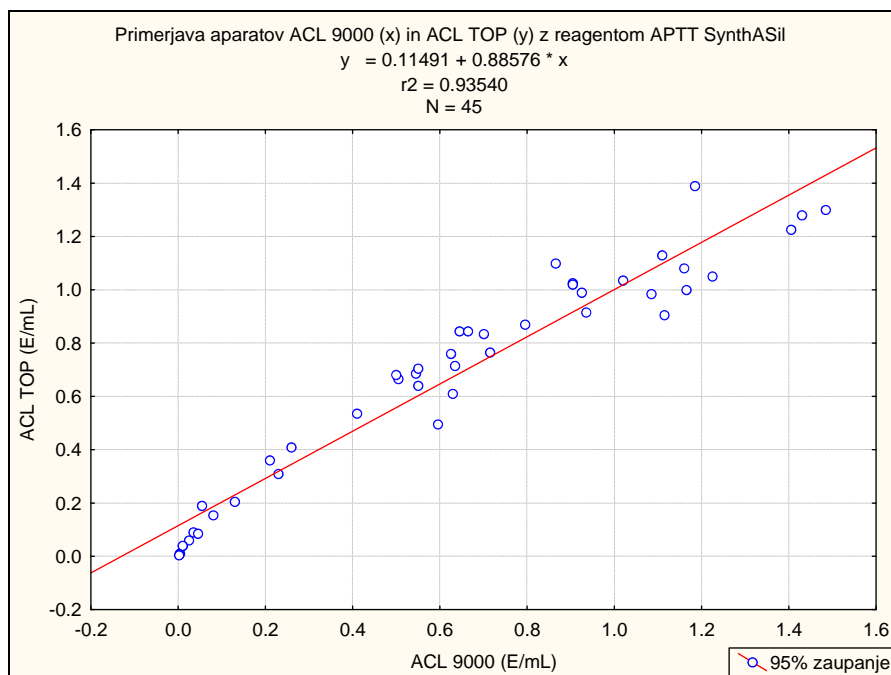
Slika 8: Primerjava vrednosti aktivnosti faktorja VIII z reagentom APTT SP na aparatih ACL 9000 in ACL TOP

Slika 9 prikazuje bias (pristranost) aktivnosti faktorja VIII z reagentom APTT SP med aparatoma ACL 9000 in ACL TOP. Iz grafa je razvidno, da so rezultati enakomerno razporejeni skozi celotno koncentracijsko območje.



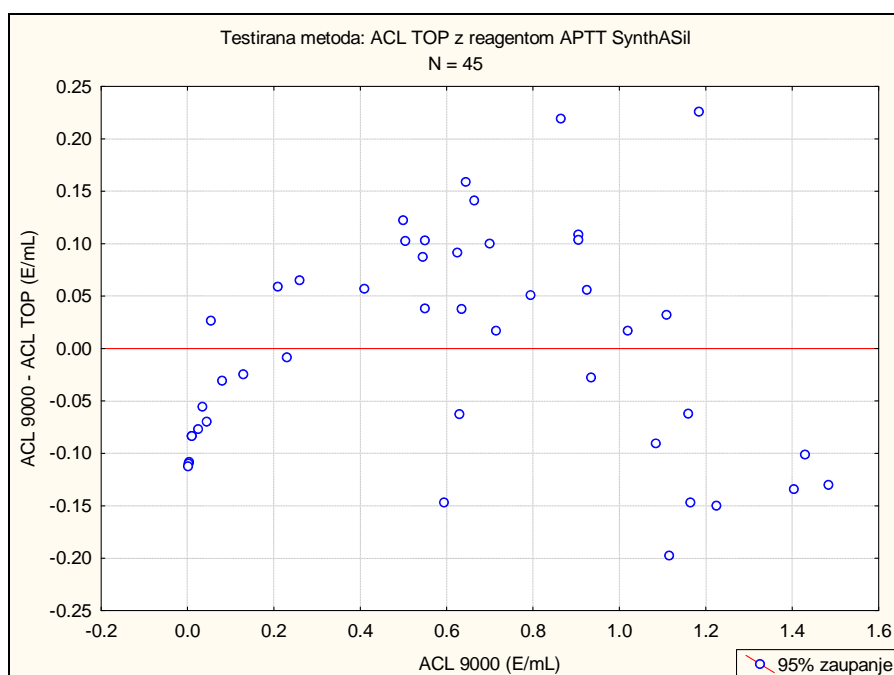
Slika 9: Bias (pristranost) aktivnosti faktorja VIII z reagentom APTT SP med aparatoma ACL 9000 in ACL TOP

Slika 10 prikazuje primerjavo vrednosti aktivnosti faktorja VIII, dobljenih z reagentom APTT SynthASil na dveh aparatih ACL 9000 in ACL TOP. Število točk, ki smo jih uporabili za regresijo je bilo 45. Izločili smo tri ubežnike, ki so bili nad mejo ± 3 SD. srednje vrednosti aktivnosti faktorja VIII. Dobili smo enačbo premice brez ubežnikov $y = 0.11491 + 0.88576 * x$. Vrednost determinacijskega koeficienta $r^2 = 0.94$.



Slika 10: Primerjava vrednosti aktivnosti faktorja VIII z reagentom APTT SynthASil na aparatih ACL 9000 in ACL TOP

Slika 11 prikazuje bias (pristranost) aktivnosti faktorja VIII z reagentom APTT SynthASil med aparatoma ACL 9000 in ACL TOP. Iz grafa je razvidno, da je bias (pristranost) aktivnosti faktorja VIII v zelo nizkem območju do približno 0.05 E/mL večinoma negativen, kar kaže, da smo z aparatom ACL TOP dobili višje vrednosti kot z aparatom ACL 9000. V območju od 0.2 do 1.0 E/mL je bias (pristranost) aktivnosti faktorja VIII večinoma pozitiven, kar pomeni, da aparat ACL TOP daje nižje vrednosti kot aparat ACL 9000.



Slika 11: Bias (pristranost) aktivnosti faktorja VIII z reagentom APTT SynthASil med aparatoma ACL 9000 in ACL TOP

4.5. SKLADNOST VREDNOSTI AKTIVNOSTI FAKTORJA VIII DOBLJENIH NA RAZLIČNIH APARATIH IN Z RAZLIČNIMI REAGENTI

Preglednica VIII prikazuje skladnost rezultatov dobljenih z reagenti APTT SP in APTT SynthASil na aparatih ACL 9000 in ACL TOP glede na določen interval aktivnosti faktorja VIII. Intervali v preglednici so narejeni z upoštevanjem klinično pomembnih opredelitev za določitev oblike hefmofilije A (preglednica II, poglavje 1.4.). Ugotovili smo, da sta določitvi aktivnosti faktorja VIII glede na klinično pomembno odločitev o opredelitvi oblike hemofilije A z aparatom ACL 9000 in reagentom APTT SP ter aparatom ACL TOP in reagentom APTT SynthASil 100 % skladni.

Preglednica VIII: Število preiskovancev z vrednostjo faktorja VIII v različnih meritvenih območjih

Metoda	Do 0.01 E/mL	Od 0.011 do 0.05 E/mL	Od 0.051 do 0.10 E/mL	Od 0.11 do 0.50 E/mL	Od 0.51 do 1.20 E/mL	Nad 1.20 E/mL
ACL 9000 APTT SP (N = 48)	3	2	3	7	24	9
ACL 9000 APTT SynthASil (N = 48)	5	3	2	5	26	7
ACL TOP APTT SP (N = 48)	3	2	3	6	25	9
ACL TOP APTT SynthASil (N = 48)	3	2	3	7	26	7

5. RAZPRAVA

Določitev aktivnosti faktorja VIII opravimo pri sumu na pridobljeno ali prirojeno znižano aktivnost koagulacijskega faktorja VIII, ko ugotovimo podaljšan parcialni tromboplastinski čas in pri spremljanju zdravljenja s pripravki koagulacijskega faktorja VIII. Za opredelitev bolezni hemofilije A je določitev aktivnosti faktorja VIII zelo pomembna, še posebej pri hudi obliki, ki je opredeljena z aktivnostjo faktorja VIII do 0.01 E/mL. Reagenti, ki se uporabljajo za določitev aktivnosti faktorja VIII niso enako občutljivi na njegovo pomanjkanje. Na lastnost preiskave lahko vpliva tudi izbira načina detekcije nastanka strdka, ki je v laboratorijih za hemostazo običajno nefelometrična ali turbidimetrična.

Po podatkih iz slovstva sta oba, v raziskavi uporabljena reagentna, primerna za opredelitev hemofilije A [8], vendar natančnih podatkov za aparata, razen tistih od proizvajalca, nismo imeli na razpolago.

Ugotovili smo, da je reagent APTT SynthASil primeren za določitev aktivnosti faktorja VIII na aparatu ACL TOP v celotnem meritvenem območju. Po drugi strani z reagentom APTT SP na aparatu ACL TOP v meritvenem območju do 0.05 E/mL dobimo nižje vrednosti kot z reagentom APTT SynthASil (poglavje 4.3., slika 7). To smo pripisali dejstvu, da je v tem območju preiskava nenatančna, ker je najnižja točka umeritvenega diagrama za določitev aktivnosti faktorja VIII pri preiskavi z reagentom APTT SP 0.05 E/mL. Pri preiskavi z reagentom APTT SynthASil je najnižja točka umeritvenega diagrama za določitev aktivnosti faktorja VIII 0.00 E/mL.

Ugotovili smo tudi, da je testiran način določitve aktivnosti faktorja VIII z reagentom APTT SP na aparatu ACL TOP primerljiv z primerjanim načinom določitve aktivnosti faktorja VIII na aparatu ACL 9000 in reagentom APTT SP v celotnem meritvenem območju. Nekoliko nepričakovano pa smo ugotovili, da je bila vrednost determinacijskega koeficienta pri primerjavi določitve aktivnosti faktorja VIII z reagentom APTT SynthASil na aparatih ACL 9000 in ACL TOP celo nižja od pričakovane ($r^2 \geq 0.95$). Menimo, da bi bilo v prihodnosti primerjavo potrebno ponoviti (slika 10).

Za klinično prakso je pomembna opredelitev oblike hemofilije A (poglavje 1.4., preglednica II). Zato je za odločitev o primernosti načina določitve aktivnosti faktorja VIII v območjih klinične pomembnosti, pomembna skladnost izsledkov. Ugotovili smo, da sta določitvi aktivnosti faktorja VIII glede na klinično pomembno odločitev o opredelitvi oblike hemofilije A z aparatom ACL 9000 in reagentom APTT SP ter aparatom ACL TOP in reagentom APTT SynthASil 100 % skladni (poglavje 4.4.). Ta načina smo izbrali kot primerjalni metodi za določitev aktivnosti faktorja VIII (poglavje 2.) in potrjujeta izsledke, ki smo jih dobili pri primerjavi.

Iz vseh izsledkov lahko zaključimo, da za vse klinično pomembne namene lahko na aparatu ACL 9000 za določitev aktivnosti faktorja VIII uporabimo reagent APTT SP in na aparatu ACL TOP reagent APTT SynthASil.

6. SKLEPI

1. Vpeljali smo nov način določitve aktivnosti faktorja VIII z reagentoma APTT SynthASil in APTT SP na aparatu ACL TOP, ki za merjenje nastanka strdka uporablja turbidimetrični način.
2. Ugotovili smo, da je za vse klinično pomembne namene najprimernejši način določitve aktivnosti faktorja VIII:
 - na aparatu ACL 9000 z uporabo reagenta APTT SP
 - in
 - na aparatu ACL TOP z uporabo reagenta APTT SynthASil.

7. LITERATURA

1. Stegnar M: Prepoznavanje motenj hemostaze z laboratorijskimi metodami, *Littera picta*, 2005: 9-51.
2. Laffan M.A, Minning R.A: Investigation of haemostasis. V: Dacie and Lewis: *Practical haematology*, ninth edition, Churchill livingstone, 2001: 339-367.
3. Andoljšek, D, Preložnik Zupan, I: Hemostaza. V: Kocjančič A, Mravlje F, Štajer D: *Interna medicina*, 3. izd., DZS, Ljubljana, 2005: 1286-1301.
4. Andoljšek D: Motnje koagulacije krvi. V: A, Mravlje F, Štajer D: *Interna medicina*, 3. izd., DZS, Ljubljana, 2005: 1302-1314.
5. <http://emedicine.medscape.com/article/201319>
6. Fay P.J: Factor VIII Structure and function. *International journal of hematology* 2006; 83: 103-108.
7. Saenko E.L, Ananyeva N, Kouiyavskaja D, Schwinn H, Josic D, Shima M, Hauser C.A.E, Pipe Et S: Molecular defects in coagulation Factor VIII and their impact on Factor VIII function. *Vox Sanguinis*, 2002; 83: 89-96.
8. Fang H, Wang L, Wang H: The protein structure and effect of factor VIII. *Thrombosis research* 2007; 119: 1-13.
9. Verbruggen B, Meijer P, Nova Knova I, Van Heerde: Diagnosis of factor VIII deficiency. *Haemophilia*, 2008; 14: 76-82.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Method comparison and bias estimation using patient samples, approved guideline. NCCLS publication EP9-A, 1995; NCCLS, Villanova, PA
11. Priložena navodila: ACL TOP proizvajalca Instrumentation Laboratory
12. Appert-Flory A, Fischer F, Jambou D, Toulon P: Evaluation and performance characteristics of the automated coagulation analyzer ACL TOP. *Thrombosis research* 2007; 120: 733-743.
13. Milos M, Herak D, Kuric L, Horvat I, Zadro R: Evaluation and performance characteristics of the coagulation system: ACL TOP analyzer – HemosIL reagents. *International journal of laboratory hematology*, 2009, 31: 26-35.
14. Priložena navodila: ACL 9000 proizvajalca Instrumentation Laboratory
15. Product information, N 400, January 2006, 1-29.

8. PRILOGE

Podatki, uporabljeni v diplomski nalogi.

Preglednica 1: ACL 9000, TM-APTT SynthASil, PM-APTT SP

TM1	TM2	TM 1 - TM2	TM-povp.	PM1	PM2	PM1 - PM2	PM-povp.	PM pov - TM pov
0,72	0,47	0,25	0,60	0,74	0,61	0,13	0,68	0,08
2,29	1,88	0,41	2,09	2,17	1,87	0,30	2,02	-0,07
1,05	0,80	0,25	0,93	1,08	0,94	0,14	1,01	0,08
1,02	0,85	0,17	0,94	1,01	0,89	0,12	0,95	0,01
0,03	0,02	0,01	0,03	0,05	0,06	-0,01	0,06	0,03
0,25	0,21	0,04	0,23	0,32	0,28	0,04	0,30	0,07
0,004	0,004	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01
0,91	0,68	0,23	0,80	0,73	0,72	0,01	0,73	-0,07
2,39	1,85	0,54	2,12	2,04	1,80	0,24	1,92	-0,20
1,43	1,38	0,05	1,41	1,46	1,32	0,14	1,39	-0,02
3,97	3,59	0,38	3,78	3,53	3,41	0,12	3,47	-0,31
1,17	1,15	0,02	1,16	1,32	1,32	0,00	1,32	0,16
0,01	0,01	0,00	0,01	0,03	0,03	0,00	0,03	0,02
0,10	0,01	0,09	0,06	0,16	0,16	0,00	0,16	0,10
0,39	0,43	-0,04	0,41	0,59	0,59	0,00	0,59	0,18
1,07	1,15	-0,08	1,11	1,25	1,28	-0,03	1,27	0,16
0,04	0,03	0,01	0,04	0,08	0,06	0,02	0,07	0,00
1,08	0,96	0,12	1,02	1,09	1,00	0,09	1,05	0,03
0,01	0,01	0,00	0,01	0,03	0,03	0,00	0,03	0,02
0,52	0,49	0,03	0,51	0,56	0,59	-0,03	0,58	0,07
0,72	0,71	0,01	0,72	0,76	0,77	-0,01	0,77	0,05
0,25	0,27	-0,02	0,26	0,41	0,44	-0,03	0,43	0,17
1,39	1,47	-0,08	1,43	1,25	1,35	-0,10	1,30	-0,13
0,88	0,93	-0,05	0,91	0,98	1,09	-0,11	1,04	0,13
1,33	1,12	0,21	1,23	1,06	0,95	0,11	1,01	-0,22
0,63	0,62	0,01	0,63	0,76	0,70	0,06	0,73	0,10
0,61	0,65	-0,04	0,63	0,62	0,64	-0,02	0,63	0,00
0,66	0,74	-0,08	0,70	0,74	0,76	-0,02	0,75	0,05
0,003	0,003	0,00	0,00	0,006	0,003	0,00	0,00	0,00
0,08	0,08	0,00	0,08	0,11	0,12	-0,01	0,12	0,04
0,51	0,58	-0,07	0,55	0,61	0,69	-0,08	0,65	0,10
1,10	1,23	-0,13	1,17	0,97	1,08	-0,11	1,03	-0,14
1,12	1,05	0,07	1,09	1,15	1,07	0,08	1,11	0,02
1,51	1,46	0,05	1,49	1,42	1,40	0,02	1,41	-0,08
0,54	0,56	-0,02	0,55	0,64	0,64	0,00	0,64	0,09
0,54	0,56	-0,02	0,55	0,56	0,54	0,02	0,55	0,00
0,002	0,002	0,00	0,00	0,008	0,007	0,00	0,01	0,01
0,12	0,14	-0,02	0,13	0,22	0,21	0,01	0,22	0,09
0,65	0,64	0,01	0,65	0,75	0,76	-0,01	0,76	0,11
0,62	0,65	-0,03	0,64	0,77	0,82	-0,05	0,80	0,16
0,96	0,77	0,19	0,87	0,94	0,88	0,06	0,91	0,04
1,17	1,06	0,11	1,12	0,95	0,91	0,04	0,93	-0,19
0,93	0,88	0,05	0,91	0,88	0,91	-0,03	0,90	-0,01

0,67	0,66	0,01	0,67	0,71	0,72	-0,01	0,72	0,05
0,04	0,05	-0,01	0,05	0,06	0,08	-0,02	0,07	0,02
0,21	0,21	0,00	0,21	0,33	0,36	-0,03	0,35	0,14
0,50	0,50	0,00	0,50	0,47	0,50	-0,03	0,49	-0,01
1,17	1,20	-0,03	1,19	1,18	1,30	-0,12	1,24	0,05

TM-testna metoda, PM-primerjalna metoda

Preglednica 2: ACL TOP, TM-APTT SP, PM-APTT SynthASil

TM1	TM2	TM 1 - TM2	TM-povp.	PM1	PM2	PM1 - PM2	PM-povp.	PM pov - TM pov
0,55	0,54	0,01	0,55	0,51	0,48	0,03	0,50	-0,05
1,85	1,78	0,07	1,82	1,71	1,63	0,08	1,67	-0,15
1,04	0,99	0,05	1,02	1,02	0,96	0,06	0,99	-0,03
0,89	0,92	-0,03	0,91	0,94	0,89	0,05	0,92	0,01
0,07	0,07	0,00	0,07	0,06	0,06	0,00	0,06	-0,01
0,22	0,22	0,00	0,22	0,30	0,32	-0,02	0,31	0,09
0,00	0,01	-0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00
0,73	0,73	0,00	0,73	0,87	0,87	0,00	0,87	0,14
1,86	1,79	0,07	1,83	1,67	1,64	0,03	1,66	-0,17
1,40	1,33	0,07	1,37	1,26	1,19	0,07	1,23	-0,14
3,21	3,05	0,16	3,13	2,51	2,26	0,25	2,39	-0,74
1,26	1,22	0,04	1,24	1,07	1,09	-0,02	1,08	-0,16
0,03	0,04	-0,01	0,04	0,04	0,04	0,00	0,04	0,00
0,12	0,11	0,01	0,12	0,19	0,19	0,00	0,19	0,07
0,43	0,41	0,02	0,42	0,55	0,52	0,03	0,54	0,12
1,23	1,22	0,01	1,23	1,13	1,13	0,00	1,13	-0,10
0,07	0,08	-0,01	0,08	0,09	0,09	0,00	0,09	0,01
1,05	1,06	-0,01	1,06	1,03	1,04	-0,01	1,04	-0,02
0,03	0,03	0,00	0,03	0,04	0,04	0,00	0,04	0,01
0,54	0,55	-0,01	0,55	0,68	0,65	0,03	0,67	0,12
0,74	0,72	0,02	0,73	0,75	0,78	-0,03	0,77	0,04
0,38	0,36	0,02	0,37	0,40	0,42	-0,02	0,41	0,04
1,33	1,29	0,04	1,31	1,27	1,29	-0,02	1,28	-0,03
1,06	1,02	0,04	1,04	1,06	0,99	0,07	1,03	-0,01
1,13	1,11	0,02	1,12	1,07	1,03	0,04	1,05	-0,07
0,78	0,71	0,07	0,75	0,78	0,74	0,04	0,76	0,01
0,63	0,57	0,06	0,60	0,64	0,58	0,06	0,61	0,01
0,80	0,76	0,04	0,78	0,88	0,79	0,09	0,84	0,06
0,00	0,00	0,00	0,00	0,008	0,007	0,00	0,01	0,01
0,11	0,11	0,00	0,11	0,16	0,15	0,01	0,16	0,05
0,67	0,67	0,00	0,67	0,69	0,68	0,01	0,69	0,02
1,09	1,10	-0,01	1,10	1,04	0,96	0,08	1,00	-0,10
1,13	1,05	0,08	1,09	0,99	0,98	0,01	0,99	-0,10
1,52	1,42	0,10	1,47	1,36	1,24	0,12	1,30	-0,17
0,70	0,66	0,04	0,68	0,76	0,65	0,11	0,71	0,03
0,61	0,56	0,05	0,59	0,66	0,62	0,04	0,64	0,05
0,00	0,00	0,00	0,00	0,006	0,002	0,00	0,00	0,00
0,14	0,14	0,00	0,14	0,20	0,21	-0,01	0,21	0,07
0,78	0,75	0,03	0,77	0,86	0,83	0,03	0,85	0,08
0,71	0,71	0,00	0,71	0,73	0,70	0,03	0,72	0,01

0,93	0,81	0,12	0,87	0,86	1,34	-0,48	1,10	0,23
0,94	0,89	0,05	0,92	0,94	0,87	0,07	0,91	-0,01
0,98	0,92	0,06	0,95	1,02	1,02	0,00	1,02	0,07
0,76	0,70	0,06	0,73	0,86	0,83	0,03	0,85	0,12
0,07	0,07	0,00	0,07	0,08	0,09	-0,01	0,09	0,02
0,32	0,33	-0,01	0,33	0,35	0,37	-0,02	0,36	0,03
0,64	0,64	0,00	0,64	0,68	0,68	0,00	0,68	0,04
1,34	1,34	0,00	1,34	1,45	1,33	0,12	1,39	0,05

TM-testna metoda, PM-primerjalna metoda

Preglednica 3: APTT SP, TM-ACL TOP, PM-ACL 9000

TM1	TM2	TM 1 - TM2	TM-povp.	PM1	PM2	PM1 - PM2	PM-povp.	PM pov - TM pov
0,55	0,54	0,01	0,55	0,74	0,61	0,13	0,68	0,13
1,85	1,78	0,07	1,82	2,17	1,87	0,30	2,02	0,20
1,04	0,99	0,05	1,02	1,08	0,94	0,14	1,01	-0,01
0,89	0,92	-0,03	0,91	1,01	0,89	0,12	0,95	0,04
0,07	0,07	0,00	0,07	0,05	0,06	-0,01	0,06	-0,01
0,22	0,22	0,00	0,22	0,32	0,28	0,04	0,30	0,08
0,00	0,01	-0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00
0,73	0,73	0,00	0,73	0,73	0,72	0,01	0,73	0,00
1,86	1,79	0,07	1,83	2,04	1,80	0,24	1,92	0,09
1,40	1,33	0,07	1,37	1,46	1,32	0,14	1,39	0,02
3,21	3,05	0,16	3,13	3,53	3,41	0,12	3,47	0,34
1,26	1,22	0,04	1,24	1,32	1,32	0,00	1,32	0,08
0,03	0,04	-0,01	0,04	0,03	0,03	0,00	0,03	-0,01
0,12	0,11	0,01	0,12	0,16	0,16	0,00	0,16	0,04
0,43	0,41	0,02	0,42	0,59	0,59	0,00	0,59	0,17
1,23	1,22	0,01	1,23	1,25	1,28	-0,03	1,27	0,04
0,07	0,08	-0,01	0,08	0,08	0,06	0,02	0,07	-0,01
1,05	1,06	-0,01	1,06	1,09	1,00	0,09	1,05	-0,01
0,03	0,03	0,00	0,03	0,03	0,03	0,00	0,03	0,00
0,54	0,55	-0,01	0,55	0,56	0,59	-0,03	0,58	0,03
0,74	0,72	0,02	0,73	0,76	0,77	-0,01	0,77	0,04
0,38	0,36	0,02	0,37	0,41	0,44	-0,03	0,43	0,06
1,33	1,29	0,04	1,31	1,25	1,35	-0,10	1,30	-0,01
1,06	1,02	0,04	1,04	0,98	1,09	-0,11	1,04	0,00
1,13	1,11	0,02	1,12	1,06	0,95	0,11	1,01	-0,11
0,78	0,71	0,07	0,75	0,76	0,70	0,06	0,73	-0,02
0,63	0,57	0,06	0,60	0,62	0,64	-0,02	0,63	0,03
0,80	0,76	0,04	0,78	0,74	0,76	-0,02	0,75	-0,03
0,00	0,00	0,00	0,00	0,006	0,003	0,00	0,00	0,00
0,11	0,11	0,00	0,11	0,11	0,12	-0,01	0,12	0,01
0,67	0,67	0,00	0,67	0,61	0,69	-0,08	0,65	-0,02
1,09	1,10	-0,01	1,10	0,97	1,08	-0,11	1,03	-0,07
1,13	1,05	0,08	1,09	1,15	1,07	0,08	1,11	0,02
1,52	1,42	0,10	1,47	1,42	1,40	0,02	1,41	-0,06
0,7	0,66	0,04	0,68	0,64	0,64	0,00	0,64	-0,04
0,61	0,56	0,05	0,59	0,56	0,54	0,02	0,55	-0,04
0,00	0,00	0,00	0,00	0,008	0,007	0,00	0,01	0,01

0,14	0,14	0,00	0,14	0,22	0,21	0,01	0,22	0,08
0,78	0,75	0,03	0,77	0,75	0,76	-0,01	0,76	-0,01
0,71	0,71	0,00	0,71	0,77	0,82	-0,05	0,80	0,09
0,93	0,81	0,12	0,87	0,94	0,88	0,06	0,91	0,04
0,94	0,89	0,05	0,92	0,95	0,91	0,04	0,93	0,01
0,98	0,92	0,06	0,95	0,88	0,91	-0,03	0,90	-0,05
0,76	0,70	0,06	0,73	0,71	0,72	-0,01	0,72	-0,01
0,07	0,07	0,00	0,07	0,06	0,08	-0,02	0,07	0,00
0,32	0,33	-0,01	0,33	0,33	0,36	-0,03	0,35	0,02
0,64	0,64	0,00	0,64	0,47	0,50	-0,03	0,49	-0,15
1,34	1,34	0,00	1,34	1,18	1,30	-0,12	1,24	-0,10

TM-testna metoda, PM-primerjalna metoda

Preglednica 4: APTT SynthASil, TM-ACL TOP, PM-ACL 900

TM1	TM2	TM 1 - TM2	TM-povp.	PM1	PM2	PM1 - PM2	PM-povp.	PM pov - TM pov
0,51	0,48	0,03	0,50	0,72	0,47	0,25	0,60	0,10
1,71	1,63	0,08	1,67	2,29	1,88	0,41	2,09	0,42
1,02	0,96	0,06	0,99	1,05	0,80	0,25	0,93	-0,06
0,94	0,89	0,05	0,92	1,02	0,85	0,17	0,94	0,02
0,06	0,06	0,00	0,06	0,03	0,02	0,01	0,03	-0,03
0,30	0,32	-0,02	0,31	0,25	0,21	0,04	0,23	-0,08
0,01	0,01	0,00	0,01	0,004	0,004	0,00	0,00	-0,01
0,87	0,87	0,00	0,87	0,91	0,68	0,23	0,80	-0,07
1,67	1,64	0,03	1,66	2,39	1,85	0,54	2,12	0,46
1,26	1,19	0,07	1,23	1,43	1,38	0,05	1,41	0,18
2,51	2,26	0,25	2,39	3,97	3,59	0,38	3,78	1,39
1,07	1,09	-0,02	1,08	1,17	1,15	0,02	1,16	0,08
0,04	0,04	0,00	0,04	0,01	0,01	0,00	0,01	-0,03
0,19	0,19	0,00	0,19	0,10	0,01	0,09	0,06	-0,13
0,55	0,52	0,03	0,54	0,39	0,43	-0,04	0,41	-0,13
1,13	1,13	0,00	1,13	1,07	1,15	-0,08	1,11	-0,02
0,09	0,09	0,00	0,09	0,04	0,03	0,01	0,04	-0,05
1,03	1,04	-0,01	1,04	1,08	0,96	0,12	1,02	-0,02
0,04	0,04	0,00	0,04	0,01	0,01	0,00	0,01	-0,03
0,68	0,65	0,03	0,67	0,52	0,49	0,03	0,51	-0,16
0,75	0,78	-0,03	0,77	0,72	0,71	0,01	0,72	-0,05
0,40	0,42	-0,02	0,41	0,25	0,27	-0,02	0,26	-0,15
1,27	1,29	-0,02	1,28	1,39	1,47	-0,08	1,43	0,15
1,06	0,99	0,07	1,03	0,88	0,93	-0,05	0,91	-0,12
1,07	1,03	0,04	1,05	1,33	1,12	0,21	1,23	0,18
0,78	0,74	0,04	0,76	0,63	0,62	0,01	0,63	-0,13
0,64	0,58	0,06	0,61	0,61	0,65	-0,04	0,63	0,02
0,88	0,79	0,09	0,84	0,66	0,74	-0,08	0,70	-0,14
0,008	0,007	0,00	0,01	0,003	0,003	0,00	0,00	-0,01
0,16	0,15	0,01	0,16	0,08	0,08	0,00	0,08	-0,08
0,69	0,68	0,01	0,69	0,51	0,58	-0,07	0,55	-0,14
1,04	0,96	0,08	1,00	1,10	1,23	-0,13	1,17	0,17
0,99	0,98	0,01	0,99	1,12	1,05	0,07	1,09	0,10
1,36	1,24	0,12	1,30	1,51	1,46	0,05	1,49	0,19

0,76	0,65	0,11	0,71	0,54	0,56	-0,02	0,55	-0,16
0,66	0,62	0,04	0,64	0,54	0,56	-0,02	0,55	-0,09
0,006	0,002	0,00	0,00	0,002	0,002	0,00	0,00	0,00
0,20	0,21	-0,01	0,21	0,12	0,14	-0,02	0,13	-0,08
0,86	0,83	0,03	0,85	0,65	0,64	0,01	0,65	-0,20
0,73	0,70	0,03	0,72	0,62	0,65	-0,03	0,64	-0,08
0,86	1,34	-0,48	1,10	0,96	0,77	0,19	0,87	-0,23
0,94	0,87	0,07	0,91	1,17	1,06	0,11	1,12	0,21
1,02	1,02	0,00	1,02	0,93	0,88	0,05	0,91	-0,11
0,86	0,83	0,03	0,85	0,67	0,66	0,01	0,67	-0,18
0,08	0,09	-0,01	0,09	0,04	0,05	-0,01	0,05	-0,04
0,35	0,37	-0,02	0,36	0,21	0,21	0,00	0,21	-0,15
0,68	0,68	0,00	0,68	0,50	0,50	0,00	0,50	-0,18
1,45	1,33	0,12	1,39	1,17	1,20	-0,03	1,19	-0,20

TM-testna metoda, PM-primerjalna metoda