

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

INES KRALJ

**VZPOSTAVITEV, VALIDACIJA IN PRIMERJALNO VREDNOTENJE NOVE
ANALIZNE METODE ZA DOLOČANJE AKTIVNOSTI FAKTORJA
STRJEVANJA KRVİ Xa PRI PACIENTIH NA TERAPIJI Z RIVAROKSABANOM**

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

INES KRALJ

**VZPOSTAVITEV, VALIDACIJA IN PRIMERJALNO VREDNOTENJE NOVE
ANALIZNE METODE ZA DOLOČANJE AKTIVNOSTI FAKTORJA
STRJEVANJA KRVİ Xa PRI PACIENTIH NA TERAPIJI Z RIVAROKSABANOM**

**ESTABLISHMENT, VALIDATION AND COMPARATIVE EVALUATION OF A
NEW ANALYTICAL METHOD FOR DETERMINING THE ACTIVITY OF
BLOOD COAGULATION FACTOR Xa IN PATIENTS ON THERAPY WITH
RIVAROXABAN**

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2014

Magistrsko nalogo sem opravila na Oddelku za laboratorijsko diagnostiko v Splošni bolnišnici Slovenj Gradec, pod vodstvom delovne mentorice Tanje Ladić univ. dipl. kem., spec. med. biokem.

ZAHVALA

Zahvaljujem se delovni mentorici Tanji Ladić univ. dipl. kem., spec. med. biokem., ki mi je omogočila izvedbo magistrske naloge. Velika zahvala gre tudi gospe dr. Mojci Božič univ.dipl.biol., spec. med. biokem., ki mi je na Kliničnem oddelku za žilne bolezni (KOŽB) UKC Ljubljana pomagala z meritvami na analizatorju CS – 2100i. Posebna zahvala velja tudi prof. dr. Matjažu Jerasu mag. farm., kot glavnemu mentorju magistrske naloge, ki mi je nudil strokovno podporo in praktične nasvete glede njene izvedbe.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja prof. dr. Matjaža Jerasa mag. farm. in somentorstvom Tanje Ladić univ. dipl. kem., spec. med. biokem.

Ines Kralj

Podpis:

Predsednik magistrske komisije: izr. prof. dr. Iztok Grabnar

Član magistrske komisije: doc. dr. Janez Mravljak

Ljubljana, 2014

KAZALO VSEBINE

1	UVOD.....	1
1.1	FAKTOR Xa.....	1
1.2	HEMOSTAZA.....	1
1.2.1	PRIMARNA HEMOSTAZA	2
1.2.2	SEKUNDARNA HEMOSTAZA	3
1.3	RIVAROKSABAN.....	6
1.4	INDIKACIJE ZA ZDRAVLJENJE.....	8
1.5	MERJENJE AKTIVNOSTI FXa.....	10
1.5.1	AKTIVNOST ANTI-Xa.....	10
1.5.2	PROTROMBINSKI ČAS (PČ) - MERITEV Z NEOPLASTINOM	11
1.6	POSTOPKI PRI VPELJEVANJU NOVIH ANALITSKIH METOD.....	11
1.6.1	PRIMERJAVA METOD.....	12
1.7	PRAVILEN ODVZEM KRVI.....	13
2	NAMEN DELA.....	15
3	MATERIALI IN METODE	16
3.1	ODVZEM KRVI.....	16
3.2	MERJENJE AKTIVNOSTI FXa Z ANALIZATORJEM BCS XP	16
3.2.1	REAGENTI.....	16
3.2.2	KONTROLE KAKOVOSTI	17
3.2.3	PRINCIP MERJENJA.....	18
3.3	MERJENJE AKTIVNOSTI FXa NA ANALIZATORJU CS – 2100i.....	22
3.3.1	REAGENTI IN KONTROLE	22
3.3.2	PRINCIP MERJENJA.....	22
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	24

4.1	OCENA KAKOVOSTI MERITEV KONTROLNIH VZORCEV Z ANALIZATORJEM BCS XP	24
4.2	OCENA KAKOVOSTI MERITEV KONTROLNIH VZORCEV Z ANALIZATORJEM CS – 2100i.....	26
4.3	MERITVE VZORCEV.....	26
4.3.1	PREVERJANJE NORMALNOSTI PORAZDELITVE MERITEV.....	29
4.3.2	PRIMERJAVA MERITEV MED ANALIZATORJEMA	30
4.4	MERITVE VZORCEV ZNOTRAJ DIAGNOSTIČNO POMEMBNEGA INTERVALA	35
5	LITERATURA	40
6	PRILOGE	42

KAZALO SLIK

Slika 1.1: Koagulacijska kaskada	4
Slika 1.2: Shematski prikaz fibrinolize.....	6
Slika 1.3: Struktura rivaroksabana.....	7
Slika 1.4: Delovanje inhibitorjev koagulacije krvi.....	8
Slika 1.5: Vakuumske epruvete z Na – citratom	13
Slika 3.1: Analizator BCS XP	18
Slika 3.2: Primerjava cepitve naravnega in sintetičnega substrata z FXa	21
Slika 3.3: Analizator CS - 2100i.....	22

KAZALO TABEL

Tabela 3.1: Stabilnost reagentov	17
Tabela 4.1: Stabilnost kontrolnih vzorcev	24
Tabela 4.2: Rezultati kontrolnih vzorcev na analizatorju BCS XP	25
Tabela 4.3: Rezultati $\bar{x}$, SD, CV za STA® - Rivaroxaban Control 1 in 2.....	25
Tabela 4.4: Rezultati meritev aktivnosti FXa v vzorcih citratne plazme	27
Tabela 4.5: Rezultati meritev v območju $< 5\mu\text{g/L}$	35

KAZALO DIAGRAMOV

Diagram 4.1: Oblika porazdelitve meritve, izmerjenih z analizatorjem BCS XP	29
Diagram 4.2: Oblika porazdelitve meritev, izmerjenih z analizatorjem CS 2100i.....	30
Diagram 4.3: Primerjava aktivnosti Xa na obeh analizatorjih.....	31
Diagram 4.4: Izmerjene vrednosti Xa z obema analizatorjema.....	32
Diagram 4.5: Demingova (rdeča barva) in linearna (zelena barva) regresija.....	33
Diagram 4.6: Bland-Altmanov diagram razlik	34
Diagram 4.7: Primerjava aktivnosti Xa, izmerjenih z obema analizatorjema	36
Diagram 4.8: Bland-Altmanov diagram razlik parnih meritev	37

POVZETEK

Faktor Xa (FXa) tudi Stuart-Prower faktor ali encim protrombinaza, nastaja v jetrih. Za njegovo sintezo je potreben vitamin K, aktivira pa se v Xa s pomočjo faktorjev IX in VII. Gen za FX je lociran na 13 kromosomu.

Faktor Xa v molekuli protrombina cepi vezi na dveh mestih (arginin-treonin in arginin-izoleucin), pri čemer nastane aktivni trombin. To se zgodi le, ko se FXa v prisotnosti Ca^{++} poveže z aktiviranim kofaktorjem V v protrombinazni kompleks (Va-Xa),.

Povprečna življenjska doba FXa je 40-45 ur. Aktivno mesto FXa je sestavljeno iz štirih podenot: S1, S2, S3 in S4. Prirojene okvare FX so zelo redke, izražajo pa se lahko s krvavitvijo iz nosu, krvavenjem v sklepe in izgubo krvi iz prebavil.

Rivaroksaban (Xarelto®) se uporablja za: preprečevanja možganske kapi in sistemske embolije pri odraslih bolnikih z nevalvularno atrijsko fibrilacijo (z enim ali več dejavniki tveganja); zdravljenje globoke venske tromboze (GVT) in pljučne embolije (PE) in njenih ponovitev ter preprečevanje venske trombembolije (VTE) po načrtovani kirurški zamenjavi kolka ali kolena.

Namen magistrske naloge je bil uvesti analizno metodo za spremljanje učinkovitosti antikoagulantne terapije z rivaroksabanom, in sicer na nivoju njegovega delovanja proti FXa. Aktivnost zdravila smo merili na 71 bolnikih, ki so ga prejeli. Analizni postopek smo razvili na analizatorju BCS XP (Siemens), na Oddelku za laboratorijsko diagnostiko Splošne bolnišnice Slovenj Gradec. Novo metodo smo primerjali z obstoječo referenčno, ki se rutinsko izvaja na analizatorju CS – 2100i istega proizvajalca, in sicer na Kliničnem oddelku za žilne bolezni (KOŽB) UKC Ljubljana. Oba analizatorja temeljita na kromogeni metodi, s katero količine FXa določimo spektrofotometrično, v obliki porasta absorbance kromogenega substrata pri valovni dolžini 405 nm.

Rezultate smo obdelali s pomočjo statističnih programov SPSS, MedCalc ter Prism 6.0 in s t-testom dokazali, da so vrednosti izmerjene z obema aparatoma med seboj primerljive, ker je $p > 0,05$ ($p=0,233$). Tudi korelacija (povezanost) med meritvami, dobljenimi z obema aparatoma je bila dobra, saj je bil korelacijski koeficient (r) 0,98. Ujemanje med obema metodama smo prikazali z Bland-Altmanovim diagramom razlik. Na osnovi teh ugotovitev

in opravljeno validacijo smo novo metodo že uvedli v rutinsko prakso v bolnišničnem diagnostičnem laboratoriju.

ABSTRACT

Factor Xa (FXa), also known as Stuart-Prower factor or prothrombinase enzyme, is produced in the liver. Its synthesis requires vitamin K and is activated with the help of factors IX and VII. The genome for FX is located on the thirteenth chromosome.

Factor Xa cleaves the bonds of a prothrombin molecule in two places (arginine-threonine and arginine-isoleucine). During this process, active thrombin is produced. This happens only on condition that FXa connects with the activated cofactor in the presence of Ca^{++} into a prothrombinase complex (Va-Xa).

The average activity expectancy of FXa is 40-45 hours. The active area of FXa consists of four subunits: S1, S2, S3 and S4. Congenital defects of FXa are rare, but can be manifested in nosebleeds, bleeding into joints and gastrointestinal bleeding.

Rivaroxaban (Xarelto®) is used to prevent stroke and systemic embolism in adult patients with non-valvular atrial fibrillation (with one or more risk factors); to cure deep vein thrombosis (DVT) and pulmonary embolism (PE) including its recurrences; and to prevent venous thromboembolism (VTE) after elective hip or knee replacement surgery.

The aim of the master's thesis was to introduce an analytic method for monitoring the efficiency of the anticoagulant therapy with rivaroxaban against FXa. The effect of the drug was measured on 71 patients who had been taking it. The analytic procedure was developed on the BCS XP analyzer system from Siemens at the Department of Laboratory Diagnostics at the General Hospital Slovenj Gradec. The new method was compared to the existing reference method that is routinely performed on the CS – 2100i analyzer system from the same manufacturer at the Department of Vascular Diseases at the University Medical Centre Ljubljana. Both analyzer systems are based on the chromogenic method which measures the quantities of FXa spectrophotometrically, in the form of an increase in absorbance of the chromogenic substrate at a wavelength of 405 nm.

The results were processed with statistical programmes SPSS, MedCalc and Prism 6.0. The t-test proved that the values measured with both analyzer systems are comparable because $p > 0.05$ ($p=0.233$). The correlation between the measurements of both analyzer systems was good, since the correlation coefficient (r) was 0.98. The correlation between the two methods was shown using Bland-Altman diagram of differences. On the basis of these

findings and their validation, the new method has already been introduced into our routine practice at the hospital diagnostic laboratory.

SEZNAM OKRAJŠAV

ZIP – od proteina Z odvisni proteazni inhibitor

GP – glikoprotein

vWf – von Willebrandov faktor

ADP – adenzindifosfat

PAF – faktor, ki aktivira trombocite

t-PA – tkivni aktivator plazminogena

HMWK – visokomolekularni kininogen

TF – tkivni faktor

PC – protein C

RES – retikuloendotelijski sistem

AT – antitrombin

GVT – globoka venska tromboza

PE – pljučna embolija

VTE – venska trombembolija

PČ – protrombinski čas

aPTČ – aktivirani delni tromboplastinski čas

INR (International Normalized Ratio) - mednarodno umerjeno razmerje

ANBA – 5-amino-2-nitrobenzojska kislina

$\bar{x}$ – aritmetična sredina

CV – koeficient variacije

SD – standardni odklon

1 UVOD

1.1 FAKTOR Xa

Faktor Xa je znan tudi pod imenoma Stuart-Prowerjev faktor ali encim protrombinaza. Sodeluje v koagulacijski kaskadi in sodi v skupino serinskih endopeptidaz. Nastaja v jetrih, za njegovo sintezo pa je potreben vitamin K. Faktor X se aktivira v Xa s pomočjo faktorjev **IX** (njegov kofaktor je FVIII) in **VII** (njegov kofaktor je tkivni faktor/FIII/tromboplastin).

Deluje tako, da cepi vezi protrombina na dveh mestih (arginin-treonin in arginin-izoleucin), pri čemer nastane aktivni trombin. Do tega pa pride le v primeru, ko se FXa v prisotnosti Ca^{++} poveže z aktiviranim kofaktorjem V v protrombinazni kompleks (Va-Xa). Čeprav lahko FXa sam pretvarja protrombin v trombin, pa se ob nastanku protrombinaznega kompleksa hitrost te reakcije poveča za približno 300.000-krat.

Faktor Xa inaktivira od proteina Z odvisni proteazni inhibitor (ZPI), ki je serinski proteazni zaviralec (serpin). Afiniteta te beljakovine za FXa se v prisotnosti proteina Z poveča 1.000-krat. Okvare proteina Z povzročajo povečano aktivnost FXa in nagnjenost k trombozam. Gen za FX je lociran na 13 kromosomu. Aktivno mesto FXa je sestavljeno iz štirih podenot: S1, S2, S3 in S4. Podenota S1 zagotavlja selektivnost in vezavo, S2 je majhna, plitka in slabo opredeljena ter se združuje z S4, S3 pa se nahaja na robu S1 in je zelo izpostavljena topilu. Podenota S4 ima 3 vezavne domene, imenovane: »hidrofobno polje«, »kationska vdolbina« in »vodni predel«. Povprečni življenjski čas FXa je 40-45 ur (1,2).

Prirojene okvare FX so zelo redke (1:500.000) in se lahko izražajo s krvavitvijo iz nosu, krvavenjem v sklepe in izgubo krvi iz prebavil (3).

1.2 HEMOSTAZA

Hemostaza je skupek procesov in reakcij, ki prispevajo k učinkovitemu ustavljanju krvi ob poškodbi žil ter k preprečevanju tromboz. Procesi potekajo med **beljakovinami v krvi**, ki so faktorji in zaviralci koagulacije in fibrinolize, **žilno steno**, ki vsebuje tkivni faktor, tkivni aktivator plazminogena ter **celičnimi sestavinami krvi** (trombociti) in **žilno steno** (endotelijske celice, celice gladkega mišičja). Ti procesi omogočajo, da kri ostane tekoča oziroma, da se strdi, kadar je prisotna žilna poškodba. Ločimo primarno in sekundarno

hemostazo. **Primarna** se prične s kontrakcijo žilne stene, adhezijo trombocitov in nastankom trombocitnega čepa. Med **sekundarno** pa nastanejo trombin in posledično fibrinska vlakna, ki učvrstijo trombocitni čep, s čimer se ustavi krvavitev. Širjenje strdka preprečujejo zaščitni mehanizmi zaviralcev koagulacije, pri tem pa sodeluje tudi fibrinoliza, ki strdek razgradi.

Motnje v hemostazi lahko povzročajo bodisi prepočasno strjevanje krvi, kar vodi v spontane krvavitve ali pa prehitro strjevanje krvi, z nastankom strdkov v žilah (tromboza). Obstajajo tudi prirojene motnje, ki povzročajo krvavitve in so običajno posledica pomanjkljivosti ene same beljakovine. Najbolj znani med njimi sta hemofilija A, ki je posledica pomanjkanja FVIII in hemofilija B, ki nastane zaradi pomanjkanja FIX (3,4).

1.2.1 PRIMARNA HEMOSTAZA

Za učinkovito primarno hemostazo je nujno potrebno normalno število funkcionalnih trombocitov, saj brez njih regeneracija rane v žilni steni ni mogoča. Trombociti se najprej adherirajo na kolagen v subendoteliju, ki se razgali ob poškodbi. V fizioloških pogojih pa to preprečujejo antitrombotične lastnosti endotelija. Adhezija je odvisna od izraženosti receptorjev na membranah trombocitov, in sicer glikoproteina (GP) Ia, ki se neposredno veže na kolagen in GPIb, ki se posredno preko von Willebrandovega faktorja (vWf) pripne na ustrezna vezavna mesta na omenjeni beljakovini. Von Willebrandov faktor (vWf) je glavna vezavna beljakovina pri normalnem toku krvi in normalnih strižnih silah v žilah, nastaja pa tako v endotelijskih celicah kot v trombocitih. Adheziji sledi aktivacija trombocitov, kar vodi do spremembe njihovih oblik in do agregacije. Agonisti, ki aktivirajo trombocite se vežejo na ustrezne receptorje na njihovih površinah. Mednje sodijo: adrenalin, adenzin difosfat (ADP), trombin, faktor, ki aktivira trombocite (PAF) ter kolagen in tromboksan A₂. Med aktivacijo se oblika trombocitov spremeni iz diskoidne v sferično, z izraženimi psevdopodiji. Trombociti se tako lahko razpotegejo po poškodovanem delu žile, pri čemer pride do sekrecije različnih dejavnikov iz njihovih znotrajceličnih zrn (zrnca α , gosta zrnca in lizosomi). Sledi povezava receptorjev med sosednjimi trombociti preko vezave fibrinogena, kar vodi v trombocitno agregacijo. Ta proces se nadaljuje in zato se trombocitni strdek veča. Subendotelij nato aktivira koagulacijo, pri čemer sodelujejo kontaktna faktorja FXII in FXI ter tkivni faktor. Posledica delovanja koagulacijskih faktorjev je tvorba trombina, ki aktivira FV in FVIII ter

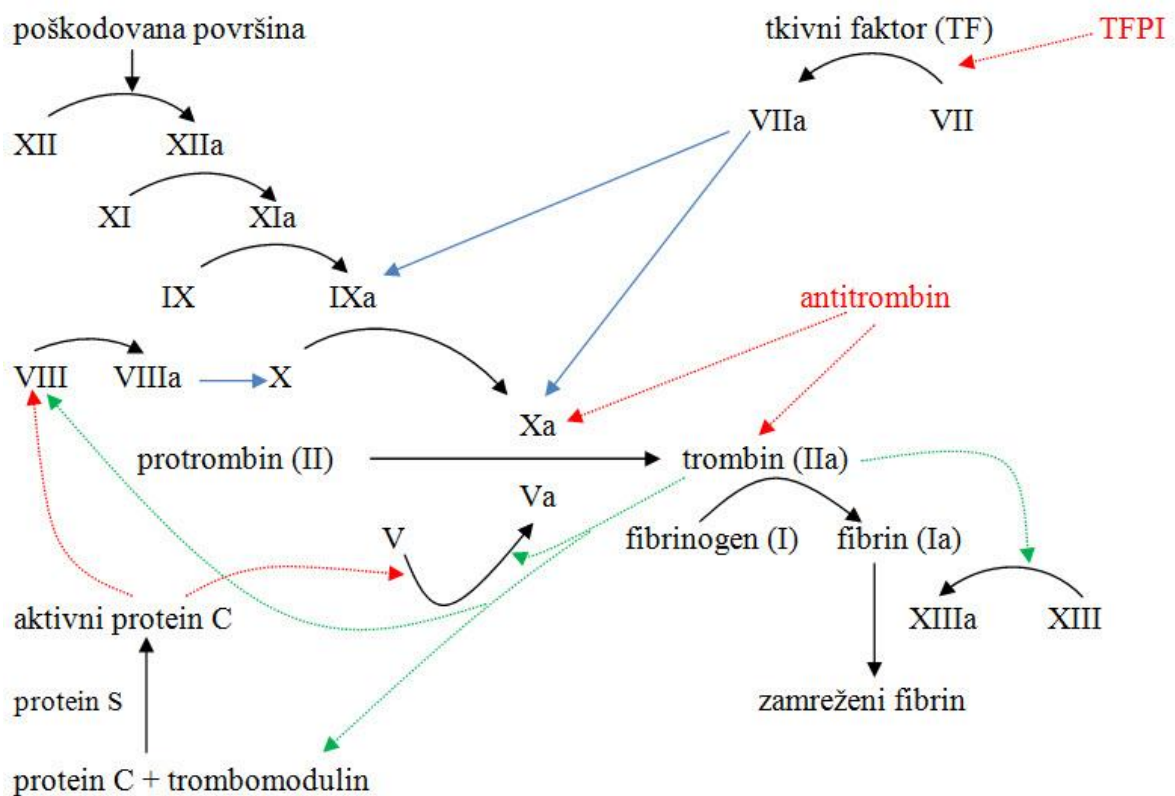
s pozitivno povratno zvezo poveča tudi obseg svojega nastajanja. Trombin povzroči še polimerizacijo fibrinogena v fibrin ter s tem učvrsti trombocitni čep. Trombocitno-fibrinski strdek se lahko raztopi šele čez čas, in sicer ko se na fibrin veže dovolj tkivnega aktivatorja plazminogena (t-PA) in plazminogena. Omenjeni aktivator namreč pretvori plazminogen v aktivni encim plazmin, ki sproži fibrinolizo, ta pa odstrani strdek (3,4).

1.2.2 SEKUNDARNA HEMOSTAZA

Sočasno z nastajanjem trombocitnega strdka nastaja tudi fibrin. Ta se pojavi po zaporedju encimskih reakcij znotraj koagulacijske kaskade. Koagulacijski sistem je sestavljen iz koagulacijskih faktorjev, ki so glikoproteini z različnimi razpolovnimi dobami, prisotni v krvi v različnih koncentracijah. Aktivirane oblike faktorjev II, VII, IX, X, XI in XII (trombin, FVIIa, FIXa, FXa, FXIa in FXIIa), so encimi, imenovani serinske proteinaze. V krvi se nahajajo v obliki proencimov, med koagulacijo krvi pa se pretvorijo v aktivne oblike. Aktivirana faktorja V in VIII (FVa in FVIIIa) nista encima, temveč zelo pomembna kofaktorja. Faktorji protrombinskega kompleksa (FII, FVII, FIX in FX) nastajajo v hepatocitih, njihova sinteza pa je odvisna od vitamina K. Slednji je potreben za karboksilacijo glutaminske kisline v γ -karboksiguatminko kislino. Če vitamina K ni, oziroma ga je premalo, pride do zmanjšane karboksilacije proteinov in s tem do tvorbe funkcionalno nepopolnih molekul. Von Willebrandov faktor je pomemben za adhezijo trombocitov in je v krvi prisoten v kompleksu s FVIII. Sintetizirajo ga žilne endotelijske celice in megakariociti. Faktor XIII pa je transglutaminaza, ki nastaja predvsem v jetrih in je odgovoren za premreženje polimeriziranega fibrina s kovalentnimi vezmi.

Kontaktna aktivacija - intrinzična pot

Celična poškodba - ekstrinzična pot



Slika 1.1: Koagulacijska kaskada

Aktivacija koagulacijskih faktorjev poteka zaporedno, v **koagulacijski kaskadi**, vse dokler se topni fibrinogen ne pretvori v netopni fibrin. Koagulacijo zaradi lažjega razumevanja delimo na dve poti, notranjo (intrinzično) in zunanjo (ekstrinzično). Dejansko pa takšna delitev *in vivo* ne obstaja.

Intrinzična ali notranja pot se prične z aktivacijo FXII in FXI na subendotelijskih strukturah žil, proces pa se imenuje kontaktna aktivacija. Faktor XII se aktivira z delno proteolizo. V tej reakciji sodelujeta kalikrein in visokomolekularni kininogen (HMWK). Faktorji notranje poti, FXII, FXI, FIX in FX, pa se nato aktivirajo drug za drugim. Pospešeno aktivacijo FX v FXa omogoči FVIIIa, skupaj s fosfolipidi in Ca^{++} . Faktor IXa v tej reakciji deluje kot encim, FVIIIa pa kot kofaktor. Kofaktorsko aktivnost pridobi tudi FVIIIa, potem ko ga v aktivno obliko pretvori trombin.

Ekstrinzična ali zunanja pot poteka preko FVII, ki se veže s tkivnim faktorjem (TF) kot kofaktorjem. Slednji skupaj s fosfolipidi tvori tkivni tromboplastin. Faktor VII je v

majhnih koncentracijah vedno prisoten v krvi, kar omogoča pospeševanje aktivacije koagulacije. Faktor VIIa aktivira tako FIX kot FX. Skupaj s FX in TF tvori tudi pospeševalno zanko, ki omogoča visoko aktivnost FXa v zelo kratkem času. Faktorja Xa in Va pa skupaj predstavljata protrombinazni kompleks, to je encimski kofaktorski kompleks, ki pretvarja FII (protrombin) v FIIa (trombin).

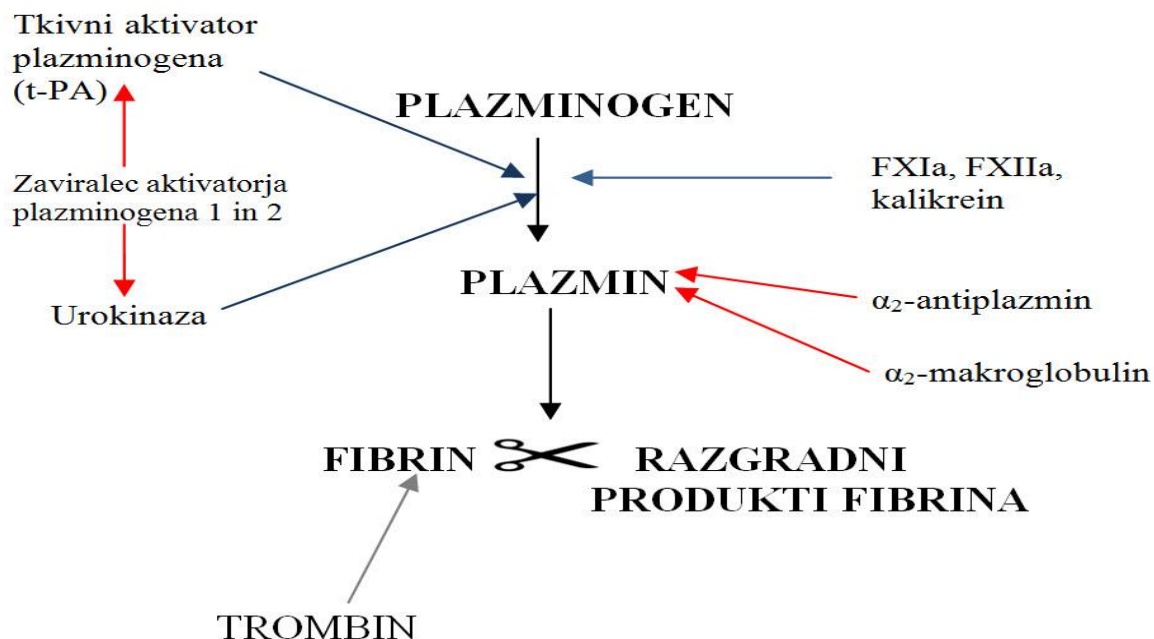
Pri uravnavanju koagulacije sodelujejo različni mehanizmi, kot so: zaviralci koagulacijskih faktorjev (serpini) in negativna povratna zanka, ki vključuje protein C (PC), aktivira pa se hkrati s koagulacijskimi faktorji. Protein C cepi kofaktorja FVa in FVIIa, s čimer zavira koagulacijo. Aktivacija koagulacijske kaskade poteka predvsem na površinah trombocitov in endotelijskih celic in se zato iz systemskega spremeni v lokalni dogodek. Razgradnji produkti fibrinogena in fibrina zavirajo polimerizacijo novonastalega fibrina ter agregacijo trombocitov in pospešujejo sproščanje tkivnega aktivatorja plazminogena (t-PA) iz žilne stene, s čimer aktivirajo fibrinolizo. Aktivirane koagulacijske faktorje, ki so lokalno prisotni v povečanih koncentracijah odnaša krvni tok, iz obtoka pa jih odstranjuje retikuloendotelijski sistem (RES). Zaviralci koagulacije krožijo po krvi, prisotni pa so tudi v trombocitih. Tako serpini, ki so zaviralci serinskih proteinaz, omejujejo aktivacijo koagulacijskega sistema s tem, da zavirajo ključne koagulacijske faktorje. Najpomembnejši zaviralec je antitrombin (AT), ki sorazmerno počasi inhibira delovanje vseh serinskih proteinaz, predvsem FIXa, FXa in FIIa (trombin) (3,4).

Idealne površine za aktiviranje koagulacije so celične membrane trombocitov in žilnih endotelijskih celic, saj imajo na svojih površinah izražene receptorje za koagulacijske faktorje. Ti vsebujejo anionske fosfolipide, katerih funkcija je vezava FIXa in FXa. Aktivirani trombociti izražajo tudi receptorje za FVa in FVIIIa (4).

Kofaktor je po definiciji nebeljakovinska spojina, ki je na protein vezana bodisi močno ali šibko, je pa nujno potrebna za ustrezno biološko aktivnost encima. Kofaktor VIIIa je nujen za to, da encim prepozna substrat, poleg tega pa poveča njegovo učinkovitost in specifičnost pri razgradnji vezi arginin-izolevcin, in sicer izključno v FX, ne pa tudi v FII ter omogoča, da reakcija poteka na površini celic (3).

Fibrinoliza je pomemben fiziološki mehanizem, saj ima nalogo, da razgrajuje fibrinske strdke in omejuje njihovo širjenje po tem, ko so ti opravili svojo fiziološko nalogo. Tako

kot koagulacija je tudi fibrinoliza sestavljena iz notranje, ki jo sproži kontaktna aktivacija in zunanje poti, ki poteka preko aktivatorjev plazminogena (4).



Slika 1.2: Shematski prikaz fibrinolize

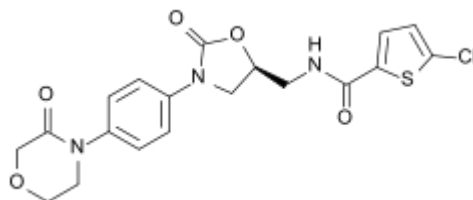
Plazminogen sintetizirajo hepatociti. V naravni obliki ima plazminogen na N – končnem delu vezano glutaminsko kislino in ga zato imenujemo glu – plazminogen. Po aktiviranju s plazminom pa nastane liz- plazminogen, ker ima na N – koncu prisoten lizin.

Tktivni faktor plazminogena (t-PA) in urokinaza pretvarjata plazminogen v aktivni plazmin. t-PA se s poškodovanega endotelija krvnih žil sprošča v kri zelo počasi. Endotelijske celice so tudi primarno mesto za sintezo t-PA. Ta je v plazmi prisoten v kompleksu s svojim inhibitorjem, to je zaviralcem aktivatorja plazminogena – 1. Inhibitorja α_2 -antiplazmin in α_2 -makroglobulin zavirata aktivnost plazmina, t-PA in urokinazo pa inhibirata zaviralec aktivatorja plazminogena - 1 (PAI-1) in zaviralec aktivatorja plazminogena - 2 (PAI-2). Urokinazo sintetizirajo epiteljske celice ledvičnih tubulov, zato je v visokih koncentracijah prisotna v urinu.

1.3 RIVAROKSABAN

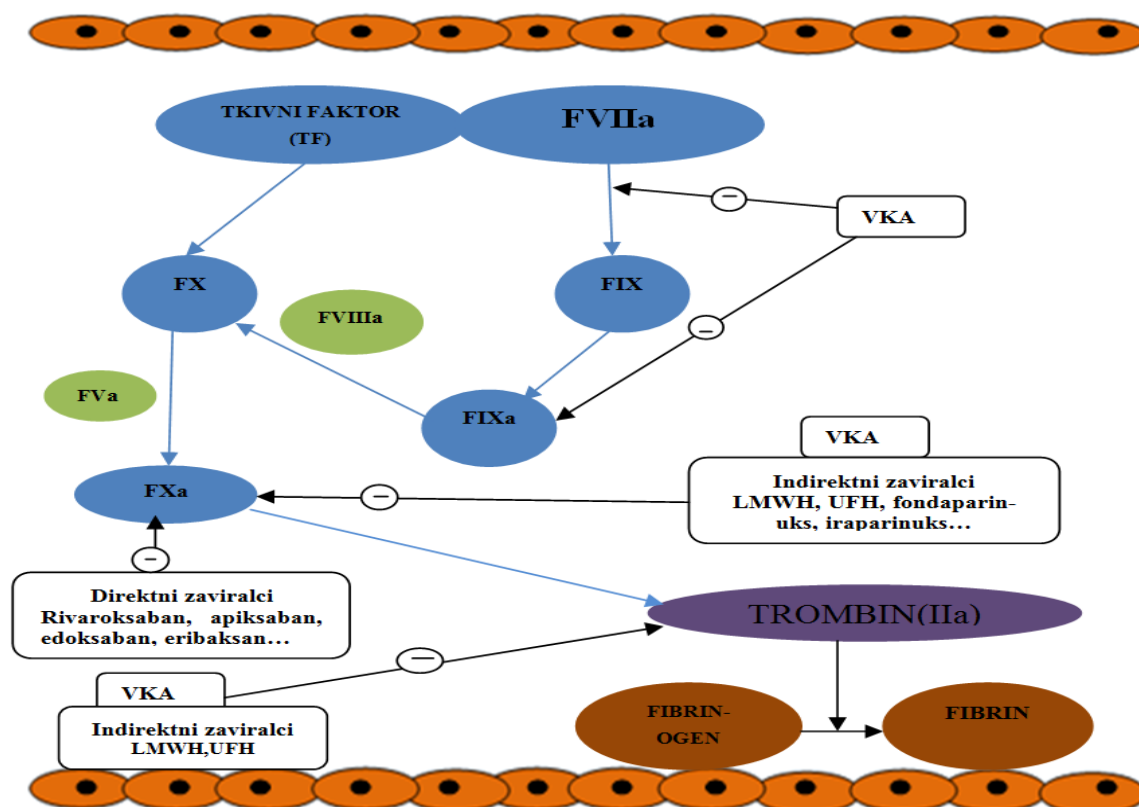
Zdravilo Xarelto® (Bayer) je na voljo v obliki filmsko obloženih tablet, ki lahko vsebujejo 2,5; 10; 15 ali 20 mg rivaroksabana (5). Rivaroksaban ima neposreden, reverzibilen učinek

na aktivirani koagulacijski faktor X (Xa). Je oksazolidinonski derivat, ki inhibira tako prosti, kot na protrombinazni kompleks vezani FXa. S tem zavre tako notranjo kot zunanjo aktivacijsko pot koagulacije krvi, saj inhibira tvorbo trombina in nastanek krvnega strdka. Rivaroksaban ne zavira delovanja trombina in nima nobenega vpliva na trombocite (6).



Slika 1.3: Struktura rivaroksabana

Rivaroksaban se hitro absorbira in doseže največjo koncentracijo ($c_{\max}$) v 2 do 4 urah po zaužitju tablete. Njegova vezava na beljakovine v plazmi je pri ljudeh velika (približno 92 - 95 %), pri čemer se večinoma veže na serumski albumin. Približno dve tretjini uporabljenega odmerka se presnovi. Od tega se polovica izloči skozi ledvice, polovica pa z blatom. Ena tretjina uporabljenega odmerka se v obliki nespremenjene zdravilne učinkovine izloči s sečem, v glavnem z aktivno ledvično sekrecijo. V človeški plazmi je rivaroksaban najbolj učinkovit v nespremenjeni obliki, saj v krvnem obtoku ni njegovih pomembnih ali aktivnih presnovkov. Po peroralni uporabi je izločanje odvisno od hitrosti absorpcije. Pri mlajših osebah se iz plazme izloči s končnim razpolovnim časom od 5 do 9 ur, pri starejših osebah pa od 11 do 13 ur (5,7).



Slika 1.4: Delovanje inhibitorjev koagulacije krvi

1.4 INDIKACIJE ZA ZDRAVLJENJE

Zdravilo Xarelto® se uporablja za naslednje indikacije:

1. Preprečevanje možganske kapi in sistemske embolije pri odraslih bolnikih z nevalvularno atrijsko fibrilacijo z enim ali več dejavniki tveganja

Dejavniki tveganja za embolijo so kongestivno srčno popuščanje, hipertenzija, starost ≥ 75 let, sladkorna bolezen, predhodna možganska kap ali prehodni ishemični napad (5).

Atrijska fibrilacija je najpogostejša motnja srčnega utripa pri odraslih. Gre za plapolanje srčnih preddvorov (atrijev), kar privede do nerednega utripa z nihajočo frekvenco, ki lahko doseže tudi do več impulzov na sekundo. Običajno gre za nenormalne električne aktivnosti v levem atriju. Zaradi plapolanja preddvorov lahko zastaja kri, kar poveča nevarnost za nastajanje strdkov (8).

2. Zdravljenje globoke venske tromboze (GVT) in pljučne embolije (PE) ter preprečevanje njenih ponovitev

Venska tromboza je delna ali popolna zamašitev ven s strdki. Razlogi za trombozo so lahko upočasnen pretok krvi, povečano nagnjenje k strjevanju krvi in poškodba žilne (venske) stene. Venska tromboza nastane večinoma v globokih venah spodnjih udov, druge lokacije, ki so npr. globoke vene zgornjih udov, vena porta, spodnja vena kava, možganske vene, pa so redke. Površinski tromboflebitis, ki prizadene površinske vene, moramo ločiti od VT globokih ven (9).

Pljučna embolija je zapora pljučne arterije. Večinoma jo povzročijo strdki, ki pripotujejo iz globokih ven spodnjih okončin. Redkeje so za to odgovorni maščobni ali kostni strdki (odtrgani deli strdka), ki nastanejo po zlomih kosti ali mehurčki (potapljanje). Strdek se zagozdi v križišču vej pljučne arterije ali tam, kjer se premer žile zmanjša na premer velikosti strdka. To lahko povzroči delno ali popolno zamašitev pljučne arterije, kar ustavi dotok krvi v pljuča. Znaki bolezni so različni, npr. dispneja (oteženo dihanje), tahipneja (pospešeno dihanje), plevritična bolečina (prsna bolečina ob vdihu), kašelj in hemoptniza (izkašljevanje krvi). Ker pa se ti znaki pojavljajo tudi pri drugih boleznih, je PE na tej osnovi težko prepoznati (10).

3. Preprečevanje venske trombembolije (VTE) po načrtovani kirurški zamenjavi kolka ali kolena

Med VTE sodita tako venska tromboza kot pljučna embolija. Nastanek najpogosteje povzroči več sočasno sprožilnih dejavnikov, ki so bodisi prehodni ali pa stalno prisotni. Med prehodne sodijo operacije, poškodbe, vstavljeni intravenski katetri, nosečnost in porod ter daljši letalski poleti (>8ur). Med stalno prisotne pa uvrščamo aktivni rak in trombofilijo. Slednja je prirojena ali pridobljena nagnjenost k nastanku VTE (11).

Obstajajo pa tudi splošni zadržki za zdravljenje, kot so: aktivna in nedavna krvavitev, veliko tveganje za krvavitev, predviden ali nedaven operativni poseg, visok krvni tlak (> 180/100 mmHg), pomembna anemija (hemoglobin < 100 g/L), pomembna trombocitopenija (število trombocitov < $100 \times 10^9/L$). Dodatni zadržki so tudi ledvična okvara (ocena glomerulne filtracije < 30 mL/min), huda oziroma zmerna jetrna okvara, nosečnost in dojenje (11).

1.5 MERJENJE AKTIVNOSTI FXa

Pri uporabi zdravila Xarelto® rutinsko spremljanje strjevanja krvi ni potrebno (12). Rivaroksaban, ki ga zdravilo vsebuje, je zaviralec faktorja Xa. To pomeni, da zavira nastajanje trombina, ki je ključnega pomena za strjevanje krvi. Z zaviranjem FXa, se nivo trombina zmanjša, kar zmanjšuje tveganje za nastanek krvnih strdkov v venah in arterijah, omogočena pa je tudi resolucija obstoječih strdkov (5). Rivaroksaban zaradi načina delovanja vpliva na teste strjevanja krvi, kot so: protrombinski čas (PČ), aktivirani delni tromboplastinski čas (aPTČ) in HepTest (13). Omenjeni klasični koagulacijski testi so sicer primerni le za kvalitativno oceno učinka zdravila. Za kvantitativno ugotavljanje delovanja (merjenje koncentracije učinkovine v plazmi), pa moramo uporabiti specifične koagulacijske teste, prilagojene posameznemu antikoagulacijskemu zdravilu. Rezultati testov so odvisni tudi od farmakokinetike zdravilne učinkovine, zato je čas po zaužitju zdravila oz. pred odvzemom krvi za koagulacijske preiskave ključen za njihovo interpretacijo. Za kvalitativno oceno delovanja določimo **protrombinski čas (PČ meritve z Neoplastin-om)**, pri čemer rezultat ocenimo v sekundah. Za določitev koncentracije rivaroksabana v plazmi (kvantitativna ocena) pa je primeren le specifičen test, s katerim lahko merimo opisano **aktivnost anti-Xa** (7). Rutinsko izvajamo merjenje anti-Xa aktivnosti rivaroksabana, saj PČ ni dovolj občutljiv predvsem pri nizkih koncentracijah učinkovine. Poleg tega mednarodnega umerjenega razmerja (INR = International Normalized Ratio) za rivaroksaban ne moremo uporabiti, saj je bil standardiziran na bolnikih, zdravljenih z antagonisti vitamina K, ki imajo povsem drugačen mehanizem (7,13).

V nalogi smo uporabili metodo specifičnega določanja aktivnosti anti-Xa, s kromogeno metodo.

1.5.1 AKTIVNOST ANTI-Xa

Aktivnost anti-Xa v plazmi določamo s kromogeno metodo. Z njo lahko natančno izmerimo dovolj širok interval koncentracije rivaroksabana v plazmi, kar pomeni, da nam poda kvantitativno oceno prisotnosti zdravilne učinkovine, pod pogojem, da standardno kalibracijsko krivuljo izdelamo s pomočjo kalibratorjev (7).

Vzorcu citratne plazme dodamo ustrezne reagente, AT III in FXa in jih inkubiramo pri 37 °C. V času inkubacije pride do inaktivacije dodanega FXa, ki jo povzroči v vzorcu prisotni rivaroksaban. Količino FXa, ki ostane po fazi inkubacije, nato določimo **spektrofotometrično**, po dodatku kromogenega substrata. Posledični porast absorbance izmerimo s kinetičnim testom pri 405 nm (14).

1.5.2 PROTROMBINSKI ČAS (PČ) - MERITEV Z NEOPLASTINOM

Protrombinski čas (PČ) je presejalna preiskava namenjena oceni obsega pridobljenih in prirojenih motenj aktivnosti faktorjev II, V, VII, X in fibrinogena (15). Pri bolnikih, ki jemljejo zdravilo Xarelto®, moramo pri izvajanju tega testa uporabiti reagent Neoplastin, pridobljenega iz kunčjih možganov (14). Protrombinski čas je primeren le za kvalitativno oceno, pri čemer spremljamo rezultat v sekundah in ne izračunamo vrednosti INR, ki je prilagojena za spremljanje učinkov zdravljenja s kumarini (antagonisti vitamina K). Ta metoda je lahko sicer dovolj občutljiva pri merjenju najvišjih koncentracij rivaroksabana v plazmi, s čimer pa lahko le kvalitativno potrdimo prisotnost učinkovine. Vendar pa PČ ni dovolj natančen test, zlasti ne pri nizkih koncentracijah rivaroksabana, zato ni primeren za merjenje njegove količine v vzorcih odvzetih v obdobju blizu minimalne serumske koncentracije. Merjenje PČ tudi ni specifično za faktor Xa, saj lahko nanj vpliva veliko bolezenskih stanj, kot so npr. jetrne bolezni, nekatere vrste raka in Hodgkinova bolezen (7,16).

Test izvedemo tako, da polno kri odvzeto v epruveto z 0,109 M Na-citratom, najprej centrifugiramo 10 minut pri 3.600 obr/min, in tako pripravimo citratno plazmo. Takoj po centrifugiranju k 100 µL citratne plazme dodamo 200 µL Neoplastina in vzorec inkubiramo 1 minuto pri 37 °C. Merimo čas v sekundah, ki je potreben za nastanek strdka (15).

1.6 POSTOPKI PRI VPOLJEVANJU NOVIH ANALITSKIH METOD

Zahtevnost uvajanja novih analitskih metod oz. parametrov v laboratorije za klinično kemijo, je danes precej manjša kot je bila še pred 15 - 20 leti. Ob tem pa se povečuje zahtevnost analitskih metod, kar zahteva več priprave in treninge za laboratorijsko osebje. Že proizvajalci laboratorijskih aparatov, analizatorjev in reagenčnih materialov poskrbijo za ustrezno kakovost, saj morajo upoštevati načela dobre laboratorijske prakse (GLP –

Good Laboratory Practice) in predpisane standardizacije. Odgovornost za izdani rezultat pa pripada izključno laboratoriju, zato mora laboratorijsko osebje pred uvedbo nove analitske metode preveriti ustreznost le-te, tako, da jo primerja z obstoječo, rutinsko metodo, seveda v kolikor ta obstaja (17).

Kakovost je opredeljevanje storitve in izdelkov glede na njihove pozitivne lastnosti. Tako lahko pojem kakovosti v laboratoriju za klinično kemijo smatramo kot pravi rezultat za preiskovanca ob pravem času. Da bi kakovost zagotovili vsak trenutek, z vsakim izdanim rezultatom, moramo podrobno poznati vsak korak analitskega procesa. V laboratorijih za klinično kemijo lahko procese v grobem razdelimo na tri faze (17):

- **predanalitska faza:** izbira preiskav s strani zdravnika, odvzem vzorca, njegov transport, sprejem, vpis ter obdelava in triaža vzorcev ob sprejemu biološkega materiala
- **analitska faza:** identifikacija vzorca v laboratoriju, priprava in analiza vzorca, validacija rezultatov (potrditev, odobritev)
- **postanalitska faza:** pošiljanje izvidov k naročniku, arhiviranje vzorcev in izvidov, obračun opravljenega dela ter morebitna komunikacija z naročnikom

Validacija je proces s katerim dokažemo, da je analitska metoda sprejemljiva za namen njene uporabe. Z njo torej potrdimo, da razpolagamo s pravim testom za naše potrebe. Validacija je nujno potrebna, da dokažemo tisto, kar trdimo in s tem povečamo vrednost rezultatov analize ter tako zadovoljimo naročnikovo zaupanje. Izvajati jo moramo pri razvoju in vpeljevanju novih metod, pri preverjanju že uporabljenih metod ter takrat, ko določeno metodo vpeljujemo v drug laboratorij. Pri tem lahko izvedemo medlaboratorijsko primerjavo. Za ugotavljanje kvalitete analitske metode moramo uporabiti opremo, ki ima ustrezno specifikacijo in deluje brezhibno (18).

1.6.1 PRIMERJAVA METOD

S primerjanjem dveh testnih metod ugotavljamo, ali nova metoda daje enako kakovostne rezultate kot rutinska oz. referenčna. To hipotezo moramo statistično potrditi ali zavreči. V primeru, da jo potrdimo lahko novo metodo začnemo uporabljati za rutinske preiskave.

Za vpeljava nove metode v laboratorij potrebujemo najmanj 40 vzorcev preiskovancev. Pri izvajanju primerjave je potrebno dosledno upoštevati priporočila proizvajalcev glede

obstoynosti reagentov in kontrol. Za pravilen vpogled in oceno analitske metode moramo primerjavo vsakokrat izvesti pod istimi pogoji. Po končanem analitskem delu rezultate vpišemo v vnaprej pripravljene tabele. Temu sledi njihova statistična obdelava, ki jih prikažemo v različnih grafičnih oblikah in jih primerjamo skladno z določenimi kriteriji. Na podlagi ugotovitev se nato odločimo ali je metoda primerna ali ne (17).

1.7 PRAVILEN ODVZEM KRVI

Skrbna priprava bolnika, pravilen odvzem krvnih vzorcev, ustrezno ravnanje z njimi, vključno s transportom so osnovni pogoji za zagotovitev zanesljivih analitskih rezultatov. Vzorec mora biti kakovosten in pravilno pripravljen za analizo.

Plazma je krvna tekočina, ki jo dobimo po centrifugiranju polne krvi, odvzete v epruveto z dodanim antikoagulantom, npr. 0,109 M Na-citratom. Vzorec krvi lahko centrifugiramo takoj po odvzemu. Epruveta s krvjo mora biti tekom centrifugiranja dobro zamašena, da preprečimo zunanje onesnaženje vzorca, izhlapevanje, nastanek aerosola in morebitno razlitje vzorca (19).



Slika 1.5: Vakuumske epruvete z Na – citratom

Vzorci krvi dobimo z odvzemom iz vene z venepunkcijo, pri čemer žilo prebodemo tako, da jo čim manj poškodujemo. Poškodbo zmanjšamo že s tem, da vanjo vbodemo le enkrat, da se igla, ki mora biti primerna, v njej ne premika in da je preveza čim krajša in rahla. Koagulacijo oz. nastanek trombina v epruveti med odvzemom lahko aktivirajo prepočasen tok krvi skozi iglo ali večje poškodbe žile. Nastanek trombina lahko pospeši koagulacijo in navidezno skrajša čase strjevanja krvi pri presejalnih koagulacijskih preiskavah (APTČ,

PČ). Zaradi delne koagulacije v vzorcu krvi pa lahko pride tudi do pomanjkanja fibrinogena, FV in FVIII ter zato do podaljšanega časa strjevanja krvi.

Na razpolago imamo več antikoagulacijskih sredstev, pri čemer pa kalcijev oksalat, heparin in etilendiamintetraocetna kislina (EDTA), niso primerni za koagulacijske preiskave. Zato se v ta namen večinoma uporablja Na-citrat, in sicer kot 3-Na-citrat v dihidratni obliki ($\text{Na}_3\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$), ki ne vstopa v eritrocite in ostane v plazmi. Za analizo je primerna le tista plazma, ki vsebuje malo trombocitov. Zato kri odvzeta v EDTA ni uporabna, saj to antikoagulacijsko sredstvo premočno veže ione Ca^{++} . Kalcijev oksalat pa zmanjšuje obstojnost FV in FVIII (4).

Pred uporabo moramo vzorce plazme pregledati, da ugotovimo morebitno prisotnost fibrina, hemolize ali lipemije, saj so to dejavniki, ki pomembno vplivajo na rezultate koagulacijskih preiskav. Hemolizirani vzorci niso uporabni zato, ker se v njih aktivira koagulacija. Hemolizo pri odvzemu lahko preprečimo z upoštevanjem naslednjih navodil: vbojno mesto mora biti vedno popolnoma suho, uporabljati ne smemo pretankih igel, krvi ne smemo odvzeti na mestu, kjer je nastal hematoma. Epruvet s krvjo tudi ne smemo stresati, temveč jih nežno, $5-10 \times$ obrnemo. Hemoliza pa lahko nastane tudi zaradi premočnega vleka krvi v brizgo (20).

Kri moramo čimprej po odvzemu centrifugirati pri 2.500 g (3.600 obr/min) in jo nato analizirati. Od odvzema krvi do preiskave smeta preteči največ 2 uri, če vzorec stoji na sobni temperaturi in ne več kot 4 ure, če ga shranimo na 4 °C (4).

2 NAMEN DELA

V zadnjih letih je bilo veliko raziskav usmerjenih v iskanje novih peroralnih antikoagulacijskih zdravil, ki bi imela hiter in predvidljiv učinek z manj pogostim laboratorijskim nadzorom in malo interakcij s hrano in drugimi zdravili. Tovrstne nove oblike zdravila imajo krajši razpolovni čas (11).

Namen magistrske naloge je uvedba analitske metode za spremljanje učinkovitosti terapije z zdravilom Xarelto®, ki vsebuje zdravilno učinkovino rivaroksaban in se jemlje peroralno. Je zelo selektiven in neposredno učinkujoč zaviralec faktorja strjevanja krvi Xa (FXa), njegovo delovanje pa je odvisno od uporabljenega odmerka. Testa, ki ju lahko uporabimo za spremljanje učinkovitosti terapije sta merjenje protrombinskega časa (PČ) in določanje aktivnosti rivaroksabana proti faktorju strjevanja krvi Xa.

Naš cilj bo vzpostavitev in validacija novega analiznega postopka za spremljanje učinkovitosti terapije z rivaroksabanom, in sicer na nivoju njegovega delovanja proti FXa. Njegovo aktivnost bomo merili v skupini 60 - 80 pacientov, ki prejemajo rivaroksaban. Analitski postopek bomo vrednotili na analizatorju BCS XP (Siemens), in sicer na Oddelku za laboratorijsko diagnostiko Splošne bolnišnice Slovenj Gradec. Novo metodo bomo primerjali z obstoječo, ki se rutinsko izvaja na analizatorju CS – 2100i istega proizvajalca, na Kliničnem oddelku za žilne bolezni (KOŽB) UKC Ljubljana. Odvzem krvnih vzorcev bolnikov bomo izvedli na KOŽB UKC Ljubljana in na Oddelku za laboratorijsko diagnostiko Splošne bolnišnice Slovenj Gradec. Vzorce zamrznjene plazme, ki jo bomo uporabili za primerjalno analizo, bomo iz Laboratorija za hemostazo na KOŽB UKC Ljubljana transportirali na suhem ledu na Oddelek za laboratorijsko diagnostiko Splošne bolnišnice Slovenj Gradec in obratno.

Rezultate bomo statistično ovrednotili tako, da bomo kritično in celovito ugotavljali primerljivost rezultatov dobljenih z obstoječo rutinsko in novo metodo. Izračunali bomo koeficient korelacije in ovrednotili primerljivost analitskih metod na obeh analizatorjih. Pričakujemo, da bomo na osnovi izsledkov naše naloge lahko novo metodo uspešno uvedli v rutinsko prakso klinične diagnostike.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 ODVZEM KRVI

Odvzem krvnih vzorcev smo deloma opravili na KOŽB UKC Ljubljana, deloma pa v Splošni bolnišnici Slovenj Gradec. Bolnikom smo odvzeli vensko kri s pomočjo vakuumskih epruvet z 0,109 M natrijevim citratom. Po prejemu vzorcev v laboratorij smo odvzeto kri centrifugirali pri 3.600 obr/min, 10 min, da se bo plazma ločila od celic in v njej nato izmerili aktivnost FXa. Po končani analizi smo vse plazemske vzorce prenesli v ustrezne epruvete z neomočljivo površino in jih nato na hitro zamrznili v zamrzovalniku pri - 70°C. Tako zamrznjena plazma je pri takšni temperaturi obstojna 6 mesecev.

Zbrane vzorce smo transportirali na suhem ledu iz UKC Ljubljana v Splošno bolnišnico Slovenj Gradec in obratno. Vzorce plazme smo nato na hitro odtalili pri 37°C, saj smo tako preprečili obarjanje fibrinogena in FVIII in jih nemudoma analizirali s pomočjo aparatov BCS XP oziroma CS – 2100i.

Pri tem je treba poudariti, da smo tiste vzorce, ki smo jih odvzeli v Ljubljani ali Slovenj Gradcu lokalno analizirali takoj po odvzemu, nato pa jih zamrznili in izmenjali med oddelkoma. Ker smo primerjali rezultate meritev v svežih in odmrznjenih plazemskih vzorcih, je možno, da je to dejstvo vplivalo na sam rezultat, česar pa zaradi logističnih pogojev ne bomo ugotavljali.

3.2 MERJENJE AKTIVNOSTI FXa Z ANALIZATORJEM BCS XP

3.2.1 REAGENTI

Za merjenje aktivnosti FXa bomo uporabljali že pripravljene reagente Berichrom® Heparin, proizvajalca Siemens (21):

- **Reagent FX Diluent** (Dextran Sulphate): liofilizirano vsebino raztopimo v 10 mL destilirane vode 15 minut pred uporabo.
- **Reagent FX** (reagent za FXa): liofilizirana frakcionirana človeška plazma z dodatkom pufru Tris, NaCl in EDTA; raztopimo jo v raztopini diluenta FX (10 mL); vsebuje konzervans natrijev azid (< 1 g/L).

- **Reagent AT III:** liofilizat, ki vsebuje človeški antitrombin in natrijev azid (< 1 g/L); raztopimo ga v 1 mL destilirane vode.
- **Substrat:** 4 mmol/L Z-D-Leu-Gly-Arg-ANBA-metil-amid je liofiliziran; raztopimo ga v 2 mL destilirane vode. Vsebuje tri aminokisline. Kratica ANBA predstavlja 5-amino-2-nitrobenzojsko kislino.

Vse reagente moramo tik pred uporabo dobro premešati, tako, da se ne penijo. Neodprte reagente shranjujemo na 2 - 8 °C in jih obvezno porabimo do preteka roka uporabe. Stabilnosti različnih reagentov pa se po raztapljanju močno razlikujejo:

Tabela 3.1: Stabilnost reagentov

Temperatura	Reagent FX	Reagent AT III	Substrat
37 °C	4 ure	-	1 teden
15 – 25 °C	3 dni	1 teden	2 tedna
2 – 8 °C	2 tedna	2 tedna	6 tednov
≤ - 20 °C	2 meseca	2 meseca	6 mesecev

V originalni steklenički lahko vse omenjene reagente zamrznemo največ trikrat zapored. Zato je potrebno na vsebnike, v katerih jih hranimo v zamrzovalniku obvezno zapisati datume priprave in odmrzovanja. Po tretjem odmrznjenju pa jih hranimo v hladilniku vse do roka uporabe (21).

3.2.2 KONTROLE KAKOVOSTI

Pred analizo vzorcev moramo z vsakim analizatorjem izvesti kontrole kakovosti. Če je rezultat teh meritev v dovoljenem referenčnem območju, lahko izvedemo analizo vzorcev. Za kontrolo kakovosti uporabljamo že pripravljene kontrolne plazme proizvajalca Stago, in sicer:

- Reagent 1 (STA® - Rivaroxaban Control 1): liofilizirana človeška plazma, ki vsebuje natančno opredeljeno količino rivaroksabana.
- Reagent 2 (STA® - Rivaroxaban Control 2): liofilizirana človeška plazma, ki vsebuje natančno opredeljeno količino rivaroksabana, ki pa je večja kot v reagentu 1 (22).

3.2.3 PRINCIP MERJENJA

Za določitev koncentracije FXa smo v Slovenj Gradcu uporabljali novi biokemični analizator BCS XP, proizvajalca Siemens.

To je avtomatski sistem, namenjen izvajanju koagulacijskih, kolorimetričnih in imunoloških testov. Sestavljen je iz dveh pomembnih delov, in sicer **analizatorja**, ki optično prebere (skenira) črtne kode vzorcev in reagentov, pipetira vzorce, standarde, kontrole in reagente, izvaja redčitve, inkubira vzorce in izvede njihove meritve. Druga komponenta, ki je povezana z analizatorjem je **računalnik**. Ta omogoča vnos podatkov za posamezne vzorce, sprejema ukaze za izvedbo analiz, prebere in shrani podatke serijskih števil reagentov, izračuna referenčne krivulje in poda rezultate meritev ter omogoča povezavo z laboratorijskim informacijskim sistemom (LIS) (23).



Slika 3.1: Analizator BCS XP

Analizator je sestavljen iz 5 pomembnih enot, ki so (23):

- **Postaja z nosilci (»rack unit«):** sprejme nosilce z vzorci, standardi, kontrolami, reagenti in raztopino za spiranje. Vsebuje 14 linij, od katerih so prve štiri namenjene samo reagentom, ostale pa tako vzorcem kot reagentom. Reagenti v začetnih linijah so hlajeni na 15 °C. Hlajenje pa je omogočeno samo takrat, ko so vstavljeni vsi štirje nosilci, zato je priporočljivo, da so v aparatu ves čas, saj tako

reagentom ohranjamo stabilnost. Vgrajeni čitalec črtnih kod omogoča, da sistem razlikuje med vzorci in reagenti.

- **Razdelilna enota (»dispensing unit«):** je sestavljena iz razredčevalca reagentov in vzorcev. Razredčevalec je sestavljen iz gonila z motornim pogonom, brizge in ventila. Brizga je namenjena razdeljevanju in aspiraciji, ventil pa nadzoru uporabe tekočin. Razredčevalec reagentov s 1000 μL brizgo omogoča pipetiranje reagentov in tekočine za spiranje. Razredčevalec vzorcev z 250 μL brizgo pa izvaja pipetiranje vzorcev, kontrol, standardov in morebitnih dodatnih reagentov.
- **Pipetorski roki:** na desni strani aparata je pipetor, ki transportira vzorce, kontrole, standarde in dodatne reagente v reakcijske kivete merilnih rotorjev. Narejen je tako, da ne doseže linij nosilcev na mestih 1 in 2. Na levi strani pa se nahaja pipetor, ki prenaša reagente v reakcijske kivete merilnih rotorjev in doseže vse linije z nosilci. Med prenosom reagenta se tekočina v pipetorju segreje na 37 °C, kar je tudi stalna temperatura v reakcijskih kivetah. Obe pipetorski roki sta opremljeni z enoto za spiranje. Za preprečitev kontaminacije s kritičnimi reagenti, kot so trombin, FXa in rekombinantni tromboplastin, pipetor uporablja inaktivacijsko raztopino za spiranje (detergent).
- **Merilna enota:** zaščiten je s pokrovom, ki preprečuje temperaturna nihanja. Skozi celoten reakcijski čas se vzdržuje stalna temperatura 37 °C. Merilno enoto sestavljajo: prenosna roka za merilne rotorje, dve komori za zalogo merilnih rotorjev, pipetorska in merilna pozicija ter mehanizem za odstranjevanje merilnih rotorjev. Prenosna roka za merilne rotorje prenaša merilne kivete na ustrezne pozicije. Najprej prenese tiste iz desne komore proti levi, nato pa sledi njihov prenos na pipetorsko pozicijo, kjer pipetor vanje doda ustrezne reagente in vzorce. Temu sledi merjenje izbranega analita. Po končanem merjenju se polne merilne kivete prenesejo v odpadno enoto, ki lahko zadrži največ 14 merilnih kivet. **Merilne rotorje sestavlja** 20 merilnih reakcijskih kivet. Reakcijska kiveta ima pipetirno, dilucijsko in merilno komoro. Celotna merilna komora sega od sredine rotorja do njegovega zunanega dela. Z dvema pregradama je ločena v tri predele. Med vrtenjem skozi pregrade, zaradi centrifugalne sile vzorci in reagenti stečejo v zunanji predel merilne komore. Tekočine se pri tem med seboj pomešajo, hkrati pa poteče koagulacijska reakcija, ki jo nato aparat izmeri.

- **Spiralni sistem:** sestavljen je iz dveh dodatnih vsebnikov in zbiralnika za odpadno tekočino. Prvi 5-litrski vsebnik vsebuje destilirano vodo, drugi pa dezinfekcijsko raztopino. Vsi vsebniki se nahajajo izven analizatorja in so nameščeni pod njim. Nivoje posameznih tekočin v njih zaznavajo s senzorji. Programska oprema v primeru pomanjkanja tekočin posreduje prikaz opozorila za njihovo zamenjavo oz. dopolnitev na zaslonu računalnika.

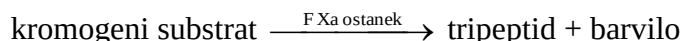
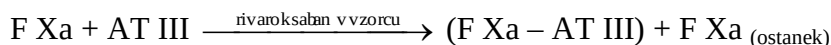
Princip analize je **optičen**. Omogočeni so fotometrični, turbidimetrični in imunološki načini merjenj. Fotometer vsebuje ksenonsko žarnico kot izvor svetlobe, filtre različnih valovnih dolžin, vodnike svetlobe, referenčni kanal in merilne detektorje. Turbidimeter meri motnost oz. upad intenzitete svetlobe zaradi le-te. Turbidimetrija je torej merjenje intenzitete prepuščene svetlobe zaradi njenega sipanja pod kotom 0° , glede na vpadno svetlobo (razpršitev, odboj in absorbanca svetlobe). V tem primeru dodatek reagenta v vzorcu povzroči spremembo intenzitete prepuščenega svetlobnega žarka. Reakcijske parametre aparat primerja s kalibracijsko krivuljo. Določimo razmerje med intenziteto vstopnega (I_0) in izstopnega (I_T) žarka. Tako lahko izračunamo absorbanco ($A = -\log I_T/I_0$) in nato še koncentracijo analita s pomočjo umeritvene oz. kalibracijske krivulje. Referenčni signal nam pri tem omogoča kompenzacijo spremembe v intenziteti svetlobe. Tako referenčni kot tudi signal iz kivete z vzorcem se pretvorita v električna signala, ki ju zazna ustrezen detektor (23).

Analize tovrstnih meritev motijo lipemičnost, motnost, ikteričnost in hemoliza vzorcev, saj v teh primerih izmerimo višjo absorbanco.

Pred zagonom analizatorja moramo obvezno pregledati njegovo stanje, in sicer vsebino vsebnika z destilirano vodo in dezinfekcijskim sredstvom, ki ju po potrebi dopolnimo. Hkrati spraznimo vsebnik za odpadno tekočino. Preverimo tudi zalogo spiralne tekočine na levi in desni strani aparata, ki je potrebna za spiranje pipetorjev. Izpraznimo tudi odpadno enoto merilnih rotorjev, zapremo pokrov in pričnemo z delom (23).

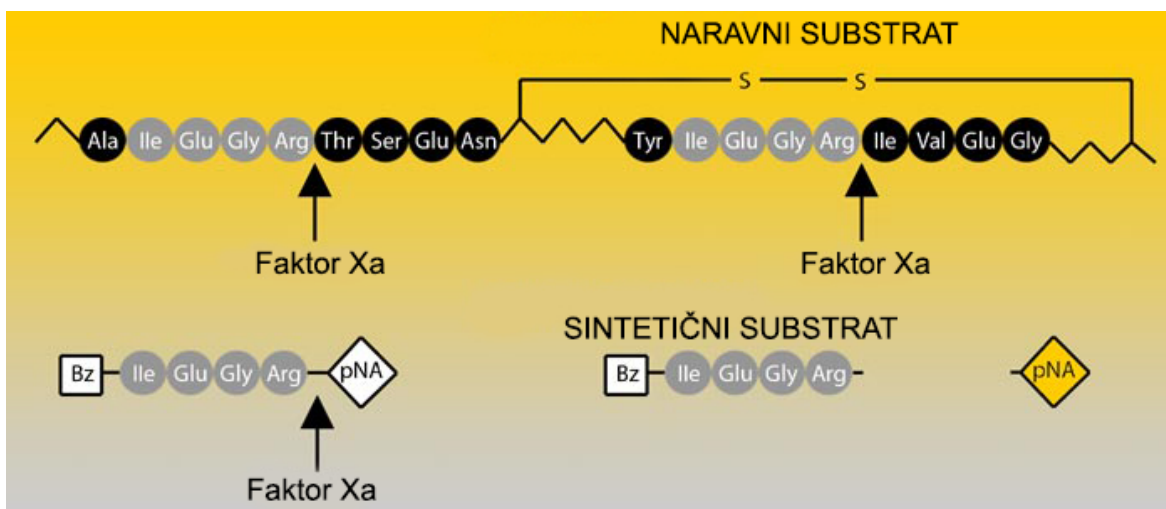
Koncentracijo rivaroksabana v plazmi določamo s kromogeno metodo. Vzorce, to je citratno plazmo vstavimo v nosilce na eno izmed za to predvidenih pozicij. Črtna koda na epruvetah mora biti obrnjena v levo, da jo čitalec lahko prebere. Pipetor za vzorce odpipetira predpisano količino citratne plazme v merilno komoro, ustrezní pipetor pa ji doda reagente. Vzorec se nato inkubira z dodanima reagentoma AT III in FXa. V času

inkubacije pride do inaktivacije FXa v reagentu, ki jo povzroči rivaroksaban. Ta se namreč ne veže na plazemske beljakovine, zato uporaba dekstran sulfata, kot je to v primeru heparina, ki pa je vezan na beljakovine, ni potrebna. Količino FXa, ki ostane v vzorcu po inkubaciji, določimo **spektrofotometrično**, in sicer z dodatkom ustreznega kromogenega substrata. Nato s kinetičnim testom izmerimo porast absorbance pri 405 nm (21).



Normalne vrednosti anti-Xa delovanja rivaroksabana so $< 5 \mu\text{g/L}$.

Kromogeni substrati so peptidi, podobni naravnim substratom za FXa. Oponašajo zaporedje aminokislin v naravnih substratih, in sicer na mestu, kjer jih cepi FXa. Na sintetični peptid je vezan kromofor, običajno para-nitroanilin (pNa) ali 5-amino-2-nitrobenzojska kislina (ANBA), ki po hidrolizi obarva raztopino. Absorbanco obarvane raztopine izmerimo spektrofotometrično in je sorazmerna aktivnosti FXa. Tehnologijo kromogenega substrata so razvili v začetku leta 1970 (24).



Slika 3.2: Primerjava cepitve naravnega in sintetičnega substrata z FXa

Slika 3.2 prikazuje primer reakcije cepitve naravnega in sintetičnega substrata. FXa na dveh mestih cepi protrombin, zaporedje štirih aminokislin je na obeh mestih enako. Aktivnost FXa lahko določimo tudi s sintetičnim kromogenim substratom, ki je sestavljen iz enakih aminokislin, na katere je vezan kromofor (24).

3.3 MERJENJE AKTIVNOSTI FXa NA ANALIZATORJU CS – 2100i

3.3.1 REAGENTI IN KONTROLE

Uporabili smo enake reagente in kontrole kot pri analizatorju BCS XP.

3.3.2 PRINCIP MERJENJA

Na KOŽB UKC Ljubljana so za določitve koncentracije FXa v sveže odvzetih in odmrznjenih (poslanih iz Slovenj Gradca) plazemskih vzorcih uporabljali analizator CS – 2100i, proizvajalca Siemens.



Slika 3.3: Analizator CS - 2100i

Gre za popolnoma avtomatiziran aparat, ki omogoča ugotavljanje parametrov strjevanja krvi za diagnostično uporabo in lahko hitro ter z visoko stopnjo natančnosti analizira veliko količino vzorcev. Vzorce lahko analizira na osnovi koagulacijskih, kromogenih in imunoloških reakcij. Primarni vzorec za analize je človeška plazma z Na-citratom. Aparat je sestavljen iz (25):

- glavne enote, ki opravlja analize vzorcev in vključuje tudi vzorčevalnik, ki samodejno dostavlja vzorce;
- informacijsko procesne enote, ki obdeluje podatke, posredovane iz glavne enote, upravljamo jo s pomočjo zaslona na dotik, tipkovnice in miške;
- pnevmatske enote, ki dovaja stisnjen zrak do glavne enote;
- vsebnika za spiranje, napolnjenega s tekočino za spiranje(destilirana voda);

- tiskalnika in vsebnika, v katerem se zbira odpadna tekočina, v kolikor ni na voljo kanalizacije ter ročnega čitalca črtnih kod, ki ga lahko uporabljamo za identifikacijo vzorcev, nosilcev in reagentov .

Kot smo že omenili, lahko analizator izvaja tri metode meritev, in sicer:

- **Koagulacijsko:** vstopna svetloba je usmerjena v zmes krvne plazme in reagentov, v kateri zaradi reakcije pretvorbe fibrinogena v fibrin pride do spremembe v motnosti, ki jo aparat zazna kot spremembo prepuščene svetlobe. Večja kot je motnost vzorca, manj svetlobe gre skozenj, izmerjena absorbanca pa je premosorazmerna koncentraciji analita v njem.
- **Kromogeno:** reakcija se začne z mešanjem plazemskega vzorca in reagenta (kromogeni substrat), aparat pa jo zaznava v obliki spremembe absorpcije svetlobe pri določeni valovni dolžini.
- **Imunološko:** reakcija se prične, ko se pomešata plazma in lateksni reagent; aparat zazna spremembo v absorbanci zaradi nastanka skupkov lateksnih delcev.

Analizator vsebuje mehanske, hidravlične in električne sisteme, ki jih uporablja za izvajanje analiz po naslednjem vrstnem redu (25):

- Vzorci na desni strani nosilca se prenesejo na položaj za aspiracijo.
- Pipetor nato prenese potrebno količino vzorca plazme iz nosilca v kivete, pri čemer samodejno določi količino vzorca, in sicer glede na nastavitve analitskih parametrov in število ponovitev meritev.
- Kivete z vzorci se ogrejejo na predpisano temperaturo (inkubacija).
- Pipetor za reagente aspirira določeno količino reagenta iz vsebnika, ki se nahaja v nosilcu za reagente; reagent se segreje na predpisano temperaturo že znotraj pipetorja.
- Kiveta s segretim vzorcem, se prenese na položaj za razdeljevanje reagenta, pipetor za reagente pa nato vanjo doda ogreti reagent.
- V kiveti se njuna vsebina najprej premeša, nato pa se kiveta prenese v detekcijski blok.
- Obseg koagulacijske reakcije aparat zazna v obliki spremembe prepuščene svetlobe.
- Kivete z vzorci, ki so bili analizirani, se odstranijo v odpadno enoto.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 OCENA KAKOVOSTI MERITEV KONTROLNIH VZORCEV Z ANALIZATORJEM BCS XP

Tako v Slovenj Gradcu kot v Ljubljani smo na obeh analizatorjih uporabljali reagente in kontrole iz iste serije (enak lot). Reagenti Berichrom® Heparin, proizvajalca Siemens so imeli lot 42750. Kontrole STA® - Rivaroxaban Control pa so bile z lotom 110838.

Kot smo že omenili, smo kakovost reagentov preverjali s tovarniško pripravljenimi kontrolnimi vzorci, proizvajalca Stago, in sicer STA® - Rivaroxaban Control 1 ter STA® - Rivaroxaban Control 2. To sta vzorca liofilizirane človeške plazme, ki vsebujeta natančno določeno količino rivaroksabana. Referenčni interval prve kontrole je 61 - 99 µg/L ($\bar{x}$ = 80 µg/L), druge pa od 246 – 340 µg/L ($\bar{x}$ = 293 µg/L). Kontroli za merjenje aktivnosti faktorja Xa smo pripravili tako, da smo ju raztopili v po 1,0 mL destilirane vode ter ju pazljivo premešali, da ne bi prišlo do penjenja. Kontroli smo pustili stati 30 minut na sobni temperaturi in ju vmes občasno premešali. Preden kontrolo vstavimo v analizator jo še enkrat dobro premešamo in nato opravimo meritev. Kontrolni vzorci pri različnih temperaturah so različno stabilni (Tabela 4.1) (22).

Tabela 4.1: Stabilnost kontrolnih vzorcev

Temperatura	Kontrola rivaroksaban
15 – 25 °C	8 ur
2 – 8 °C	7 dni (pred uporabo za 30 min na sobno T)
≤ - 20 °C	ni predpisano, če je izven dovoljenega območja raztopimo nov kontrolni vzorec

Pred vsakim začetkom merjenja aktivnosti FXa v naših vzorcih smo izvedli kontrolo reagentov z eno izmed kontrol. Rezultati dobljeni s kontrolnimi vzorci na analizatorju BCS XP so prikazani v spodnji Tabeli 4.2.

Tabela 4.2: Rezultati kontrolnih vzorcev na analizatorju BCS XP

ZAPOREDNA ŠTEVILKA	STA® - Rivaroxaban Control 1 (61 - 99 µg Xa/L)	STA® - Rivaroxaban Control 2 (246 – 340 µg Xa/L)
1	94	309
2	98	317
3	70	295
4	78	298
5	71	290
6	89	308
7	79	300
8	75	309
9	69	310
10	70	291
11		277
12		309
13		308
14		336
15		284
16		275

Za meritve obeh kontrol smo nato izračunali aritmetični sredini ($\bar{x}$) standardna odklona (SD) ter koeficienta variacije (CV). Rezultati so zbrani v Tabeli 4.3.

Tabela 4.3: Rezultati $\bar{x}$, SD, CV za STA® - Rivaroxaban Control 1 in 2

	STA® - Rivaroxaban Control 1	STA® - Rivaroxaban Control 2
PRIPOROČENE VREDNOSTI	61 - 99 µg Xa/L	246 – 340 µg Xa/L
N	10	16
$\bar{x}$	79,30	301,00
SD	10,69	15,62
CV(%)	13,3	5,2

Vidimo, da je koeficient variacije meritev kontrole Rivaroxaban Control 1 13,3%, v primeru STA® - Rivaroxaban Control 2 pa 5,2%. Očitno je torej, da je ponovljivost meritev v primeru uporabe kontrole 2 veliko boljša kot pri uporabi kontrole nivoja 1. To se je izkazalo tudi praktično, saj je bil koncentracijski nivo kontrole 2 veliko bolj stabilen od tistega pri kontroli 1. Vendar pa lahko na osnovi rezultatov trdimo, da je kakovost naših reagentov dobra.

4.2 OCENA KAKOVOSTI MERITEV KONTROLNIH VZORCEV Z ANALIZATORJEM CS – 2100i

Oceno kakovosti reagentov na analizatorju CS – 2100i, so na Kliničnem oddelku za žilne bolezni (KOŽB) UKC v Ljubljani preverjali z enakimi kontrolami, kot pri nas, na Oddelku za laboratorijsko diagnostiko Splošne bolnišnice Slovenj Gradec, torej z STA® - Rivaroxaban Control 1 ter STA® - Rivaroxaban Control 2, proizvajalca Stago. Prav tako so pred vsakim merjenjem vzorcev uporabili ustrezne kontrolne vzorce. Za kontrolo 1 so dokazali 6,1% (CV), za kontrolo 2 pa 3,9% (CV) ponovljivost. Torej lahko tudi v tem primeru ugotovimo, da je bila kakovost uporabljenih reagentov dobra.

Ker zaradi varnostne politike KOŽB, nismo mogli pridobiti posameznih vrednosti meritev kontrol, smo podatke podali zgolj opisno.

4.3 MERITVE VZORCEV

Z obema analizatorjema smo izmerili aktivnost FXa v 71 vzorcih citratne plazme. V Splošni bolnišnici Slovenj Gradec, smo zbrali 44, na KOŽB UKC Ljubljana pa 27 vzorcev. To pomeni, da smo v Slovenj Gradcu opravili analizo 44 vzorcev sveže pripravljene plazme, v Ljubljani pa 27. Vzorce smo takoj po opravljeni meritvi zamrznili na – 70 °C. Ko smo jih v obeh laboratorijih zbrali dovolj, smo naredili izmenjavo med oddelkoma, pri čemer smo uporabili nadzorovan bolnišnični transport. Nato smo v obeh laboratorijih izvedli meritve izmenjanih vzorcev, da smo potem lahko primerjali rezultate meritev enakih metod na dveh različnih analizatorjih. Izmenjane vzorce smo v obeh laboratorijih za analizo na hitro odmrznili in izvedli meritve aktivnosti faktorja Xa. Zaradi zamrzovanja in odmrzovanja vzorcev obstaja večja verjetnost za to, da rezultati med seboj variirajo. Rezultate meritev vseh 71 vzorcev smo zbrali v Tabeli 4.4. V tej tabeli so tudi posebej s krepkim in ležečim tiskom označeni vzorci, kjer so bile meritve vzorcev opravljene s svežo

citratno plazmo. Vzorci z normalnim tiskom pa predstavljajo meritve po odmrznitvi citratne plazme.

Tabela 4.4: Rezultati meritev aktivnosti FXa v vzorcih citratne plazme

ZAPOREDNA ŠTEVILKA	BCS XP Xa (µg/L)	CS – 2100i Xa (µg/L)
1	141	123
2	0	0
3	107	122
4	51	90
5	12	21
6	3	1
7	22	31
8	2	2
9	13	9
10	0	0
11	0	3
12	0	1
13	1	1
14	9	6
15	7	12
16	29	26
17	0	0
18	0	0
19	233	259
20	8	9
21	74	75
22	8	8
23	7	19
24	50	62
25	13	9
26	8	8
27	301	297
28	572	429
29	51	52
30	22	13
31	10	8
32	185	188
33	153	180
34	361	297
35	54	42
36	42	55

37	124	138
38	144	154
39	192	201
40	22	24
41	291	338
42	191	204
43	12	7
44	121	140
45	20	15
46	425	451
47	221	235
48	10	12
49	19	20
50	69	86
51	26	25
52	297	282
53	201	222
54	11	18
55	3	2
56	5	22
57	35	40
58	73	88
59	103	112
60	17	24
61	39	37
62	2	3
63	0	0
64	0	0
65	2	2
66	71	106
67	136	203
68	3	4
69	27	18
70	35	45
71	25	21
N = 71	$\bar{x} = 77,76$	$\bar{x} = 81,08$

Za obe skupini rezultatov izmerjenih z različnima analizatorjema smo izračunali povprečni vrednosti aktivnosti faktorja Xa v citratni plazmi. Povprečna izmerjena aktivnost faktorja Xa v vzorcih analiziranih z analizatorjem BCS XP je bila 77,76 µg/L, v tistih izmerjenih z CS – 2100i pa 81,08 µg/L.

4.3.1 PREVERJANJE NORMALNOSTI PORAZDELITVE MERITEV

Najprej smo preverili porazdelitve vrednosti meritev in ugotavljali ali se porazdeljujejo normalno. Testa, ki ju lahko uporabimo v ta namen sta Kolmogorov – Smirnov (K – S test) in Shapiro – Wilkov test. Kadar je pri analizi vrednost p signifikantna, torej večja od 0,05 ($p > 0,05$), gre za normalno porazdelitev, kadar pa je manjša od te vrednosti ($p < 0,05$), pa temu ni tako. Za ugotavljanje normalnosti porazdelitve smo uporabili statistična programa SPSS in MedCalc.

Ugotovili smo, da se meritve ne porazdeljujejo normalno, saj je bila vrednost p manjša od 0,05 ($p < 0,0001$). To je povsem pričakovano, saj z aparatom ne moremo izmeriti vrednosti, ki so manjše od 0. Obliki porazdelitev meritev za oba analizatorja prikazujeta diagrama 4.1 in 4.2.

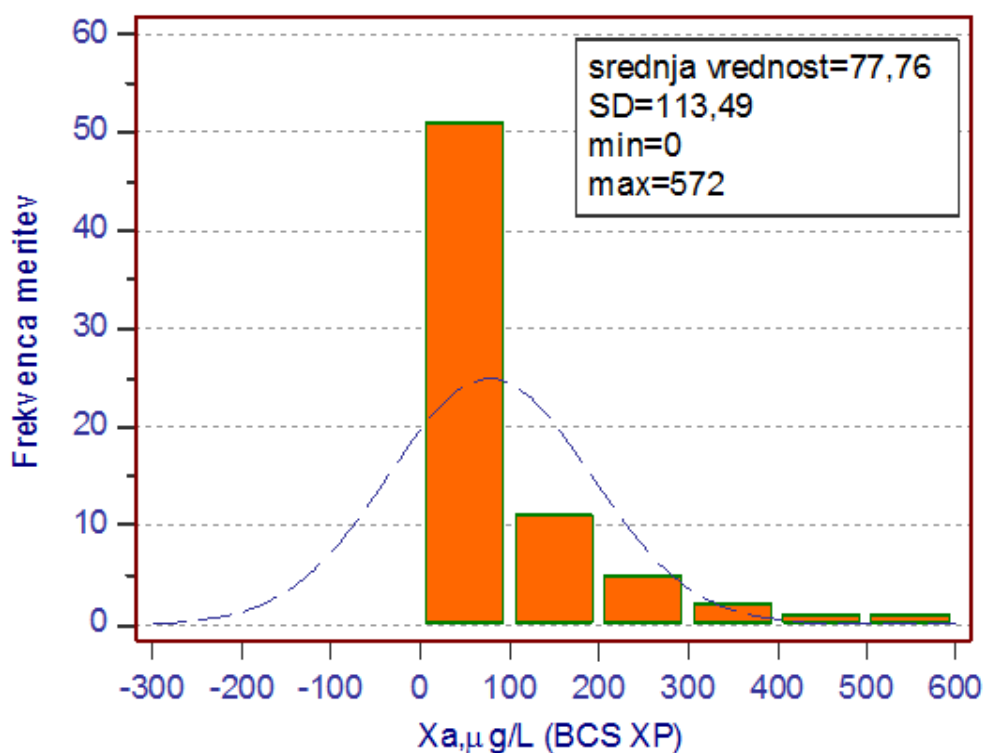


Diagram 4.1: Oblika porazdelitve meritve, izmerjenih z analizatorjem BCS XP

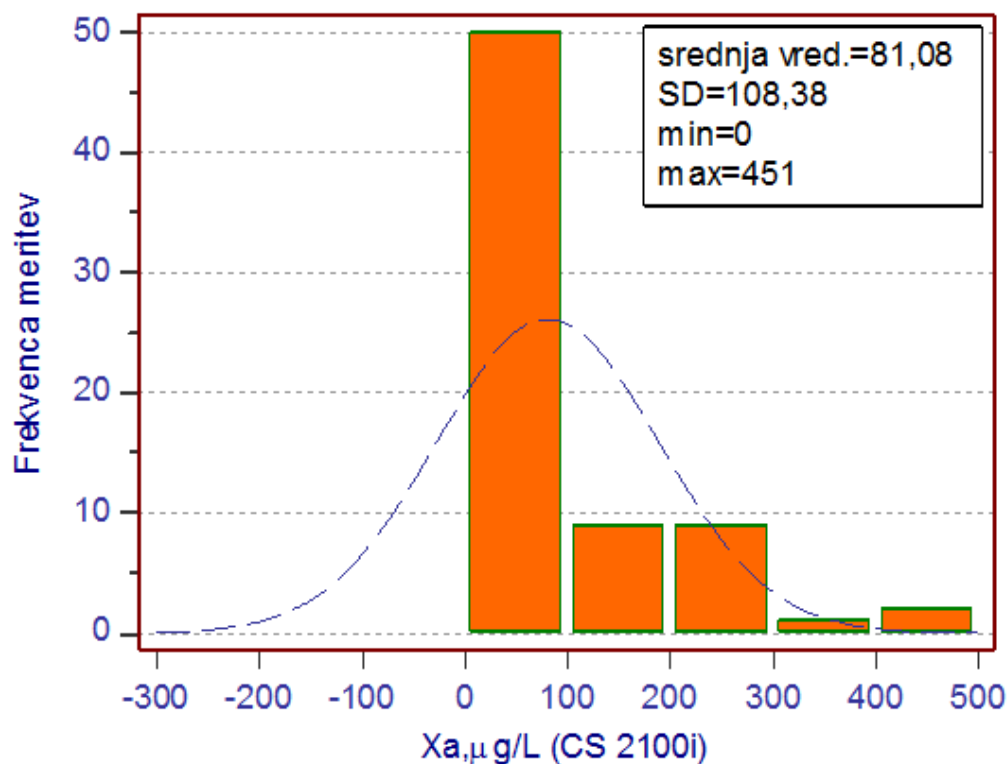


Diagram 4.2: Oblika porazdelitve meritev, izmerjenih z analizatorjem CS 2100i

Takšno obliko porazdelitve smo pričakovali, saj manj od vrednosti 0 z analizatorjema ne moremo zanesljivo izmeriti.

4.3.2 PRIMERJAVA MERITEV MED ANALIZATORJEMA

Preverili smo kako so si rezultati meritev izmerjeni z obema analizatorjema med seboj primerljivi. V ta namen smo uporabili t-test, pri čemer smo postavili ničelno hipotezo (H_0), da so rezultati meritev primerljivi oziroma niso značilno različni, v kolikor je vrednost (p) večja od 0,05 ($p > 0,05$). Alternativna hipoteza (H_a) pa predvideva, da rezultati niso primerljivi oz. so značilno različni, če je vrednost p manjša od 0,05 ($p < 0,05$). Meja značilnosti je vrednost p , ki je manjša od 0,05.

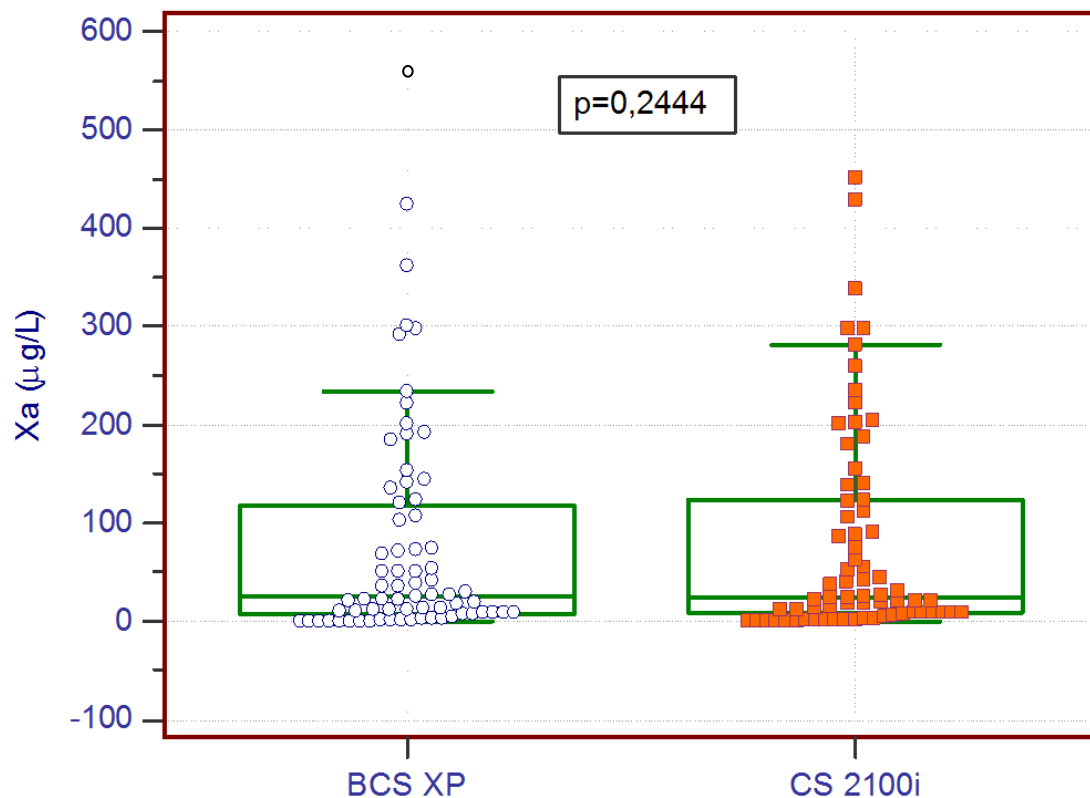


Diagram 4.3: Primerjava aktivnosti Xa na obeh analizatorjih

Diagram 4.3 prikazuje primerljivost meritev izmerjenih z obema analizatorjema. S statističnim programom MedCalc smo ugotovili, da lahko privzamemo ničelno hipotezo, saj je bila vrednost $p > 0,05$ ($p=0,2444$), kar pomeni da so meritve med analizatorjema primerljive. Statistični test je bil dvostranski, saj se lahko vrednosti meritev oz. aktivnosti faktorja Xa spreminjajo, torej zvišajo ali znižajo.

Najnižja izmerjena vrednost, z obema analizatorjema je bila 0 µg/L, najvišja dosežena z aparatom BCS XP 572 µg Xa/L, s CS – 2100i pa 451 µg Xa/L. Povprečna vrednost meritev na aparatu BCS XP je bila 77,76 µg Xa/L, na CS – 2100i pa 81,08 µg Xa/L.

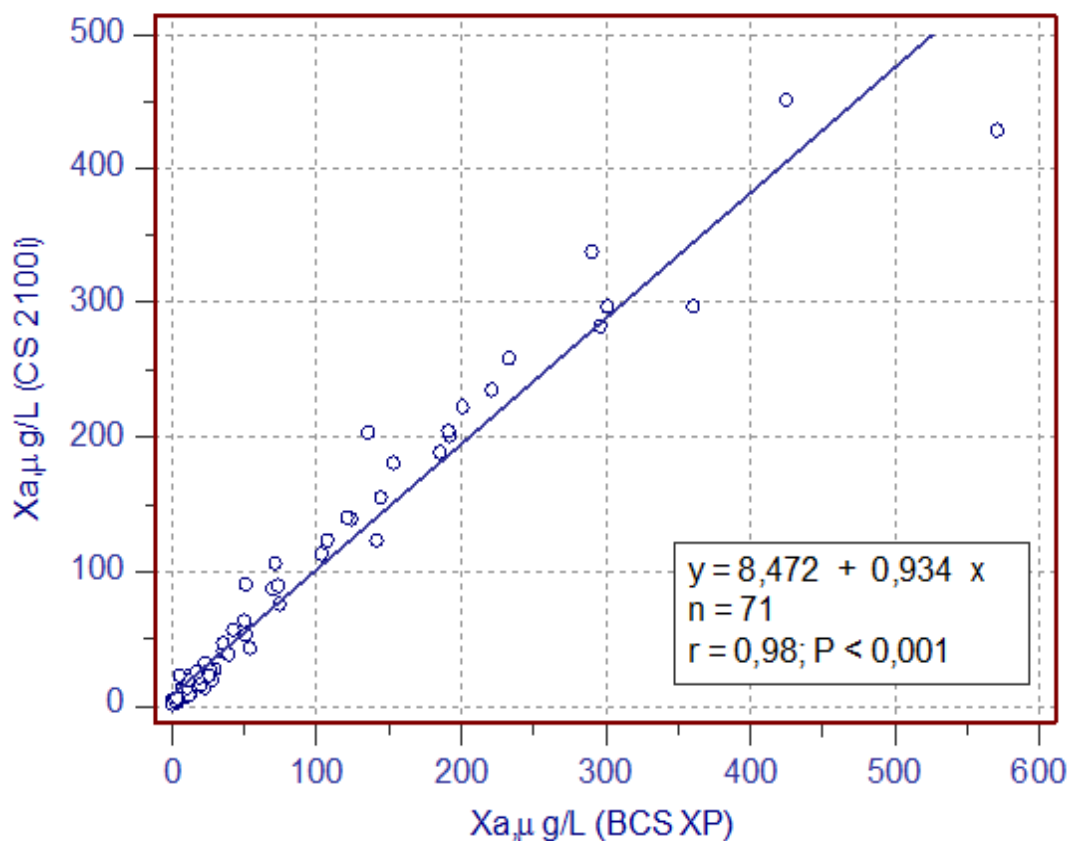


Diagram 4.4: Izmerjene vrednosti X_a z obema analizatorjema

Diagram 4.4 prikazuje razpršenost rezultatov meritev, pri čemer lahko vizualno ocenjujemo morebitna odstopanja. Vidimo, da je stopnja ujemanja med meritvami določenimi z obema aparatom dobra, naklon korelacijske premice pa je blizu enotnosti, z majhnim odstopanjem (biasom). Enačba premice je $y = 8,472 + 0,934x$, korelacijski koeficient (r) pa 0,98, kar statistično pomeni, da je korelacija (povezanost) med rezultati, izmerjenimi z obema analizatorjema dobra. Obstaja torej visoka linearna povezanost med vrednostmi enega in drugega analizatorja. Ker je vrednost p korelacije testa manjša od 0,05 ($p < 0,05$), to pomeni, da je povezanost statistično značilna. Regresijska premica torej dobro opisuje povezavo med spremenljivkama.

Ker pa koeficient korelacije ne zajema točnosti, prav tako pa tudi ne variabilnosti razlik med pari meritev, ki nam kažejo natančnost, pač pa primerja le obe skupini rezultatov med seboj, za natančnejše ocenjevanje ujemanja ni najbolj primeren. Tudi sama linearna regresija ne daje vpogleda v natančnost in točnost. Poleg tega pa predpostavlja, da je

neodvisna spremenljivka (x) brez napak. Vemo pa, da imata pri ocenjevanju ujemanja določeni napaki obe spremenljivki, tako odvisna, kot neodvisna. Zato je bolje uporabiti drugačno metodo, ki je primernejša od linearne regresije, to pa je Demingova regresija (26).

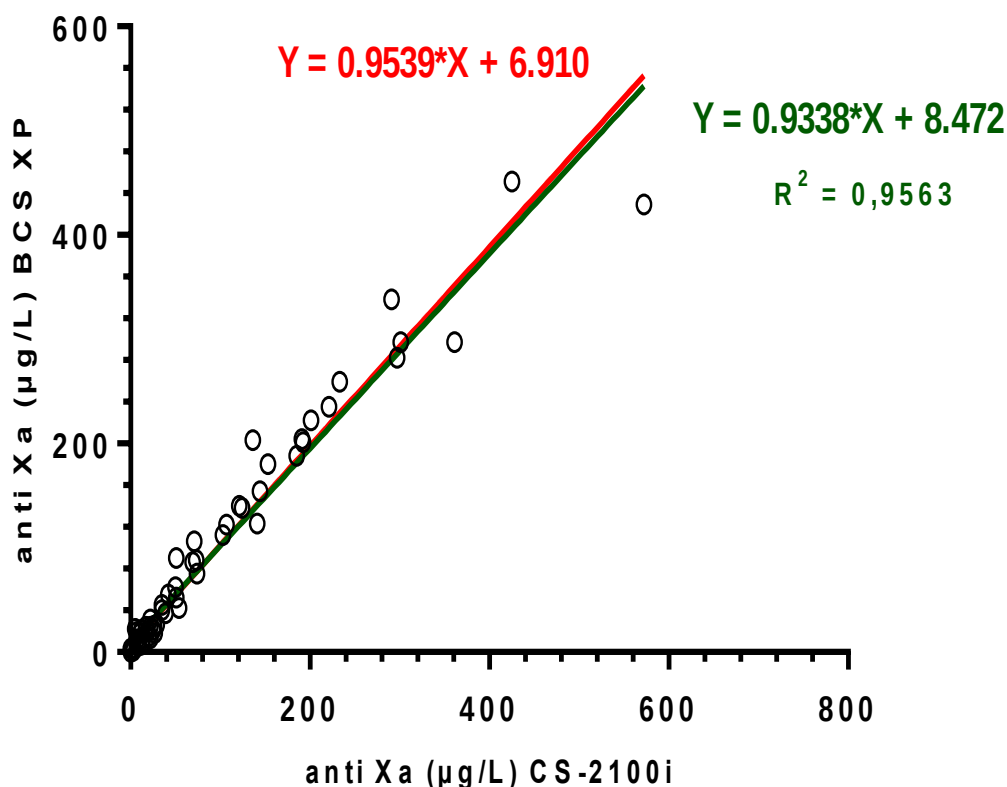


Diagram 4.5: Demingova (rdeča barva) in linearna (zelena barva) regresija

Pri regresijski analizi nam vrednost R^2 napoveduje stopnjo prileganja točk k regresijski premici. V diagramu 4.5 vidimo, da je enačba premice izračunana z Demingovo regresijo nekoliko ustrežnejša, in sicer zato, ker s tem načinom ugotavljanja regresije minimaliziramo vsote kvadratov parov meritev tako v smeri x kot tudi y. Linearna regresija pa minimalizira le kvadrate razlik v smeri y, ob že prej omenjeni predpostavki, da je spremenljivka x brez napak.

Za še bolj natančno primerjavo narišemo še Bland-Altmanov diagram razlik, v katerem lahko vidimo dejanski obseg biasa (odstopanja). Diagram 4.6 prikazuje ujemanje

rezultatov meritev, določenih z obema analizatorjema in nam omogoča njegovo opisno oceno.

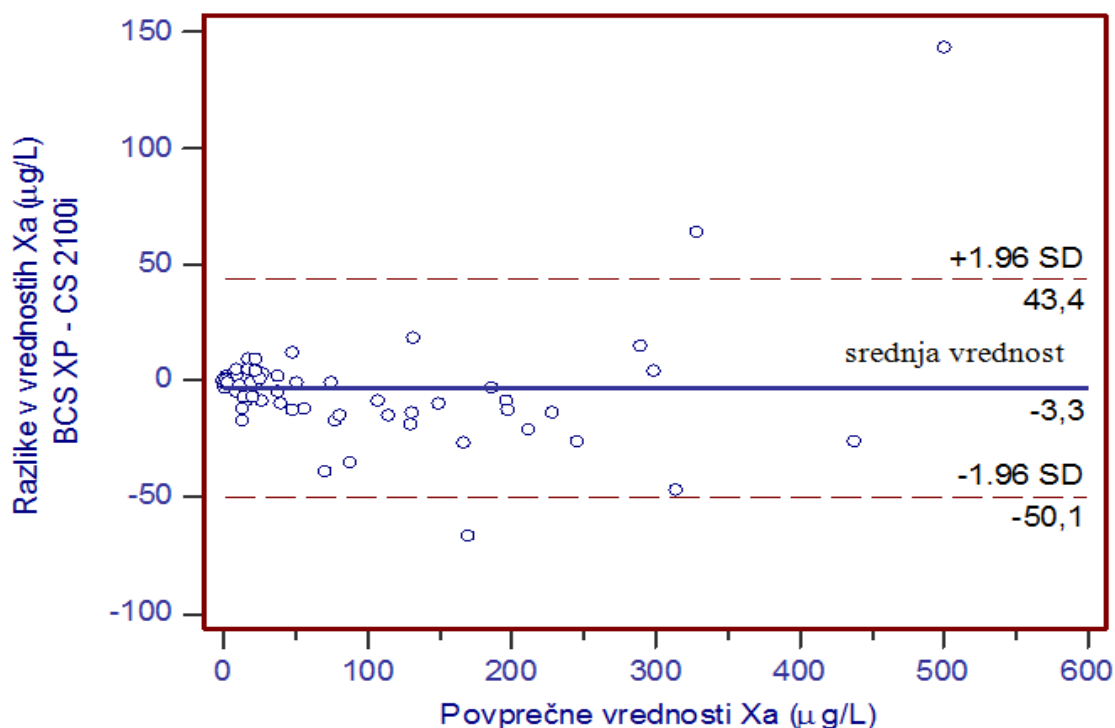


Diagram 4.6: Bland-Altmanov diagram razlik

Z Bland-Altmanovim diagramom prikažemo povprečje razlik oz. povprečno odstopanje oz. bias. Bias izračunamo kot razliko rezultatov nove metode, in jih odštejemo od tistih dobljenih z referenčno metodo. S tem prikažemo stopnjo ujemanja. Kadar npr. z eno metodo dobimo visoke rezultate, nato pa podobne še z drugo, je povprečje njihovih parnih razlik blizu nič. Sicer pa velja, da večje kot so razlike, bolj se primerjani metodi med seboj glede na meritve razlikujeta (27).

Vidimo, da je bilo povprečje razlik $-3,3 \mu\text{g Xa/L}$ kar pomeni, da smo z analizatorjem CS – 2100i v povprečju dobili za $3,3 \mu\text{g Xa/L}$ višje vrednosti, kot z BCS XP. Spodnja meja razlik je $-50,1$; zgornja pa $43,4$. Meji imata širok razpon, kar je lahko problematično pri tistih izmerjenih vrednostih, ki so nizke. To pomeni, da eden od omenjenih analizatorjev izmeri takšno vrednost, da na pacientu lahko opravimo predviden poseg, spet drug analizator pa poda meritev, ki pacientu preprečuje določen poseg. Zaključimo pa lahko, da

so razlike rezultatov meritev znotraj dveh standardnih deviacij (2SD), kar predstavlja 95% interval ujemanja oziroma še dovoljeno odstopanje.

S statistično analizo smo potrdili, da so pri vseh 71 plazemskih vzorcih pacientov, rezultati, rezidualne aktivnosti faktorja Xa, izmerjeni z obema analizatorjema primerljivi ($p < 0,05$). Aktivnost faktorja Xa je primerljiva na obeh analizatorjih. Na osnovi tega dejstva lahko torej uvedemo novo metodo za določanje aktivnosti faktorja Xa v rutinsko uporabo v naš bolnišnični laboratorij.

4.4 MERITVE VZORCEV ZNOTRAJ DIAGNOSTIČNO POMEMBNEGA INTERVALA

Vzorci, ki so v diagnostično pomembnem intervalu pri merjenju aktivnosti faktorja Xa imajo vrednosti $< 5 \mu\text{g Xa/L}$. V praksi velja, da lahko pri pacientu opravimo določen operativni poseg, kadar so vrednosti Xa nižje od $5 \mu\text{g/L}$. V primeru, da so vrednosti višje, pa moramo operativni poseg odložiti. Zato smo posebej statistično obravnavali tiste pare meritev, ki so imeli pri meritvah vrednosti pod $5 \mu\text{g/L}$ ter jih statistično primerjali med seboj. Rezultate smo zbrali v Tabeli 4.5.

Tabela 4.5: Rezultati meritev v območju $< 5\mu\text{g/L}$

ZAPOREDNA ŠTEVILKA	BCS XP Xa ($\mu\text{g/L}$)	CS-2100i Xa ($\mu\text{g/L}$)
1	0	0
2	3	1
3	2	2
4	0	0
5	0	3
6	0	1
7	1	1
8	0	0
9	0	0
10	3	2
11	2	3
12	0	0
13	0	0
14	2	2
15	3	4
N=15	$\bar{x} = 1,07$	$\bar{x} = 1,27$

Zaradi majhne količine vzorcev oz. meritev v diagnostičnem območju, smo za njihovo primerjavo uporabili neparametrični Mann-Whitneyev test. Zaradi premajhnega števila meritev ugotavljanje korelacije in regresije v tem primeru ni smiselno.

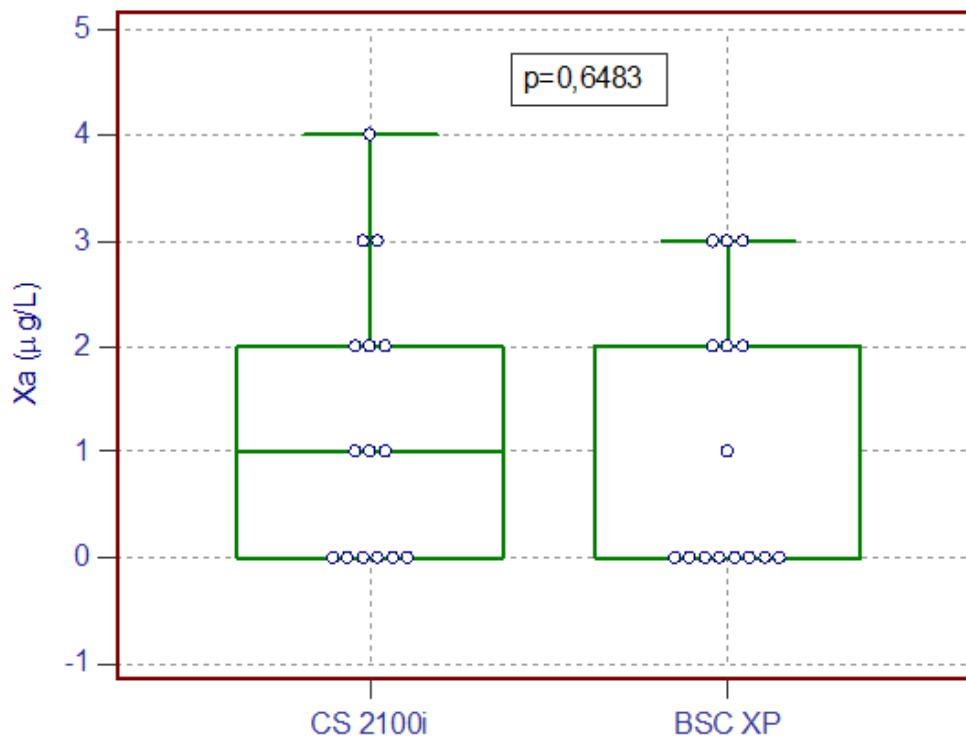


Diagram 4.7: Primerjava aktivnosti Xa, izmerjenih z obema analizatorjema

Diagram prikazuje primerjavo ugotovljenih rezidualnih aktivnosti faktorja Xa, izmerjenih z obema analizatorjema. Statistično primerjavo smo izvedli s programom MedCalc in ugotovili, da lahko tudi v tem primeru ničelno hipotezo (H_0) privzamemo, saj je bila vrednost $p > 0,05$ ($p = 0,6483$). To pomeni, da analizatorja dajeta med seboj primerljive rezultate meritev.

Tudi v tem primeru smo uporabili dvostranski test, saj se lahko vrednosti meritev spreminjajo, tako zvišajo, kot tudi znižajo.

Povprečni vrednosti meritev rezidualnega Xa sta bili v primeru uporabe analizatorja CS – 2100i 1,27 µg/L, v primeru BCS XP pa 1,07 µg/L.

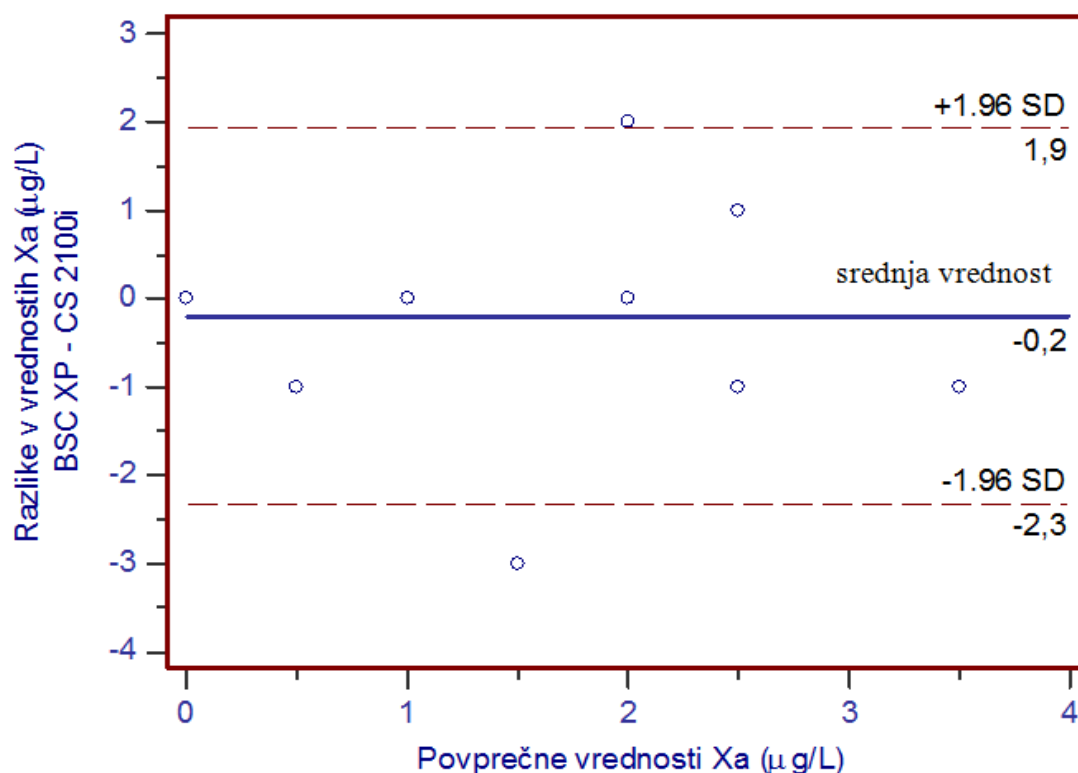


Diagram 4.8: Bland-Altmanov diagram razlik parnih meritev

Iz Bland-Altmanovega diagrama je razvidno, da je povprečje parnih razlik - 0,2 µg Xa/L, kar pomeni, da smo z aparatom CS – 2100i v povprečju izmerili za 0,2 µg/L višje vrednosti, kot z BCS XP. Spodnja meja razlik je bila -2,3 µg/L, zgornja pa 1,9 µg/L. Rezultati razlik meritev ležijo v območju dveh standardnih deviacij (2SD), kar predstavlja 95% interval ujemanja.

Vendar pa se pri trenutno veljavni diagnostično pomembni vrednosti < 5µg Xa/L, ki jo je postavil proizvajalec, pojavljajo dvomi, in sicer da to ni najbolj optimalna vrednost za načrtovanje določenih operativnih posegov. Proizvajalec sicer zagotavlja, da temu ni tako, a v klinični praksi se pri posameznih bolnikih, ki čakajo na operacijo pojavi težava zaradi tega, ker se zdravilo, kljub prenehanju jemanja nekaj dni pred načrtovanim posegom, ne odstrani popolnoma iz telesa. To lahko povzroči precejšnje zaplete, saj v tem primeru bolnik zaradi neustreznih laboratorijskih izvidov ne more na predvideno operacijo, kar pomeni, da bi bilo potrebno v takem primeru razmisliti o ustreznosti diagnostično pomembnih vrednosti Xa.

ZAKLJUČEK

Namen naše naloge je bil vzpostavitev, validacija in uvedba novega analiznega postopka za spremljanje učinkovitosti terapije z novim antikoagulacijskim zdravilom Xarelto®, ki vsebuje zdravilno učinkovino rivaroksaban. Analitski postopek smo vzpostavili na analizatorju BCS XP, s katerim smo merili rezidualno aktivnost faktorja Xa ter dobljene rezultate primerjali s tistimi, izmerjenimi z analizatorjem CS – 2100i, ki je v našem primeru predstavljal referenco. Metoda, ki jo uporabljata oba analizatorja, je enaka, in sicer kromogena metoda.

Naše delo in izsledke lahko strnemo kot sledi:

- aktivnost rivaroksabana proti faktorju Xa smo izmerili 71 pacientom, ki so bili na terapiji z zdravilom Xarelto®;
- primerjali smo rezultate izmerjene z analizatorjema BCS XP in CS – 2100i;
- pričakovano smo ugotovili, da se vrednosti meritev ne porazdeljujejo statistično normalno;
- meritve rezidualne aktivnosti Xa v plazemskih vzorcih, izmerjene z obema analizatorjema se ne razlikujejo značilno, zato smo privzeli ničelno hipotezo (H_0); saj je bila vrednost $p > 0,05$;
- primerjave smo izvedli z dvostranskim t-testom, ker se aktivnosti faktorja Xa v vzorcih spreminjajo;
- s korelacijsko analizo rezultatov določenih z obema analizatorjema, smo med njimi dokazali močno povezanost ($r = 0,98$) pri vrednosti $p < 0,05$;
- znotraj diagnostično pomembnega intervala (vrednosti meritev $< 5 \mu\text{g Xa/L}$), smo prav tako dokazali, da so parne vrednosti meritev določenih z obema analizatorjema primerljive, zato smo pri vrednosti $p > 0,05$ privzeli ničelno hipotezo.

Glede na naše izsledke lahko torej novo metodo, ki smo jo preskušali in validirali na analizatorju BCS XP uvedemo v naš laboratorij in jo začnemo rutinsko izvajati. To je pomembna pridobitev za stroške bolnišnice Slovenj Gradec, saj je vedno več pacientov, ki se odločajo za zdravljenje z novimi antikoagulacijskimi zdravili. Učinek teh zdravil je

namreč predvidljiv in zato ni potrebno redno spremljanje zdravljenja, s tem pa se zmanjša tudi število kontrolnih pregledov.

5 LITERATURA

1. <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/analytical-enzymes/factor-xa.html> (dostopno 26.6.2013)
2. http://en.wikipedia.org/wiki/Factor_X (dostopno 26.6.2013)
3. Andoljšek D. Hemostaza v: Kocijančič A, Mravlje F, Štajer D. Interna medicina. Založba Littera Picta d.o.o., Ljubljana 2005, 1286 – 1314.
4. Stegnar M. Prepoznavanje motenj hemostaze z laboratorijskimi metodami. Klinični oddelek za žilne bolezni, Interna klinika, Klinični center Ljubljana, Ljubljana 2005
5. http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000944/human_med_001155.jsp&mid=WC0b01ac058001d124 (dostopno 3.7.2013)
6. Roehrig S, Straub A, Pohlmann J, Lampe T, Pernerstorfer J, Schlemmer KH, Reinemer P, Perzborn E. (2005). »Discovery of the Novel Antithrombotic Agent 5-Chloro-N-({(5S)-2-oxo-3-[4-(3-oxomorpholin-4-yl)phenyl]-1,3-oxazolidin-5-yl}methyl)thiophene-2-carboxamide (BAY 59-7939): An Oral, Direct Factor Xa Inhibitor«. *J. Med. Chem.* 48 (19): 5900 – 8.
7. Samama MM, Contant G, Spiro TE, Perzborn E, Le Flem L, Guinet C, Gourmelin Y, Rohde G, Martinoli JL. (2013). Laboratory assessment of rivaroxaban: a review. *Trombosis Journal* 2013, 11:11. doi: 10.1186/1477-9560-11-11
8. <http://www.mayoclinic.com/health/atrial-fibrillation/DS00291> (dostopno 4.7.2013)
9. Štajer D, Koželj M. Venska tromboza v: Kocijančič A, Mravlje F, Štajer D. Interna medicina. Založba Littera Picta d.o.o., Ljubljana 2005, 273 – 276.
10. Štajer D, Koželj M. Pljučna embolija v: Kocijančič A, Mravlje F, Štajer D. Interna medicina. Založba Littera Picta d.o.o., Ljubljana 2005, 276 – 277.
11. Priročnik za uporabo novih peroralnih antikoagulacijskih zdravil v klinični praksi - Ljubljana: Slovensko zdravniško društvo, Sekcija za antikoagulacijsko zdravljenje in preprečevanje tromboemboličnih bolezni pri Združenju za žilne bolezni, 2012
12. Pomembne informacije za pravilno uporabo zdravila Xarelto®
13. Samama MM. (2013). Which test to use to measure the anticoagulant effect of rivaroxaban: the anti-factor Xa assay. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 11: 579–580. doi: 10.1111/jth.12165

14. Samama MM, Martinoli JL, LeFlem L, Guinet C, Plu-Bureau G, Depasse F, Perzborn E. (2010). Assessment of laboratory assays to measure rivaroxaban – an oral, direct factor Xa inhibitor. *Thrombosis and Haemostasis*, 103: 815–825. doi:10.1160/TH09-03-0176
15. Maunder CL, Costa M, Cue SM, Crawford EM, Papasouliotis K, Murphy KF. (2012). Measurement of prothrombin time and activated partial thromboplastin time in citrated whole blood samples from clinically ill dogs following storage. *Journal of Small Animal Practice*, 53: 531–535. doi: 10.1111/j.1748-5827.2012.01255.x
16. Samama MM, Guinet C. (2011). Laboratory assessment of new anticoagulants. *Clin Chem Lab Med* 2011, 49(5):761-72. doi: 10.1515/CCLM.2011.134
17. Krsnik M. Statistična primerjava dveh metod ob uvajanju novega testa. Univerzitetni klinični center Ljubljana, KIKKB, Ljubljana
18. Osredkar J. (2010). Validacija laboratorijskih metod. Izročki predavanj pri predmetu Načrtovanje in zagotavljanje kakovosti v medicinskih laboratorijih, 2. stopnja LBM, Ljubljana
19. Prezelj M. Priporočila za ravnanje s krvnimi vzorci. Slovensko združenje za klinično kemijo, Ljubljana 2006
20. Piskar M. Priporočeni postopek za odvzem venske krvi. Slovensko združenje za klinično kemijo, Ljubljana 1999
21. Priložena navodila proizvajalcev: Berichrom® Heparin. SIEMENS; 2012
22. Priložena navodila proizvajalcev: RIVAROXABAN CONTROL, 2012
23. Automated Blood Coagulation Analyzer BCS® XP System – Instruction Manual – Instructions for Use, Manual Version 1.0, 2006/05
24. http://chromogenicsubstrates.com/tech/chromogenic_substrates_university.htm (dostopno 3.9.2013)
25. Sysmex Automated Blood Coagulation Analyzer CS-2000i/CS-2100i Instructions for Use
26. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *The Lancet*. 1986; 1(8476): 307–10. doi: 10.1016/S0140-6736(86)90837-8
27. Bland JM, Altman DG. Measuring agreement in method comparison studies. *Stat Methods Med Res*. 1999; 8(2): 135–60. doi: 10.1177/096228029900800204

6 PRILOGE

Priloga 1: Rezultati statistične analize (MedCalc) primerjave aktivnosti Xa v vseh obravnavanih vzorcih, izmerjenih z obema analizatorjema.

Sample 1	BCS_XP BCS_XP
Sample 2	CS_2100i CS 2100i

	Sample 1	Sample 2
Sample size	71	71
Arithmetic mean	77,7606	81,0845
95% CI for the mean	50,8961 to 104,6250	55,4324 to 106,7367
Variance	12881,6990	11745,3356
Standard deviation	113,4976	108,3759
Standard error of the mean	13,4697	12,8619

Paired samples t-test

Mean difference	3,3239
Standard deviation	23,8566
95% CI	-2,3228 to 8,9707
Test statistic t	1,174
Degrees of Freedom (DF)	70
Two-tailed probability	P = 0,2444

Priloga 2: Rezultati statistične analize (MedCalc) primerjave aktivnosti Xa, izmerjenih z obem analizatorjema, ki so bili v 15 vzorcih znotraj diagnostično pomembnega intervala ($< 5 \mu\text{g Xa/L}$).

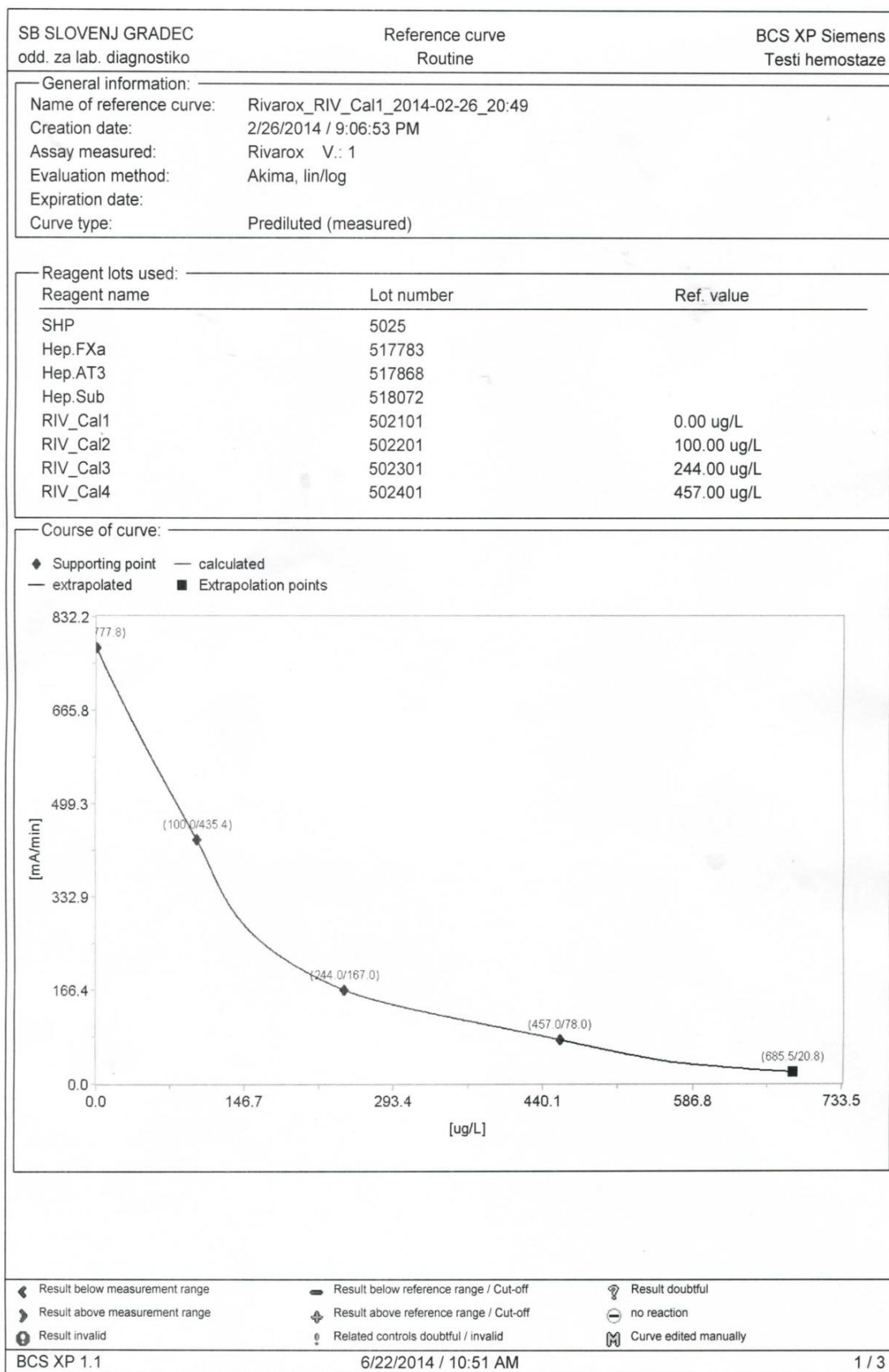
Sample 1	
Variable	CS_2100i CS 2100i
Sample 2	
Variable	BSC_XP BSC XP

	Sample 1	Sample 2
Sample size	15	15
Lowest value	0,0000	0,0000
Highest value	4,0000	3,0000
Median	1,0000	0,0000
95% CI for the median	0,0000 to 2,0000	0,0000 to 2,0000
Interquartile range	0,0000 to 2,0000	0,0000 to 2,0000

Mann-Whitney test (independent samples)

Average rank of first group	16,2000
Average rank of second group	14,8000
Mann-Whitney U	102,00
Test statistic Z (corrected for ties)	0,456
Two-tailed probability	P = 0,6483

Priloga 3: Validacijski dokument za izbrano kalibracijo.



SB SLOVENJ GRADEC
odd. za lab. diagnostiko

Reference curve
Routine

BCS XP Siemens
Testi hemostaze

Single results:

Concentration [ug/L]	Dilution	Flag	Raw value [mA/min]
457	1:1.0		77.99
244	1:1.0		167.0
100	1:1.0		435.4
0	1:1.0		777.8

◀ Result below measurement range
▶ Result above measurement range
⊘ Result invalid

▬ Result below reference range / Cut-off
⬆ Result above reference range / Cut-off
⚠ Related controls doubtful / invalid

⚡ Result doubtful
⊖ no reaction
✎ Curve edited manually

BCS XP 1.1

6/22/2014 / 10:51 AM

2 / 3

SB SLOVENJ GRADEC odd. za lab. diagnostiko	Reference curve Routine	BCS XP Siemens Testi hemostaze																											
Reference curve: Rivarox_RIV_Cal1_2014-02-26_20:49 Assay: Rivarox Date: 2/26/2014 Time: 9:06:53 PM Reagent lots: 5025 517783 517868 518072																													
Calibrator: 502401 Result: 77.99 mA/min	Concentration: 457 ug/L Date: 2/26/2014	Dilution: 1:1.0 Time: 9:06:53 PM																											
Remarks																													
Raw values																													
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Date</th> <th>Time</th> <th>Cuv.</th> <th>Assay procedure</th> <th>Raw value</th> <th>Unit</th> <th>EBV</th> <th>Unit</th> <th>Flag</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2/26/2014</td> <td>9:06:53 PM</td> <td>12</td> <td>Rivaroxaban</td> <td>80.74</td> <td>mA/min</td> <td>---</td> <td>---</td> <td></td> </tr> <tr> <td>2/26/2014</td> <td>9:06:53 PM</td> <td>11</td> <td>Rivaroxaban</td> <td>75.24</td> <td>mA/min</td> <td>---</td> <td>---</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>			Date	Time	Cuv.	Assay procedure	Raw value	Unit	EBV	Unit	Flag	2/26/2014	9:06:53 PM	12	Rivaroxaban	80.74	mA/min	---	---		2/26/2014	9:06:53 PM	11	Rivaroxaban	75.24	mA/min	---	---	
Date	Time	Cuv.	Assay procedure	Raw value	Unit	EBV	Unit	Flag																					
2/26/2014	9:06:53 PM	12	Rivaroxaban	80.74	mA/min	---	---																						
2/26/2014	9:06:53 PM	11	Rivaroxaban	75.24	mA/min	---	---																						
Calibrator: 502301 Result: 167.0 mA/min	Concentration: 244 ug/L Date: 2/26/2014	Dilution: 1:1.0 Time: 9:06:53 PM																											
Remarks																													
Raw values																													
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Date</th> <th>Time</th> <th>Cuv.</th> <th>Assay procedure</th> <th>Raw value</th> <th>Unit</th> <th>EBV</th> <th>Unit</th> <th>Flag</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2/26/2014</td> <td>9:06:53 PM</td> <td>10</td> <td>Rivaroxaban</td> <td>164.9</td> <td>mA/min</td> <td>---</td> <td>---</td> <td></td> </tr> <tr> <td>2/26/2014</td> <td>9:06:53 PM</td> <td>9</td> <td>Rivaroxaban</td> <td>169.1</td> <td>mA/min</td> <td>---</td> <td>---</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>			Date	Time	Cuv.	Assay procedure	Raw value	Unit	EBV	Unit	Flag	2/26/2014	9:06:53 PM	10	Rivaroxaban	164.9	mA/min	---	---		2/26/2014	9:06:53 PM	9	Rivaroxaban	169.1	mA/min	---	---	
Date	Time	Cuv.	Assay procedure	Raw value	Unit	EBV	Unit	Flag																					
2/26/2014	9:06:53 PM	10	Rivaroxaban	164.9	mA/min	---	---																						
2/26/2014	9:06:53 PM	9	Rivaroxaban	169.1	mA/min	---	---																						
Calibrator: 502201 Result: 435.4 mA/min	Concentration: 100 ug/L Date: 2/26/2014	Dilution: 1:1.0 Time: 9:06:53 PM																											
Remarks																													
Raw values																													
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Date</th> <th>Time</th> <th>Cuv.</th> <th>Assay procedure</th> <th>Raw value</th> <th>Unit</th> <th>EBV</th> <th>Unit</th> <th>Flag</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2/26/2014</td> <td>9:06:53 PM</td> <td>8</td> <td>Rivaroxaban</td> <td>438.5</td> <td>mA/min</td> <td>---</td> <td>---</td> <td></td> </tr> <tr> <td>2/26/2014</td> <td>9:06:53 PM</td> <td>7</td> <td>Rivaroxaban</td> <td>432.3</td> <td>mA/min</td> <td>---</td> <td>---</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>			Date	Time	Cuv.	Assay procedure	Raw value	Unit	EBV	Unit	Flag	2/26/2014	9:06:53 PM	8	Rivaroxaban	438.5	mA/min	---	---		2/26/2014	9:06:53 PM	7	Rivaroxaban	432.3	mA/min	---	---	
Date	Time	Cuv.	Assay procedure	Raw value	Unit	EBV	Unit	Flag																					
2/26/2014	9:06:53 PM	8	Rivaroxaban	438.5	mA/min	---	---																						
2/26/2014	9:06:53 PM	7	Rivaroxaban	432.3	mA/min	---	---																						
Calibrator: 502101 Result: 777.8 mA/min	Concentration: 0 ug/L Date: 2/26/2014	Dilution: 1:1.0 Time: 9:02:11 PM																											
Remarks																													
Raw values																													
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Date</th> <th>Time</th> <th>Cuv.</th> <th>Assay procedure</th> <th>Raw value</th> <th>Unit</th> <th>EBV</th> <th>Unit</th> <th>Flag</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2/26/2014</td> <td>9:02:11 PM</td> <td>1</td> <td>Rivaroxaban</td> <td>786.3</td> <td>mA/min</td> <td>---</td> <td>---</td> <td></td> </tr> <tr> <td>2/26/2014</td> <td>8:55:55 PM</td> <td>15</td> <td>Rivaroxaban</td> <td>769.3</td> <td>mA/min</td> <td>---</td> <td>---</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>			Date	Time	Cuv.	Assay procedure	Raw value	Unit	EBV	Unit	Flag	2/26/2014	9:02:11 PM	1	Rivaroxaban	786.3	mA/min	---	---		2/26/2014	8:55:55 PM	15	Rivaroxaban	769.3	mA/min	---	---	
Date	Time	Cuv.	Assay procedure	Raw value	Unit	EBV	Unit	Flag																					
2/26/2014	9:02:11 PM	1	Rivaroxaban	786.3	mA/min	---	---																						
2/26/2014	8:55:55 PM	15	Rivaroxaban	769.3	mA/min	---	---																						
Result below measurement range Result above measurement range Result invalid Result below reference range / Cut-off Result above reference range / Cut-off Related controls doubtful / invalid Result doubtful no reaction Curve edited manually																													
BCS XP 1.1 6/22/2014 / 10:51 AM 3 / 3																													