

# Dodjela vrijednosti predloženom 2. međunarodnom standardu Svjetske zdravstvene organizacije za faktor zgrušavanja V u plazmi

---

Šako, Mateja

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:753057>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Mateja Šako**

**Dodjela vrijednosti predloženom 2.  
međunarodnom standardu Svjetske zdravstvene  
organizacije za faktor zgrušavanja V u plazmi**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Koagulacija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Odjelu za laboratorijsku hematologiju i koagulaciju Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku, Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Renate Zadro.

*Na samom kraju svog studentskog putovanja željela bih se zahvaliti svima koji su mi bili pomoć i podrška, svojim prijateljima bez kojih bi studiranje bilo dosadno, roditeljima koji su uvijek bili tu za mene i suprugu koji mi je bio najveća podrška..*

*Posebnu zahvalu upućujem svojoj mentorici koja mi je uvelike pomogla pri izvedbi i pisanju diplomskog rada.*

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1 Međunarodni biološki standardi za faktore zgrušavanja.....	1
1.1.1. Internacionalna jedinica.....	2
1.1.2. Dodjela vrijednosti i zamjena Međunarodnih standarada.....	2
1.2. Stanični model hemostaze.....	3
1.2.1. Faktor V (FV).....	5
1.3. Globalne koagulacijske pretrage.....	6
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	8
3. MATERIJALI I METODE.....	9
3.1. Upute za provedbu studije.....	9
3.1.1. Uzorci.....	9
3.1.2. Priprema <i>pool</i> -a svježe normalne plazme.....	10
3.1.3 Protokol kolaborativne studije.....	10
3.2. Postupak.....	12
3.2.1. Donacije krvi i izrada <i>pool</i> -a.....	13
3.2.2. Izrada baždarnog pravca.....	13
3.2.3. Priprema uzoraka.....	14
3.2.4. Analiza uzoraka.....	14
3.2.5. Načelo rada koagulacijskog analizatora CS - 2000i.....	15
3.2.6. Faktorom V deficijentna plazma.....	15
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	16
4.1. Rezultati.....	16
4.2. Rasprava.....	24
5. ZAKLJUČCI.....	26
6. LITERATURA.....	27
7. SAŽETAK/SUMMARY.....	29

# 1. UVOD

## 1.1. Međunarodni biološki standardi za faktore zgrušavanja

Mnogi biološki materijali, zbog kompleksnosti strukture i mehanizma djelovanja ili zbog malih plazmatskih koncentracija, ne mogu biti okarakterizirani nekom vrstom apsolutnog mjerenja, niti im mogu biti dodijeljene mjerne jedinice SI sustava. Ovom problemu podliježe i većina faktora zgrušavanja, a problem je riješen uvođenjem Međunarodnih bioloških referentnih standarada (engl. *International Standard - IS*).

Koncept biološkog standarda prvi je opisao Paul Ehrlich krajem 19.stoljeća zbog procjene potentnosti difterijskog antitoksina i od tad se upotrebljava za mnoge materijale koji ne mogu biti procijenjeni direktno kemijski ili fizikalno (Burn i sur., 1950). Ideja ovog koncepta je dodjela relativnih vrijednosti parametru mjerenom u uzorku, a temelji se na usporedbi odgovora dobivenog iz uzorka i odgovora dobivenog iz Međunarodnog standarda koji sadrži poznatu količinu uzorka. Referentni standardi pripremljeni lokalno mogu osigurati sljedivost i kontinuitet testiranja u laboratoriju u kojem se koriste, ali njima se ne postiže harmonizacija na globalnoj razini. Harmonizaciju omogućavaju Međunarodni standardi Svjetske zdravstvene organizacije (SZO), koji su dostupni u ograničenim količinama i kojima se baždare sekundarni radni standardi.

Međunarodni standardi za koagulacijske faktore pojavili su se uspostavom prvog Međunarodnog standarda za Faktor VIII 1970. godine od strane Svjetske zdravstvene organizacije, kao odgovor na potrebu za preciznom i usklađenom procjenom potentnosti novih terapijskih koncentrata (Bangham i sur., 1971) i od tada ih se drži kao najviši stupanj standardizacije. Svrha referentnih standarada je olakšati standardiziranu karakterizaciju bioloških uzoraka bez obzira na vrstu mjerenja ili metodu koja se koristi (WHO Technical Report Series, 2006 br. 932).

Kako bi neki pripravak mogao služiti kao IS mora ispunjavati određene fizikalne zahtjeve, koji uključuju homogenost pripravka i posjedovanje karakteristika koje rezultiraju dugotrajnom stabilnošću, kao što su niska ostatna vlažnost i mali sadržaj kisika (Hubbord, 2007). Ove osobine postignute su liofilizacijom pripravka i pakiranjem u zapečaćene staklene ampule.

### 1.1.1. Internacionalna jedinica

Većini standarada za koagulacijske faktore dodijeljene su vrijednosti u Internacionalnim jedinicama (engl. *International unit* - IU), gdje je 1 IU definirana kao količina analita u 1 mL svježe normalne plazme u *pool*-u (Hubbard, 2007). IU relativna je veličina ovisna o vrijednosti izmjerenoj u odnosu na normalnu plazmu u *pool*-u koja je korištena kod kalibracije zbog čega je bitno uključiti što je moguće više dobrovoljnih darivatelja u *pool* normalne plazme. Većim brojem darivatelja *pool* preciznije predstavlja srednju vrijednost populacije, a IU kalibrirana u odnosu na taj *pool* bolje ju aproksimira i bliža je 100% normale. Pristup IU pokazao se iznimno uspješnim, pružajući jasnoću i pri dijagnostici, za izražavanje normalnih i deficijentnih stanja, i pri označavanju terapijskih koncentrata koji se koriste kao nadomjestna terapija (Hubbard, 2007).

### 1.1.2. Dodjela vrijednosti i zamjena Međunarodnih standarada

Vrijednost se IS-u dodjeljuje u velikoj kolaborativnoj studiji u kojoj sudjeluje minimalno 20 različitih ekspertnih laboratorija svih kategorija (akademski, komercijalni i klinički) i koja je pažljivo osmišljena na način da predstavi sve trenutne metodologije kako bi demonstrirala da su dodijeljene vrijednosti primjenjive u svim okolnostima. Laboratoriji koji sudjeluju u ovakvoj studiji dužni su provesti usporedbu pripravka, koji im je, zajedno s detaljnim uputama, osigurao organizator studije, u odnosu na lokalno pripremljen *pool* svježe normalne plazme. Sirovi podaci kolaborativne studije analiziraju se u NIBSC-u (engl. *National Institute for Biological Standards and Control*), a predložene vrijednosti dodijeljene pripravku kandidatu zahtijevaju podršku sudionika studije i Odbora za znanost i standardizaciju (engl. *Scientific and Standardisation Committee* - SSC) prije nego što se predaju Ekspertnom odboru za biološku standardizaciju (engl. *Expert Committee on Biological Standardisation* - ECBS) Svjetske zdravstvene organizacije (Hubbard i Raut, 2010). Kada je 1. IS-u dodijeljena vrijednost u IU-u, prihvaćeno je da vrijednost IU prebiva i definirana je liofiliziranim materijalom pohranjenim u zapečaćenoj ampuli (Hubbard i Raut, 2010).

Količine IS-a ograničene su, troše se i kada se zalihe postojećeg standarda smanje do određene količine potrebno je kalibrirati novi, zamjenski standard. Kada je uspostavljen

zamjenski IS, prethodne verzije smatraju se nevažećima za daljnju uporabu (Hubbard, 2007). Prvi uspostavljeni IS za neki parametar kalibrira se samo u odnosu na lokalni *pool* normalne plazme, dok se drugi, i svaki sljedeći, kandidat za IS testira i u odnosu na lokalni *pool* normalne plazme i u odnosu na IS koji mu prethodi. Ovakvim pristupom kalibraciji uzastopnih standarada osigurava se kontinuitet uzastopnih standarada i provjerava se odmak IU od originalno definirane vrijednosti.

Prije nego dođe do testiranja pripravka kandidata za zamjenski standard, takav pripravak mora zadovoljiti određene kriterije. On mora biti prikladan za testiranje načelom „*like vs. like*“ i ne smije pokazivati značajna odstupanja u procjeni potentnosti između različitih metoda. Pakiran u zapečaćene ampule u liofiliziranom obliku mora biti homogen i dugotrajno stabilan, što se postiže niskom ostatnom vlažnošću i malim sadržajem kisika u zapečaćenoj ampuli. Nije neobično da IS SZO-e bude u opticaju i do 20 godina i stoga je nužno da pripravci zadrže stabilnost i da su dodijeljene vrijednosti valjane čitav period uporabe (Hubbard i Raut, 2010).

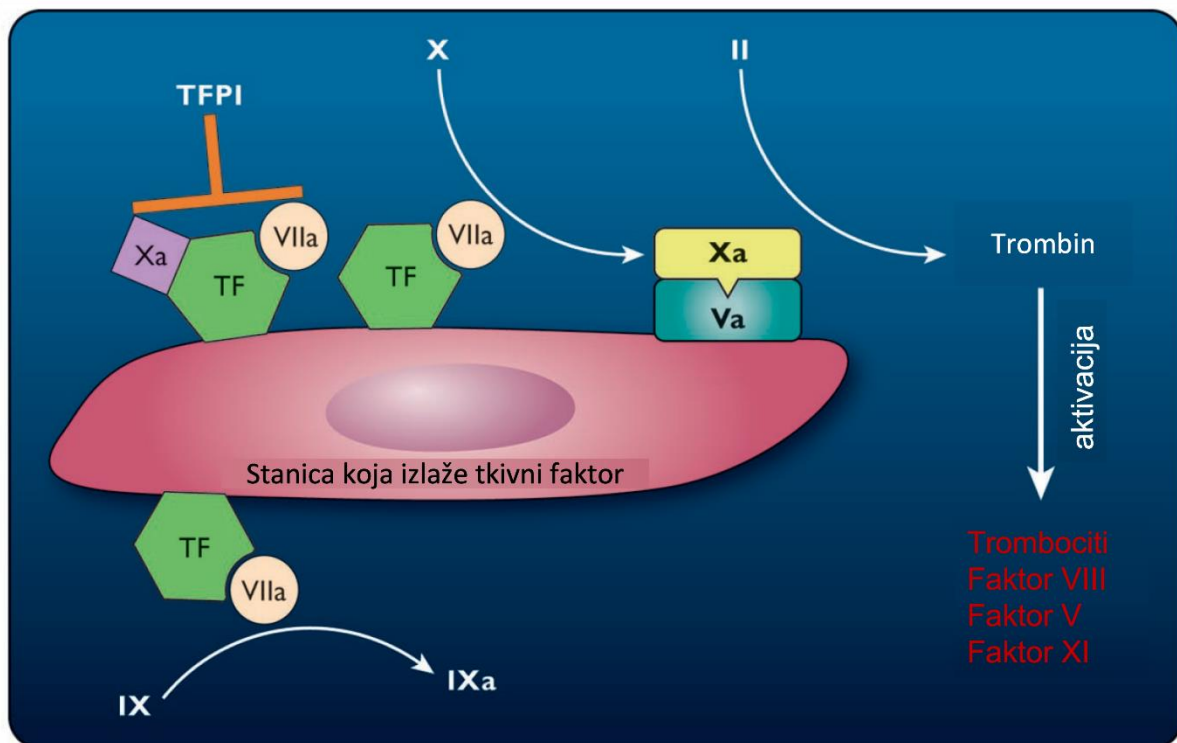
## 1.2. Stanični model hemostaze

Hemostaza je proces zadržavanja krvi unutar vaskularnog sustava, popravka oštećenja na krvnim žilama i zaustavljanja ili sprečavanja gubitka krvi. Ovaj proces podrazumijeva konstantno održavanje ravnoteže između krvarenja (hemoragije) i zgrušavanja (tromboze), a poremećaj ove ravnoteže može dovesti do hipokoagulabilnog ili hiperkoagulabilnog stanja.

Reakcije koje pokreću zgrušavanje odvijaju se kaskadnim mehanizmom u kojem jedan koagulacijski faktor, kada je aktiviran, aktivira sljedeći koagulacijski faktor, a aktivacija faktora odvija se iz dva različita smjera. Unutrašnji put koagulacije sadrži samo faktore koji cirkuliraju krvlju, dok vanjski put zgrušavanja započinje tkivnim faktorom (TF), koji ne cirkulira slobodno krvlju već je izložen na stanicama koje oblažu krvne žile. Ova dva puta spajaju se u zajednički put zgrušavanja koji rezultira stvaranjem krvnog ugruška. Početni događaj, koji može pokrenuti kaskadni mehanizam, ozlijeda je stijenke krvne žile, koja je obložena stanicama koje izražavaju TF. TF receptor je za faktor VII (FVII) i zajedno s njim stvara kompleks TF/VIIa. Ovaj kompleks ima dvije funkcije, može aktivirati i faktor X (FX) u Xa (FXa) i faktor IX (FIX) u IXa (FIXa). Faktor Xa ostaje u blizini stanice koja nosi TF i

aktivira faktor V (FV) u Va (FVa), što dovodi do stvaranja kompleksa Xa/Va na stanici koja nosi TF i koji je sposoban pretvoriti male količine protrombina u trombin (Escobar MA i sur., 2004.). Iako se radi o malim količinama trombina, one su izrazito bitne za aktivaciju trombocita, faktora VIII (FVIII), FV i faktora XI (FXI), te odvaja FVIII od njegovog nosača u cirkulaciji, von Willebrandova faktora. Ove reakcije događaju se u blizini stanice koja izlaže TF, a kad je FIX aktiviran, on odlazi do aktiviranog trombocita, na njemu sjeda na specifična vezna mjesta na veznom proteinu i tamo nastavlja kaskadu. Vezna mjesta za FIXa nalaze se u blizini njegovog kofaktora, FVIIIa, koji je također vezan na površini aktiviranog trombocita. FXIa na površini aktiviranog trombocita i u prisutnosti svog kofaktora FVIIIa aktivira još FX (Escobar MA i sur., 2004). Osim FVIIIa, aktivirani trombocit veže i FVa, koji je kofaktor FXa i s njim tvori kompleks protrombinaze koji je sposoban prevesti velike količine protrombina u trombin, dovoljne za stvaranje fibrinskog ugruška.

Kao i svaka druga reakcija u organizmu, i ovaj proces je strogo reguliran kontrolnim mehanizmima kojima je cilj lokalizirati stvaranje ugruška samo na oštećeni dio endotela krvne žile.



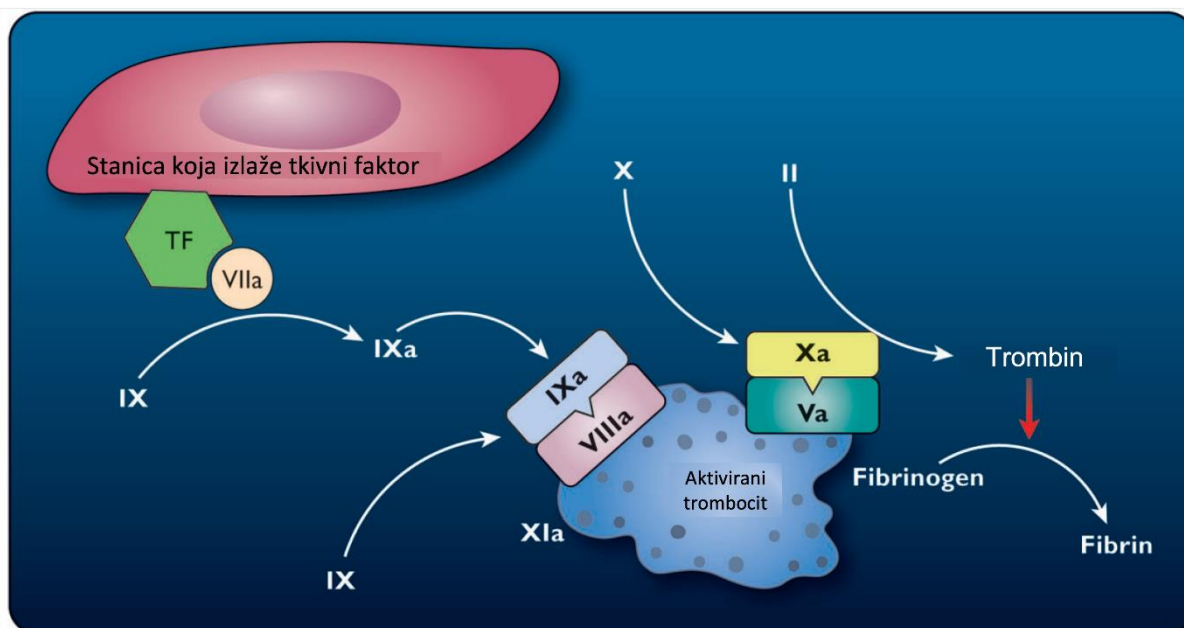
**Slika 1.** Stanični model hemostaze, događanja na stanici koja izražava tkivni faktor

TF- Tkivni faktor, TFPI- Inhibitor puta tkivnog faktora

Izvor: Roberts HR, Monroe DM, Escobar MA. Current concepts of hemostasis.

*Anesthesiology*, 2004, 100, 722-730.





**Slika 2.** Stanični model hemostaze, događanja na aktiviranom trombocitu

TF- Tkivni faktor, TFPI- Inhibitor puta tkivnog faktora

Izvor: Roberts HR, Monroe DM, Escobar MA. Current concepts of hemostasis. *Anesthesiology*, 2004, 100, 722-730.

### 1.2.1. Faktor V (FV)

Faktor V (proakcelerin) glikoprotein je koji je dio zajedničkog puta zgrušavanja, a ovisno o enzimima koji su prisutni u njegovoj okolini može imati koagulacijsku ili antikoagulacijsku aktivnost. Koagulacijsku aktivnost ispoljava kada je aktiviran cijepanjem od strane aktivnog FX s kojim se potom spaja u protrombinazni kompleks i nastavlja koagulacijsku kaskadu, dok se antikoagulacijska aktivnost postiže modifikacijom neaktivnog FV na mjestu Arg506 aktiviranim proteinom C. Protein C može i deaktivirati aktivirani FV, čime se smanjuje njegov afinitet za aktivirani FX i inhibira se koagulacijska kaskada. Razlikujemo dva tipa FV, trombocitni, koji proizvode megakariociti i aktivirani trombociti i koji nastaje na mjestu ozljede, i plazmatski FV koji proizvode hepatociti.

Aktivirani FX i trombin imaju proteolitičko djelovanje na FV i uklanjaju *a* domenu s FV u koagulacijskoj kaskadi (Lam i Moosavi 2020). Na ovaj način FV se aktivira i kristalografijom X-zrakama definirana je njegova struktura  $\beta$  - bačve s tri stršeće omče koje

pridonose njegovoj funkciji da se veže za negativno nabijene fosfolipidne membrane. Aktivirani FV je kofaktor FX, oni se vežu i zajedno tvore protrombinazni kompleks koji cijepa protrombin do trombina (Lam i Moosavi, 2020).

Aktivirani protein C može utjecati na FV na dva načina ovisno o potrebama i o tome je li FV aktiviran ili je inaktivan. Kada je FV aktiviran kao dio aktivne koagulacijske kaskade i postoji potreba za zaustavljanjem procesa koagulacije, protein C ga cijepa na mjestima Arg306, Arg506 i Arg679 čime gubi afinitet prema aktiviranom FX i ne stvara se protrombinazni kompleks, pa nema stvaranja trombina i posljedično fibrina. Inaktivni FV, kada ga aktivirani protein C pocijepa na mjestu Arg506 postaje antikoagulacijski protein koji nazivamo FVac. FVac ponaša se kao kofaktor aktiviranog proteina C, zajedno s proteinom S, kako bi dozvolili aktiviranom proteinu C da razgradi aktivirani FVIII (Lam i Moosavi, 2020) i prekine koagulacijsku kaskadu na samom početku.

Manjak FV, mutacije u genu za FV ili nemogućnost stvaranja FVac podloga su najčešćih patoloških stanja vezanih uz FV. Manjak FV poremećaj je krvarenja uzrokovan smanjenom količinom FV zbog inhibicije FV antitijelina ili greškom u sintezi, sekreciji ili transportu. Najčešće mjesto krvarenja kod osoba s manjkom FV su mukoza i sluznica (Lam i Moosavi, 2020). Mutacija G1691A u genu za Faktor V uzrokuje zamjenu arginina na mjestu 506 s glutaminom, što rezultira FV Leiden koji protein C ne može pocijepati i stvoriti antikoagulacijski protein FVac. Homozigoti za ovu mutaciju imaju velik rizik tromboze, značajno veći od heterozigota koji imaju nešto funkcionalnog proteina.

### **1.3. Globalne koagulacijske pretrage - PV i APTV**

Protrombinsko vrijeme(PV) i aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme (APTV) globalne su koagulacijske pretrage kojima se ispituje ukupna aktivnost sustava zgrušavanja.

PV je najčešća probirna koagulacijska pretraga (Bronić i sur., 2019.) kojom se mjeri vrijeme potrebno da se stvori ugrušak aktivacijom vanjskog puta zgrušavanja, a prema Nacionalnim smjernicama koje propisuje Hrvatsko društvo za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu PV se koristi za praćenje terapije antagonistima vitamina K i za procjenu nasljednog ili stečenog manjka FII, FV, FVII, FX i fibrinogena. Reakcija koja se mjeri pokreće se dodavanjem tkivnog faktora i kalcijevih iona ispitivanom uzorku, a rezultat mjerenja može se izražavati u sekundama, kao udjel ili u postotcima od normale, a kada se

koristi za praćenje antikoagulacijske terapije izražava se kao INR (engl. *International Normalized Ratio*). U rutini se najčešće izražava kao omjer vremena koje je potrebno da se stvori ugrušak u ispitivanoj plazmi i srednjeg normalnog protrombinskog vremena. INR predstavlja omjer vrijednosti PV-a u sekundama izmjerenog kod bolesnika i srednjeg normalnog protrombinskog vremena (engl. *Mean Normal Prothrombin Time* - MNPT), uz eksponent ISI za odgovarajući PV reagens (Bronić i sur., 2019). ISI je vrijednost koja odražava osjetljivost reagensa na faktore zgrušavanja ovisne o vitaminu K u odnosu na odgovarajući referentni standard.

APTV je također probirna pretraga, ali ona mjeri vrijeme potrebno da se stvori ugrušak unutarnjim putem zgrušavanja i prema Nacionalnim smjernicama koje propisuje Hrvatsko društvo za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu koristi se pri procjeni manjka FVIII, FIX, FXI i FXII i njihovih inhibitora. Kao pokretač koagulacijske kaskade za mjerenje APTV-a koristi se kontaktni aktivator (silicijev dioksid, elaginska kiselina ili kaolin) u kombinaciji s fosfolipidima i kalcijevim kloridom. Vrijednost APTV-a izražava se u sekundama ili kao omjer.

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

2018. godine SZO je provela kolaborativnu studiju čiji je cilj bio dodjela vrijednosti zamjenskom IS-u za FV i u kojoj je sudjelovalo 30 laboratorija iz 14 zemalja, a među njima i Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Razlog provođenja studije bilo je smanjenje preostale zalihe IS za FV u plazmi, koje će biti u potpunosti potrošene unutar godine dana.

Nacionalne preporuke za postupke uzorkovanja, pripreme i analize uzorka te izvještavanje rezultata probirnih koagulacijskih pretraga protrombinskog vremena, aktiviranog parcijalnog tromboplastinskog vremena, trombinskog vremena, fibrinogena i D- dimera koje izdaje Hrvatsko društvo za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu kao pretragu za procjenu nasljednog ili stečenog manjka faktora zgrušavanja V propisuju modifikaciju protrombinskog vremena. Uzevši u obzir položaj FV u koagulacijskoj kaskadi, kao dio zajedničkog puta zgrušavanja, njegova je procjena moguća i primjenom modofociranog aktiviranog parcijalnog tromboplastinskog vremena, iako Nacionalne preporuke ovu metodu ne propisuju za rutinsku uporabu. Imajući na umu definiciju IS-a kao neovisnog o primjenjenoj metodi, uspoređeni su pripravak kandidat za 2. IS za FV u plazmi s normalnom plazmom u *pool*-u i s 1. IS za FV u plazmi koristeći najprije modificirano PV, a potom je to isto učinjeno koristeći modificirano APTV kao testnu metodu.

Primjenom obje metode za testiranje zadanog pripravka ispitana je neovisnost IS-a o primjenjenoj metodi, a ujedno i prikladnost primjene modofociranog APTV-a za određivanje aktivnosti FV u plazmi.

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Upute za provedbu studije

Sudjelovanje u kolaborativnoj studiji podrazumijeva dobivanje jasnih i detaljnih uputa od kreatora studije prema kojima se test provodi.

#### 3.1.1. Uzorci

Uzorci se sastoje od zapečaćenih staklenih ampula (uzorci A, B, E) ili čepom na odvrtnanje zatvorenih bočica (uzorci C, D) od kojih svaka sadrži 1,0 mL alikvota liofilizirane humane plazme.

Preparati sadrže materijal humanog porijekla koji je testiranjem dokazano negativan na HbsAg, HIV antitijela, HCV antitijela i HCV RNA. Kao i s ostalim materijalima biološkog porijekla, ovim preparatima valja rukovati kao potencijalno štetnima za zdravlje. Treba ih upotrijebiti i odložiti sukladno sigurnosnim postupcima laboratorija (nošenje zaštitnih rukavica i izbjegavanje stvaranja aerosola).

Ampule i bočice pohranjuju se na  $-20^{\circ}\text{C}$  ili niže. Prije rekonstitucije ampule i bočice puste se da se zagriju na sobnu temperaturu.

Zapečaćene staklene ampule (uzorci A, B, E) imaju obojeno slabo mjesto na kojem se usko dno ampule spaja sa širim tijelom. Epruvete se lagano protresu kako bi se sadržaj spustio na dno. Potrebno je osigurati da je sigurnosni prekidač epruvete pritisnut na dno ampule i protiv ramena tijela ampule. Tijelo ampule drži se u jednoj ruci i jednokratni omot ampule između palca i kažiprsta druge ruke. Ampulu se otvori koristeći ruku koja drži plastični omot. Potrebno je paziti i izbjeći posjekotine i staklene fragmente koji su se rasprsnuli i mogli bi uletjeti u oko, koristeći rukavice i zaštitne naočale. Unutar ampule nalazi se suhi dušik pri malo nižem tlaku od atmosferskog. Čepom na odvrtnanje zatvorene bočice (uzorci C, D) lagano se protresu kako bi se sadržaj spustio na dno čaše. Prilikom otvaranja valja paziti da se sadržaj ne izgubi.

Rekonstitucija svih uzoraka provodi se dodavanjem 1,0 mL destilirane ili deionizirane vode. Sadržaj se ostavi 15 minuta na sobnoj temperaturi uz lagano protresanje. Kada je rekonstitucija završena cijeli sadržaj se prebaci u začepljene plastične epruvete i pohrani na  $4^{\circ}\text{C}$  za vrijeme trajanja testa.

### **3.1.2. Priprema *pool*-a svježe normalne plazme**

Prikupi se svježa normalna plazma na dva različita dana što daje *pool* N1 i *pool* N2. Metoda prikupljanja svježe normalne plazme je bitan dio studije i mora biti što je moguće više standardizirana.

Dobrovoljni darivatelji plazme moraju biti zdrave isključujući žene koje su trudne ili koriste oralne kontraceptive. Krv se uzme od što je moguće više osoba u dva odvojena dana. Ako je moguće, koristi se minimalno 8 različitih donora za svaki *pool*. Ako to nije moguće, neke donacije mogu se koristiti opetovano, ali potrebno je imati ukupno najmanje različitih donora za svaki laboratorij.

Krv se prikuplja na antikoagulant 0,109 M natrijev citrat. Omjer miješanja krvi i antikoagulanta mora biti 9 volumena krvi : 1 volumen antikoagulanta.

Krv se centrifugira na 4°C, što je prije moguće nakon prikupljanja, na 50 000 g 5 minuta ili na 2000 g 20 minuta.

Nakon centrifugiranja izvade se jednaki volumeni plazme od različitih donora u jednu epruvetu i lagano ih se pomiješa. *Pool* plazme čuva se u plastičnoj zatvorenoj epruveti na 4°C dok traje test. Alikvote svakog *pool*-a (NF1 i NF2) brzo se zamrzne za testove 2 i 4.

Popis uzoraka korištenih u studiji prikazan je u Tablici 1.

### **3.1.3 Protokol kolaborativne studije**

Dodjela vrijednosti predloženom 2. Međunarodnom standardu Svjetske zdravstvene organizacije za Faktor V u plazmi i Sekundarnom koagulacijskom standardu za aktivnost Faktora V SSC/ISTH-a

Tablica 1. Uzorci uključeni u studiju

Oznaka uzorka	FV zgrušavanja	Materijali uključeni u studiju
<b>A</b>	<b>5 ampula</b>	<b>1. Međunarodni standard za Faktor V u plazmi, dodijeljene vrijednosti za aktivnost FV od 0,74 IU/ampuli</b>
<b>B</b>	<b>5 ampula</b>	<b>predloženi 2. Međunarodni standard za FV u plazmi</b>
<b>C</b>	<b>5 bočica</b>	<b>Sekundarni koagulacijski standard SSC/ISTH, Lot # 4 dodijeljenje vrijednosti za aktivnost FV od 0,89 IU/mL</b>
<b>D</b>	<b>5 bočica</b>	<b>Predloženi Sekundarni koagulacijski standard SSC/ISTH, Lot #5</b>
<b>L</b>	<b>5 alikvota</b>	<b>Lokalni <i>pool</i> svježe normalne plazme</b>

Neotvorene ampule i bočice od A do E pohranjuju se na -20°C ili niže. Ampule i bočice puste se da se zagriju do sobne temperature prije rekonstitucije. Lagano se protresu kako bi se sadržaj spustio na dno ampule ili bočice. Rekonstituiraju se dodatkom 1,0 mL destilirane vode. Sadržaj se ostavi 15 minuta na sobnoj temperaturi uz lagano protresanje. Kad je rekonstitucija dovršena, prebaci se cijeli sadržaj u zatvorenu plastičnu epruvetu i pohrani na 4°C za vrijeme izvođenja testa.

*Pool* normalne plazme trebao bi biti svježiji ili zamrznuti preparat, iako liofilizirani *pool* može biti uključen ako nema alternative. Koristi se novi alikvot za svaki test. Ako se priprema *pool*

svježe normale plazme, izvode se 2 testa zgrušavanja na svježim uzorcima i 2 testa koristeći zamrznute alikvote.

Izvode se 4 testa metodom zgrušavanja koristeći rekonstituirane ampule/bočice A, B, C i D i svježi alikvot L. Zamrznuti alikvota A, B, C i D ne smiju se koristiti za test zgrušavanja. Četiri testa trebala bi biti podijeljena na najmanje 2 dana.

Svih 5 preparata (A, B, C, D i L) je uključeno u svaki od 4 testa. Minimum od 3 različita razrjeđenja svakog preparata treba se testirati u duplikatu u svakom testu. Tri razrjeđenja treba odabrati tako da su na linearnom dijelu baždarnog pravca. Svih 5 preparata sadrže *pool* normalne plazme i mogu biti testirani koristeći isto razrjeđenje. Koristi se uravnoteženi dizajn testa. U planu izvedbe testa (Tablica 2.) svako slovo predstavlja set od 3 ili više razrjeđenja, a A, A' i B, B'... predstavlja za svježi set razrjeđenja napravljenih od iste ampule/bočice.

Tablica 2. Plan izvedbe testa

<b>TEST 1</b>	A	B	C	D	L	L'	D'	C'	B'	A'
<b>TEST 2</b>	B	C	D	L	A	A'	L'	D'	C'	B'
<b>TEST 3</b>	C	D	L	A	B	B'	A'	L'	D'	C'
<b>TEST 4</b>	D	L	A	B	C	C'	B'	A'	L'	D'

Sirovi rezultati testa i detalji korištene metode pošalju se u EXCELL tablici kako bi ih bilo moguće centralno analizirati. Rezultati moraju biti prikazani kao apsolutni sirovi podaci (npr. vrijeme koagulacije, optička gustoća), a ne kao % ili relativna jedinica u odnosu na *in house* standard. Mogu se uključiti i vlastite procjene aktivnosti zgrušavanja B, C, D i L uzorka u odnosu na uzorak A (za vrijednost uzorka A koristi se vrijednost 0,74 IU/mL).

### 3.2. Postupak

Prateći zadane upute najprije je pripremljen svježi *pool* normalne plazme, rekonstituirani su uzorci koji su dani za analizu, te su potom složena 4 različita testa prema zadanom planu studije i provedeno testiranje na istom analizatoru izvodivši paralelno dvije različite pretrage na istim uzorcima, protrombinsko vrijeme i aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme.



### 3.2.1. Donacije krvi i izrada *pool*-a

Za pripremu *poola* normalne plazme prikupljeno je ukupno 18 donacija krvi. Donori su bili zdravi odrasli pojedinci, koji nisu trudni niti koriste oralne kontraceptive. Za testove 1 i 3 korišten je svježi *pool*, dok je za testove 2 i 4 korišten zamrznuti *pool*.

#### Broj donacija:

Pool N1- 9 različitih donora plazme

Pool N2- 9 različitih donora plazme

#### Korišteni antikoagulant:

0.109 mmol/L trinatrijev citrat

#### Omjer krvi i antikoagulanta:

9 : 1

### 3.2.2. Izrada baždarnog pravca

Baždarni pravac se temelji na Lambert – Beerovom zakonu koji glasi:

$$\log \left( \frac{P_0}{P} \right) = A = l \varepsilon c$$

A označava apsorbanciju na danoj valnoj duljini svjetlosti,  $\varepsilon$  je molarni apsorpcijski koeficijent ( $\text{L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), svojstven svakoj molekulskoj vrsti i ovisan o valnoj duljini svjetlosti,  $l$  je duljina puta svjetlosti kroz uzorak (cm), a  $c$  je koncentracija tvari u otopini ( $\text{mol L}^{-1}$ ).

Za izradu baždarnog pravca potrebno je pripremiti različita razrjeđenja matične otopine, kojima će se mjeriti apsorbanciju. Idealno bi bilo pripremiti 7 različitih razrjeđenja matične otopine u triplicatu i to tako da su tri razrjeđenja unutar referentnih vrijednosti, dva ispod donje granice referentnog intervala i dva iznad gornje granice referentnog intervala. Za jedno razrjeđenje vrijednost se dobije tako što se izračuna srednja vrijednost triju mjerenja. Nakon što se dobiju vrijednosti apsorbancija svih mjerenih koncentracija uzorka metodom linearne regresije konstruira se pravac s pripadajućom jednačbom ( $y = ax + b$ ). Poznavajući tu jednačbu moguće je odrediti nepoznatu koncentraciju analita u uzorku mjerenjem njegove apsorbancije.

Za izradu baždarnog pravca korištena je Standardna humana plazma (Siemens Healthineers, Njemačka).

### **3.2.3. Priprema uzoraka**

Studijom je predviđena priprema uzoraka pripravom tri različita razrjeđenja svakog uzorka u duplikatu i slaganje testiranih uzoraka prema točno definiranom planu.

#### Razrjeđenje 1:

200  $\mu$ L uzorka

#### Razrjeđenje 2:

100  $\mu$ L pufera + 100  $\mu$ L uzorka

#### Razrjeđenje 3:

200  $\mu$ L pufera + 100  $\mu$ L uzorka

### **3.2.4. Analiza uzoraka**

#### Korišteni analizator:

Sysmex CS2000i (Siemens Healthineers, Njemačka)

#### Pufer za razrjeđivanje:

OVB (Siemens Healthineers, Njemačka)

#### Reagensi:

Innovin (kalcijev tromboplastin) (Siemens Healthineers, Njemačka)

Actin FS (APTV reagens) (Siemens Healthineers, Njemačka)

Kalcijev klorid 0,025 M (Siemens Healthineers, Njemačka)

Faktorom V deficijentna plazma - STA-DEFICIENT V (Diagnostica Stago, Francuska)

### **3.2.5. Načelo rada koagulacijskog analizatora CS - 2000i**

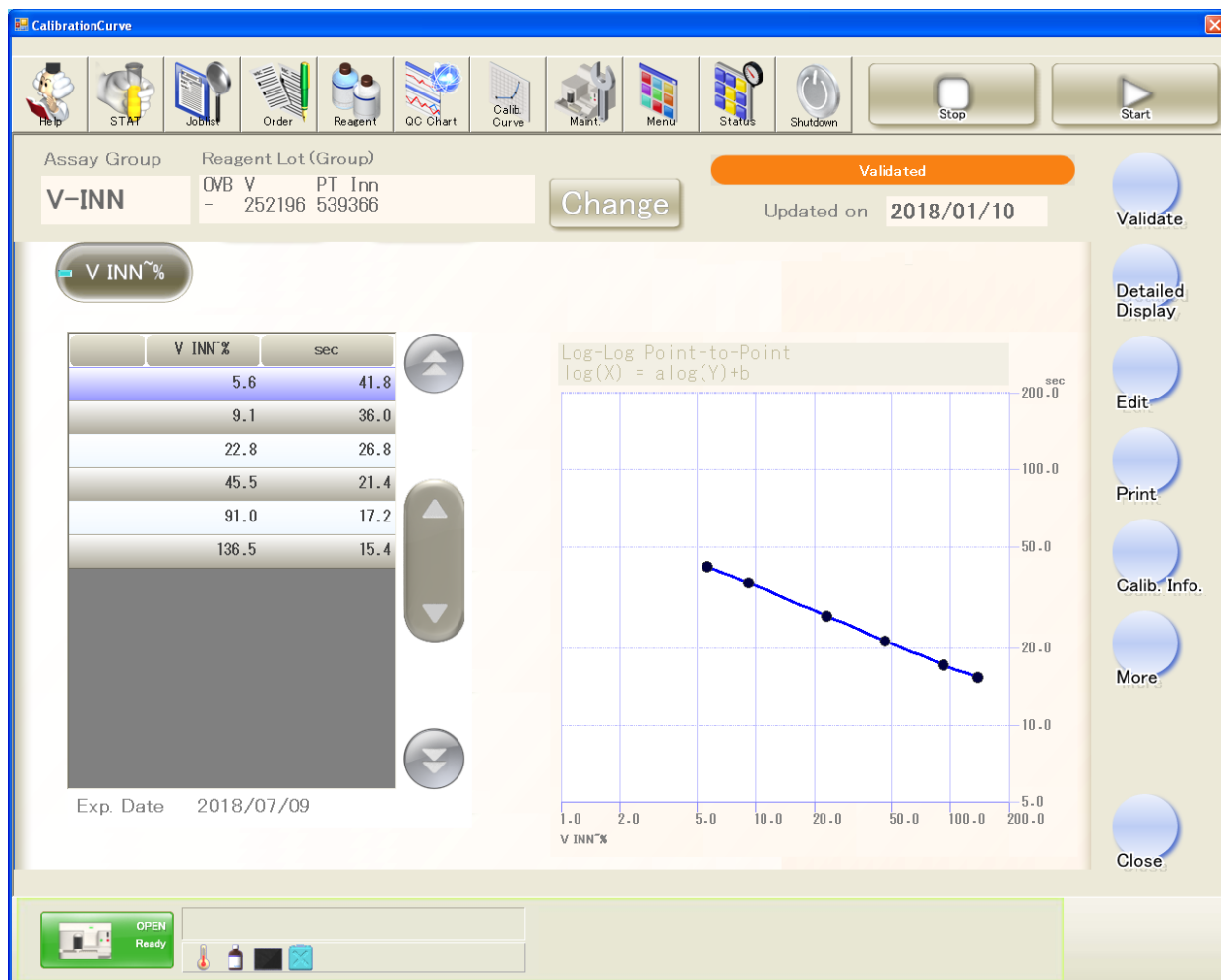
CS-2000i potpuno je automatizirani koagulacijski analizator tvrtke Sysmex koji radi na načelu foto-optičke koagulometrijske metode. Posjeduje detekcijski sustav višestrukih valnih duljina koji je konstruiran tako da se svjetlo iz halogene lampe raspršuje na svjetlost valnih duljina 340, 405, 575, 600 i 800 nm pomoću 5 filtera. Svjetlost se potom optičkim vlaknom prenosi do detektora gdje obasjava kivetu u kojoj se odvija reakcija u uzorku. Detektor svakih 0,1 sekundu mjeri intenzitet svjetla propuštenog kroz kivetu na svim valnim duljinama i prevodi svjetlosne signale u elektroničke.

### **3.2.6. Faktorom V deficijentna plazma**

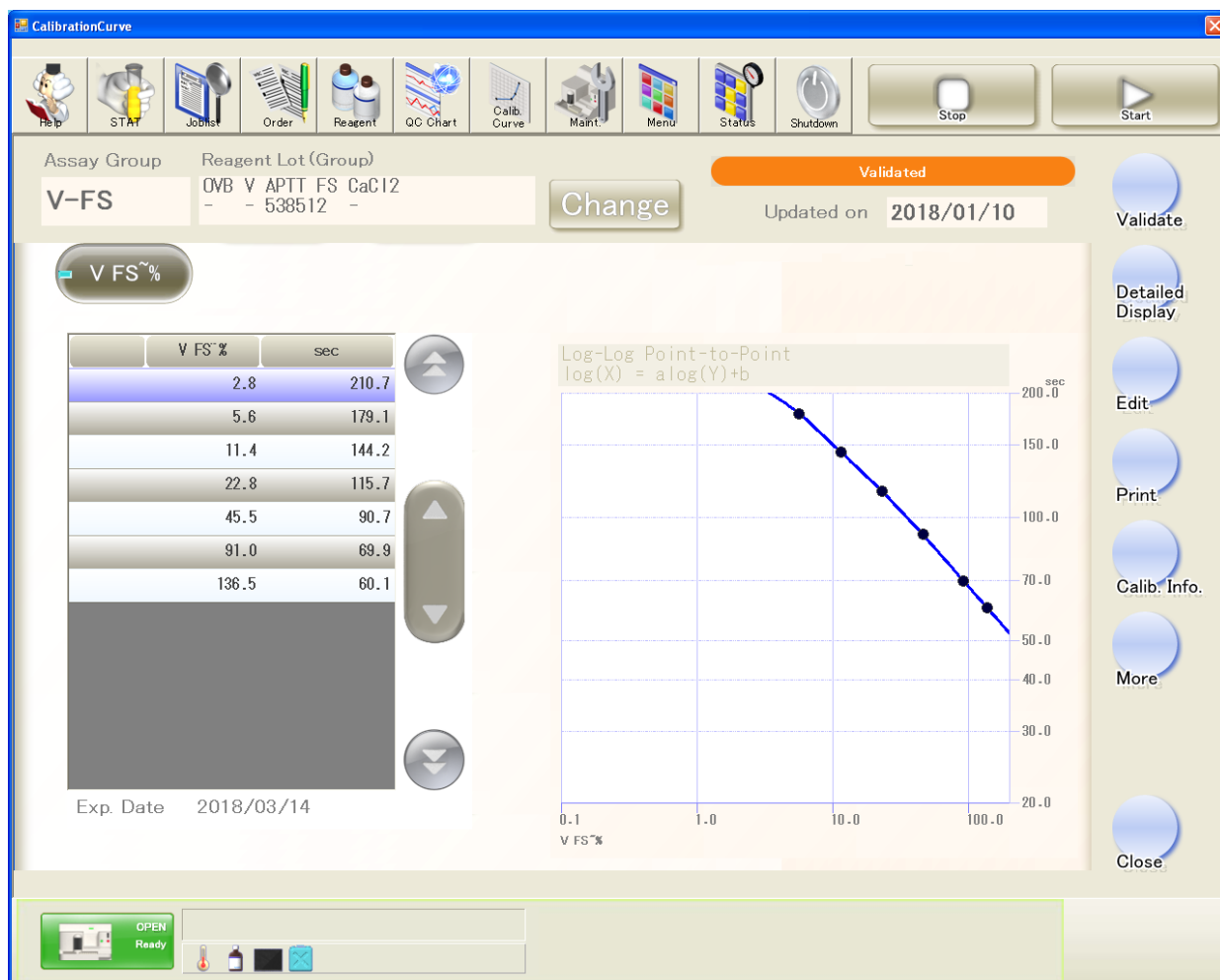
Faktorom V deficijentna plazma omogućava mjerenje aktivnosti FV globalnom koagulacijskom pretragom, protrombinskim vremenom ili aktiviranim parcijalnim tromboplastinskim vremenom. Ovakva plazma sadrži sve elemente koagulacijske kaskade osim onog koji želimo odrediti. U deficijentu plazmu doda se alikvot ispitivanog uzorka i pokreće se proces zgrušavanja. Svih faktora, osim onog mjerenog ima u dovoljnim količinama, zbog čega vrijeme zgrušavanja ovisi isključivo o količini i aktivnosti faktora kojeg želimo odrediti.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Rezultati



Slika 3. Kalibracijska krivulja za mjerenje aktivnosti FV modificiranim protrombinskim vremenom



**Slika 4.** Kalibracijska krivulja za mjerenje aktivnosti FV modificiranim aktiviranim parcijalnim tromboplastinskim vremenom

**Tablica 3.** Procijenjene vrijednosti uzoraka B, C, D i L dobivene metodom modificiranog PV-a u odnosu na uzorak A

Uzorci	Test				Srednja vrijednost
	1	2	3	4	
<b>B u odnosu na A</b>	<b>0,71</b>	<b>0,72</b>	<b>0,72</b>	<b>0,68</b>	<b>0,70</b>
<b>C u odnosu na A</b>	<b>0,87</b>	<b>0,85</b>	<b>0,88</b>	<b>0,81</b>	<b>0,85</b>
<b>D u odnosu na A</b>	<b>0,84</b>	<b>0,84</b>	<b>0,85</b>	<b>0,81</b>	<b>0,84</b>
<b>L u odnosu na A</b>	<b>1,06</b>	<b>1,07</b>	<b>1,06</b>	<b>0,91</b>	<b>1,03</b>

**Tablica 4.** Procijenjene vrijednosti uzoraka B, C, D i L dobivene metodom modificiranog APTV-a u odnosu na uzorak A

Uzorci	Test				Srednja vrijednost
	1	2	3	4	
<b>B u odnosu na A</b>	<b>0,68</b>	<b>0,68</b>	<b>0,70</b>	<b>0,70</b>	<b>0,69</b>
<b>C u odnosu na A</b>	<b>0,90</b>	<b>0,91</b>	<b>0,94</b>	<b>0,92</b>	<b>0,92</b>
<b>D u odnosu na A</b>	<b>0,88</b>	<b>0,88</b>	<b>0,90</b>	<b>0,90</b>	<b>0,89</b>
<b>L u odnosu na A</b>	<b>1,03</b>	<b>1,04</b>	<b>1,13</b>	<b>1,09</b>	<b>1,07</b>

**Tablica 5.** Prikaz svih metodologija primjenjenih u provođenju studije (originalno izvješće)  
(Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb označen je brojem 33a i 33b)

<b>CLOTTING METHODS</b>				
<b>Lab No</b>	<b>Thromboplastin or APTT* reagent</b>	<b>Deficient Plasma</b>	<b>Instrument</b>	<b>Local Plasma pool &amp; no. donors</b>
1a	Innovin	Siemens	CS-2000i	assays 1&2: 20 donors; assays 3&4: 10 donors; fresh 1&3, frozen 2&4;
1b	Innovin	Siemens	BCS XP	
1c	Thromborel S	Siemens	CS-2000i	
1d	Thromborel S	Siemens	BCS XP	
4	Recombiplastin 2G	Instrumentation Lab	ACL TOP 350	20 frozen
6	Technoplastin HIS	Technoclone	Ceveron Alpha	130 lyoph; assigned 1.1 IU/ml
7	Innovin	Siemens	CS-5100	20 frozen
8	Roche PT rec	Roche	Cobas t711	10 frozen
9	Recombiplastin 2G	Instrumentation Lab	ACL TOP 700	not given, lyoph; 1.06 IU/ml
10	Innovin	Behring	BCS XP	not given, frozen; 115% IU/ml
11	Neoplastin	Stago	STA-R	20 frozen
12	Innovin	Siemens	BCS XP	not given, frozen
13	Neoplastin	Precision Biologic	STA-R	300 frozen
14	Neoplastin	Stago	STA-R	23, 25, 12, 22, frozen
15	Recombiplastin 2G	Instrumentation Lab	ACL TOP 700	13 frozen, 1.14 IU/ml
16	Recombiplastin 2G	Instrumentation Lab	ACL TOP 700	300 frozen, 97%
17	Recombiplastin 2G	Instrumentation Lab	ACL TOP 500	ng; frozen, 1.06 IU/ml
18	Neoplastin	Stago	STA-R	>20; frozen
19	Thromborel S	Siemens	MC10 Plus	no pool
20	Neoplastin	Affinity	STA-R	2 pools x 10 donors; frozen
21	Innovin	Precision Biologic	CS 5100i	no pool
22	Recombiplastin 2G	Technoclone	ACL TOP 700	100 frozen; 111%
23	Neoplastin	George King	STA-R	64 frozen; 96%
24a	Neoplastin R	Stago	STA-R	ng lyoph; 1.0 IU/ml
24b	Neoplastin CI plus	Stago	STA-R	
25	Innovin	Siemens	CS 5100	>20 frozen; 116%
27	Innovin	Siemens	CS 5100	ng lyoph; 91%
28*	Actin FS <b>APTT</b>	Siemens	CS 2100i	ng frozen
29	Innovin	Diagnostic Reagents	ACL TOP 550	30 frozen
30	Recombiplastin 2G	HRF	ACL Elite	20 frozen
31	Recombiplastin 2G	Instrumentation Lab	ACL TOP 700	50 frozen; 0.93 IU/ml
32	Thromborel S	Tcoag	BCS XP	20 assay 1 fresh, 2,3,4 frozen
33a	Innovin	Stago	CS 2000i	2 x 9 donors fresh assays 1&3; frozen assays 2&4
33b*	Actin FS - <b>APTT</b>	Stago	CS 2000i	
<b>ANTIGEN ELISA METHODS</b>				
<b>Lab No</b>	<b>Antibody source / Kit</b>		<b>Local Plasma pool &amp; no. donors</b>	
29	Hyphen Biomed Zymutest		30 frozen	
30a	Affinity Biologicals		20 frozen	
30b	Affinity Biologicals		not given, frozen	
31	Hyphen Biomed Zymutest		50 frozen	
32	Coachrom Diagnostica		20 frozen	

Izvor: Hubbard AR, Thelwell C, Rigsby P. Value assignment of the proposed WHO 2nd IS Factor V plasma (16/374) and the ISTH/SSC secondary coagulation standard Lot # 5 – Report to participants, March 2018.

**Tablica 6.** Procjene Faktora V u predloženom 2. IS SZO (uzorak B) u odnosu na 1. IS SZO (uzorak A) i lokalni *pool* normalne plazme (uzorak L) (originalno izvješće). Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb označen je brojem 33a i 33b.

Lab No	Proposed WHO 2 <sup>nd</sup> IS vs WHO 1 <sup>st</sup> IS (B vs A)			Proposed WHO 2 <sup>nd</sup> IS vs Local pools (B vs L)		
	GM IU/ml	GCV%	n	GM IU/ml	GCV%	n
1a	0.72	2.66	4	0.78	5.12	4
1b	0.74	2.80	4	0.83	4.33	4
1c	0.70	1.38	4	0.75	5.41	4
1d	0.71	2.48	4	0.76	8.82	4
4	0.73	1.27	3	0.64	5.09	3
6	0.69	8.01	4	0.88	7.04	4
7	0.73	2.08	4	0.63	1.71	4
8	0.73	0.93	4	0.72	1.96	4
9	0.71	2.43	4	0.70	3.83	4
10	0.70	2.58	4	0.71	4.03	4
11	0.70	2.70	4	0.66	2.78	4
12	0.73	6.96	4	0.73	-	2
13	0.70	3.81	4	0.89	3.48	4
14	0.70	2.66	4	0.67	4.71	4
15	0.71	2.68	4	0.73	2.6	4
16	0.73	6.30	4	0.70	3.34	4
17	0.71	1.65	4	0.75	1.46	4
18	0.72	4.88	4	0.69	4.19	4
19	0.78	3.56	4	-	-	-
20	0.76	3.18	4	0.77	1.61	4
21	0.73	1.67	4	-	-	-
22	0.71	3.37	4	0.73	2.86	4
23	0.71	2.54	8	0.73	4.25	8
24a	0.70	2.71	4	0.69	2.24	4
24b	0.70	1.19	4	0.72	1.07	4
25	0.73	5.68	4	0.75	6.12	4
27	0.77	4.90	4	0.74	2.62	4
28	0.68	-	2	0.64	-	2
29	0.73	1.20	4	0.89	6.32	4
30	0.74	2.79	7	0.66	4.49	7
31	0.71	1.74	4	0.71	1.07	4
32	0.71	2.31	4	0.62	2.81	4
33a	0.70	2.20	4	0.68	6.01	4
33b	0.68	2.81	4	0.64	3.33	4
<b>Combined</b>	<b>0.72</b>	<b>3.19%</b>	<b>34</b>	<b>0.72</b>	<b>10.00%</b>	<b>32</b>
	<b>95% limits 0.71 - 0.73</b>			<b>95% limits 0.70 - 0.75</b>		

GM – geometrijska sredina

Izvor: Hubbard AR, Thelwell C, Rigsby P. Value assignment of the proposed WHO 2nd IS Factor V plasma (16/374) and the ISTH/SSC secondary coagulation standard Lot # 5 – Report to participants, March 2018.



**Tablica 7.** Procjene Faktora V u 1. IS SZO (uzorak A) u odnosu na lokalni *pool* normalne plazme (uzorak L) i procjene za lokalni *pool* normalne plazme (uzorak L) u odnosu na 1. IS SZO (uzorak A) (originalno izvješće). Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb označen je brojem 33a i 33b.

Lab No	WHO 1 <sup>st</sup> IS vs Local pools (A vs L)			Local pools vs WHO 1 <sup>st</sup> IS (L vs A)			*Local pool assigned value
	GM IU/ml	GCV%	n	GM IU/ml	GCV%	n	IU/ml
1a	0.80	4.85	4	0.92	4.85	4	-
1b	0.83	4.77	4	0.89	4.77	4	-
1c	0.79	5.41	4	0.94	5.41	4	-
1d	0.80	7.54	4	0.92	7.54	4	-
4	0.65	4.56	3	1.13	4.56	3	-
6	0.93	5.30	4	0.87	5.30	4	1.10
7	0.64	3.13	4	1.16	3.13	4	-
8	0.72	2.52	4	1.02	2.52	4	-
9	0.73	2.22	4	1.07	2.22	4	1.06
10	0.75	1.65	4	0.98	1.65	4	1.15
11	0.70	1.35	4	1.06	1.35	4	-
12	0.70	-	2	1.05	-	2	-
13	0.94	1.07	4	0.78	1.07	4	-
14	0.71	4.82	4	1.05	4.82	4	-
15	0.76	2.17	4	1.10	2.17	4	1.14
16	0.71	4.17	4	1.01	4.17	4	0.97
17	0.79	2.31	4	1.00	2.31	4	1.06
18	0.71	7.23	4	1.05	7.23	4	-
20	0.76	4.49	4	0.98	4.49	4	-
22	0.76	2.11	4	1.08	2.11	4	1.11
23	0.76	5.60	8	0.94	5.60	8	0.96
24a	0.72	2.19	4	1.02	2.19	4	1.00
24b	0.76	0.67	4	0.97	0.67	4	1.00
25	0.76	1.85	4	1.13	1.85	4	1.16
27	0.72	5.38	4	0.94	5.38	4	0.91
28	0.67	10.66	3	1.11	10.81	3	-
29	0.91	5.35	4	0.82	5.35	4	-
30	0.66	4.52	7	1.12	4.42	7	-
31	0.74	1.29	4	0.93	1.29	4	0.93
32	0.65	0.98	4	1.14	0.98	4	-
33a	0.71	5.33	4	1.04	5.33	4	-
33b	0.70	5.31	4	1.06	5.31	4	-
<b>Combined</b>	<b>0.74</b>	<b>10.07%</b>	<b>32</b>	<b>1.00</b>	<b>10.24%</b>	<b>32</b>	<b>-</b>
	<b>95% limits 0.72 – 0.77</b>			<b>95% limits 0.97 – 1.04</b>			<b>-</b>

GM – geometrijska sredina; \*dodijeljena vrijednost za lokalni *pool*

Izvor: Hubbard AR, Thelwell C, Rigby P. Value assignment of the proposed WHO 2nd IS Factor V plasma (16/374) and the ISTH/SSC secondary coagulation standard Lot # 5 – Report to participants, March 2018.

**Tablica 8.** Procjene Faktora V u ISTH/SSC standardu (Lot # 4) (uzorak C) u odnosu na 1. IS SZO (uzorak A) (originalno izvješće). Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb označen je brojem 33a i 33b.

Lab No	ISTH/SSC Lot #4 vs WHO 1 <sup>st</sup> IS (C vs A)		
	GM IU/ml	GCV%	n
1a	0.88	2.31	4
1b	0.88	3.44	4
1c	0.84	1.06	4
1d	0.83	2.32	4
4	0.86	2.58	3
6	0.87	4.12	4
7	0.91	3.07	4
8	0.87	1.29	4
9	0.88	1.72	4
10	0.82	7.01	4
11	0.86	2.17	4
12	0.91	4.03	4
13	0.87	4.92	4
14	0.86	1.65	4
15	0.88	2.28	4
16	0.85	3.41	4
17	0.87	0.69	4
18	0.94	6.90	4
19	0.97	4.37	4
20	0.91	3.88	4
21	0.89	2.42	4
22	0.85	2.12	4
23	0.88	3.23	8
24a	0.88	1.92	4
24b	0.89	0.48	4
25	0.90	1.28	4
27	0.97	7.73	4
28	0.89	9.24	4
29	0.89	2.05	4
30	0.94	4.22	5
31	0.84	1.60	4
32	0.87	4.81	4
33a	0.86	2.68	4
33b	0.91	2.10	4
<b>Combined</b>	<b>0.88</b>	<b>4.00%</b>	<b>34</b>
<b>95% limits 0.87 – 0.89</b>			

GM – geometrijska sredina

Izvor: Hubbard AR, Thelwell C, Rigsby P. Value assignment of the proposed WHO 2nd IS Factor V plasma (16/374) and the ISTH/SSC secondary coagulation standard Lot # 5 – Report to participants, March 2018.

**Tablica 9.** Procjene Faktora V u predloženom ISTH/SSC standardu (Lot #5) (uzorak D) u odnosu na 1. IS SZO (uzorak A) i predloženom 2. IS SZO (uzorak B) (originalno izvješće) (Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb označen je brojem 33a i 33b)

Lab No	ISTH/SSC Lot #5 vs WHO 1 <sup>st</sup> IS (D vs A)			ISTH/SSC Lot #5 vs Proposed WHO 2 <sup>nd</sup> IS 0.72 IU/ml (D vs B)		
	GM IU/ml	GCV%	n	GM IU/ml	GCV%	n
1a	0.88	1.70	4	0.88	1.72	4
1b	0.87	2.67	4	0.85	1.31	4
1c	0.85	0.61	4	0.87	1.41	4
1d	0.84	2.02	4	0.85	2.53	4
4	0.87	1.41	3	0.86	2.54	3
6	0.87	6.28	4	0.90	8.31	4
7	0.89	3.11	4	0.88	1.93	4
8	0.84	3.57	4	0.82	3.03	4
9	0.85	1.51	4	0.86	2.43	4
10	0.83	5.63	4	0.85	6.27	4
11	0.86	1.11	4	0.88	1.76	4
12	0.86	3.14	4	0.85	5.06	4
13	0.85	2.68	4	0.87	2.06	4
14	0.88	2.83	4	0.90	2.42	4
15	0.84	2.74	4	0.85	4.79	4
16	0.82	3.34	4	0.81	5.03	4
17	0.85	3.12	4	0.86	1.95	4
18	0.93	5.75	4	0.93	1.84	4
19	0.94	4.59	4	0.86	6.66	4
20	0.90	3.49	4	0.86	2.43	4
21	0.87	2.91	4	0.86	1.74	4
22	0.82	3.52	4	0.83	2.84	4
23	0.87	3.48	7	0.88	3.82	8
24a	0.85	1.14	4	0.87	1.64	4
24b	0.88	1.07	4	0.91	1.72	4
25	0.89	2.74	4	0.88	6.46	4
27	0.96	6.66	4	0.90	2.03	4
28	0.86	9.92	4	0.88	-	2
29	0.85	3.35	4	0.84	3.04	4
30	0.92	4.63	5	0.89	3.64	5
31	0.85	2.37	4	0.87	2.61	4
32	0.87	3.85	4	0.88	4.03	4
33a	0.84	2.57	4	0.86	1.28	4
33b	0.88	2.18	4	0.93	1.16	4
<b>Combined</b>	<b>0.87</b>	<b>3.72%</b>	<b>34</b>	<b>0.87</b>	<b>3.14%</b>	<b>34</b>
	<b>95% limits 0.86 – 0.88</b>			<b>95% limits 0.86 – 0.88</b>		

GM – geometrijska sredina

Izvor: Hubbard AR, Thelwell C, Rigsby P. Value assignment of the proposed WHO 2nd IS Factor V plasma (16/374) and the ISTH/SSC secondary coagulation standard Lot # 5 – Report to participants, March 2018.

## 4.2. Rasprava

U kolaborativnoj studiji koja je provedena kako bi se dodijelila vrijednost 2. IS SZO-e za FV u plazmi sudjelovalo je 30 laboratorija iz 14 zemalja. Vrijednost IS-a mora biti neovisna o primjenjenoj metodologiji, pa su ovom studijom i obuhvaćene sve metodologije koje se primjenjuju za određivanje vrijednosti FV u plazmi. Hrvatske nacionalne preporuke za postupke uzorkovanja, pripreme i analize uzorka te izvještavanje rezultata probirnih koagulacijskih pretraga protrombinskog vremena, aktiviranog parcijalnog tromboplastinskog vremena, trombinskog vremena, fibrinogena i D-dimera koje izdaje Hrvatsko društvo za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu propisuju modificirano protrombinsko vrijeme kao pretragu za procjenu nasljednog ili stečenog manjka FV, međutim u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb aktivnost FV u plazmi određena je također i modificiranom metodom APTV-a te su poslani rezultati dobiveni obim metodama.

Rezultati testiranja iz svih laboratorija koji su sudjelovali u kolaborativnoj studiji obrađeni su centralno od strane SZO. Relativne potentnosti testiranih uzoraka izračunate su uporabom paralelne analize s logaritamskom transformacijom vremena zgrušavanja uporabom minimalno 3 razrjeđenja uzorka na linearnom dijelu baždarnog pravca, a izračuni su izvedeni uporabom programske podrške *CombiStats* (Hubbard i sur., 2018). Za svaki laboratorij generirana je geometrijska sredina logaritamski transformiranih srednjih vrijednosti testiranja, te su one uspoređene dvosmjernim t-testom.

Za testirani uzorak B (predloženi 2. IS SZO za FV u plazmi) u usporedbi s uzorkom A (1. IS SZO za FV u plazmi) metodom PV-a dobili smo ukupni rezultat od 0,70 IU/mL (Tablica 3.), a metodom APTV-a 0,69 IU/mL (Tablica 4.). Raspon svih rezultata koje je SZO-a prikupila bio je od 0,68 do 0,78 IU/mL sa ukupnom srednjom vrijednošću od 0,72 IU/mL (Tablica 6.). Ovakvi rezultati pokazuju malu varijabilnost između laboratorija i dobro slaganje između 1. i 2. IS SZO za FV u plazmi, što omogućuje prijenos IU s 1. IS na 2 IS.

Za testirani uzorak C (Sekundarni koagulacijski standard SSC/ISTH, Lot #4 dodijeljenje vrijednosti za aktivnost FV od 0,89 IU/mL) u odnosu na uzorak A (1. IS SZO za FV u plazmi) metodom PV-a dobili smo ukupni rezultat od 0,85 IU/mL (Tablica 3.), a metodom APTV-a 0,92 IU/mL (Tablica 4.). Raspon rezultata koje je SZO-a prikupila bio je od 0,82 do 0,97 IU/mL s ukupnom srednjom vrijednošću od 0,88 IU/mL (Tablica 8.). Ovakav rezultat pokazuje izvrsno slaganje između vrijednosti dodijeljene uzorku (0,89 IU/mL) i vrijednosti dobivene testiranjem (0,88 IU/mL) te vrlo nisku međulaboratorijsku varijabilnost od 4,0%.

Za testirani uzorak D (predloženi Sekundarni koagulacijski standard SSC/ISTH, Lot #5) u odnosu na uzorak A (1. IS SZO za FV u plazmi) metodom PV-a dobili smo ukupni rezultat od 0,84 IU/mL (Tablica 3.), a metodom APTV-a dobili smo rezultat od 0,89 IU/mL (Tablica 4.). Raspon rezultata koje je SZO-a prikupila bio je od 0,82 do 0,96 IU/mL s ukupnom srednjom vrijednošću od 0,87 IU/mL (Tablica 9.).

Za testirani uzorak L (lokalno pripremljeni *pool* normalne plazme) u odnosu na uzorak A (1. IS SZO za FV u plazmi) metodom PV-a dobili smo ukupni rezultat od 1,03 IU/mL (Tablica 3.), a metodom APTV-a 1,07 IU/mL (Tablica 4.). Raspon rezultata koje je SZO-a prikupila bio je od 0,78 do 1,16 IU/mL s ukupnom srednjom vrijednošću od 1.00 IU/mL (Tablica 7.). Međulaboratorijska varijabilnost je 10,24%, ali ukupni dobiveni rezultat potvrdio je da je kontinuitet između 1. IS SZO za FV u plazmi i lokalnih *pool*-ova normalne plazme očuvan.

## 5. ZAKLJUČCI

Ovom studijom potvrđen je i omogućen prijenos IU s 1. IS SZO za FV u plazmi na 2. IS SZO za FV u plazmi, i dodijeljena vrijednost od 0,72 IU/mL. Studijom su prikazane sve metodologije koje su se u tom trenutku koristile za određivanje aktivnosti FV u plazmi što potvrđuje neovisnost u određivanju potentnosti IS-a o korištenoj metodi i mogućnost primjene modificirane metode APTV-a za određivanje aktivnosti FV u plazmi.

## 6. LITERATURA

Arai N, Matsuo N. Introduction of products: Overview of the automated blood coagulation analyzer CS-2000i. *Sysmex Journal International* , 2007, 17 (S1), 49-59.

Bangham DR, Biggs R, Brozovic M, Denson KWE, Skegg JL. A biological standard for mesurment of blood coagulation factor VIII activity. *Bull World Health Organ* 1971, 45, 337-351.

Bronić A, Coen Herak D, Margetić S, Milić M. Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine: National recommendations for blood collection, processing, performance and reporting of results for coagulation screening assays: prothrombin time, activated partial thromboplastin time, thrombin time, fibrinogen and D-dimer. *Biochem Med* 2019, 29, 020503.

Burn JH, Finnely DJ, Goodwin LG. Biological Standardization. *Oxford University Press*, 1950, str. 125 .

CLSI. One Stage Prothrombin Time (PT) Test and Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) Test. *Approved Guidline- Second Edition H47-A2*, Wayne, PA. Clinical Laboratory Standard Institute, 2008.

Colaborative study CS589 - Proposed WHO 2nd IS factor V plasma, Samples A, B, C, D, E, Instructions for use, 2017.

Hubbard A. International Biological Standards for Coagulation Factors and Inhibitors. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 2007, 33, 283-289.

Hubbard A, Raut S. International reference standards in coagulation. *Biological* 2010, 38, 423-429.

Hubbard AR, Thelwell C, Rigsby P. Value assignment of the proposed WHO 2nd IS Factor V plasma (16/374) and the ISTH/SSC secondary coagulation standard Lot # 5 – Report to participants, March 2018.

Hubbard AR, Thelwell C, Rigsby P, for the Subcommittee on Factor VIII, Factor IX and Rare Coagulation Disorders. Establishment of the WHO 2nd International Standard Factor V, plasma (16/374): communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost*, 2019, 17, 695–697.

Lam W, Moosavi L. Physiology, Factor V. [Updated 2020 Jul 26]. U: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544237/>, pristupljeno 17. 8. 2021.

Roberts HR, Monroe DM, Escobar MA. Current concepts of hemostasis. *Anesthesiology* 2004, 100, 722-730.

World Health Organization. Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards (revised 2004). *WHO Technical Report Series*, 2006, str. 932.



## 7. SAŽETAK/ SUMMARY

Međunarodni standardi za koagulacijske faktore pojavili su se uspostavom prvog međunarodnog standarda za faktor VIII 1970. godine od strane Svjetske zdravstvene organizacije, kao odgovor na potrebu za preciznom i usklađenom procjenom potentnosti novih terapijskih koncentrata i od tada se smatraju najvišim stupnjem standardizacije. Svrha referentnih standarda je olakšati standardiziranu karakterizaciju bioloških uzoraka bez obzira na vrstu mjerenja ili metodu koja se koristi. Većini standarda za koagulacijske faktore dodijeljene su vrijednosti u internacionalnim jedinicama (engl. *International unit* - IU), gdje je 1 IU definirana kao količina analita u 1 mL svježe normalne plazme u *pool*-u. Vrijednost se IS-u dodjeljuje u velikoj kolaborativnoj studiji u kojoj sudjeluje minimalno 20 različitih ekspertnih laboratorija svih kategorija (akademski, komercijalni i klinički) i koja je pažljivo osmišljena na način da predstavi sve trenutne metodologije kako bi demonstrirala da su dodijeljene vrijednosti primjenjive u svim okolnostima. Laboratoriji koji sudjeluju u ovakvoj studiji dužni su provesti usporedbu pripravka, koji im je, zajedno s detaljnim uputama, osigurao organizator studije, u odnosu na lokalno pripremljen *pool* svježe normalne plazme.

Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) provela je 2018. godine kolaborativnu studiju čiji je cilj bio dodjela vrijednosti zamjenskom internacionalnom standardu (IS) za faktor V u kojoj je sudjelovalo 30 laboratorija iz 14 zemalja, a među njima i Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Razlog provođenja studije bilo je smanjenje preostale zalihe IS za FV u plazmi, koje će biti u potpunosti potrošene unutar godine dana. Imajući na umu definiciju IS-a kao neovisnog o primijenjenoj metodi uspoređeni su pripravak kandidat za 2. IS za FV u plazmi s normalnom plazmom u *pool*-u i s 1. IS za FV u plazmi koristeći protrombinsko vrijeme (PV), a potom je to isto učinjeno koristeći aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme (APTV) kao metodu mjerenja aktivnosti FV. Primjenom obje metode za testiranje zadanog pripravka ispitana je neovisnost određivanja potentnosti IS-a o primijenjenoj metodi, a ujedno i prikladnost primjene APTV-a za određivanje aktivnosti FV u plazmi. Rezultati testiranja obrađeni su od strane SZO. Relativne potentnosti testiranih uzoraka izračunate su uporabom paralelne analize s logaritamskom transformacijom vremena zgrušavanja uporabom minimalno 3 razrjeđenja uzorka na linearnom dijelu baždarnog pravca, a izračuni su izvedeni uporabom programske podrške *CombiStats*. Za svaki laboratorij generirana je geometrijska sredina logaritamski transformiranih srednjih vrijednosti testiranja, te su one uspoređene dvosmjernim t-testom.

Ovom studijom potvrđen je i omogućen prijenos IU s 1. IS SZO za FV u plazmi na 2. IS SZO za FV u plazmi, s dodijeljenom vrijednošću od 0,72 IU/mL. Studijom su prikazane sve metodologije koje su se u tom trenutku koristile za određivanje aktivnosti FV u plazmi što potvrđuje neovisnost određivanja potentnosti IS-a o korištenoj metodi i mogućnost primjene modificirane metode APTV-a za određivanje aktivnosti FV u plazmi.

## SUMMARY

International standards (IS) for coagulation factors have only appeared relatively recently in the history of biological standards, with the establishment of the first IS for factor VIII concentrate by the World Health Organization (WHO) in 1970., in response to the need for accurate and harmonized potency estimation for the new therapeutic concentrates and because it is the highest form of standardization. WHO biological reference standards comprise materials of complex composition that require biological or immunological assay for appropriate characterization. Most standards for plasma coagulation factors and inhibitors have assigned values in International Units (IU) where 1 IU is defined as the amount of analyte in 1mL of fresh, pooled, normal plasma. IU value is assigned through collaborative study with participation of at least 20 expert laboratories in all categories (academy, comercial, clinical) and is designed to demonstrate all curently used metodologies. Participating laboratories are asked to assay given preparations relative to local normal plasma pool, as given in instructions. A collaborative study involving 30 laboratories from 14 countries has been undertaken to assign the value to the proposed WHO 2nd International Standard Factor V in plasma. The reason for the study was low remaining stocks of the WHO 1st IS for Factor V in plasma that will be exhausted whitin a year. IS value is methodology independent and WHO 2nd IS for Factor V in plasma is tested relative to WHO 1st IS for Factor V in plasma using PT and APTT metodologies. By using both metodologies independency of metodologies is tested. Relative potencies of test samples were calculated using parallel line analysis with a log transformation of clotting time, using a minimum of three sample dilutions on the linear section of the dose-response curve and calculations were performed using the software CombiStats. Relative laboratories potency estimates were generated as geometric mean and comparison between test data were made by two-tailed-t-test. This study confirmed methodology independency for IS potency estimation.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Medicinska biokemija  
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### Dodjela vrijednosti predloženom 2. međunarodnom standardu Svjetske zdravstvene organizacije za faktor zgrušavanja V u plazmi

Mateja Šako

#### SAŽETAK

Međunarodni standardi za koagulacijske faktore pojavili su se uspostavom prvog međunarodnog standarda za faktor VIII 1970. godine od strane Svjetske zdravstvene organizacije, kao odgovor na potrebu za preciznom i usklađenom procjenom potentnosti novih terapijskih koncentrata i od tada se smatraju najvišim stupnjem standardizacije. Svrha referentnih standarada je olakšati standardiziranu karakterizaciju bioloških uzoraka bez obzira na vrstu mjerenja ili metodu koja se koristi. Većini standarada za koagulacijske faktore dodijeljene su vrijednosti u internacionalnim jedinicama (engl. International unit - IU), gdje je 1 IU definirana kao količina analita u 1 mL svježe normalne plazme u pool-u. Vrijednost se IS-u dodjeljuje u velikoj kolaborativnoj studiji u kojoj sudjeluje minimalno 20 različitih ekspertnih laboratorija svih kategorija (akademski, komercijalni i klinički) i koja je pažljivo osmišljena na način da predstavi sve trenutne metodologije kako bi demonstrirala da su dodijeljene vrijednosti primjenjive u svim okolnostima. Laboratoriji koji sudjeluju u ovakvoj studiji dužni su provesti usporedbu pripravka, koji im je, zajedno s detaljnim uputama, osigurao organizator studije, u odnosu na lokalno pripremljen pool svježe normalne plazme.

Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) provela je 2018. godine kolaborativnu studiju čiji je cilj bio dodjela vrijednosti zamjenskom internacionalnom standardu (IS) za faktor V u kojoj je sudjelovalo 30 laboratorija iz 14 zemalja, a među njima i Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Razlog provođenja studije bilo je smanjenje preostale zalihe IS za FV u plazmi, koje će biti u potpunosti potrošene unutar godine dana. Imajući na umu definiciju IS-a kao neovisnog o primijenjenoj metodi uspoređeni su pripravak kandidat za 2. IS za FV u plazmi s normalnom plazmom u pool-u i s 1. IS za FV u plazmi koristeći protrombinsko vrijeme (PV), a potom je to isto učinjeno koristeći aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme (APTV) kao metodu mjerenja aktivnosti FV. Primjenom obje metode za testiranje zadanog pripravka ispitana je neovisnost određivanja potentnosti IS-a o primijenjenoj metodi, a ujedno i prikladnost primjene APTV-a za određivanje aktivnosti FV u plazmi. Rezultati testiranja obrađeni su od strane SZO. Relativne potentnosti testiranih uzoraka izračunate su uporabom paralelne analize s logaritamskom transformacijom vremena zgrušavanja uporabom minimalno 3 razrjeđenja uzorka na linearnom dijelu baždarnog pravca, a izračuni su izvedeni uporabom programske podrške CombiStats. Za svaki laboratorij generirana je geometrijska sredina logaritamski transformiranih srednjih vrijednosti testiranja, te su one uspoređene dvosmjernim t-testom.

Ovom studijom potvrđen je i omogućen prijenos IU s 1. IS SZO za FV u plazmi na 2. IS SZO za FV u plazmi, s dodijeljenom vrijednošću od 0,72 IU/mL. Studijom su prikazane sve metodologije koje su se u tom trenutku koristile za određivanje aktivnosti FV u plazmi što potvrđuje neovisnost određivanja potentnosti IS-a o korištenoj metodi i mogućnost primjene modificirane metode APTV-a za određivanje aktivnosti FV u plazmi.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 31 stranica, 4 grafička prikaza, 9 tablica i 13 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Faktor zgrušavanja V, međunarodni standard

Mentor: **Dr. sc. Renata Zadro**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Renata Zadro**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Lidija Bach Rojecky**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Andrea Hulina Tomašković**, poslijedoktorand Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: kolovoz 2021.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Medical biochemistry  
Department of medical biochemistry and hematology  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### Value assignment of the proposed WHO 2<sup>nd</sup> IS Factor V plasma

**Mateja Šako**

#### SUMMARY

International standards (IS) for coagulation factors have only appeared relatively recently in the history of biological standards, with the establishment of the first IS for factor VIII concentrate by the World Health Organization (WHO) in 1970., in response to the need for accurate and harmonized potency estimation for the new therapeutic concentrates and because it is the highest form of standardization. WHO biological reference standards comprise materials of complex composition that require biological or immunological assay for appropriate characterization. Most standards for plasma coagulation factors and inhibitors have assigned values in International Units (IU) where 1 IU is defined as the amount of analyte in 1mL of fresh, pooled, normal plasma. IU value is assigned through collaborative study with participation of at least 20 expert laboratories in all categories (academy, commercial, clinical) and is designed to demonstrate all currently used methodologies. Participating laboratories are asked to assay given preparations relative to local normal plasma pool, as given in instructions. A collaborative study involving 30 laboratories from 14 countries has been undertaken to assign the value to the proposed WHO 2<sup>nd</sup> International Standard Factor V in plasma. The reason for the study was low remaining stocks of the WHO 1<sup>st</sup> IS for Factor V in plasma that will be exhausted within a year. IS value is methodology independent and WHO 2<sup>nd</sup> IS for Factor V in plasma is tested relative to WHO 1<sup>st</sup> IS for Factor V in plasma using PT and APTT methodologies. By using both methodologies independency of methodologies is tested. Relative potencies of test samples were calculated using parallel line analysis with a log transformation of clotting time, using a minimum of three sample dilutions on the linear section of the dose-response curve and calculations were performed using the software CombiStats. Relative laboratories potency estimates were generated as geometric mean and comparison between test data were made by two-tailed-t-test. This study confirmed methodology independency for IS potency estimation.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 31 pages, 4 figures, 9 tables and 13 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Factor V, International Standard

Mentor: **Renata Zadro, Ph.D.** *Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Renata Zadro, Ph.D.** *Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Lidija Bach Rojecky, Ph.D.** *Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Andrea Hulina Tomašković, Ph.D.** *Postdoctorant*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: August 2021..