

# Verifikacija referentnih intervala za koagulacijske pretrage na uređaju za rotacijsku tromboelastometriju (ROTEM)

---

Bašić, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:163:701614>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-20**



Repository / Repozitorij:

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



6756/18.

**Ivana Bašić**

**Verifikacija referentnih intervala za  
koagulacijske pretrage na uređaju za rotacijsku  
tromboleastometriju (ROTEM)**

PREDSJEDNIK KOLEGIJE  
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET  
SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Specijalna područja kliničke biokemije Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod stručnim vodstvom izv.prof.dr.sc. Dunje Rogić i suvoditeljstvom mag.med.biochem. Ivane Lapić.

*Zahvaljujem se izv.prof.dr.sc. Dunji Rogić i mag.med.biochem.. Ivani Lapić koje su mi omogućile izradu praktičnog dijela rada. Hvala Vam na susretljivosti, zalaganju i pomoći.*

## SADRŽAJ :

1. UVOD.....	1
1.1. REFERENTNI INTERVALI .....	1
1.1.1. Izrada referentnih intervala.....	1
1.1.2. Verifikacija referentnih intervala .....	2
1.2. HEMOSTAZA.....	3
1.2.1. Primarna hemostaza .....	3
1.2.2. Putevi zgrušavanja .....	2
1.2.3. Inhibicija zgrušavanja I fibrinoliza .....	4
1.2.4. Koagulopatije.....	6
1.3. STANDARDNE KOAGULACIJSKE PRETRAGE.....	6
1.4. ROTEM I DRUGE VISKOELASTIČNE METODE.....	6
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	8
3. MATERIJALI I METODE .....	9
3.4. GRAĐA I PRINCIP RADA ROTEM-a.....	9
3.5. ROTEM TESTOVI .....	11
3.6. PARAMETRI TROMBOELASTOMETRIJSKE ANALIZE .....	12
3.7. PRIMJERI TEMOGRAMA.....	14
3.8. UZORCI I REAGENSI .....	16
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	18
1.4. KLINIČKA PRIMJENA ROTEMA.....	21
1.4.1. Usporedba tromboelastometrije I standardnih koagulacijskih pretraga u pedijatrijskoj kirurgiji .....	21
1.4.2. Prepoznavanje I liječenje koagulopatije kod transplatacije jetre .....	21
1.4.3. Primjena tromboelastometrije u nekardijalnoj kirurgiji.....	22
5. ZAKLJUČCI .....	23
6. SAŽETAK/ SUMMARY.....	24
7. LITERATURA .....	26
8. TEMELINA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD .....	28

## 1.1.REFERENTNI INTERVALI

Pojam referentnih vrijednosti (intervala) zamijenio je prethodno uobičajen izraz „normalne vrijednosti“ da bi se izbjegli nesporazumi, a znači odgovarajuće vrijednosti. Taj koncept je prvi put predstavljen 1972. od strane R. Dybkaera u Kopenhagenu na 8. međunarodnom kongresu kliničkih kemičara. Uvođenje referentnih intervala nužno je za tumačenje laboratorijskih nalaza jer sama vrijednost ako je ne usporedimo s vrijednošću referentne populacije ne znači puno. Odlukom Izvršnog odbora Hrvatske komore medicinskih biokemičara primjena preporučenih metoda i referentnih intervala obvezna je za sve medicinsko-biokemijske laboratorije RH od 1. siječnja 2005. Za određene pretrage koje nisu obuhvaćene navedenim dokumentom laboratorij obično preuzima referentne intervale koje navodi proizvođač reagensa, uz verifikaciju na osobama koje vjerno predstavljaju populaciju koju obuhvaća laboratorij. (Kolić i sur., 2017.)

### 1.1.1. IZRADA REFERENTNIH INTERVALA

Za izradu referentnih intervala potrebno je izabrati referentne osobe koje čine referentni uzorak, a predstavljaju referentnu populaciju, izmjeriti referentne vrijednosti te iz njihove raspodjele odrediti referentne granice – 2.5 i 97.5-ta percentila koje ograđuju referentni interval. Dakle, referentni interval obuhvaća 95 posto središnjih vrijednosti referentne raspodjele i same granice intervala. Referentnom se osobom može smatrati ona osoba određene životne dobi kod koje se anamnezom i fizikalnim pregledom te uvidom u postojeću medicinsku dokumentaciju ne može utvrditi bolesno stanje koje bi utjecalo na promjenu rezultata laboratorijskih pretraga za koje se određuju referentne vrijednosti. Treba i uključiti kriterije biološke i analitičke varijabilnosti ako utječu na mjerenje analita (interferencije, prekomjerna tjelesna težina, spol, dob...). Analitičke varijacije pokušavaju se smanjiti standardizacijom predanalitičkih postupaka i analitičkih metoda (odabir preporučene metode prema IFCC-u s detaljnim opisom metode i karakteristikama kao što su nepreciznost, netočnost, linearnost, mjerna sljedivost, interferencije). Statistički su modeli za izračunavanje referentnog intervala:

- ▶ parametrijska metoda
- ▶ neparametrijska metoda
- ▶ metoda grube procjene te
- ▶ metoda ponovljenog uzorkovanja.

Podatci se prikazu histogramom tako da se na apcisu nanese izmjerene vrijednosti, a na ordinatu učestalost. Zatim se na temelju broja uzoraka i raspodjele rezultata izabire statistički model. Za izbor parametrijske metode rezultati trebaju pratiti Gaussovu krivulju (normalna raspodjela). Prema smjernicama Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (CLSI), preporučene su neparametrijske metode jer one ne uzimaju u obzir tip raspodjele već dodijeljuju rang svakom rezultatu. Preporučeni broj uzoraka je 120. Ako je broj uzoraka manji od 120 primjenjuje se metoda grube procjene ili metoda ponovljenog uzorkovanja (najmanje 100 uzoraka, koristi se

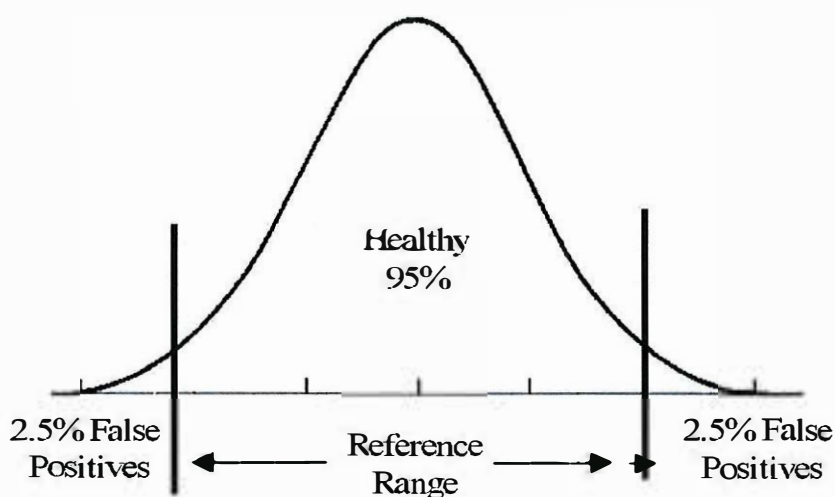
matematičkim modelom koji nasumce iz skupa podataka odabire određeni broj izmjerenih vrijednosti). (Kolić i sur., 2017.; Čvorišćec i Čepelak, 2009.)

### 1.1.2. VERIFIKACIJA REFERENTNIH INTERVALA

Izradu referentnih intervala za sve laboratorijske pretrage moraju osigurati kako klinički laboratoriji tako i proizvođači komercijalnih reagensa u skladu s direktivom IVD 98/79/EC. Ne pristupa svaki laboratorij izradi vlastitih referentnih intervala zbog ekonomskih razloga, ali i kompleksnosti samog postupka. Dovoljno je preuzeti harmonizirane referentne intervale ili preporučene iz literaturnih izvora, ali obavezno je napraviti usporedivost analitičkog sustava i odgovarajućeg referentnog intervala. Verifikacija se može napraviti na 3 načina:

1. subjektivnom procjenom
2. verifikacijom s manjim brojem referentnih osoba  
(na 20 referentnih osoba koje zadovoljavaju sve postavljene kriterije za referentnu populaciju)
3. verifikacijom na većem broju referentnih osoba  
(primjerice na 60 referentnih osoba)

Prema preporukama struke, referentne intervale dovoljno je provjeriti na 20 uzoraka zdravih ispitanika. Ako 10 posto ili manje rezultata odstupa interval se prihvaća. Provjeravanje se ponavlja periodično, preporučuje se jednom godišnje ili kod promjene bilo kojih uvjeta koji mogu znatno utjecati na primjenjivani referentni interval. (Kolić i sur., 2017.; Čvorišćec i Čepelak, 2009.)



Slika 1: Grafički prikaz referentnog intervala (preuzeto s <http://ucsdlabmed.wikidot.com/chapter-1>)



## 1.2. HEMOSTAZA

Hemostaza kao pojam označava zaustavljanje krvarenja, a sustav hemostaze u ljudskom tijelu ima ulogu održati krv u tekućem stanju u fiziološkim uvjetima, a kad nastupi ozljeda zaustaviti krvarenja. Takav sustav čine krvne žile, trombociti, faktori zgrušavanja, inhibitori zgrušavanja i fibrinolitički sustav. (Labar, 2009.)

### 1.2.1. PRIMARNA HEMOSTAZA

Primarna hemostaza uključuje kontrakciju krvne žile neposredno nakon ozljede i traje manje od minute, a cilj je spriječiti gubitak krvi. Serotonin i tromboksan A2 oslobođeni iz trombocita imaju vazokonstriktorski učinak.

Drugi korak je adhezija ili "priljepljenje" trombocita na ozlijeđeni endotel krvnih žila. Za to je neophodan von Willebrandov faktor (vWF) vežući se na subendotelne strukture i trombocite. Adherirani trombociti se zatim aktiviraju, gube diskoidan oblik i oslobađaju sadržaj granula u trombocite (ADP, adrenalin, kalcij, vWF).

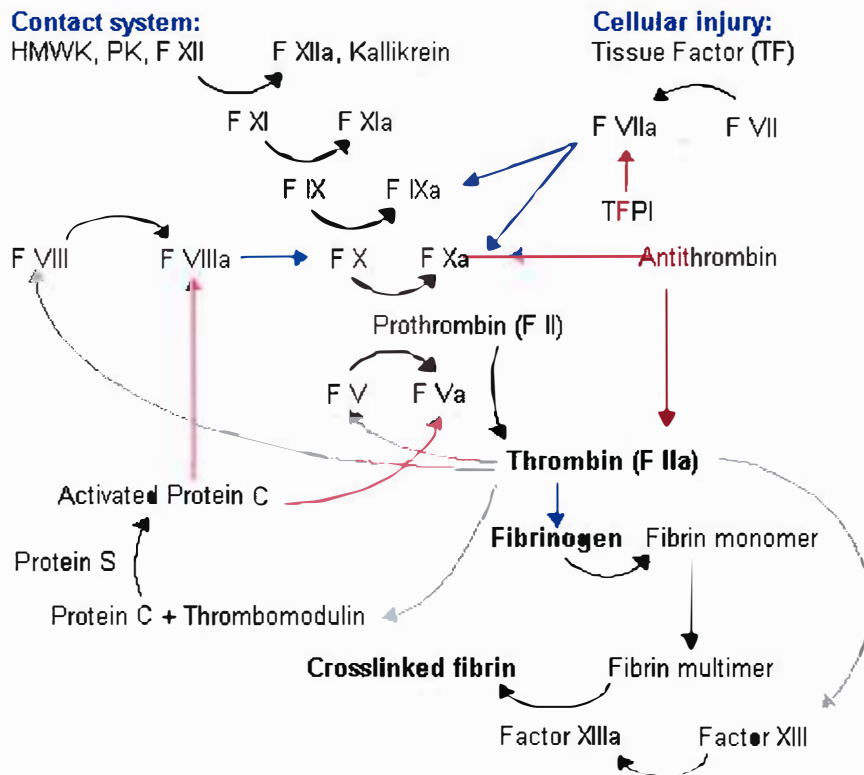
Nakon adhezije slijedi međusobno sljepljivanje trombocita ili agregacija pod utjecajem ADP-a, adrenalina i tromboksana A2, podrijetlom iz trombocita, i trombina, koji nastaje vanjskim putem zgrušavanja. Na kraju rezultat agregacije je trombocitni čep na mjestu ozljede. (Labar, 2009.; Smith SA, 2007.)

### 1.2.2. PUTEVI ZGRUŠAVANJA

Zgrušavanje je dio hemostaze, odnosno zaustavljanja krvarenja. U normalnom stanju u krvi prevladavaju antikoagulansi, a prokoagulansi su prisutni, ali nisu aktivni (zimogeni). Koagulansi se oslobađaju iz ozlijeđene stijenke krvnih žila, aktiviranih trombocita i proteina plazme, te njihovom aktivacijom dolazi do kaskadne reakcije gdje jedna supstanca aktivira sljedeću itd. Postoji unutarnji i vanjski put zgrušavanja. Oba puta dovode do nastanka enzimskog kompleksa aktivatora protrombina u trombin (faktor II). Trombin aktivira protein plazme fibrinogen tako što ga cijepa u fibrinske monomere koji grade fibrinsku mrežu koja hvata krvne stanice i omogućuje nastanak ugruška. U početku je ugrušak slab zbog vodikovih veza, ali pod utjecajem faktora XIII, kojeg aktivira trombin, nastaju kovalentne veze i ugrušak se stabilizira,

Vanjski put zgrušavanja započinje ozljedom krvne žile te oslobađanjem tkivnog tromboplastina (faktora) koji se sastoji od fosfolipida tkivnih membrana i lipoproteinskog kompleksa koji sadrži važan enzim. Lipoproteinski kompleks tkivnog faktora veže se za faktor VII te ga aktivira, a zajedno s kalcijem aktiviraju faktor X, ali i faktor IX koji je dio unutarnjeg puta zgrušavanja. Endotoksini mogu dovesti do oslobađanja tkivnog faktora i nastanka diseminirane intravaskularne koagulacije (DIK).

Unutarnji put ili kontaktni put, započinje kontaktom krvi s kolagenom oštećenih žila ili stranom površinom i aktivacijom faktora XII i oslobađanjem fosfolipida iz povrijeđenih trombocita. Za aktivaciju faktora XII potreban je kalikrein i kininogen visoke molekularne mase. FXIIa aktivira F XI, a on faktor IX koji zajedno s FVIII i fosfolipidima iz trombocita aktivira faktor X. Faktor X zajedno sa faktorom V i fosfolipidima gradi kompleks aktivatora protrombina. Trombin povratno aktivira i faktor VIII. Vanjskim putem krv se zgruša za 15s ,a unutarnjim putem za par minuta. Faktori ovisni o vitaminu K su II, VII, IX i X te zato kod deficita vitamina K i oboljenja jetre dolazi do sklonosti krvarenju. (Labar, 2009.; Smith SA, 2007.)



Slika 2: Prikaz kaskadnih reakcija vanjskog i unutrašnjeg puta zgrušavanja (preuzeto s [https://sh.wikipedia.org/wiki/Zgru%C5%A1avanje\\_krvi](https://sh.wikipedia.org/wiki/Zgru%C5%A1avanje_krvi), pristupljeno 1.6.2018.)

### 1.2.3. INHIBICIJA ZGRUŠAVANJA I FIBRINOLIZA

Inhibitori koagulacije i fibrinolitički sustav sprječavaju zgrušavanje. Endotel krvnih žila je gladak i negativno naelektriziran da spriječi agregaciju krvnih stanica, pogotovo trombocita, te luči NO (dušikov oksid) i prostacikline koji djeluju antikoagulacijski. Na površini endotela nalazi se trombomodulin koji inaktivira trombin i aktivira protein C (inaktivira FVIII i V). Oštećenjem endotela on gubi ova svojstva i aktivira se zgrušavanje. Osim proteina C, zgrušavanje inhibiraju i protein S, alfa-2-makroglobulin, alfa-1-antitripsin, antitrombin i C1 inhibitor (inhibira komponente komplekta C1r i s). Antitrombin je inhibitor serin proteaza i inaktivira trombin i aktivni faktor X, djeluje zajedno s heparinom. Heparin je anionski



sulfatirani polimer glikozaminoglikana koji djeluje reverzibilno se vezujući na antitrombin i pojačavajući njegovo djelovanje.

Glavni fibrinolitik je plazminogen koji prelazi u plazmin pomoću tkivnog aktivatora plazminogena (tPA) i urokinaze (uPA), plazmin se visokim afinitetom veže na fibrin i razlaže ga na fragmente.

Inhibitori fibrinolize su PAI (inhibitor aktivatora plazminogena), inhibitor plazmina i  $\alpha$ 2-makroglobulin. (Labar, 2009.; Smith SA, 2007.)

Tablica 1: Popis aktivatora zgrušavanja, inhibitora zgrušavanja, fibrinolitika i antifibrinolitika

BROJ I IME	FUNKCIJA
Factor I (fibrinogen)	Formiranje ugruška
Factor II (protrombin)	aktivira I, V, X, VII, VIII, XI, XIII, protein C, Tc
Factor III (tkivni faktor, tromboplastin)	Kofaktor za VIIa
Factor IV (kalcij)	Vežanje koagulacijskih faktora za fosfolipide
Factor V (proakcelerin)	Kofaktor FX ,dio protrombinaznog kompleksa
Factor VI	Stari naziv za Va
FVII (prokonvertin)	Aktivira F IX i X
FVIII(antihemofiljski faktor A)	Kofaktor za FIX
FIX (Christmas faktor ili antihemofiljski B)	Aktivira FX
FX (Stuart-Prower faktor)	Aktivira FII, protrombinazni kompleks s FV
FXI (prekursor tromboplastina plazme)	Aktivira FIX
FXII (Hageman faktor)	Aktivira FXI, VII i prekalikrein
FXIII (fibrin stabilizirajući faktor)	Umrežavanje fibrina
Prekalikrein	Aktivira FXII
Antitrombin III	Inhibira IIa i Xa
Kininogen visoke molekularne mase (HMWK)-Fitzgerald faktor	Recipročna aktivacija FXII.FXI i prekalikreina
Protein C	Inhibira FVa i VIIIa
Protein S	Kofaktor aktiviranog proteina C
Protein Z	Stimulira adheziju trombina za fosfolipide, degradacija FX
Von Willebrandov faktor	Veže se za FVIII, posreduje adheziju trombocita
Fibronektin	Adhezija trombocita
Heparin kofaktor II	Inhibira FIIa
Plazminogen	Razgradnja fibrina
A2-antiplazmin	Inhibira plazmin
Urokinaza	Aktivira plazminogen
Tkivni aktivator plazminogena	Aktivira plazminogen
Inhibitor aktivatora plazminogena 1	Endotelni ,inaktivira tPA i uPA
Inhibitor aktivatora plazminogena 2	Placentarni ,inaktivira tPA i uPA

#### 1.2.4. KOAGULOPATIJE

Koagulopatije su općenito poremećaji zgrušavanja, mehanizmi nastanka su: hiperfibrinoliza (pojačana razgradnja fibrina), hipofibrinogenemija (manjak fibrinogena), trombocitopenija (manjak trombocita), manjak faktora zgrušavanja (npr. hemofilija) i heparinski efekt. Rizik koagulopatije povezan je s preoperativnom upotrebom antikoagulacijskih lijekova, hipotermijom (<35 °C), hiperfibrilacijom, nakupljanjem faktora zgrušavanja i trombocita s ciljem da spriječe gubitak krvi kroz oštećenu žilu, dilucijom krvi kao posljedicom transfuzije, hipoksijom, acidozom ... (Whiting, 2013.)

#### 1.3. STANDARDNE KOAGULACIJSKE PRETRAGE

Osnovne koagulacijske pretrage koje se koriste za otkrivanje poremećaja zgrušavanja krvi su: protrombinsko vrijeme (PV), aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme (APTV), trombinsko vrijeme (TV), koncentracija fibrinogena, koncentracija trombocita i ispitivanje agregacije trombocita.

PV- mjeri vanjski i zajednički put koagulacije, faktore I, II, V, VII i X na 37 °C, vrijeme nastanka ugruška obično se izražava kao omjer u odnosu na kontrolnu plazmu

APTV- mjeri unutrašnji i zajednički put zgrušavanja

Ovi testovi ne mogu odrediti uzrok svake koagulopatije, niti primjerice koagulopatiju induciranu hipotermijom, jer su standardizirani na 37 °C, dugo vrijeme pretrage postavlja pitanje odgovaraju li rezultati pretrage u trenutku izdavanja trenutnom stanju pacijenta, i ne detektiraju hiperfibrinolizu i promjenu ugruška tijekom vremena. Osim tih pretraga mogu se odrediti i pojedini faktori zgrušavanja te antikoagulacijski lijekovi. Iako se tim pretragama otkrije većina poremećaja zgrušavanja, nisu prikladni za dijagnostiku akutnih krvarenja te ne koreliraju uvijek s kliničkim stanjem. Nastoje se razviti globalni testovi koji će bolje oponašati fiziološka hemostatska stanja, a time i bolje korelirati s kliničkim stanjem pacijenta. ([www.labmedic.org](http://www.labmedic.org); Whiting, 2013.)

#### 1.4. ROTACIJSKI TROMBOELASTOMETAR (ROTEM) I DRUGE VISKOELASTIČNE METODE

ROTEM je viskoelastična metoda koja omogućava praćenje zgrušavanja krvi, ali i fibrinolize. Prvotno se zvala ROTEG, ali odlučili su promijeniti ime u ROTEM jer su htjeli jedinstveno, globalno prepoznatljivo ime budući da je već postojao TEG. Od velike je važnosti u razlikovanju kirurškog krvarenja od poremećaja zgrušavanja. Radi tako da se u čašicu koja je na nosaču stavi uzorak i odgovarajući reagensi pomoću automatske pipete, već je namještena količina, treba samo pratiti upute na ekranu koji reagensi idu po redu, tako da na njemu može raditi i osoblje kliničke struke. Nakon što se sve doda stavi se čašica pomoću nosača na iglu i pokrene analiza. Osovina se rotira i kako nastaju prve niti ugruška tako se rotacija usporava, a

tome dodatno doprinosi rast ugruška te njegova stabilizacija pomoću fibrinogena i trombocita. Ima optički detektor. Okretni moment detektira se tako da se svjetlost iz izvora reflektira o zrcalo i pada na detektor u kojem je CCD čip.

Drugi slični uređaji na tržištu su Sonoclot analyser i TEG (tromboelastografija). Razlikuju se po tome što se vrtila čašica, a ne osovina, po smjeru oscilacije i korištenim reagensima, ali daju slične informacije o procesu zgrušavanja.

TEG je razvio Helmut Hartet nakon Drugog svjetskog rata 1948. godine, posebno se koristio 80-ih godina tijekom primjene anestezija za dijagnozu akutnih krvarenja. Tvrtka Tem Innovations GmbH, Munich, razvila je ROTEM 90-ih godina iz TEG-a s određenim promjenama koje su navedene plus koristi se optički detektor umjesto torzijske žice. Problem TEG-a bilo je što je uzorak nativna krv i moralo se neposredno nakon vađenja analizirati, osjetljivost instrumenta na vibracije i dugo vrijeme reakcije zgrušavanja. 80-ih godina razvila se tromboelastometrija uvođenjem različitih aktivatora i inhibitora zgrušavanja za diferenciranje koagulopatija, uzorak je citratna krv i manje je osjetljiv uređaj na vibracije i udarce te prenosiv.

Sonoclot je prvi put predstavio 1975. godine von Kualla. Također daje informacije kao i TEG o formaciji fibrina, koagulaciji, fibrinolizi i funkciji trombocita. Slično ROTEM-u kreće se plastična proba umočena u kivetu s uzorkom, ali ne horizontalno već gore-dolje duž vertikalne osi.

Prednost u odnosu na standardne koagulacijske testove je kraće vrijeme analize uzorka i daje nam više informacija što omogućuje da se traže specifični krvni pripravci, a ne da se izlaže nepotrebnom riziku transfuzije. (Whiting, 2013.)

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku u KBC Zagreb ima u planu ROTEM delta uređaj koristiti za ono što je i primarno namijenjen, a to je za brzo otkrivanje uzroka krvarenja pacijenata s odjela i njihovog pravodobnog i ispravnog liječenja. Omogućit će brze rezultate, kvalitetno liječenje, sprječavanje dodatnih trauma i tretmana, skratit će boravak pacijenata u bolnici. Ono što je nužno za njegovu uporabu su referentni intervali koje je proizvođač reagensa dao, a potrebno ih je provjeriti na minimalno 20 zdravih osoba. Poželjno je da bude podjednako muških i ženskih. Referentni intervali omogućuju da se vidi je li riječ o normalnoj ili patološkoj vrijednosti

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. GRAĐA I PRINCIP RADA ROTEM-a

Tromboelastometar ROTEM delta ima 4 kanala koji se mogu istovremeno koristiti, a na svakom kanalu može se namjestiti željeni test. Svaki kanal ima vlastiti grijač i neovisni senzor temperature kao i radno mjesto gdje se uzorak stavlja. Zauzima malo prostora, veličine je oko 0.54m x 0.33m.,mase 22kg. Ima i elektroničku pipetu s jasnim slikovnim uputama na ekranu koje čine uređaj primjenjiv za nelaboratorijsko osoblje nakon provedene edukacije.

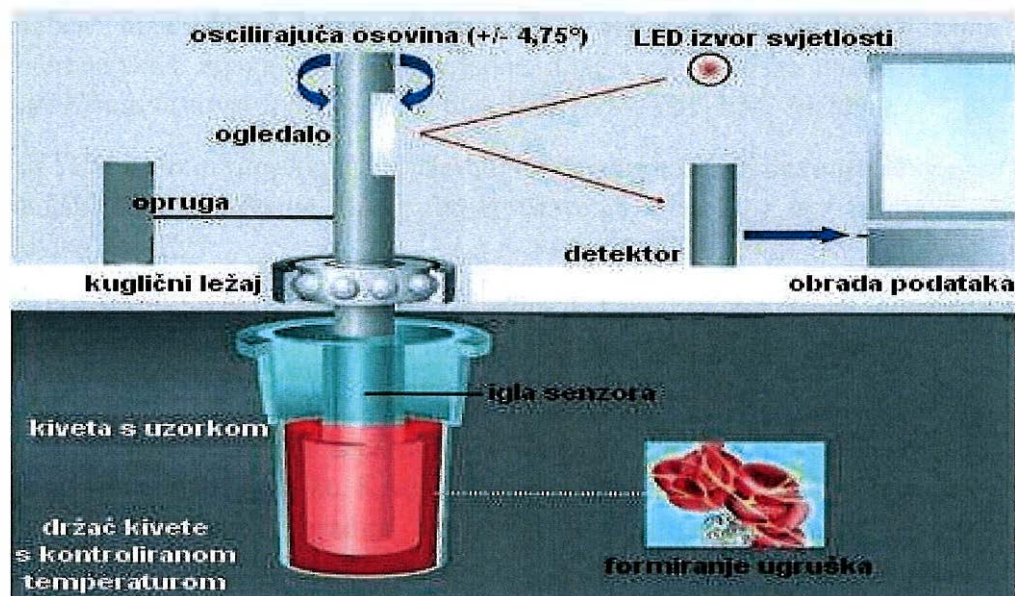


Slika 3: Izgled tromboelastometra ROTEM delta (preuzeto s <http://medilon.bg/en/shop/rotem-delta-thromboelastometry-systems/>, pristupljeno 1.6.2018.)

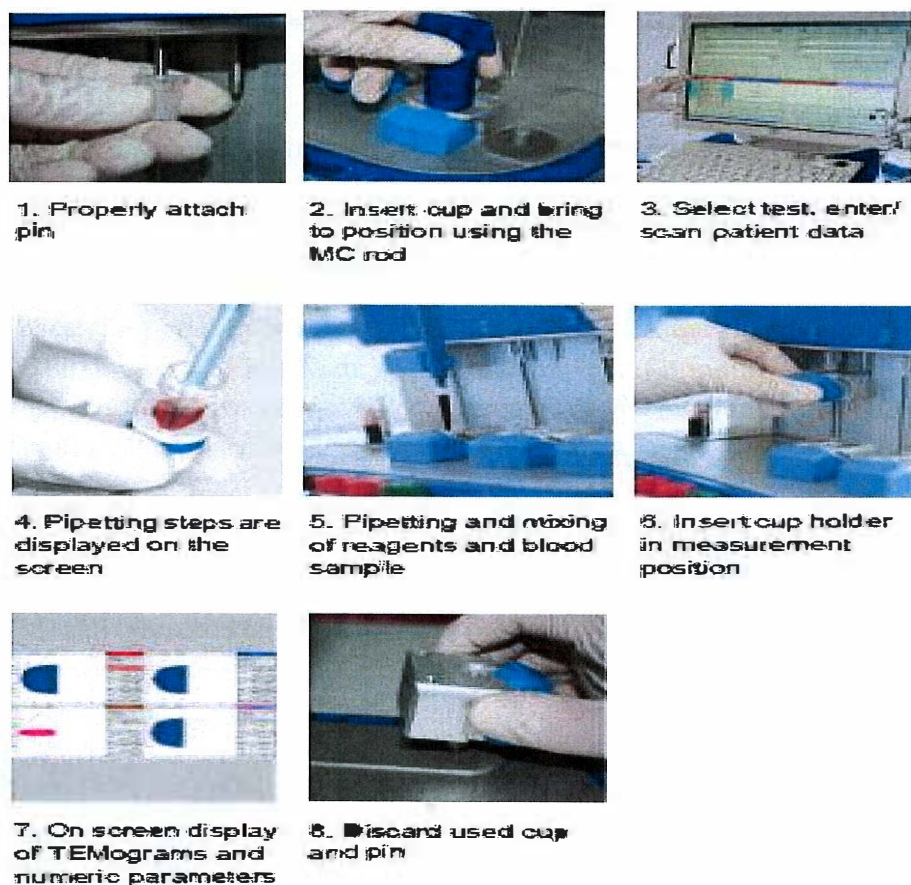
Uzorak pune krvi izvađen na citratu stavlja se zajedno s reagensima u kivetu te brzo pomiješa jer reakcija je već pokrenuta. Kiveta je smještena na grijanom metalnom nosaču pomoću kojeg se ona usmjeri prema gore tako da bude igla (na koju je stavljen plastični nastavak) umočena u uzorak, točnije 1 mm je između igle i kivete gdje će se stvoriti ugrušak. Igla je povezana s pokretnom osovinom i stabilizirana s kugličnim ležajem. Rotira se naizmjenično lijevo pa desno za 4.75 stupnjeva 12 puta u minuti. Kada je reakcija pokrenuta nastaje ugrušak i to usporava kretanju igle - što je čvršći ugrušak sporija je kretanja. Dakle, rotacija igle i čvrstoća ugruška obrnuto su proporcionalne. Promjene u rotaciji detektiraju se pomoću optičkog detektora. LED izvor svjetla usmjeren je na zrcalo na osovini, reflektirana zraka pada na detektor u kojem je CCD čip. Računalo prevodi dobiveni signal u grafički prikaz, tzv. temogram, koji pokazuje ovisnost veličine ugruška o vremenu. Iz temograma računalo očitava različite parametre koji su korisni u procjeni zgrušavanja. Kontrola se provodi jednom tjedno pomoću standardiziranih komercijalnih kontrolnih otopina ROTROL N i P koje su bazirane na ljudskoj plazmi i pokazuju



krivulju u dvije različite razine. Uzorak je poželjno analizirati unutar 2 sata od uzorkovanja (maksimalno 4 sata). (ROTEM operating manual; Gonzalez i sur. 2016.; Calatzis i sur. 2016.)



Slika 4 Princip rada tromboelastometra (Gonzalez i sur., 2016.)



Slika 5: Izvođenje testa na ROTEM delta uređaju (Calatzis i sur. 2016.)



### 3.2 ROTEM TESTOVI

ROTEM-om se pomoću različitih reagensa koji djeluju kao aktivatori ili inhibitori stimuliraju različiti hemostatski procesi poput onih u organizmu te se na taj način može postaviti diferencijalna dijagnoza. Diferencijalna dijagnoza može se postaviti uz pomoć slijedećih specifičnih testova: INTEM, EXTEM, HEPTEM, FIBTEM, APTEM.

EXTEM ispituje vanjski put zgrušavanja. Reagens je tkivni faktor (tromboplastin) koji pokreće vanjski put zgrušavanja. Inicijacija zgrušavanja je za 70 s, a formiranje ugruška za 10min. (slično kao PV)

INTEM ispituje unutarnji put zgrušavanja ili kontaktni put, stoga je osjetljiv na deficijenciju faktora unutarnjeg puta (npr. FVIII) i na prisutnost heparina u uzorku

HEPTEM test se uz INTEM primjenjuje pri praćenju terapije heparinom ili drugih poremećaja zgrušavanja prikriivenih heparinom, a može se upotrijebiti i za otkrivanje heparinu sličnih antikoagulansa u krvotoku. Koagulacija se aktivira kao kod INTEM-a, ali koristi se i heparinaza kao reagens koja degradira heparin i omogućuje analizu u hepariniziranom uzorku. Usporedbom vremena zgrušavanja (CT) INTEM-a i HEPTEM-a dobijemo informaciju je li heparin prisutan u uzorku.

FIBTEM se koristi za razlikovanja uzroka poremećaja zgrušavanja kad je EXTEM-om uočeno da postoji poremećaj s polimerizacijom fibrina, manjak fibrinogena ili nedostatak trombocita. Uz pomoć FIBTEM testa može se razlučiti koliki je udio trombocita i fibrinogena u formiranju ugruška jer je reagens inhibitor trombocita pa se, nakon što su inhibirani trombociti, prati nastanak ugruška samo iz fibrinogena. Koagulacija je aktivirana kao u EXTEM-u, ali dodaje se citokalazin D koji blokira trombocite i tada nastanak ugruška ovisi samo o formaciji i polimerizaciji fibrina. Niži MCF (maximum clot formation) ukazuje na manjak fibrinogena. Postoje razlike između FIBTEM-a i standardnog fibrinogena jer FIBTEM je dosta osjetljiviji na poremećaje polimerizacije ugruška.

APTEM testom potvrđujemo hiperfibrinolizu jer je reagens aprotinin ili transeksemična kiselina koji inhibiraju fibrinolizu. Ako je prisutna hiperfibrinoliza, nakon dodatka aprotinina, uspostavlja se normalna hemostaza i dobijemo normalan temogram u odnosu na EXTEM. Može se procijeniti i učinak antifibrinolitičkih lijekova. Koagulacija se aktivira kao i kod EXTEM-a.

Postoje i dva rjeđe korištena testa - NATEM i ECATEM.

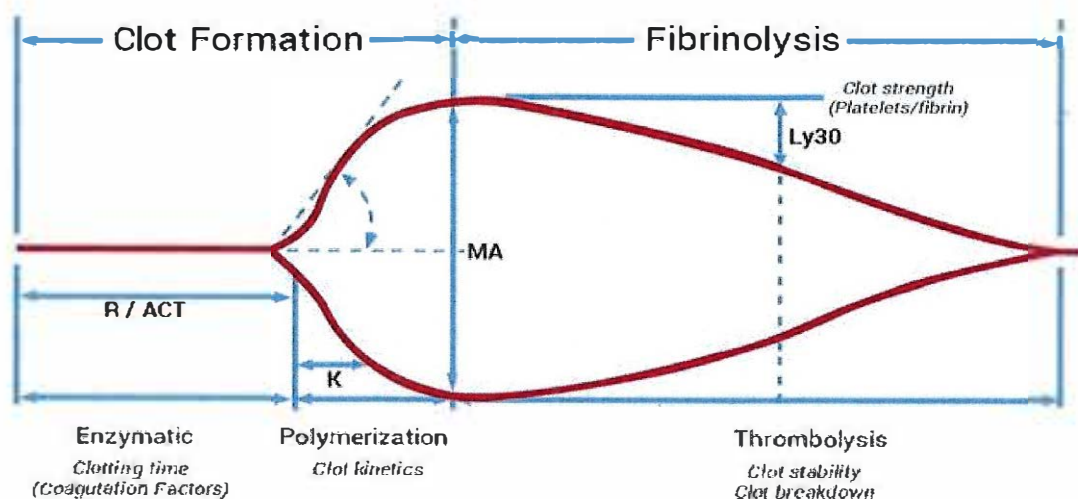
NATEM- aktivira se samo rekalcifikacijom, koristi se za istraživanja

ECATEM- aktivator je ekarin koji pretvara protrombin u meizotrombin- inhibiraju ga inhibitori trombina (hirudin, dabigatran...), a ne i heparin.

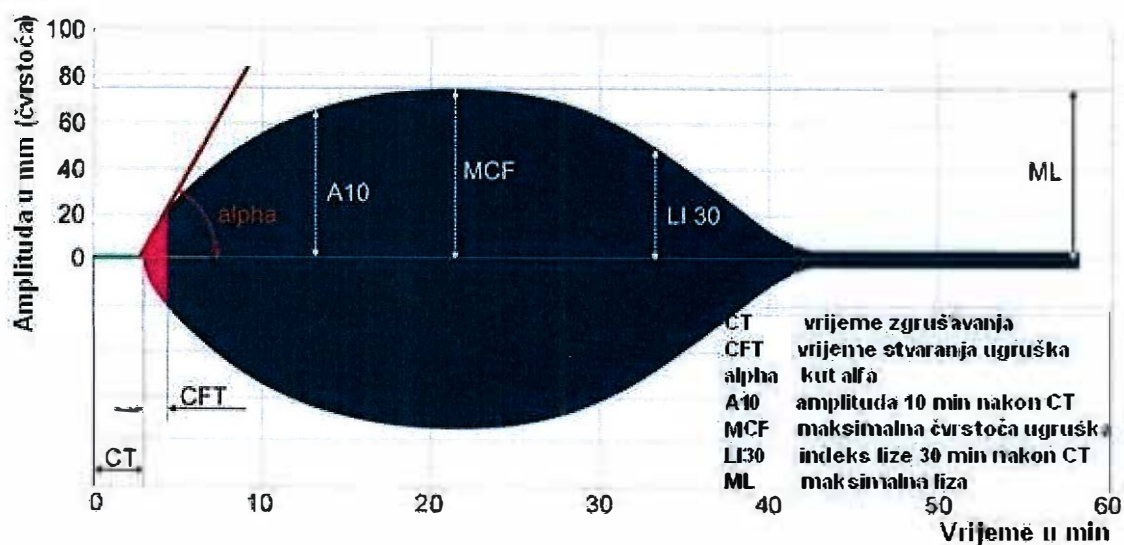
OGRANIČENJA TESTOVA:

1. nije osjetljiv na inhibitore agregacije trombocita : aspirin, klopidogrel, Reopro, von Willebrand faktor
2. slaba osjetljivost na niskomolekularni heparin, Orgaran, pentasaharid i oralne antikoagulanse (varfarin ...) (Gorlinger i sur. 2016.; Gonzalez i sur. 2016.; Rotem delta operating manual,2012; Calatzis i sur. 2016.)

### 3.3 PARAMETRI TROMBOELASTOMETRIJSKE ANALIZE



[http://teg.haemonetics.com/en\\_gb](http://teg.haemonetics.com/en_gb)



Slika 6: Dva prikaza temograma (krivulje tromboelastometra) s označenim najznačajnijim parametrima (Calatzis i sur. 2016.)

#### Parametri aktivacije zgrušavanja i polimerizacije ugruška :

CT (clotting time) – vrijeme od početka mjerenja do početka zgrušavanja (amplituda 2mm) , reflektira formiranje trombina

CFT (clot formation time) – vrijeme od inicijacije zgrušavanja pa dok ne dostigne veličinu od 20mm, reflektira polimerizaciju fibrina, stabilizaciju ugruška trombocitima, fibrin i faktor XIII

ALFA KUT- mjera inicijalne polimerizacije fibrina, predstavlja kinetiku zgrušavanja, kut između bazne linije i tangente na krivulju koja prolazi kroz točku od 2mm

#### Parametri čvrstoće/veličine ugruška :

MCF- maksimalna amplituda veličine/ čvrstine ugruška postignuta tijekom testa, ovisi o koncentraciji i polimerizaciji fibrina, trombocitima i faktoru XIII

A5,10,20 koriste se radi ubrzanog donošenja odluke kod krvarenja, jako dobro koreliraju s MCF (r=0.91-0.98) i zato se odluka donosi već nakon 10 do 15 min

A5- amplituda veličine/ čvrstoće ugruška nakon 5 min od CT

A10- amplituda veličine/ čvrstoće ugruška nakon 10 min od CT

A20- amplituda veličine/ čvrstoće ugruška nakon 20 min

Parametri razgradnje/ lize ugruška:

Ovise o fibrinolitičkim enzimima, inhibitorima fibrinolize i FXIII.

ML ( maximum lysis) – maksimalna liza ugruška detektirana u vremenu analize, detektira se u postotku MCF-a

LI30 (lysis indeks at 30 min)- ostatna veličina ugruška 30 min nakon CT , izražava se kao postotak u odnosu na MCF

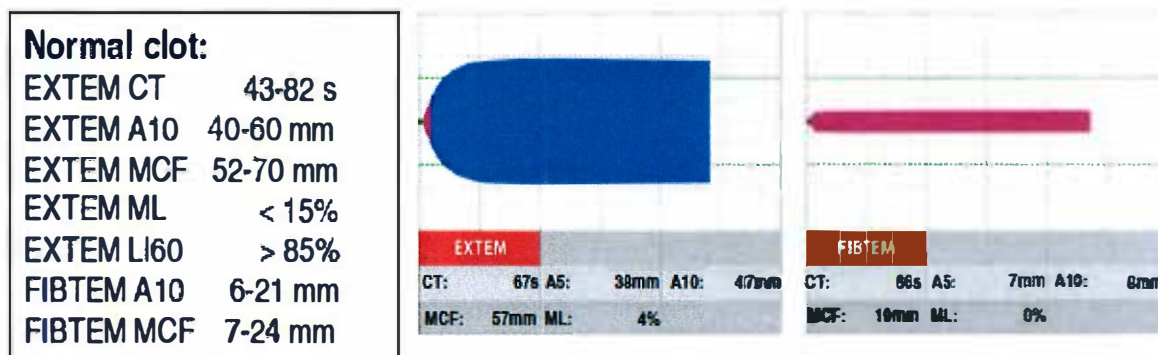
LI60 (lysis indeks at 60 min)- ostatna veličina ugruška 60 min nakon CT , izražava se kao postotak u odnosu na MCF

LOT (lysis onset time) – vrijeme od CT pa sve dok ne padne veličina ugruška za 15 % od MCF (Gorlinger i sur. 2016.; Gonzalez i sur. 2016.; Rotem delta operating manual)

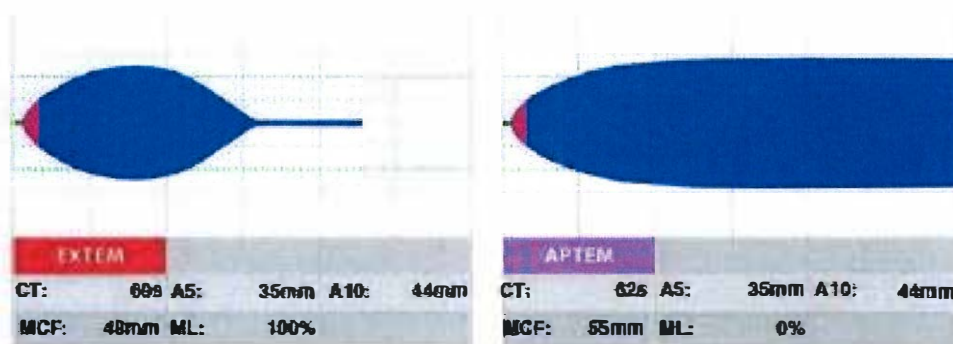
Tablica 2: Prikaz ROTEM referentnih intervala za odraslu populaciju (Gorlinger i sur. 2016.)

	<b>CT</b> Clotting Time (secs)	<b>CFT</b> Clot Formation Time (secs)	<b>A10</b> Amplitude at 10 mins (mm)	<b>A20</b> Amplitude at 20 mins (mm)	<b>MCF</b> Maximum Clot Firmness (mm)	<b>ML</b> Maximum Lysis (% of MCF)
<b>EXTEM</b>	38-79	34-159	43-65	50-71	50-72	<15
<b>FIBTEM</b>	n/a	9-24	7-23	8-24	9-25	<15
	A10 or MCF <9 mm – reduced fibrinogen level or impairment fibrin polymerisation A10 or MCF >25 mm – increased fibrinogen level May lead to normal clot formation in EXTEM or INTEM in spite of thrombocytopenia					
<b>APTEM</b>	Normalised clotting (shortened CT, higher MCF) in APTEM assay as compared to EXTEM is a sign for fibrinolysis					
<b>INTEM</b>	100-240	30-110	44-66	50-71	50-72	<15
<b>HEPTEM</b>	100-240	Normalised CT in HEPTEM compared to INTEM is indicative to a heparin effect				

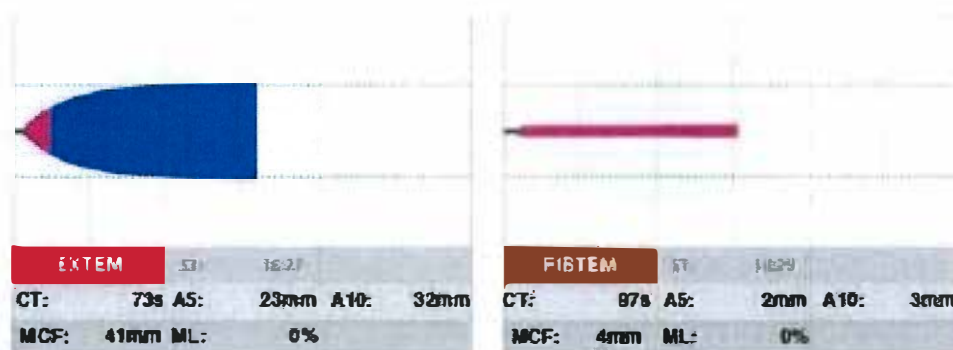
### 3.4. PRIMJERI TEMOGRAMA



Slika 7: Prikaz temograma kod normalnog zgrušavanja uz referentne vrijednosti (Gorlinger i sur., 2016.)

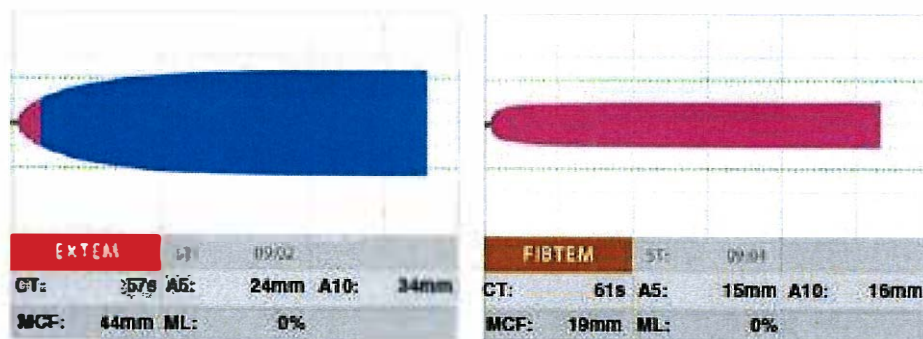


Slika 8: Prikaz temograma APTEM i EXTEM u dijagnozi hiperfibrinolize – ugrušak postiže manju amplitudu i zatim slijedi fibrinoliza 100 postotna što je vidljivo padom amplitude do 0, a na APTEM-u se vidi normalno zgrušavanje jer je reagensom spriječena fibrinoliza (Gorlinger i sur., 2016.)

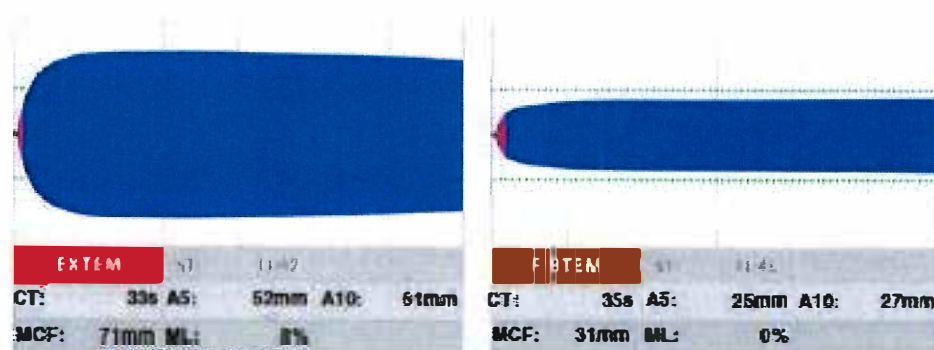


Slika 9: Prikaz EXTEM i FIBTEM temograma u deficijenciji fibrinogena – na EXTEM krivulji vidljiva je niža amplituda zgrušavanja, kao i na FIBTEM što ukazuje na manjak fibrinogena (Gorlinger i sur., 2016.)

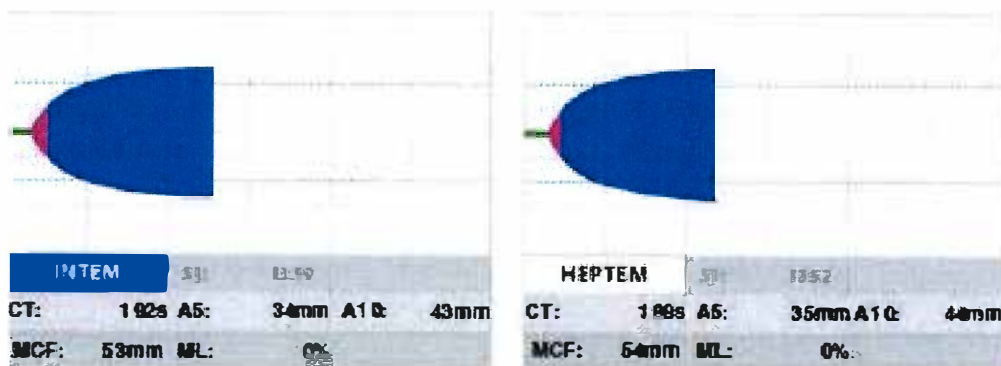




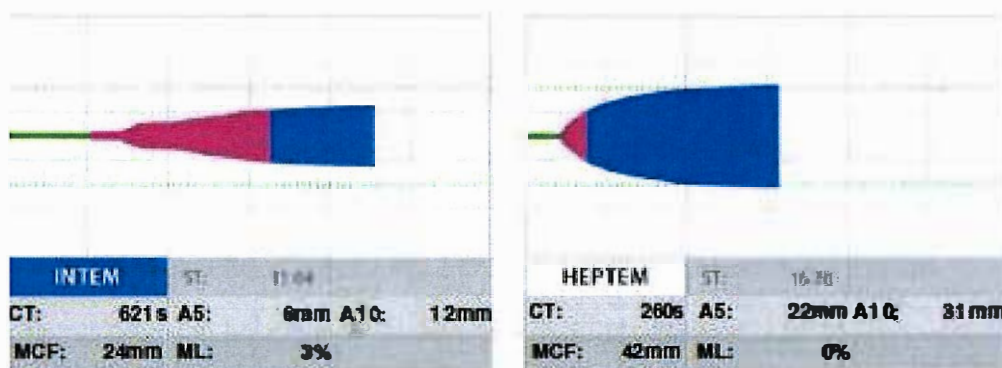
Slika 10: Prikaz EXTEM i FIBTEM temograma u dijagnozi trombocitopenije – niža amplituda ugruška na EXTEM krivulji, a normalna amplituda u FIBTEM znači da je normalan fibrinogen, a deficijentni trombociti (Gorlinger i sur., 2016.)



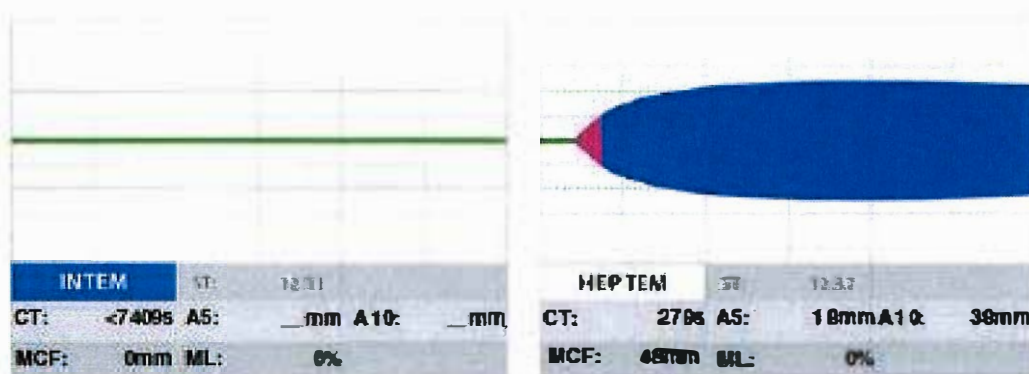
Slika 11: Prikaz FIBTEM i EXTEM temograma u slučaju hiperkoagulabilnosti (visoki rizik od tromboze) – vidljiva je visoka amplituda ugruška i skraćeno je vrijeme zgrušavanja CT i CFT, plava boja na FIBTEM prikazu znači da reagens ne uspijeva inhibirati sve trombocite (Gorlinger i sur., 2016.)



Slika 12: Prikaz temograma INTEM i HEPTEM kod normalnog zgrušavanja, krivulje trebaju biti podjednake (Gorlinger i sur., 2016.)



Slika 13: Prikaz INTEM i HEPTEM temograma kod niske doze heparina, produljeno je vrijeme zgrušavanja i niska amplituda jer je heparin antikoagulans, a HEPTEM-om se maskira učinak heparina te se uspoređuje s INTEM-om (Gorlinger i sur., 2016.)



Slika 14: Prikaz INTEM i HEPTEM temograma kod visoke doze heparina (CPB), na INTEM je vidljiva ravna linija (Gorlinger i sur., 2016.)

### 3.5. UZORCI I REAGENSI

Za potrebu provjere referentnih intervala na ROTEM uređaju prikupljeno je 22 uzorka, od čega 10 muških i 12 ženskih. To su uzorci zdravih dobrovoljaca koji su uglavnom bili djelatnici KBC Zagreb. Uzorak je puna venska krv izvađena na tekući antikoagulans natrijev citrat 3.2 % (0.109 mol/L) u Becton Dickinson epruvetu s podtlakom, 4,5ml.. Bitno je uzorkovati krv točno do oznake uz 10% odstupanja, to je standardizirano, inače se uzorak ne prihvaća jer je krv razrijeđena i rezultati neće biti vjerodostojni. Također, nakon vađenja krvi treba je odmah promiješati inverzijom 3-4 puta (ne mućkati, niti tresti) kako se ne bi zgrušala stajanjem, a trešnjom se stanice mogu lizirati. Uzorke koji su zgrušani treba odbaciti, upisati u nesukladnosti i tražiti ponovno vađenje krvi. Na sobnoj temperaturi uzorci su stabilni do 4 sata za analizu. Prije analize ostaviti uzorak 10 min na grijanoj stanici na uređaju.

Korišteni reagensi su komercijalni, pakirani u bočicama (10 testova) od proizvođača Tem International GmbH, Munich. Trebaju postići sobnu temperaturu prije analize i lagano ih promiješati. Treba označiti datum otvaranja te paziti na rok upotrebe od datuma otvaranja bočice.



- 1) Star-tem (10x10 testova) reagens: CaCl<sub>2</sub>, prezervativi i pufer
- 2) In-tem (10x10) reagens: Parcijalni tromboplastin (fosfolipidi) iz zečjeg mozga, elagična kiselina, prezervativi i pufer
- 3) Ex-tem (10x10) reagens: rekombinantni tkivni faktor i fosfolipidi, inhibitor heparina, prezervativi i pufer
- 4) Fib-tem (10x5): citokalazin D, CaCl<sub>2</sub>, prezervativi i pufer
- 5) Hep-tem Lyo: heparinaza 1 iz flavobakterija, prezervativi i pufer

Hep-tem Dil: 2000μl diluenta s CaCl<sub>2</sub> .prezervativi i pufer

Hep-tem reagens pripremiti miješanjem hep-tem lyo plus 200μl hep-tem dil

- 6) Ap-tem reagens: aprotinin, CaCl<sub>2</sub>, prezervativi i pufer

In-tem i ex-tem reagensi koriste se u kombinaciji sa star-tem koji služi za rekalcifikaciju radi nadoknade kalcija koji je keliran natrijevim citratom

Za analizu uređaj uzima standardiziranu količinu od 300μl uzorka i 20μl pojedinog reagensa.

Pipeta je elektronička i ima svoje, originalne nastavke.

Za svaku analizu uzima se plastična čašica.

Treba uvijek na kraju dana očistiti uređaj (nosač za čašice i iglu).

(ROTEM delta operating manual,2012; Calatzis i sur., 2016.)

#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

Tablica 3: Prikaz rezultata za FIBTEM test za parametre A10,A20 i MCF

Ispitanik	Spol	A10 (mm)	A20 (mm)	MCF (mm)
I1	Ž	12	12	12
I2	M	10	11	10
I3	Ž	17	17	17
I4	Ž	8	9	<b>8</b>
I5	M	13	14	14
I6	Ž	greška prilikom analize		
I7	M	14	14	14
I8	M	9	10	9
I9	Ž	18	19	19
I10	Ž	13	13	13
I11	M	12	12	12
I12	M	14	15	15
I13	M	11	11	11
I14	Ž	13	13	13
I15	Ž	15	16	16
I16	M	13	14	14
I17	Ž	9	9	9
I18	Ž	15	16	16
I19	M	10	10	10
I20	M	12	13	13
I21	Ž	12	12	12
I22	Ž	13	13	13
<b>Referentni intervali</b>		<b>7 -23</b>	<b>8 - 24</b>	<b>9 - 25</b>

Ova tablica prikazuje rezultate FIBTEM testa za amplitude nakon 10 i 20 min od CT i MCF (maximum clot formation). Provjeravaju se ta 3 parametra jer su dijagnostički korisna i značajna. Ukupno je bilo 22 uzorka, ali kod jednog je došlo do pogreške tijekom izvedbe analize, tako da je u statističku obradu uzet 21 uzorak. U dnu tablice su navedeni univerzalni referentni intervali koji se ne razlikuju po spolu i dobi. Oni su dobiveni od proizvođača, a napravljeni su u multicentričkoj studiji na 150 zdravih ispitanika s područja centralne Europe. Za A10 i A20 svi su rezultati unutar referentnog intervala, a za MCF 1 je izvan. Budući da je 10 % dopuštena pogreška, to bi na 21 uzorak bila 2, sva 3 referentna intervala se prihvaćaju.

Tablica 4: Prikaz rezultata EXTEM testa za 6 parametra CT, CFT, alfa kut, A10, A20 i MCF

Ispitanik	Spol	CT(s)	CFT (s)	$\alpha$ -kut (°)	A10 (mm)	A20 (mm)	MCF (mm)
I1	Ž	60	64	77	59	65	65
I2	M	64	78	74	52	59	59
I3	Ž	57	68	77	56	62	62
I4	Ž	58	92	71	52	58	58
I5	M	66	94	71	54	60	60
I6	Ž	71	66	77	57	62	62
I7	M	74	82	75	55	62	63
I8	M	72	82	73	50	57	57
I9	Ž	61	62	77	61	66	67
I10	Ž	63	78	74	54	60	61
I11	M	68	85	73	55	60	61
I12	M	55	97	72	50	57	57
I13	M	61	83	73	50	56	57
I14	Ž	61	73	75	55	61	61
I15	Ž	61	58	79	60	66	66
I16	M	73	71	75	56	61	61
I17	Ž	61	89	72	52	59	60
I18	Ž	58	58	78	62	68	68
I19	M	59	81	73	50	56	56
I20	M	58	82	73	54	61	61
I21	Ž	74	75	75	57	63	64
I22	Ž	55	88	72	51	58	59
<b>Referentni intervali</b>		<b>38 - 79</b>	<b>34 - 159</b>	<b>63 - 83</b>	<b>43 - 65</b>	<b>50 - 71</b>	<b>50 - 72</b>

U ovoj tablici 4 prikazani su rezultati analize 22 uzorka EXTEM testom. Od tih 22, 10 je muških, a 12 ženskih ispitanika. Na dnu tablice navedeni su referentni intervali za ispitivane parametre: CT (clotting time), CFT (clot formation time), A10, A20 (amplituda nakon 20 min), MCF (maximum clot formation) i alfa kut. Referentni intervali dobiveni su od proizvođača multicentričnom studijom na 150 ispitanika iz centralne Europe. Ne razlikuju se po dobi i spolu. Svi dobiveni rezultati ulaze u referentne intervale proizvođača, stoga se svih 6 prihvaća.

Tablica 5: Prikaz rezultata INTEM testa za parametre CT, CFT, alfa kut, A10, A20 i MCF

Ispitanik	Spol	CT(s)	CFT (s)	$\alpha$ -kut (°)	A10 (mm)	A20 (mm)	MCF (mm)
I1	Ž	165	74	75	58	63	63
I2	M	159	73	75	51	57	57
I3	Ž	168	60	78	56	61	60
I4	Ž	165	73	75	54	58	58
I5	M	191	81	74	53	57	57
I6	Ž	195	66	76	57	63	63
I7	M	173	84	73	53	60	62
I8	M	191	85	73	50	57	57
I9	Ž	185	57	78	59	65	65
I10	Ž	169	75	75	52	56	56
I11	M	187	89	72	51	55	55
I12	M	160	91	72	49	55	55
I13	M	173	81	74	49	55	55
I14	Ž	156	59	78	56	59	59
I15	Ž	188	60	78	58	63	63
I16	M	185	66	76	55	60	60
I17	Ž	166	80	74	52	58	58
I18	Ž	185	72	75	56	62	62
I19	M	214	91	72	48	55	55
I20	M	199	82	73	53	58	58
I21	Ž	180	71	75	56	61	61
I22	Ž	152	95	71	50	57	57
<b>Referentni intervali</b>		<b>100 - 240</b>	<b>30 - 110</b>	<b>70 - 83</b>	<b>44 - 66</b>	<b>50 - 71</b>	<b>50 - 72</b>

U tablici 5 prikazani su rezultati 22 uzorka analizirana INTEM testom, od čega su 12 ispitanica, a 10 ispitanika. Parametri koji su provjeravani su CT (clotting time), CFT (clot formation time), MCF (maximum clot formation), alfa kut, A10, i A20 (amplituda nakon 10,20 min). Na dnu tablice su upisani referentni intervali preuzeti od proizvođača. Proizvođač ih je napravio u multicentričnoj studiji sa 150 zdravih ispitanika s područja centralne Europe. Svi dobiveni rezultati su unutar pripadajućih intervala, tako da se svi ispitivani referentni intervali za INTEM prihvataju.

#### 4.1.KLINIČKA PRIMJENA ROTEM ANALIZE

Situacije povezane s visokim rizikom krvarenja su operacije i traume, ili zbog problema zgrušavanja krvi. Od kirurških zahvata, visoki rizik krvarenja je kod kardijalnih, vaskularnih, transplatacije jetre, zamjene kuka i obstetričke intervencije. Pacijenti zbog krvarenja moraju na transfuziju krvi i/ili ponovnu operaciju, stoga je važno poznavati uzrok krvarenja i liječiti ga na odgovarajući način da bi se izbjegle nepotrebne transfuzije. Važnost rotacijske tromboelastometrije (ROTEM) upravo je u razlikovanju kirurškog krvarenja od poremećaja zgrušavanja. (Whiting, 2013.)

##### 4.1.1. USPOREDBA TROMBOELASTOMETRIJE I STANDARDNIH KOAGULACIJSKIH PRETRAGA U PEDIJATRIJSKOJ KIRURGIJI

Djeca tijekom operacije često gube velike količine krvi po kilogramu zbog čega trebaju transfuziju alogenih krvnih pripravaka, što kasnije može dovesti do dilucijske koagulopatije. Cilj je otkriti rane znakove koagulopatije. Prvi faktor koji je značajno snižen kod perioperativnih hemoragija i dilucijskih koagulopatija je fibrinogen. Transfuzija svježe smrznute plazme i primjena koncentrata protrombinskog kompleksa temelji se prema preporukama na produženom PT (protrombinskom vremenu) i aPTT (aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme). Različite studije bavile su se usporedbom standardnih koagulacijskih pretraga (aPTT, PT i fibrinogen) s ROTEM-om jer ROTEM-om se dobiju rezultati dosta prije, za nekih 10 minuta su prvi rezultati, dok kod standardnih koagulacijskih pretraga samo centrifugiranje traje 15min. No, rezultati nisu baš pokazali dobru korelaciju između pretraga, razlog može biti i u tome što se jedne pretrage rade u plazmi, a druge u punoj krvi. Korelacija PT s EXTEM CT je 0.46, a sa CFT je 0.78. Korelacija aPTT s CT i CFT INTEM je nešto viša 0.72 i 0.79. Korelacija fibrinogena s FIBTEM A10 i MCF je 0.82 i 0.88. Korelacija u broju trombocita s A10 i MCF INTEM je 0.9 i 0.87. Tako da se PT i aPTT ne mogu koristiti za predviđanje ROTEM CT. Uočene su i razlike u postotku rezultata izvan referentnog intervala, vrijednosti aPTT i PT upućuju na više koagulacijskih terapija (nepotrebnih) nego vrijednosti ROTEM-a. (Haas i sur., 2011)

##### 4.1.2. PREPOZNAVANJE I LIJEČENJE KOAGULOPATIJE KOD TRANSPLATACIJE JETRE

Praćenje koagulacije perioperativno kod velikih operacija, kao što je transplatacija jetre, bitno je za procjenu rizika krvarenja i prave hemostatske terapije tijekom operacije. Standardne koagulacijske pretrage za razliku od ROTEM-a imaju duže vrijeme izrade, ne odražavaju funkciju trombocita i rade se na 37 celzijevih stupnjeva što često nije stvarna temperatura



pacijenta. Tromboelastometrija radi na temperaturi pacijenta i procjenjuje funkciju trombocita i njihove interakcije s eritrocitima. Sve je to razlog zašto je takvo izvođenje pretraga nepodobno za dinamičke intraoperativne poslovne postavke. Kod jetrenih bolesnika dolazi do hemostatskih poremećaja uslijed: 1) disfunkcije i smanjene produkcije pro- i antikoagulacijskih faktora 2) smanjenja broja trombocita zbog sekvestracije slezene, skraćenog poluživota ili smanjene proizvodnje (malo trombopoetina). Unatoč tome, pacijenti mogu imati normalno zgrušavanje zbog kompenzacije smanjenjem proizvodnje antikoagulansa proteina C i povećane proizvodnje faktora VIII. Povećan udio infekcija i tromboze jetrene arterije poslije transplatacije jetre povezano je s transfuzijom eritrocita. Pokazano je da svi krvni pripravci (krioprecipitati, svježe smrznuta plazma i trombociti) imaju negativan učinak na preživljavanje, te su i povezani s akutnom upalom pluća. ROTEM će stoga poslužiti za procjenu i tretman hiper- i hipokoagulabilnih stanja povezanih s krvarenjem tijekom operacije. S tromboelastogramom pratilo bi se stanje u stvarnom vremenu tijekom različitih faza transplatacije te u kombinaciji s tradicionalnim pretragama i mišljenjem kirurga poboljšao bi se ishod pacijenta pravovremenom i ispravnom terapijom krvarenja. (Zamper RP, 2017)

#### 4.1.3. PRIMJENA TROMBOELASTOMETRIJE U NEKARDIJALNOJ KIRURGIJI

Veliki problem u nekardijalnoj kirurgiji (transplatacija jetre, različite traume, postporođajna hemoragija) je stečena koagulopatija. Kliničari se često odlučuju na hemostatsku terapiju prema svom iskustvu ili omjeru eritrocita i svježe smrznute plazme. To može dovesti do krive transfuzije i povećati morbiditet, smrtnost i bolničke troškove. Upotreba point of care tromboelastometrije u vođenju hemostatske terapije, -i ciljna terapija sa koncentratima specifičnih koagulacijskih faktora (fibrinogen, protrombinski kompleks) povezana je sa smanjenim brojem transfuzija i transfuzijskim nuspojavama, boljim ishodima i smanjenim bolničkim troškovima. Jedna od najvažnijih ROTEM varijabli je maksimalna čvrstoća ugruška (MCF), ali budući da se ta vrijednost dobije kasnije, cilj je pomoću ranijih varijabli predvidjeti MCF. Korelacija CT (coagulation time) sa MCF je loša 0.18-0.49, amplitude A5, A10, A15 imaju odličnu korelaciju 0.95, 0.96, 0.98, CFT (clot formation time) i alfa kut imaju nelinearne korelacije s MCF što je teško klinički primijeniti. Zaključeno je da najbolje u procjeni MCF služe A5, A10 i A15. Isto tako MCF u FIBTEM-u dobro korelira s koncentracijom fibrinogena, što je odlično jer ima visoku prediktivnu vrijednost za perioperativna krvarenja i potrebu za masivnim transfuzijama u traumama, postporođajnom krvarenju kardijalnoj i skolioznoj kirurgiji. FIBTEM ne pruža informacije samo o koncentraciji fibrinogena, već i o poremećajima polimerizacije fibrinogena uzrokovane disfibrinogenemijom često prisutnoj u cirozi jete, koloidnoj infuziji i deficijenciji faktora XIII. Važno je i znati da na rezultate ROTEM-a utječe hematokrit. Sniženi hematokrit znači da je veća plazmatska frakcija u uzorku pune krvi, što može rezultirati većim MCF-om. (Gorlinger i sur., 2012)



## 5. ZAKLJUČCI

Provedbom verifikacije dijagnostički značajnih referentnih intervala za ROTEM delta koagulacijski uređaj zaključujem da se prihvaćaju svi ispitani referentni intervali i da se mogu koristiti u radu kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb. I dalje će se koristiti standardne koagulacijske pretrage, a ove analize će poslužiti za otkrivanje uzroka krvarenja i propisivanju pravilne i pravovremene terapije. Referentni intervali su univerzalni po dobi i spolu, a to su slijedeći:

FIBTEM: A10 7-23 mm  
A20 8-24 mm  
MCF 9-25 mm

EXTEM: CT 38-79 s  
CFT 34-159 s  
 $\alpha$  KUT 63-83°  
MCF 50-72 mm  
A10 43-65 mm  
A20 50-71 mm

INTEM: CT 100-240 s  
CFT 30-110 s  
 $\alpha$  KUT 70-83°  
A10 44-66 mm  
A20 50-71 mm  
MCF 50-72 mm

## 6. SAŽETAK

Uvođenje novog uređaja u laboratorij zahtijeva nužno verifikaciju postojećih analitičkih značajki i referentnih intervala koje je utvrdio proizvođač. Referentni intervali su utvrđeni na velikom broju zdrave populacije srednje Europe, gdje mi pripadamo. Za verifikaciju je dovoljno na minimalno 20 zdravih ispitanika provjeriti te referentne intervale, te se oni prihvaćaju ako odstupa 10% ispitanika, odnosno ne prihvaćaju se ako odstupa više od 10% ispitanika. Hemostaza kao pojam označava zaustavljanje krvarenja, a sustav hemostaze u ljudskom tijelu ima ulogu održati krv u tekućem stanju u fiziološkim uvjetima, a kad nastupi ozljeda zaustaviti krvarenja. Takav sustav čine krvne žile, trombociti, faktori zgrušavanja, inhibitori zgrušavanja i fibrinolitički sustav. Svi ti čimbenici hemostaze ispituju se laboratorijskim testovima i na taj način se otkriva u kojem je dijelu sustava problem. Osnovne koagulacijske pretrage koje se koriste za otkrivanje poremećaja zgrušavanja krvi su: protrombinsko vrijeme (PV), aktivirano parcijalno trombotičko vrijeme (APTV), trombinsko vrijeme (TV), koncentracija fibrinogena, koncentracija trombocita i ispitivanje agregacije trombocita. To su nezamjenjive pretrage u rutini, ali kad je riječ o krvarenju gdje treba hitno intervenirati tu nisu korisne. Mana im je dugo trajanje analize (oko 40 min). Zato se u tim slučajevima koristi ROTEM koji ima 4 kanala i u roku 20 min dobiju se rezultati analize koji ukazuju na uzrok krvarenja, ovisno o izboru testova. 2 situacije povezane s visokim rizikom krvarenja su operacije i traume same po sebi, ili zbog problema zgrušavanja krvi. Od kirurgija visoki rizik krvarenja je kod kardijalne, vaskularne, transplantacije jetre, zamjene kuka i obstetričke intervencije. Pacijenti zbog krvarenja moraju na transfuziju krvi i/ili ponovnu operaciju, stoga je važno poznavati uzrok krvarenja i liječiti ga na odgovarajući način da bi se izbjegle nepotrebne transfuzije. Važnost ROTEM-a upravo je u razlikovanju kirurškog krvarenja od poremećaja zgrušavanja. Iz krivulje temogram osim zgrušavanja, vidljiva je i fibrinoliza, to su takozvane viskoelastične metode. Sonclot i TEG su prethodnici ROTEM-a, ali zbog svojih izvedbenih mana nisu se dugo zadržali. Prednosti ROTEM-a su jednostavna izvedba s uputama na ekranu i elektroničkom pipetom, brzina izvedbe, dodatne informacije koje pruža i skraćuje boravak pacijenta u bolnici, a samim time smanjuje i troškove. Testovi koje nudi su EXTEM (vanjski put zgrušavanja), INTEM (unutrašnji put), FIBTEM (funkcija fibrinogena inhibicijom trombocita), HEPTEM (heparinaza) i APTEM (aprotinin inhibitor fibrinolize). Zaključno su na temelju 22 ispitanika potvrđeni referentni intervali dijagnostički korisnih parametara FIBTEM, INTEM i EXTEM testova, a HEPTEM se tumači u odnosu na INTEM, te APTEM u odnosu na EXTEM.

Ključne riječi: koagulacijski testovi, fibrinoliza, referentni intervali, krvarenje, transfuzija

## 6. SUMMARY

The introduction of a new device into a laboratory requires verification of the existing analytical features and reference intervals established by the manufacturer. The reference intervals are established on a large number of healthy population of Central Europe, where we belong. For verification, it is necessary for at least 20 healthy respondents to check these reference intervals. They will be accepted if 10% or less of the respondents are out of interval, or they will not be accepted if more than 10% of the respondents are out of it. Hemostasis as a term means stopping bleeding, and the hemostasis system in the human body has the role of keeping blood in the fluid state under physiological conditions and when the injury occurs to stop the bleeding. Such a system consists of blood vessels, platelets, coagulation factors, coagulation inhibitors and fibrinolytic system. All of these hemostasis factors are tested by laboratory tests and thus reveal which part of the system is a problem. The basic coagulation tests used to detect blood clotting disorders are: prothrombin time (PV), activated partial thromboplastin time (APTV), thrombin time (TV), fibrinogen concentration, platelet aggregation, and platelet aggregation assay. These are irreplaceable routine tests, but when it comes to bleeding, where they need to intervene urgently, they are not useful. Their disadvantage is long duration of analysis (about 40 minutes). Therefore, in these cases, ROTEM has 4 channels and within 20 min results of the analysis that indicate the cause of bleeding, depending on the choice of tests. 2 situations associated with high risk of bleeding are the operation and trauma by itself, or because of the problem of blood clotting. Among the surgeries, high risk of bleeding is in cardiac, vascular, liver transplants, hip replacement and obstetric intervention. Patients due to bleeding have to undergo blood transfusion and / or re-operation, so it is important to know the cause of bleeding and treat it appropriately to avoid unnecessary transfusions. The importance of ROTEM is just to distinguish surgical bleeding from clotting disorders. From the curve called temogram except coagulation, fibrinolysis is also apparent, so-called viscoelastic methods. Sonclot and TEG are the predecessors of ROTEM, but due to their performance failures they did not last long. The benefits of ROTEM are simple execution with on-screen instructions and electronic pipette, speed of performance, additional informations which provide and shorten the patient's stay at the hospital, and thus reduces costs. Tests that are offered include EXTEM (external clotting pathway), INTEM (internal clotting pathway), FIBTEM (fibrinogen function inhibiting platelet function), HEPTEM (heparinase) and APTEM (aprotinin fibrinolysis inhibitor). Based on 22 respondents, reference intervals for the diagnostically significant parameters of FIBTEM, INTEM and EXTEM tests are confirmed, HEPTEM is interpreted in relation to INTEM and APTEM compared to EXTEM.

Key words: coagulation tests, fibrinolysis, reference intervals, bleeding, transfusion

## 7. LITERATURA

Calatzis A, Gorlinger K, Spannagl M, Vorweg M. ROTEM analysis targeted treatment of acute haemostatic disorders, Munich, Tem Innovations GmbH, 2016.

Chitlur M, Sorensen B, Rivard E, Young G, Ingerslev J. Standardization of thromboelastography: a report from the TEG-ROTEM working group, Haemophilia, 2011, 17(3), 532-537.

Čvorišćec D, Čepelak I. Štrausova medicinska biokemija, Zagreb, Medicinska naklada, 2009., str. 12-13, 46-47.

Gorlinger K, Dirkmann D, Solomon C, Hanke AA, Fast interpretation of thromboelastometry in non-cardiac surgery: reliability in patients with hypo., normo- and hypercoagulability, British Journal of Anaesthesia, 2012, 110(2), 222-230.

Gorlinger K, Hanke AA, Dirkman D. Trauma induced coagulopathy, U: Rotational thromboelastometry (ROTEM). Gonzalez E, Moore HB, Moore EE, urednici, 2016, Charm, Springer International Publishing AG, str. 267-297.

Haas T, Spielmann N, Mauch J, Madjdpour C, Speer O, Schmutz M, Weiss M. Comparison of thromboelastometry (ROTEM) with standard plasmatic coagulation testing in paediatric surgery. British Journal of Anaesthesia, 2011, 108(1), 36-41.

Koagulacijski testovi, 2015, <https://www.labmedic.org/bs/strucni-radovi>, pristupljeno 15.5.2018.

Kolić V, Feher Turković L, Šegulja D, Matišić D. Referentni intervali u laboratorijskoj medicini, Journal of Applied Health Sciences, 2017, 3(1), 107-114.

Labar B, Hauptmann E. Hematologija, Školska knjiga, Zagreb, 2007, str. 60-75, 406-412.

Rotational thromboelastometry (ROTEM) – targeted therapy for coagulation management in patients with massive bleeding, 2012, <http://health-pact.org>, pristupljeno 2.5.2018.

ROTEM delta operating manual, Munich, Tem Innovations GmbH, 2012.

ROTEM delta: Targeted therapy stops the bleeding, 2016, [http://top-diagnostics.com/wp-content/uploads/2017/07/ROTEM-delta-and-platelet\\_EN\\_2016\\_V01-1.pdf](http://top-diagnostics.com/wp-content/uploads/2017/07/ROTEM-delta-and-platelet_EN_2016_V01-1.pdf), pristupljeno 15.5.2018.

ROTEM Trauma, resuscitation, 2016, <http://www.emergpa.net/wp/wp-content/uploads/PAH-ED-ROTEM-Procedure.pdf>, pristupljeno 15.5.2018.

Smith SA. The cell-based model of coagulation, Journal of Veterinary Emergency and Critical Care, 2009, 19(1), 3-10.



Theusinger OM, Nurnberg J, Asmis LM, Seifert B, Spahn DR. Rotational thromboelastometry (ROTEM®) stability and reproducibility over time. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 2009, 37(5), 677-683.

Upute za izradu diplomskog rada, 2012, <http://www.pharma.unizg.hr/prostiranje/>  
28.4.2018.

Veigas VP, Callum J, Rizoli S, Nascimento B, Teodoro da Luz L. A systematic review on the rotational thromboelastometry (ROTEM) values for the diagnosis of coagulopathy, prediction and guidance of blood transfusion and prediction of mortality in trauma patients, *Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine*, 2014, 24, 114-128.

Whiting P. Viscoelastic point-of-care testing to assist with the diagnosis, management and monitoring of haemostasis, *Health Technol Assess.*, 2013, 19(58), 1-228.

Zamper RP, Amorim TC, Costa LG, Takaoka F, Serpa Neto A. The role of thromboelastometry in the assessment and treatment of coagulopathy in liver transplant patients. *Einstein*, 2011, 15(2), 243-246.

## 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

### Verifikacija referentnih intervala za koagulacijske pretrage na uređaju za rotacijsku tromboelastometriju (ROTEM)

Ivana Bašić

#### SAŽETAK

Tekst sažetka

Uvođenje novog uređaja u laboratorij zahtijeva nužno verifikaciju postojećih analitičkih značajki i referentnih intervala koje je utvrdio proizvođač. Referentni intervali su utvrđeni na velikom broju zdrave populacije srednje Europe, gdje mi pripadamo. Za verifikaciju je dovoljno na minimalno 20 zdravih ispitanika provjeriti te referentne intervale, te se oni prihvaćaju ako odstupa 10% ispitanika, odnosno ne prihvaćaju se ako odstupa više od 10% ispitanika. Hemostaza kao pojam označava zaustavljanje krvarenja, a sustav hemostaze u ljudskom tijelu ima ulogu održati krv u tekućem stanju u fiziološkim uvjetima, a kad nastupi ozljeda zaustaviti krvarenje. Takav sustav čine krvne žile, trombociti, faktori zgrušavanja, inhibitori zgrušavanja i fibrinolitički sustav. Svi ti čimbenici hemostaze ispituju se laboratorijskim testovima i na taj način se otkriva u kojem je dijelu sustava problem. Osnovne koagulacijske pretrage koje se koriste za otkrivanje poremećaja zgrušavanja krvi su: protrombinsko vrijeme (PV), aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme (APTV), trombinsko vrijeme (TV), koncentracija fibrinogena, koncentracija trombocita i ispitivanje agregacije trombocita. To su nezamjenjive pretrage u rutini, ali kad je riječ o krvarenju gdje treba hitno intervenirati tu nisu korisne. Mana im je dugo trajanje analize (oko 40 min). Zato se u tim slučajevima koristi ROTEM koji ima 4 kanala i u roku 20 min dobiju se rezultati analize koji ukazuju na uzrok krvarenja, ovisno o izboru testova. 2 situacije povezane s visokim rizikom krvarenja su operacije i traume same po sebi, ili zbog problema zgrušavanja krvi. Od kirurgija visoki rizik krvarenja je kod kardijalne, vaskularne, transplatacije jetre, zamjene kuka i obstetričke intervencije. Pacijenti zbog krvarenja moraju na transfuziju krvi i/ili ponovnu operaciju, stoga je važno poznavati uzrok krvarenja i liječiti ga na odgovarajući način da bi se izbjegle nepotrebne transfuzije. Važnost ROTEM-a upravo je u razlikovanju kirurškog krvarenja od poremećaja zgrušavanja. Iz krivulje temogram osim zgrušavanja, vidljiva je i fibrinoliza, to su takozvane viskoelastične metode. Sonclot i TEG su prethodnici ROTEM-a, ali zbog svojih izvedbenih mana nisu se dugo zadržali. Prednosti ROTEM-a su jednostavna izvedba s uputama na ekranu i elektroničkom pipetom, brzina izvedbe, dodatne informacije koje pruža i skraćuje boravak pacijenta u bolnici, a samim time smanjuje i troškove. Testovi koje nudi su EXTEM (vanjski put zgrušavanja), INTEM (unutrašnji put), FIBTEM (funkcija fibrinogena inhibicijom trombocita), HEPTTEM (heparinaza) i APTEM (aprotinin inhibitor fibrinolize). Zaključno su na temelju 22 ispitanika potvrđeni referentni intervali dijagnostički korisnih parametara FIBTEM, INTEM i EXTEM testova, a HEPTTEM se tumači u odnosu na INTEM, a APTEM u odnosu na EXTEM.

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

Rad sadrži: 29 stranica, 14 grafičkih prikaza, 5 tablica i 18 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Referentni intervali, verifikacija, koagulacija, fibrinoliza temogram, krvarenje, unutrašnji i vanjski put, kirurgija, trauma, transplatacija, transfuzija

Mentor: **Dr. sc. Dunja Rogić**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Dunja Rogić**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Suzana Inić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Marija Grdić Rajković**, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: srpanj 2018.



## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Medical Biochemistry  
Department of Clinical Chemistry and Hematology  
Domagojeva 2 , 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### Verification of reference intervals for coagulation tests on rotational thromboelastometric device (ROTEM)

Ivana Bašić

#### SUMMARY

Text

The introduction of a new device into a laboratory requires verification of the existing analytical features and reference intervals established by the manufacturer. The reference intervals are established on a large number of healthy population of Central Europe, where we belong. For verification, it is necessary for at least 20 healthy respondents to check these reference intervals. They will be accepted if 10% or less of the respondents are out of interval, or they will not be accepted if more than 10% of the respondents are out of it. Hemostasis as a term means stopping bleeding, and the hemostasis system in the human body has the role of keeping blood in the fluid state under physiological conditions and when the injury occurs to stop the bleeding. Such a system consists of blood vessels, platelets, coagulation factors, coagulation inhibitors and fibrinolytic system. All of these hemostasis factors are tested by laboratory tests and thus reveal which part of the system is a problem. The basic coagulation tests used to detect blood clotting disorders are: prothrombin time (PV), activated partial thromboplastin time (APTV), thrombin time (TV), fibrinogen concentration, platelet aggregation, and platelet aggregation assay. These are irreplaceable routine tests, but when it comes to bleeding, where they need to intervene urgently, they are not useful. Their disadvantage is long duration of analysis (about 40 minutes). Therefore, in these cases, ROTEM has 4 channels and within 20 min results of the analysis that indicate the cause of bleeding, depending on the choice of tests. 2 situations associated with high risk of bleeding are the operation and trauma by itself, or because of the problem of blood clotting. Among the surgeries, high risk of bleeding is in cardiac, vascular, liver transplants, hip replacement and obstetric intervention. Patients due to bleeding have to undergo blood transfusion and / or re-operation, so it is important to know the cause of bleeding and treat it appropriately to avoid unnecessary transfusions. The importance of ROTEM is just to distinguish surgical bleeding from clotting disorders. From the curve called temogram except coagulation, fibrinolysis is also apparent, so-called viscoelastic methods. Sonclot and TEG are the predecessors of ROTEM, but due to their performance failures they did not last long. The benefits of ROTEM are simple execution with on-screen instructions and electronic pipette, speed of performance, additional informations which provide and shorten the patient's stay at the hospital, and thus reduces costs. Tests that are offered include EXTEM (external clotting pathway), INTEM (internal clotting pathway), FIBTEM (fibrinogen function inhibiting platelet function), HEPTEM (heparinase) and APTM (aprotinin fibrinolysis inhibitor). Based on 22 respondents, reference intervals for the diagnostically significant parameters of FIBTEM, INTEM and EXTEM tests are confirmed, HEPTEM is interpreted in relation to INTEM and APTM compared to EXTEM.

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

Thesis includes: 29 pages, 14 figures, 5 tables and 18 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Reference intervals, verification, coagulation, fibrinolysis, temogram, bleeding, inner and external pathway, surgery, trauma, transplantation, transfusion

Mentor: **Dunja Rogić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Dunja Rogić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Suzna Inić, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Marija Grdić Rajković, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2018.