

# Uspostava pedijatrijskih referentnih intervala za koagulacijske parametre za sustav analizatora/reagensa

---

**Kocijančić, Marija**

**Professional thesis / Završni specijalistički**

**2022**

*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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:592893>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2023-03-24**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Marija Kocijančić

USPOSTAVA PEDIJATRIJSKIH REFERENTNIH INTERVALA ZA KOAGULACIJSKE  
PARAMETRE ZA SUSTAV ANALIZATORA/REAGENSA

Specijalistički rad

Zagreb, 2022. godina

Poslijediplomski specijalistički studij: Medicinska biokemija i laboratorijska medicina

Mentor rada: Prof. dr. sc. Renata Zadro, spec. medicinske biokemije

Specijalistički rad obranjen je dana 31. ožujka 2022. godine na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu pred povjerenstvom u sastavu:

1. Izv. prof. dr. sc. Marija Grdić Rajković
2. Prof. dr. sc. Renata Zadro
3. Prof. dr. sc. József Petrik

Rad ima 46 listova.

## **Predgovor**

Rad je izrađen na Zavodu za laboratorijsku medicinu u centralnom laboratoriju Sveučilišne bolnice Halle.

Zahvaljujem svojoj učiteljici i mentorici, prof. dr. sc. Renati Zadro na nesebičnoj podršci, uloženom vremenu i trudu. Hvala na nesebično podijeljenom znanju i iskustvu.

Zahvaljujem svojoj obitelji na strpljivosti, razumijevanju i potpori.

## Sažetak

**Cilj:** Uspostaviti referentne intervale (RI) globalnih pretraga zgrušavanja i najučestalijih parametara krvarenja za dječju populaciju obzirom na dob i spol uzimajući u obzir korištenu metodu, analizator i reagens te usporediti dobivene vrijednosti s indirektnom metodom određivanja RI.

**Ispitanici i metode:** Podaci za parametre zgrušavanja: protrombinsko vrijeme (PV; s), aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme (aPTV; s), trombinsko vrijeme (TV; s), aktivnosti fibrinogena (Fbg; g/l) faktora VIII (FVIII; %), faktora XIII (FXIII; %), von Willebrandova faktora (VWF:Ac; %), antigena koncentracija von Willebrandova faktora (VWF:Ag; %) i aktivnost vezanja von Willebrandova faktora za kolagen (VWF:CB; %) prikupljeni su retrospektivno iz laboratorijskog informacijskog sustava tijekom pet godina (2015. - 2021.). U obzir su uzeti samo laboratorijski rezultati zdravih ispitanika (N = 1000) u dobi od 1-18 godina određivani na analizatorima STA-R. Prva grupa (N = 250) pokriva dobnu skupinu od 1-5 godina, druga (N = 248) od 6-10, treća (N = 242) od 11-14 te četvrta grupa (N = 260) od 15-18 godina. U svih ispitanika RI su određeni prema smjernicama CLSI (engl. *Clinical Laboratory Standard Institute*) – direktnim *a posteriori* pristupom. Nadalje, dobivene vrijednosti uspoređene su s vrijednostima RI dobivenim indirektnom metodom (N = 12348).

**Rezultati:** Od globalnih parametara zgrušavanja jedino RI za PV nisu pokazali statistički značajnu razliku između djevojčica i dječaka (P = 0,111). Statistički značajna razlika RI-a među dobnim skupinama pokazala se za PV i aPTV (P < 0,0001 i P = 0,007). Referentni intervale FVIII i FXIII nisu se statistički značajno razlikovali između dobnih skupina (P = 0,078 i P = 0,082) dok je za FXIII značajna razlika između spola ispitanika (P = 0,038). Dokazana je statistički značajna razlika u RI za sva tri parametara VWF za grupu 4 u odnosu na ostale grupe (P = 0,029, P =

0,005 i  $P = 0,009$ ). Indirektna procjena RI za globalne teste sustava zgrušavanja rezultirala je statistički nerazlučivim razlikama u RI u odnosu na RI dobivene direktnom metodom.

**Zaključak:** Referentni intervali znatno se razlikuju obzirom na dob, metodu, proizvođača te korišteni reagens. Moraju se koristiti referentni rasponi specifični za dob/spol kao i za sustav analizatora/reagensa kako bi se osigurala pravilna procjena hemostaze u djece. Referentni intervali dobiveni korištenjem indirektna metode usporedivi su s RI dobivenim direktnom metodom.

## Summary

**Objectives:** Establishment of reference intervals (RI) of global clotting tests and the most common bleeding parameters for the paediatric population with respect to age and sex, taking into account the method, analyser and reagent used and to compare the obtained values with the indirect method of determining RI.

**Patients and Methods:** Data for coagulation parameters: prothrombin time (PT; s), activated partial thromboplastin time (APTT; s), thrombin time (TT; s), fibrinogen activity (Fbg; g/l) factor VIII (FVIII; %), factor XIII (FXIII; %), von Willebrand factor (VWF:Ac; %), antigenic concentration of von Willebrand factor (VWF:Ag; %) and collagen binding activity of von Willebrand factor (VWF:CB; %) were collected retrospectively from laboratory information system over five years (2015-2021). Only laboratory results of healthy subjects (N = 1000) aged 1-18 years determined on STA-R analysers were taken into account. The first group (N = 250) covers the age group of 1-5 years, the second (N = 248) of 6-10, the third (N = 242) of 11-14 and the fourth group (N = 260) of 15-18 years. In all subjects, RI was determined according to the Clinical Laboratory Standard Institute guidelines (CLSI) – using direct *a posteriori* approach. Furthermore, the obtained values were compared with the RI values obtained by the indirect method (N = 12348).

**Results:** Of the global coagulation parameters, only RI for PV did not show a statistically significant difference between girls and boys (P = 0.111). A statistically significant difference in RI between age groups was shown for PV and aPTV (P < 0.0001 and P = 0.007). The reference intervals of FVIII and FXIII did not differ statistically significantly between age groups (P = 0.078 and P = 0.082), while for FXIII there was a significant difference according to gender (P = 0.038). A statistically significant difference in RI was proved for all three parameters of vWF for group 4 in

relation to other groups ( $P = 0.029$ ,  $P = 0.005$  and  $P = 0.009$ ). Further, indirect estimation of RI for global coagulation system tests resulted in statistically indistinguishable differences in RI relative to RI obtained by the direct method.

**Conclusion:** Reference intervals vary considerably depending on age, method, manufacturer, and reagent used. Reference ranges specific to age/gender as well as analyser/reagent system must be used to ensure proper assessment of haemostasis in children. Reference intervals obtained using the indirect method are comparable to the RI obtained by the direct method.



# Sadržaj

<b>1. Uvod i pregled područja istraživanja</b>	<b>1</b>
1.1. Razvojna hemostaza	1
1.2. Hemostatski poremećaji u dječjoj dobi	4
1.3. Laboratorijska dijagnostika hemostatskih poremećaja u dječjoj dobi	6
1.3.1. <i>Predanalitička faza rada pri izradi koagulacijskih pretraga</i>	6
1.3.2. <i>Referentni intervali</i>	7
<b>2. Cilj istraživanja</b>	<b>9</b>
<b>3. Ispitanici i metode</b>	<b>10</b>
3.1. Plan provedbe istraživanja	10
3.2. Ispitanici	10
3.3. Metode	12
3.3.1. <i>Laboratorijska mjerenja</i>	12
3.3.1.1. <i>Uzorkovanje krvi</i>	13
3.3.1.2. <i>Određivanje globalnih pretraga zgrušavanja</i>	14
3.3.1.3. <i>Određivanje aktivnosti faktora VIII i XIII</i>	15
3.3.1.4. <i>Određivanje aktivnosti i koncentracije von Willebrandova faktora</i>	15
3.3.2. <i>Uspostava referentnih intervala</i>	16
3.3.2.1. <i>Direktna metoda</i>	17
3.3.2.2. <i>Indirektna metoda</i>	18
3.4. Statistička obrada podataka	18
<b>4. Rezultati</b>	<b>20</b>
4.1. Referentni intervali globalnih pretraga zgrušavanja	20

4.2. Referentni intervali faktora VIII i XIII	21
4.3. Referentni intervali von Willebrandova faktora	21
4.4. Referentni intervali dobiveni indirektnom metodom	22
<b>5. Rasprava</b>	<b>24</b>
<b>6. Zaključci</b>	<b>28</b>
<b>7. Literatura</b>	<b>29</b>
<b>8. Popis skraćenica</b>	<b>32</b>
<b>9. Životopis</b>	<b>33</b>

# 1. Uvod i pregled područja istraživanja

## 1.1. Razvojna hemostaza

Hemostaza je složen fiziološki mehanizam koji uključuje prokoagulacijske i antikoagulacijske čimbenike te predstavlja dinamičan proces koji započinje *in utero* i postupno se razvija. Vrijednosti pojedinih komponenti hemostatskog sustava nejednoliko se mijenjaju s obzirom na starosnu dob, a promjene su najizraženije u djetinjstvu pa su stoga i klinički najznačajnije u tom razdoblju. Djeca nisu samo minijaturne odrasle osobe te laboratorijska dijagnostika hemostatskih poremećaja u djece predstavlja poseban izazov (1-4). Poznavanje značajki hemostatskog sustava u djece preduvjet je za točnu laboratorijsku dijagnostiku hemostatskih poremećaja (4). Temelj za razumijevanje hemostatskog sustava u djece i pojam razvojne hemostaze postavila je Maureen Andrew kasnih 1980-tih godina objavom referentnih intervala 30-ak hemostatskih parametara za dječju populaciju prema starosnoj dobi, od nedonoščadi do adolescenata (2,5).

Model razvojne hemostaze postavljen je na temelju spoznaja da se koncentracije koagulacijskih proteina mijenjaju na predvidljiv način ovisno o starosnoj dobi te označava fiziološke promjene hemostatskog sustava tijekom života (3). Proteini hemostatskog sustava majke ne prelaze kroz placentnu barijeru nego se već između petog i šestog gestacijskog tjedna počinju sintetizirati neovisno u fetusu dok se zgrušavanje krvi i fibrinolitička aktivnost mogu opaziti u jedanaestom gestacijskom tjednu (4). Fiziološke koncentracije hemostatskih proteina postupno rastu tijekom fetalnog i neonatalnog života, ali njihov porast nije ujednačen pa se vrijednosti slične odraslim osobama dostižu u različitim razvojnim fazama (2). Varijabilnost protrombinskog vremena (PV) široka je i u novorođenčadi i u nedonoščadi, a PV se skraćuje tijekom prvih dana života. Od 4. dana života i tijekom cijelog postnatalnog

razdoblja vrijednosti PV-a su usporedive s vrijednostima PV-a odraslih. Aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme (aPTV), koje je uvijek produženo pri rođenju, dostiže vrijednosti za odrasle do 3. mjeseca starosti u novorođenčadi, ali ostaje produženo u nedonoščadi tijekom postnatalnog razdoblja. U novorođenčadi su plazmatske koncentracije samo malog broja hemostatskih proteina približno slične vrijednostima u odraslih (2).

U novorođenčadi su plazmatske koncentracije faktora ovisnih o vitaminu K (FII, FVII, FIX, FX) i kontaktnih faktora (FXI, FXII, prekalikreina, kininogena velike molekularne mase) snižene i iznose približno 50% vrijednosti u odraslih. Postupan se porast koncentracija odvija tijekom prvih 6 mjeseci života kad iznose približno 80% vrijednosti u odraslih, ali i dalje ostaju snižene tijekom djetinjstva (4). Snižene razine kontaktnih faktora pridonose opaženom produljenju aPTV-a tijekom prvih 6 mjeseci života. Faktori ovisni o vitaminu K imaju izrazito heterogen obrazac postnatalnog sazrijevanja. U novorođenčeta koncentracija FVII dostiže vrijednost odrasle osobe do 5. dana života, pridonoseći smanjenju PV-a u istoj postnatalnoj vremenskoj točki dok koncentracije FII, FIX i FX pokazuju relativno kasno povećanje (3,4). Koncentracija FV u novorođenčadi je u rasponu odraslih, a nešto niža u nedonoščadi, ali u oba slučaja povećava se na vrijednosti u odraslih do 5. dana života. Koncentracija fibrinogena značajno raste do 5. dana života i kod nedonoščadi i kod novorođenčadi iako je uvijek u rasponu odraslih vrijednosti (3). Prosječna koncentracija FVIII i FXIII pri rođenju ista je kao i kod odraslih, dok je koncentracija von Willebrandova faktora (VWF-a) povišena u usporedbi s vrijednostima u odraslih te se nakon 2. mjeseca života počinje smanjivati na vrijednosti odrasle osobe (4). U zdrave djece od 1 do 16 godina hemostatski sustav ima veći stupanj sazrijevanja. Međutim, važno je napomenuti da bi srednje vrijednosti FII, FV, FVII, FIX, FX, FXI i FXII i dalje mogle biti znatno niže od vrijednosti za odrasle te da PV može biti malo produžen jer koncentracije protrombina u plazmi tijekom

djetinjstva mogu biti 10-20% niže nego u odraslih, zajedno s koncentracijom FVII. Plazmatske koncentracije gotovo svih inhibitora zgrušavanja snižene su u novorođenčadi i nedonoščadi u odnosu na odrasle vrijednosti te iznose približno 20% za inhibitor puta tkivnog faktora (engl. *tissue factor pathway inhibitor*, TFPI), 35% za protein C (PC) i protein S (PS), te 50% vrijednosti za antitrombin (AT) i heparinski kofaktor II (HCII). Iako se vrijednosti odraslih dostižu tijekom 3-6 mjeseci života, koncentracije PC ostaju izrazito snižene tijekom djetinjstva sve do mladenačke dobi (2,3). Nasuprot tome, koncentracija  $\alpha$ 2-makroglobulina približno je dvaput viša u odnosu na vrijednosti u odraslih te ostaje povišena tijekom djetinjstva, a počinje se smanjivati u kasnoj adolescentnoj dobi. Povišene vrijednosti  $\alpha$ 2-makroglobulina mogu se objasniti njegovom ulogom inhibicije trombina u djetinjstvu kompenzirajući smanjenu inhibiciju trombina AT zbog prije spomenutih niskih vrijednosti AT u novorođenčadi (2).

Slično sustavu zgrušavanja i fibrinolitički sustav u djece podložan je promjenama koncentracija pojedinih komponenti. Iako su sve ključne komponente fibrinolitičkog sustava prisutne u plazmi novorođenčadi, u djece se mogu uočiti važne kvantitativne i kvalitativne razlike ovisne o starosnoj dobi. Glavne razlike u fibrinolitičkom sustavu između djece i odraslih uključuju 50% smanjenje koncentracije plazminogena, tkivnog aktivatora plazminogena (t-PA) te čak 80% sniženje antiplazmina u plazmi, povećane koncentracije inhibitora aktivatora plazminogena-1 (PAI-1), kao i smanjenje proizvodnje plazmina i ukupne fibrinolitičke aktivnosti (2,3). Antifibrinolitički učinak lipoproteina također je manje izražen u novorođenčadi u usporedbi s odraslima, zbog prisutnosti niže koncentracije plazminogena. U usporedbi sa vrijednostima za odrasle, djeca u dobi od 1 do 5 godina mogu pokazati značajno veće vrijednosti topljivog trombomodulina, trombin-antitrombinskog kompleksa (TAT) i D-dimera. Tablica 1 prikazuje sažetu razliku hemostaze novorođenčadi naspram odraslih.

**Tablica 1.** Usporedba neonatalnog i odraslog hemostatskog sustava

Komponenta	Funkcija u novorođenčadi	Globalni učinak na hemostazu
Koagulacijski faktori	↓ FII, FVII, FIX, FX, FXI, FXII	Smanjeno stvaranje trombina
	↔ Fbg, FV	
	↑ FVIII	
Primarna hemostaza	↑ VWF	Pojačana primarna hemostaza
	↓ funkcija trombocita	
Fibrinoloza	↓ plazminogen, t-PA, antiplazmin	Smanjenje fibrinolitičke aktivnosti
	↑ PAI	
Koagulacijski inhibitori	↓ AT, PC, PS	Smanjena mogućnost inhibicije aktiviranih hemostatskih proteina

F – faktor. Fbg – fibrinogen. VWF – von Willebrand faktor. t-PA – tkivni aktivator plazminogena. PAI – inhibitor aktivatora plazminogena. AT – antitrombin. PC – protein C. PS – protein S. ↓ smanjenje. ↑ povećanje. ↔ nepromijenjeno/isto.

## 1.2. Hemostatski poremećaji u dječjoj dobi

Kao i u odraslih, poremećaji fiziološke ravnoteže u sustavu hemostaze u djece mogu dovesti do krvarenja i/ili tromboze. Spontana krvarenja i tromboembolijski poremećaji relativno su rijetki u dječjoj dobi jer, iako nerazvijen, hemostatski sustav je fiziološki funkcionalan pa su zdrava djeca zaštićena kako od krvarenja, tako i od tromboze (2,6). Hemostatski poremećaji u dječjoj dobi češće se javljaju u slučaju stresnih patoloških stanja budući da hemostatski sustav u novorođenčeta nema dovoljnu kompenzacijsku sposobnost. Ovi poremećaji mogu biti urođeni ili stečeni (2,3). Nasljedni poremećaji krvarenja uključuju ozbiljne nedostatke faktora VIII, IX, V, VII, XI, X i XIII, kao i protrombina, fibrinogena i antiplazmina. Također, primarna hemostaza može biti zahvaćena kvalitativnim ili kvantitativnim poremećajima trombocita te poremećajem VWF-a (3). Stečeni poremećaji krvarenja uključuju manjak vitamina K, koji uzrokuje smanjenje faktora zgrušavanja ovisnih o vitaminu K. Vitamin K se slabo prenosi preko

placentne barijere. Pri rođenju su njegove razine često ispod granice detekcije od 0,02 ng/mL, no hemostaza je još uvijek "prikladna" i većina novorođenčadi ne krvari. Stoga se krvarenje obično javlja ako je koncentracija vitamina K daleko ispod normalne. Manjak vitamina K bez krvarenja javlja se u čak 50% dojenčadi mlađe od 5 dana, no povremeno se može povezati s teškim krvarenjima, obično intracerebralnim, između 1. i 7. dana života (3). Klasična hemoragična bolest (prisutna tijekom prvog tjedna života) javlja se u 0,25 do 1,7% dojenčadi, dok je prevalencija kasne hemoragične bolesti (koja se javlja između 2. tjedna i 6 mjeseci starosti) u dojene djece približno 20 na 100,000 živorođene djece. Učestalost teških komplikacija krvarenja uvelike je smanjena nakon uvođenja dodatka vitamina K pri rođenju. Druge komplikacije povezane s krvarenjem u novorođenčeta mogu se pojaviti u vezi s diseminiranom intravaskularnom koagulacijom, imunološkim ili neimunološkim trombocitopenijskim poremećajima ili bolestima jetre (2,3).

Stečeni ili nasljedni čimbenici rizika koji pridonose tromboembolijskim događajima također se javljaju u novorođenčadi te se venske/arterijske tromboze sve češće dijagnosticiraju i prepoznaju u djetinjstvu. Urođeni protrombotični čimbenici rizika uključuju manjak PC, PS i AT-a, kao i mutacije protrombina G20210A i faktora V Leiden. Takvi poremećaji nisu samo uključeni u pedijatrijsku trombozu, već također mogu pridonijeti ograničenju rasta fetusa i nastanku intraventrikularnog krvarenja u nedonoščadi. Iako se radi o vrlo rijetkim patološkim stanjima, manjak homozigotnog PC ili PS može biti povezan s katastrofalnim i fatalnim mikrovaskularnim trombozama ili trombotičkim komplikacijama koje se javljaju tijekom neonatalnog razdoblja. Drugi rijetki poremećaji kao što su disfibrinogenemija, hipo- ili displazminogenemija i nedostatak HCII povezani su također s venskom trombozom. Najčešći rizični čimbenici za neonatalnu trombozu su uređaji za venski i arterijski pristup. Urođene srčane mane s potrebom za kirurškim intervencijama i respiratorni distres sindrom

također povećavaju rizik od tromboembolijskih događaja. Ostali stečeni čimbenici rizika uključuju dehidraciju, sepsu, zatajenje srca, kongenitalni nefritički sindrom, nekrotizirajući enterokolitis i asfiksiju. Antikardiolipinska/antifosfolipidna protutijela također igraju potencijalnu ulogu u pedijatrijskoj populaciji sa simptomatskom venskom trombozom ili ishemijskim moždanim udarom (3).

### **1.3. Laboratorijska dijagnostika hemostatskih poremećaja u dječjoj dobi**

Uloga laboratorijske dijagnostike je utvrditi moguće nasljedne ili stečene poremećaje krvarenja i/ili tromboze. Za razliku od drugih područja laboratorijske medicine, standardizacija, usklađivanje određenih dijagnostičkih algoritama pa čak i usklađivanje postupaka ispitivanja nisu uvijek ispunjeni u laboratorijskoj dijagnostici hemostatskih poremećaja te je za pravilno tumačenje rezultata potrebno pravilno uzorkovanje i primjena odgovarajućih referentnih intervala.

#### ***1.3.1. Predanalitička faza rada pri izradi koagulacijskih pretraga***

Specifična značajka laboratorijske dijagnostike hemostatskih poremećaja je ta da su potrebni postupni koraci za potvrdu ili isključivanje sumnje na hemostatski poremećaj, a uzorci za ispitivanje hemostaze osobito su osjetljivi na preanalitičke varijable. Ispravno uzorkovanje podrazumijeva nehemolizirani uzorak s odgovarajućim omjerom krvi i antikoagulanta (2). Uzorci krvi za koagulacijske pretrage uzimaju se u staklene ili plastične spremnike s neaktivirajućom površinom dok se kao osnovni antikoagulant koristi puferirani 3,2% trinatrijev citrat. Omjer krvi i antikoagulanta u spremniku treba biti 9:1. Ovo je posebno bitno kod uzoraka s vrijednostima hematokrita iznad 0,55 L/L gdje je tada potrebna prilagodba konačne koncentracije citrata u spremniku. Nadalje, uzorkovanje za koagulacijske pretrage potrebno je izvršiti prije uzorkovanja bilo kojeg drugog spremnika sa aditivom ili antikoagulansima poput



etilendiamintetraoctenekiseline (EDTA), litijevog heparina ili inhibitora glikolize kako bi se smanjila mogućnost kontaminacije uzorka i dobivanja pogrešnih rezultata analize usljed prenošenja aditiva i mogućeg stvaranja mikrougruška u spremniku (7).

Nakon uzorkovanja potrebno je uzorak krvi za analizu pravilno pripremiti. Plazma za određivanje pretraga probira priprema se centrifugiranjem primarnog spremnika na sobnoj temperaturi (18-25 °C) tijekom 15 minuta pri 2000-2500xg u centrifugama koje imaju rotor s promjenjivim kutom (engl. *swing-out rotor*). Poželjno vrijeme analize uzorka je unutar 4 sata od uzorkovanja. Ukoliko analizu nije moguće izraditi unutar preporučenog vremena, plazmu treba nakon centrifugiranja odmah odvojiti od stanica i pohraniti na -20 odnosno -70 °C. Sve uzorke plazme koji se zamrzavaju, prije izvođenja analize potrebno je centrifugirati još jednom kako bi se dobila plazma siromašna trombocitima (engl. *platelet poor plasma*, PPP) koja sadrži  $< 10 \times 10^9/L$  trombocita (7).

### **1.3.2. Referentni intervali**

Kako razvojna hemostaza ima izravan utjecaj na vrijednosti pojedinih hemostatskih parametara ponekad je teško razlučiti patološke od fizioloških vrijednosti pojedinih parametara za pojedinu dob (2). Upravo zato na svakom laboratorijskom nalazu trebali bi biti istaknuti referentni intervali (RI) obzirom na starosnu dob. Nadalje, dokazano je kako se apsolutne vrijednosti za pojedine parametre više ili manje razlikuju ovisno o kombinaciji reagensa i sustava na kojem se pretrage izvode stoga bi RI trebali biti validirani za kombinaciju reagensa s analizatorom koja se koristi u laboratoriju (8). Reagensi koji se koriste u rutinskim ispitivanjima mogu imati različitu osjetljivost na faktore koagulacije ovisno o koncentraciji i vrsti fosfolipida, kao i aktivatorima. Ove varijable doprinose tome da standardizacija testiranja postaje vrlo izazovna.

Svi tromboplastinski reagensi za ispitivanje PV-a sadrže tkivni faktor, fosfolipide i kalcijev klorid. Većina tromboplastinskih reagensa sadrži inhibitor heparina. Aktivirani parcijalni tromboplastinski reagensi koriste čestice (npr. kaolin, celit, silicijev dioksid) ili kemijske (npr. elaginska kiselina) aktivatore; međutim, klasa fosfolipida i sastav masnih kiselina nisu standardizirani. Sadržaj fosfolipida u reagensima utjecat će na rezultate testa koagulacije i pridonijeti poteškoćama u dobivanju ujednačenih kliničkih rezultata. Sva ta svojstva reagensa potrebno je uzeti u obzir pri usvajanju objavljenih RI-a koja su možda dobiveni korištenjem različitih kombinacija reagensa i/ili analizatora (8).

Reagensi PV-a i aPTV-a mogu biti neosjetljivi na određene čimbenike koagulacije. Reagens se smatra neosjetljivim kada probirni testovi ostanu unutar RI-a unatoč tome što su razine faktora < 30%. Važno je razumjeti izvedbu reagensa i njihov mogući utjecaj na RI-e (8).

Referentni intervali definirani su u odnosu na zdravu populaciju tako da uključuju vrijednosti u koje spada 95% naizgled zdravih pojedinaca i u kojima je 2,5% rezultata u donjem rasponu izvan RI -a, te 2,5% rezultata u gornjem rasponu izvan RI-a; odnosno donji i gornji referentni interval se definiraju kao 2,5 i 97,5 percentil (9).

## **2. Cilj istraživanja**

Cilj istraživanja je uspostaviti RI-e za globalne pretrage zgrušavanja i najučestalije parametre krvarenja za dječju populaciju obzirom na dob i spol uzimajući u obzir korištenu metodu, analizator i reagens prema smjericama CLSI te usporediti dobivene vrijednosti sa indirektnom metodom određivanja RI.

### 3. Ispitanici i metode

#### 3.1. Plan provedbe istraživanja

Podaci za parametre zgrušavanja: PV (s), aPTV (s), trombinsko vrijeme (TV; s), aktivnosti fibrinogena (Fbg; g/l), FVIII (%), FXIII, (%), von Willebrandova faktora (VWF:Ac; %), antigena koncentracija von Willebrandova faktora (VWF:Ag; %) i aktivnost vezanja kolagena von Willebrandova faktora (VWF:CB; %) prikupili su se retrospektivno iz laboratorijskog informacijskog sustava, Zavoda za laboratorijsku medicinu, centralnog laboratorija sveučilišne bolnice Halle, Njemačka, tijekom pet godina (2015. - 2021.).

U svih ispitanika RI-i su se odredili prema smjernicama CLSI (engl. *Clinical Laboratory Standard Institute*) – direktnim *a posteriori* pristupom (9). Nadalje, koristeći indirektnu metodu prema Arzideh i sur. te Zierku i sur. usporedili su se neizravno dobiveni RI-i (N = 12 348) sa RI-ima dobivenim direktnom metodom te na taj način razjasnili potencijalnu ulogu i prednost korištenja indirektna metode određivanja RI-a (10-13).

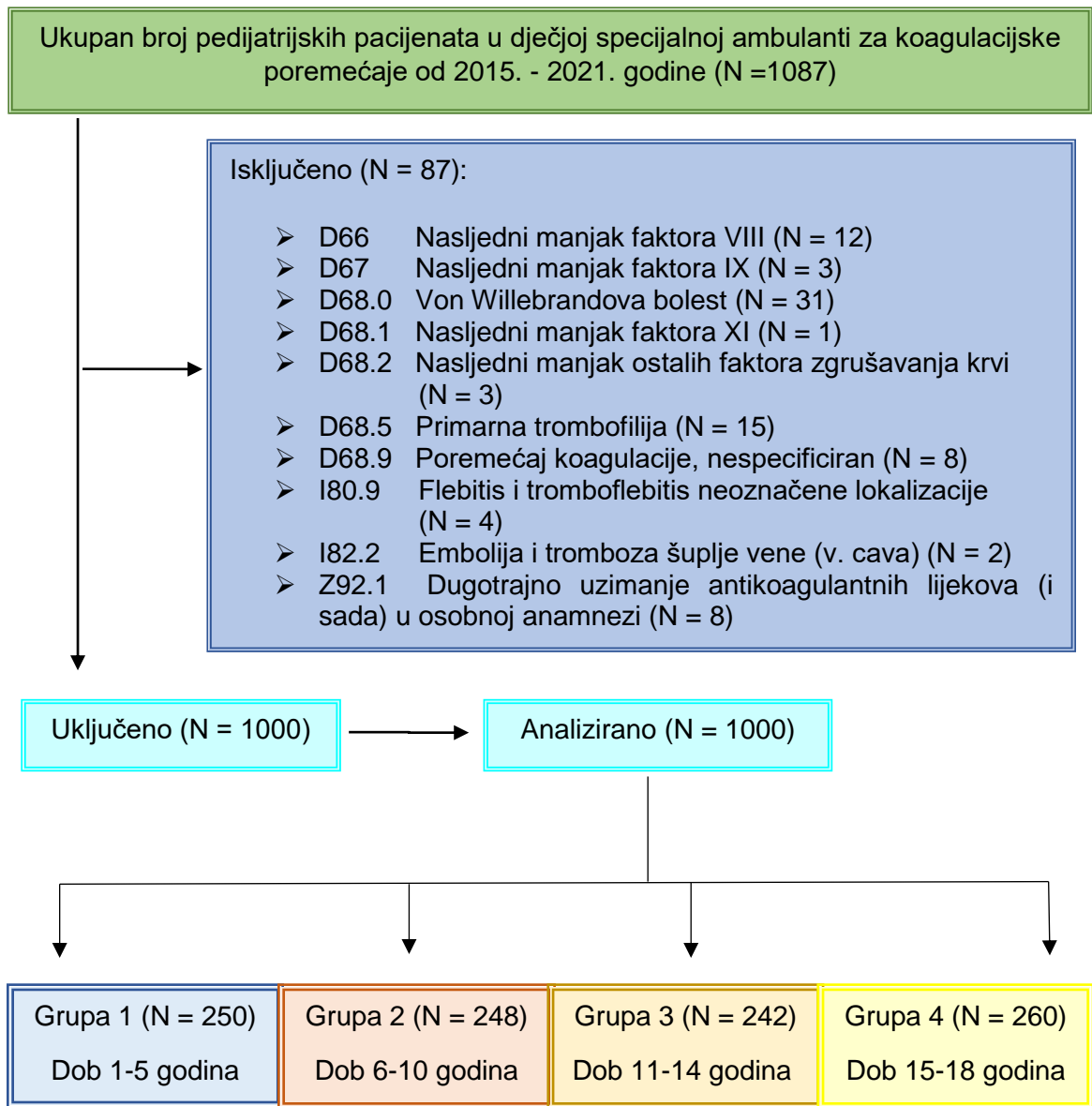
#### 3.2. Ispitanici

U obzir su se uzeli samo laboratorijski rezultati 1000 zdravih ispitanika (N<sub>dječaci</sub> = 632, N<sub>djevojčice</sub> = 368) u dobi od 1-18 godina, dobiveni tijekom rutinskog kliničkog pregleda u dječjoj specijalnoj ambulanti za koagulacijske poremećaje, u kojih je prema kliničkim kriterijima isključen poremećaj zgrušavanja, antikoagulacijska terapija i druge ometajuće bolesti (Slika1). Isključenje bolesti je potvrđeno od strane nadležnog specijaliste hematologa.

U skladu s podacima iz postojeće literature, ispitanici su podijeljeni u 4 grupe ovisno o dobi. Prva grupa pokriva dobnu skupinu od 1-5 godina sa ukupno 250 ispitanika

( $N_{\text{dječaci}} = 163$ ,  $N_{\text{djevojčice}} = 87$ ), druga pokriva dobnu skupinu od 6-10 godina sa 248 ispitanika ( $N_{\text{dječaci}} = 145$ ,  $N_{\text{djevojčice}} = 103$ ), treća dobnu skupinu od 11-14 godina sa 242 ispitanika ( $N_{\text{dječaci}} = 144$ ,  $N_{\text{djevojčice}} = 98$ ) te četvrta grupa pokriva dobnu skupinu od 15-18 godina sa 260 ispitanika ( $N_{\text{dječaci}} = 180$ ,  $N_{\text{djevojčice}} = 80$ ).

Svi ispitanici su dolaskom u liječničku ambulantu ispunili upitnik o zdravstvenom stanju. U skladu sa Helsinškom deklaracijom ovim retrospektivnim ispitivanjem osigurano je poštivanje bioetičkih standarda, odnosno četiriju temeljnih bioetičkih principa. Ovo istraživanje pregledalo je i odobrilo etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta Martin-Luther, Halle-Wittenberg (odobrenje 2021-117).



**Slika 1.** Probir ispitanika za studiju referentnih intervala.

### 3.3. Metode

#### 3.3.1. Laboratorijska mjerenja

Svi parametri određivani su na analizatoru STA-R (Diagnostica Stago, Asnières-sur-Seine, Francuska) koristeći izvorne reagense (Diagnostica Stago, Asnières-sur-Seine, Francuska) uz iznimku aktivnosti VWF:Ac (Siemens Healthineers, Marburg,

Njemačka) i FXIII (Medical & Biological Laboratories, Nagoya, Japan). Pregled korištenih reagensa kao i princip metoda prikazan je u tablici 2.

**Tablica 2.** Korišteni reagensi na analizatorima STA-R i principi ispitivanja

Parametar (jedinica)	Reagens	Načelo ispitivanja
PV (s)	STA – NeoPTimal	Zgrušavanje ( <i>engl.</i> clotting)
aPTV (s)	STA – Cephascreen	Zgrušavanje ( <i>engl.</i> clotting)
TV (s)	STA – Thrombin	Zgrušavanje ( <i>engl.</i> clotting)
Fbg (g/L)	STA – Liquid Fib	Zgrušavanje ( <i>engl.</i> clotting)
FVIII (%)	STA – ImmunoDef VIII STA - C.K. Prest	zgrušavanje na bazi aPTV-a u jednom koraku ( <i>engl.</i> one-stage clotting)
FXIII (%)	Hexamate FXIII	Lateks aglutinacija
VWF (%)	INNOVANCE VWF Ac	Lateks aglutinacija
	STA Liatest VWF:Ag	Lateks aglutinacija
	Asserachrom VWF:CB	ELISA

PV – protrombinsko vrijeme. aPTV- aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme. TV – trombinsko vrijeme. Fbg – fibrinogen. F – faktor. VWF – von Willebrand faktor. ELISA - enzim imunokemijska metoda. Ac – aktivnost. Ag – antigen. CB – vezanje kolagena.

### 3.3.1.1. Uzorkovanje krvi

Uzorci venske krvi uzorkovani su ispitanicima u jutarnjim satima u 3,2% trinitrijev citratni spremnik (Sarstedt, Nümbrecht, Njemačka). Plazma je dobivena prema preporukama proizvođača spremnika centrifugiranjem pri 2000–2500×g tijekom 15 min na sobnoj temperaturi u centrifugi koja ima rotor s promjenjivim kutom (Rotanta 460, Hettich Zentrifugen, Bäch, Švicarska) unutar 1 sata nakon uzimanja uzorka. Uzorci za rutinske parametre PV, aPTV, TV, Fbg, FVIII, FXIII odmah su analizirani, dok je jedan udio plazme alikvotiran i odmah pohranjen na -20 °C tijekom 7 dana do određivanja aktivnosti VWF:Ac, VWF:Ag i VWF:CB.

### **3.3.1.2. Određivanje globalnih pretraga zgrušavanja**

Određivanje PV-a (STA – NeoPTimal, Diagnostica Stago, Francuska) temelji se na načelu da se u citratnoj plazmi uz dodatak tromboplastina i kalcijevog klorida stvori ugrušak. Rezultat stvaranja stabilnog ugrušaka bilježi se u sekundama i značajno ovisi o vrsti reagensa i korištenom analizatoru. Test mjeri ukupnu aktivnost protrombina, FV, FVII, FX i fibrinogena.

Određivanje aPTV-a (STA – Cephascreen, Diagnostica Stago, Francuska) temelji se na principu rekalcifikacije citratne plazme nakon aktivacije zgrušavanja u prisutnosti standardizirane količine cefalina (nadmjestak trombocita) i aktivatora faktora XII (polifenolna komponenta). Probirni je test koji se koristi u procjeni manjka kininogena velike molekularne mase, prekalikreina, FXII, FXI, FIX, FVIII, FX, FV, protrombina i fibrinogena. Rezultat stvaranja stabilnog ugrušaka se mjeri u sekundama te značajno ovisi o vrsti reagensa i korištenom analizatoru.

Određivanje TV-a (STA – Thrombin, Diagnostica Stago, Francuska) temelji se na principu da se u citratnoj plazmi uz dodatak unaprijed određene količine trombina (dodatak trombina u suvišku) stvori stabilni ugrušak. Pretragom se procjenjuje sposobnost pretvorbe fibrinogena u fibrin. Vrijeme potrebno za stvaranje ugruška se bilježi u sekundama. Test se koristi za procjenu manjka ili kvalitativnih poremećaja fibrinogena te prisutnosti inhibitora trombina.

Određivanje Fbg-a (STA – Liquid Fib, Diagnostica Stago, Francuska) temelji se na Claussovoj metodi. Načelo metode sastoji se u dodatku visoke koncentracije trombina razrijeđenoj plazmi ispitanika i određivanju vremena zgrušavanja plazme u sekundama. Kako se rezultat izražava u g/L, test zahtijeva kalibraciju pomoću referentne plazme poznate kalibracije fibrinogena kalibrirane prema međunarodnom standardu.



### **3.3.1.3. Određivanje aktivnosti faktora VIII i XIII**

Određivanje FVIII (STA – ImmunoDef VIII, Diagnostica Stago, Francuska) temelji se na mjerenju vremena zgrušavanja (STA – C.K. Prest) u prisutnosti cefalina i aktivatora F XII (kaolin) u sustavu u kojem su svi faktori prisutni u višku, s izuzetkom faktora VIII koji je sadržan samo u ispitivanom uzorku. Mjerni raspon iznosi od 1-400%.

Aktivnost FXIII (Hexamate Factor XIII, Medical & Biological Laboratories, Japan) određena je u plazmi ispitanika imunoturbidimetrijskom metodom. Faktor XIII (antigen) u uzorku veže se na čestice lateksa obložene poliklonskim antitijelima protiv faktora XIII. Antitijela su usmjerena protiv podjedinice A faktora XIII. Aglutinacija čestica lateksa dovodi do većeg rasipanja svjetlosti, što se mjeri kao povećanje optičke gustoće. Promjena je proporcionalna razini faktora XIII u uzorku. Mjerni raspon iznosi od 4-110%.

### **3.3.1.4. Određivanje aktivnosti i koncentracije von Willebrandova faktora**

Princip ispitivanja aktivnosti VWF:Ac (INNOVANCE VWF Ac, Siemens Healthineers, Njemačka) je imunoturbidimetrija. von Willebrandov faktor iz uzorka se veže na receptor glikoprotein Ib (GPIb). Reagens I sadrži čestice polistirena obložene antitijelom protiv GPIb. Dodatkom rekombinantnog GPIb (uključene su dvije mutacije povećanja funkcije) isti se veže na antitijelo, kao i na VWF iz uzorka. Zbog mutacija povećanja funkcije, vezanje VWF-a na GPIb ne zahtijeva ristocetin. Ovo vezivanje VWF izaziva aglutinaciju čestica što mjeri kao povećanje apsorpcije. Mjerni raspon iznosi od 3-160%.

Antigena koncentracija von Willebrandova faktora (STA Liatest VWF:Ag, Diagnostica Stago, Francuska) određena je imunoturbidimetrijskom metodom. Princip se temelji na povećanju zamućenosti suspenzije lateks-mikročestica. Kad se VWF iz ispitivane

plazme pomiješa sa lateks-mikročesticama iz reagensa, na koje su kovalentno vezana specifična antitijela usmjerena protiv VWF-a, reakcija antigen-antitijelo uzrokuje aglutinaciju mikročestica. Ova reakcija povećava zamućenost reaktivne smjese, a time i izmjerenu optičku gustoću. Amplituda ovog povećanja ovisi o količini VWF-a sadržanoj u testiranoj plazmi. Mjerni raspon iznosi od 3-420%.

Aktivnost vezanja kolagena von Willebrandova faktora (Asserachrom VWF:CB, Diagnostica Stago, Francuska) određena je enzim imunokemijskom metodom tzv. sendvič ELISA tehnikom pomoću čitača mikrotitarskih ploča Epoch (BioTek, Berlin, Njemačka) koristeći programsku podršku Gen5. Princip reakcije je sljedeći: mikrotitarske jažice su prethodno prevučene ljudskim kolagenom koji fiksira VWF iz plazme ispitanika uz pomoć njegovih visoko molekularnih multimera. Fiksirani VWF se detektira pomoću zečjih antitijela protiv ljudskog VWF-a, koji su obilježeni s peroksidazom i koji se vežu na slobodne antigenske determinante. Sadržaj vezane peroksidaze mjeri se aktivnošću prema supstratu tetrametilbenzidinu. Reakcija se zaustavlja dodatkom kisele otopine i mjeri se spektrofotometrijski se na valnoj duljini od 450 nm. Mjerni raspon ovisan o vrijednostima kalibratora te se kreće od 10-180%.

### **3.3.2. Uspostava referentnih intervala**

Grasbeck i Saris su još 1969. godine razmatrali uspostavljanje normalnih vrijednosti. Korištenje izraza "normalne vrijednosti" u mnogim je slučajevima bilo netočno ili neodgovarajuće, pa se od 1987. - 1991. godine koristio izraz "referentne vrijednosti". Međutim smjernice o tome kako provesti ove studije dostupne su tek od 1993. godine kada su CLSi i međunarodna federacija kliničke kemije i laboratorijske medicine (*engl.* International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, IFCC) objavili smjernicu „Definiranje, uspostava i provjera referentnih intervala u kliničkom

laboratoriju“ (8,9). Referentni intervali moraju se navesti uz svaki laboratorijski rezultat kako bi pripomogli u tumačenju između normalnog i abnormalnog rezultata.

Osobe za uspostavu studija referentnih intervala važno je pažljivo odabrati. Koristeći interval pouzdanosti od 90%, potrebno je ukupno 120 referentnih ispitanika. Upitnik bi se trebao koristiti za prikupljanje informacija radi utvrđivanja zdravstvenog stanja ispitanika, kao i dobi, spola, etničke pripadnosti i upotrebe lijekova. Trebalo bi uključiti jednak broj muškaraca i žena, a ispitanici bi također trebali biti reprezentativni za ispitivanu populaciju. Rezultati upitnika mogu se koristiti za *a priori* ili *posteriori* pristup uzorkovanja. Kad se koristi *a priori* uzorkovanje, primjenjuju se kriteriji isključenja prije prikupljanja uzorka. Ako se koristi *posteriori* uzorkovanje, kriteriji isključenja primjenjuju se nakon uzorkovanja. Dobiveni rezultati nakon uzorkovanja se statistički procjenjuju, a vrsta statističkog testa temelji se na broju ispitanika koji se koriste. Za procjenu podataka koriste se tri različite statističke metode: parametrijska, neparametrijska te robustna. Nadalje, važno je odrediti kako će se odrediti ekstremne vrijednosti (*engl. outlier*). Najčešće se koristi metoda koju je predložio Dixon.

### **3.3.2.1. Direktna metoda**

Tradicionalni pristup uspostavljanja RI nazvan je direktnom metodom. U ovom procesu, pojedinci iz populacije (referentna populacija) odabiru se za uzorkovanje na temelju definiranih kriterija. Uzorci se zatim prikupljaju od tih pojedinaca i analiziraju za odabrane analite. Ovaj pristup, kao što je prethodno spomenuto podijeljen je na *a priori* i *a posteriori* procese odabira. U idealnom slučaju, izravan pristup bi koristio nasumično odabrane članove referentne populacije; međutim, to se rijetko postiže s testiranom populacijom na koju obično utječu i čimbenici troškova. Istinska randomizacija za traženje potpuno reprezentativne skupine zahtijeva opsežno (i skupo) planiranje i provedbu.

### **3.3.2.2. Indirektna metoda**

Kako bi se kako bi se osigurali kontinuirani RI, oni se mogu izraditi i alternativno, indirektnom metodom na temelju svih podataka rutinske analize mješovite populacije (14). Odabir se provodi statističkim alatima koji rješavaju raspodjelu interesa.

Indirektna metoda nasuprot direktne koristi velike skupove podataka ( $N > 5000$ ) kliničkih laboratorijskih rezultata izvedenih iz baza podataka rutinske dijagnostike, a temelji se na mješovitoj populaciji oboljelih i zdravih ispitanika. Ovi se klinički podaci potom koriste za zaključivanje raspodjele vrijednosti analita za zdrave osobe kako bi se statistički izveli RI. Odbor za RI i granice odlučivanja IFCC-a nedavno je preporučio takve neizravne pristupe za procjenu RI. Važno je međutim napomenuti da iako se standardni parametrijski ili neparametrijski testovi koriste za indirektnu referentnu intervalnu studiju, ove tehnike pate od utjecaja ekstremnijih rezultata u skupu podataka, koji su također i rezultati koji su najvjerojatnije pogođeni bolestima (14).

### **3.4. Statistička obrada podataka**

Pohrana podataka i priprema za statističku analizu učinjena je u programu Excel® programskog paketa Microsoft Office (Microsoft Corporation, Redmond, WA, Sjedinjene Američke Države). Ekstremne vrijednosti isključene su prema Dixonovom D/R pravilu:  $D = \text{najekstremnija vrijednost} - \text{susjedna vrijednost}$ ,  $R = \text{raspon vrijednost}$  između svih podataka. Kada je  $D/R > 0,33$  najekstremnija vrijednost je isključena iz izračuna. Kako direktna metoda podrazumijeva neparametrijsku statističku obradu, razlike između grupa i spola (4 grupe ovisno o dobi), analizirane su pomoću Kruskal-Wallis te MannWhitney-U testa. Statistička obrada podataka napravljena je pomoću programske podrške Analyse It (Analyse-It Software, Ujedinjeno Kraljevstvo), a statistička je značajnost postavljena na  $P < 0.05$ . Indirektna metoda izračuna RI

učinjena je pomoću programske podrške *Reference Limit Estimator* (DGKL, Bonn, Njemačka).

## 4. Rezultati

### 4.1. Referentni intervali globalnih pretraga zgrušavanja

Od globalnih parametara zgrušavanja jedino RI za PV nisu pokazali statistički značajnu razliku između djevojčica i dječaka ( $P = 0,111$ ) dok su se RI za aPTV, TZ i Fbg značajno razlikovali obzirom na spol ispitanika ( $P = 0,019$ ;  $P = 0,013$  i  $P = 0,031$ ). Statistički značajna razlika RI-a među dobnim skupinama pokazala se za PV i aPTV ( $P < 0,0001$  i  $P = 0,007$ ) dok se RI za TZ i Fbg ne razlikuju obzirom na dob ispitanika ( $P = 0,490$ ;  $P = 0,146$ ). Daljnom analizom utvrđeno je kako se RI za PV između grupe 3 i 4 ne razlikuju statistički značajno te se obzirom na to mogu spojiti u jednu referentnu vrijednost ( $P = 0,373$ ). Referentni intervali za aPTV su se značajno razlikovali za grupu 1 te se za dob od 6-18 godina može primijeniti jedan RI, ali ovisan o spolu. U tablici 3 prikazani su RI globalnih pretraga zgrušavanja obzirom na dob i spol.

**Tablica 3.** Definirani medijani i referentni rasponi specifični za dob i spol, prema smjernici CLSI-C28-A3, za globalne pretrage zgrušavanja

Parametar (jedinica)	Grupa 1 (1-5 godina)	Grupa 2 (6-10 godina)	Grupa 3 (11-14 godina)	Grupa 4 (15-18 godina)
<b>PV (s)</b>	13,5 (12,7-14,1) N = 250	13,9 (13,5 – 14,7) N = 248	14,1 (13,7-15,1) N = 502	
<b>aPTV (s)</b>	<b>M:</b> 31,3 (29,7 – 33,1) N = 163	<b>M:</b> 30,7 (28,8 – 32,2) N = 469		
	<b>Ž:</b> 31,7 (29,8 – 33,5) N = 87	<b>Ž:</b> 31,2 (28,9 – 33,2) N = 281		
<b>TV(s)</b>	<b>M:</b> 16,5 (15,9 – 17,0) N = 632			
	<b>Ž:</b> 16,3 (15,8 – 16,9) N = 368			
<b>Fbg (g/L)</b>	<b>M:</b> 2,66 (2,34 - 3,07) N = 632			
	<b>Ž:</b> 2,76 (2,40 – 3,31) N = 368			

CLSI – *engl.* Clinical Laboratory Standard Institute. PV – protrombinsko vrijeme. aPTV-aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme. TV – trombinsko vrijeme. Fbg – fibrinogen. M – muško. Ž – žensko. N – broj ispitanika.

#### 4.2. Referentni intervali faktora VIII i XIII

U tablici 4 prikazani su RI za koagulacijske faktore VIII i XIII obzirom na dob i spol. Referentni intervali FVIII i FXIII nisu se statistički značajno razlikovali između dobnih skupina ( $P = 0,078$  i  $P = 0,082$ ). Faktor XIII pokazao je značajnu razliku između spola ispitanika ( $P = 0,038$ ) dok se FVIII nije značajno razlikovao između dječaka i djevojčica ( $P = 0,735$ ).

**Tablica 4.** Definirani medijani i referentni rasponi specifični za dob i spol, prema smjernici CLSI-C28-A3, za koagulacijske faktore VIII i XIII

Parametar (jedinica)	Grupa 1 (1-5 godina)	Grupa 2 (6-10 godina)	Grupa 3 (11-14 godina)	Grupa 4 (15-18 godina)
<b>FVIII (%)</b>		109 (87 - 169) N = 1000		
<b>FXIII (%)</b>		<b>M:</b> 97 (85 - 106) N = 632		
		<b>Ž:</b> 100 (87 - 110) N = 368		

CLSI – *engl.* Clinical Laboratory Standard Institute. F – faktor. M – muško. Ž – žensko. N – broj ispitanika.

### 4.3. Referentni intervali von Willebrandova faktora

U tablici 5 prikazani su RI za von Willebrandov faktor obzirom na dob i spol. Sva tri parametra vWF (vWF:Ac, vWF:Ag i vWF:CB) nisu pokazali statistički značajnu razliku u RI između spola ( $P = 0,781$ ,  $P = 0,922$  i  $P = 0,566$ ), dok je dokazana statistički značajna razlika u RI između grupa pri čemu se samo grupa 4 značajno razlikuje od ostalih grupa ( $P = 0,029$ ,  $P = 0,005$  i  $P = 0,009$ ) što znači kako se za dob od 1-14 godina može primijeniti jedan RI neovisan o spolu.

**Tablica 5.** Definirani medijani i referentni rasponi specifični za dob, prema smjernici CLSI-C28-A3, za von Willebrandov faktor

Parametar (jedinica)	Grupa 1 (1-5 godina)	Grupa 2 (6-10 godina)	Grupa 3 (11-14 godina)	Grupa 4 (15-18 godina)
VWF:Ac (%)		88 (73 - 116) N = 740		101 (77 - 129) N = 260
VWF:Ag (%)		88 (74 - 108) N = 740		99 (79 - 137) N = 260
VWF:CB (%)		73 (59 - 94) N = 740		83 (62 - 120) N = 260

CLSI – *engl.* Clinical Laboratory Standard Institute. VWF:Ac – aktivnost von Willebrandova faktora. VWF:Ag - antigena koncentracija von Willebrandova faktora. VWF:CB - aktivnost vezanja kolagena von Willebrandova faktora. N – broj ispitanika.

### 4.4. Referentni intervali dobiveni indirektnom metodom

Uzevši u obzir sve pacijente u dobi između 1-18 godina koji su u razdoblju od 2015.-2021. godine bili zaprimljeni u sveučilišnu bolnicu Halle i u kojih je učinjena laboratorijska koagulacijska dijagnostika skupili smo maksimalno 12 348 rezultata



globalnih pretraga koagulacije (izuzetak je Fbg za kojeg je prikupljeno 10 489 rezultata). Dijagnostika von Willebrandove bolesti učinjena je u 3784 ispitanika, FVIII u 2976 ispitanika te FXIII u 2395 ispitanika te time nisu zadovoljili kriterije za mogućim određivanjem RI indirektnom metodom.

Zbog malog broja ispitanika (< 5000) grupe nisu mogle biti učinjene kao kod određivanja RI direktnom metodom te je ovakav izračun RI dao općeniti pregled RI od 1. do 18.godine. Za aPTV i Fbg su također uočeni različiti RI obzirom na spol. Tablica 6 daje uvid u dobivene RI sa pripadajućim 95% intervalima pouzdanosti.

**Tablica 6.** Definirani referentni rasponi sa 95% CI specifični za dob/spol, dobiveni indirektnom metodom za globalne pretrage zgrušavanja

Parametar (jedinica)	N	DRI	GRI	95% CI DRI	95% CI GRI
<b>PV (s)</b>	<b>12 348</b>	12,1	17,1	10,7 – 12,9	13,7 – 17,6
<b>aPTV (s)</b>	<b>M: 6409</b>	27,8	34,9	25,4 – 30,7	31,8 – 36,1
	<b>Ž: 5939</b>	28,1	35,1	25,7- 31,3	32,6 -37,1
<b>TV (s)</b>	<b>12 348</b>	14,7	18,6	13,8 – 16,0	16,3 – 21,0
<b>Fbg (g/L)</b>	<b>M: 5397</b>	2,1	3,4	1,9 – 2,4	3,1 – 3,8
	<b>Ž: 5092</b>	2,0	4,2	1,8 – 2,5	3,5 – 4,8

CI – interval pouzdanosti. PV – protrombinsko vrijeme. aPTV- aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme. TV – trombinsko vrijeme. Fbg – fibrinogen. M – muško. Ž – žensko. N – broj ispitanika. DRI – donji referentni interval. GRI – gornji referentni interval.

## 5. Rasprava

Laboratorijski RI temeljni su za točne procese kliničkog odlučivanja i stoga imaju važan utjecaj na ukupnu kvalitetu zdravstvene zaštite pacijenata (5,8,15). Kako je prethodno i spomenuto, Andrew i sur. prvi su definirali pojam razvojne hemostaze i kao rezultat toga RI za parametre zgrušavanja u djece različiti su od onih u odraslih (16,17). Upravo i naši prikazani podaci isto tako potvrđuju da, u opisanim tehničkim uvjetima, većina rezultata parametara zgrušavanja uvelike ovise o dobi i da se moraju koristiti referentni rasponi specifični za dob kako bi se osigurala pravilna procjena hemostaze u djece. Ovom studijom pružili smo nove podatke o pedijatrijskim RI za koagulacijske parametre za sustav analizatora/reagensa tvrtke Stago.

Sva dosadašnja istraživanja su pokazala da bi svaki laboratorij trebao uspostaviti RI za svoju populaciju ispitanika jer se RI znatno razlikuju obzirom na metodu, proizvođača i korišteni reagens (1,5,17-24). Pa su tako prema podacima studije Liu i sur. promjene u parametarima zgrušavanja na analizatorima STA-R (Diagnostica Stago, Francuska) značajne u odnosu na dob što je u skladu i sa našom studijom iako su ispitivane dobne skupine drugačije (1). Obje studije prikazuju kako medijan vrijednosti PV-a raste, a aPTV-a opadaju tijekom odrastanja iako su naše medijan vrijednosti za PV 1 sekundu i čak 7 sekundi niže za aPTV, a dobiveni RI su znatno uži od RI prikazanih u studiji Liu i sur. Budući da vrijednosti PV-a i aPTV-a značajno ovise o vrsti korištenih reagensa, kao što su to prikazali Monagle i sur., ova uočena razlika može proizlaziti iz toga jer nema podataka koji su reagensi korišteni u studiji Liu i sur. (1,5). Nadalje, naši podaci za TV i Fbg daju RI neovisne o dobi što je isto u skladu sa studijom Liu i sur. ako se usporede vrijednosti sa njihovom dobnom skupinom 2-15 godina. Naš doprinos na prethodno objavljene rezultate je to što su za globalne parametre zgrušavanja te FXIII dani i RI ovisni o spolu što u usporedbi sa ostalim

studijama izvedenim na analizatorima Stago nije bio slučaj (1,5,21,22). Dosad objavljeni RI za FXIII nisu prikazali nikakvu razliku između spolova što nije u skladu s našom studijom, ali obzirom da je broj muških sudionika u našoj studiji dvostruko veći u odnosu na ženske sudionike, dobiveni različiti RI između spolova za FXIII mogu biti upravo zbog izrazito nejednolike raspodjele sudionika. Nadalje, valja napomenuti kako RI uvelike ovise o veličini ispitivane skupine te se mora prikupiti dovoljan broj zdravih ispitanika za svaku određenu dobnu skupinu (8,9). Broj raspoloživih ispitanika utječe na širinu intervala pouzdanosti RI te, ako su intervali pouzdanosti neprihvatljivo široki, potreban je veći broj ispitanika (9).

Iz studije Monagle i sur. vidljivo je kako mali broj ispitanika daje relativno široke intervale pouzdanosti RI u usporedbi sa rezultatima naše studije, budući da su dobne skupine iste (5). Ali isto tako onda ne možemo objasniti zašto su naši RI uži u odnosu na RI studije Liu i sur. budući da su oni imali 10 do 20 puta veći broj ispitanika u usporedbi sa našom studijom (1).

Što se tiče FVIII i VWF naše medijan vrijednosti pokazale su se sniženima za čak 20% i sa znatno užim RI u usporedbi sa vrijednostima drugih studija. Razlog ovome isto tako može biti u veličini ispitivane grupe ili razlike u reagensima (5,21,23). Međutim isto tako naši rezultati pokazuju porast vrijednosti sva tri parametra VWF tijekom odrastanja sa značajnom razlikom nakon 14.godine što je i u skladu sa činjenicom da vrijednosti VWF rastu odrastanjem. Slične rezultate pokazuje i studija Toulona i sur. gdje su najveće vrijednosti dane za dobnu grupu od 11-17 godina (18).

Iz prikazanih rezultata možemo vidjeti bitne razlike između provedenih studija na analizatorima Stago koje ukazuju na važnost uspostave pedijatrijskih RI za svoju populaciju ispitanika kako bi se pravovremeno mogla točnije identificirati von Willebrandova bolest u djetinjstvu.

Također, studije provedene koristeći ostale analizatore i reagense prikazuju značajne razlike među dobivenim vrijednostima što isto tako upućuje na potrebu za uspostavljanjem lokalnih RI. Appel i sur. prikazali su u svojoj studiji kako se RI ispitivanih parametara između analizatora BCS (Siemens Healthineers, Marburg, Njemačka) i CA-1500 (Sysmex, Kobe, Japan) značajno razlikuju iako su na oba analizatora korišteni reagensi tvrtke Siemens, ali različitog sastava (19). Studije provedene na analizatorima ACL TOP (Instrumentation Laboratory, Sjedinjene Američke Države) pokazuju kako su promjene u parametarima zgrušavanja značajne u odnosu na dob, ali ne i u odnosu na spol (15,18,23). Iz svega navedenog proizlazi kako međusobna primjenjivost vrijednosti RI različitih proizvođača nije prihvatljiva i može dovesti do pogrešnih interpretacija i neadekvatnih kliničkih odluka jer na primjer produženo aPTV za 2 sekunde na jednom analizatoru ukazuje na patološko stanje dok može biti fiziološko i ne ukazuje na bolesno stanje ako se primjene pravilni RI za korišteni sustav analizatora/reagensa.

Uspostavljanje RI- za dječju populaciju je izazovno i gotovo nemoguće za pojedine laboratorije; identificiranje i prikupljanje dovoljnog broja zdrave djece traje dugo, a analitički troškovi su znatni. Treba napomenuti i da uzorkovanje krvi u djece u svrhu samog određivanja RI predstavlja i etički problem te su stoga predloženi globalni RI u kojima laboratoriji usvajaju RI koji su uspostavljeni na velikom regionalnom području ili u nekoliko institucija. To omogućuje proširenu veličinu uzorka, uz minimalni financijski trošak kao i analizu podskupina koje ukupno broje 120 pojedinaca (8,18,19).

Nadalje, kako bi se osigurali kontinuirani RI u području hemostaze ovisni o dobi i spolu tijekom djetinjstva, RI se mogu izraditi alternativno, indirektnom metodom na temelju svih podataka rutinske analize zdravih i bolesnih osoba (10-14). Studija Weidhofer i sur., jedna je od prvih i jedinih studija koja je koristeći upravo indirektnu metodu te podatke nekoliko institucija, pružila izračune kontinuiranih RI za 5 globalnih

parametara sustava zgrušavanja ovisno o dobi i spolu tijekom djetinjstva u hemostazi. Štoviše, studija pokazuje da su RI dobiveni korištenjem indirektna metode usporedivi s RI dobivenim *a priori* direktnom metodom (25). Naši su podaci u skladu sa studijom Weidhofer i sur. odnosno i mi smo u našoj studiji pokazati da je indirektna procjena RI za globalne teste sustava zgrušavanja rezultirala sličnim i statistički nerazlučivim razlikama u RI u odnosu na RI dobivene direktnom metodom (preklapanje 95% CI). Vidljivo je naime kako su RI dobiveni ovom metodom znatno širi što se pripisuje utjecaju ekstremnih patoloških vrijednosti koje ulaze u izračun RI. Ukoliko se to želi izbjeći tada je preporuka da se skupovi podataka filtriraju kako bi se smanjila učestalost rezultata ispitanika kod kojih postoji veća vjerojatnost da će bolest utjecati na rezultat odnosno ovisno o relativnoj učestalosti uzoraka i prirodi statističke tehnike, možda je potrebno isključiti rezultate bolesnika iz određene klinike (14). Usporedbom naših rezultata sa rezultatima studije Weidhofer i sur., koja je imala značajno veći broj ispitanika, uočava se kako se RI preklapaju s time da je kod nas uočena i razlika između spolova ne samo za Fbg nego i za aPTV.

## 6. Zaključci

1. Referentni intervali znatno se razlikuju obzirom na dob, metodu, proizvođača i korišteni reagens
2. Kako bi se osigurala pravilna procjena hemostaze u djece, moraju se koristiti referentni intervali specifični za dob/spol kao i sustav analizatora/reagensa
3. Referentni intervali dobiveni korištenjem indirektna metode usporedivi su s RI dobivenim direktnom metodom

## 7. Literatura

1. Liu J, Dai Y, Yuan E, et al. Paediatric reference intervals for common coagulation assays in Chinese children as performed on the STA-R coagulation analyzer. *Int J Lab Hematol* 2019;41:697–701.
2. Herak DC. Izazovi laboratorijske dijagnostike hemostatskih poremećaja u djece. *Paediatr Croat* 2012;56(Supl 1):176-81.
3. Lippi G, Franchini M, Montagnana M, Guidi GC. Coagulation Testing in Pediatric Patients: The Young Are Not Just Miniature Adults. *Semin Thromb Hemost* 2007;33:816-20.
4. Kuhle S, Male C, Mitchell L. Developmental Hemostasis: Pro- and Anticoagulant Systems during Childhood. *Semin Thromb Hemost* 2003;29:329-38.
5. Monagle P, Barnes Chris, Ignjatovic I, i sur. Developmental haemostasis. Impact for clinical haemostasis laboratories. *Thromb Haemost* 2006;95:362–72.
6. Kurnik K, Bildingmeier C, Hütker S. Hämostaseologie in der Pädiatrie. *Hämostaseologie* 2016;36:109-25.
7. Bronić A, Herak DC, 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 (Zagreb)* 2019;29(2):020503
8. Castellone DD. Establishing reference intervals in the coagulation laboratory. *Int J Lab Hem* 2017;39 (Supl. 1):121–7.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline—Third Edition. CLSI document EP28-A3c. Wayne, PA:CLSI;2008.

10. Arzideh F, W. Wosniok, R. Haeckel, i sur. Reference limits of plasma and serum creatinine concentrations from intra-laboratory data bases of several German and Italian medical centres: Comparison between direct and indirect procedures, *Clin Chim Acta* 2010;411:215–21.
11. Arzideh F, Brandhorst G, Gurr E, i sur. An improved indirect approach for determining reference limits from intra-laboratory data bases exemplified by concentrations of electrolytes. *Lab Med* 2009;33:52–66.
12. Arzideh F, Gurr E, Haecke RI, Hinsch W, Schumann G, Wosniok W. Guide values for quantitative examinations in medical laboratories: definitions, classification, and limits of application. Recommendations for classifying and defining guide values of quantitative measurements, *Lab Med* 2009;33:228–32.
13. Zierk J, Arzideh F, Haeckel R, Rascher W, Rauh M, Metzler M. Indirect determination of pediatric blood count reference intervals, *Clin Chem Lab Med* 2013;51:863–72.
14. Jones GRD, Haeckel R, Loh TP, et al. Indirect methods for reference interval determination - Review and recommendations. *Clin Chem Lab Med* 2019;57:20-9.
15. Zhang H, Li J, Chen H, Wu X. Establishing reference intervals of coagulation indices based on the ACL Top 700 system for children in Southwestern Fujian, China. *Clin Biochem* 2020;75:78–82.
16. Andrew M, Paes B, Milner R, i sur. Development of the human coagulation system in the full-term infant. *Blood* 1987;70:165–72.
17. Andrew M, Vegh P, Johnston M, Bowker J, Ofori F, Mitchell L. Maturation of the Hemostatic System During childhood. *Blood* 1992;80:1998-2005.
- 18.



19. Toulon P, Berruyer M, Brionne-François M. Age dependency for coagulation parameters in paediatric populations. Results of a multicentre study aimed at defining the age-specific reference ranges. *Thromb Haemost* 2016;116:9-16.
20. Apple M, Grimminck B, Geerts J, Stigter R, Cnossen MH, Beishuizen A. Age dependency of coagulation parameters during childhood and puberty. *J Thromb Haemost* 2012;10:2254-63.
21. Arslan DF, Serder M, Arvi ME, i sur. Determination of age-dependent reference ranges for coagulation tests performed using Destiny Plus. *Iran J Pediatr* 2016;26:e6177
22. Attard C, van der Straaten T, Karlaftis V, Monagle P, Ignjatovic V. Developmental hemostasis: age-specific differences in the levels of hemostatic proteins. *J Thromb haemost* 2013;11:1850-4.
23. Flanders MM, Crist RA, Roberts WI, Rodgers GM. Pediatric reference Intervals for Seven Common Coagulation Assays. *Clin Biochem* 2005;51:1738-42.
24. Sung JY, Seo JD, Ko D-H, i sur. Establishment of Pediatric Reference Intervals for Routine Laboratory Tests in Korean Population: A Retrospective Multicenter Analysis. *Ann Lab Med* 2021;41:155-70.
25. Sosothikul D, Seksarn P, Lusher JM. Pediatric reference values for Molecular Markers in Hemostasis. *J Pediatr hematol Oncol* 2007;29:19-22.
26. Weidhofer C, Meyer E, Ristl R, i sur. Dynamic reference intervals for coagulation parameters from infancy to adolescence. *Clin Chim Acta* 2018;482:124–35.

## 8. Popis skraćenica

aPTV- aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme

AT – antitrombin

CI – interval pouzdanosti

CLSI – engl. *Clinical Laboratory Standard Institute*

DRI – donji referentni interval

ELISA - enzim imunokemijska metoda

F – faktor

Fbg – fibrinogen

GRI – gornji referentni interval

N – broj ispitanika

PAI – inhibitor aktivatora plazminogena

PC – protein C

PS – protein S

PV – protrombinsko vrijeme

RI – referentni interval

TZ – trombinsko vrijeme

t-PA – tkivni aktivator plazminogena

VWF – von Willebrand faktor

VWF:Ac – aktivnost von Willebrandova faktora

VWF:Ag - antigena koncentracija von Willebrandova faktora

VWF:CB - aktivnost vezanja kolagena von Willebrandova faktora