

# Verifikacija referentnih intervala za analizator funkcije trombocita Innovance PFA-200

---

**Marić, Larisa**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:272360>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-21**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**  
**SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO**  
**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Larisa Marić**

**VERIFIKACIJA REFERENTNIH**  
**INTERVALA ZA ANALIZATOR**  
**FUNKCIJE TROMBOCITA INNOVANCE**  
**PFA-200**

**Završni rad**

**Osijek, 2023.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK  
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO  
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Larisa Marić**

**VERIFIKACIJA REFERENTNIH  
INTERVALA ZA ANALIZATOR  
FUNKCIJE TROMBOCITA INNOVANCE  
PFA-200**

**Završni rad**

**Osijek, 2023.**

Rad je ostvaren u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Osijek.

Mentor rada: doc. dr. sc. Vatroslav Šerić, mag. med. biochem.

Rad ima 23 lista, 3 tablice i 2 slike.

## ZAHVALA

*Hvala mentoru doc. dr. sc. Vatroslavu Šeriću na prenesenom znanju i vođenju tijekom izrade završnog rada.*

*Hvala dr. sc. Mariji Milić na pomoći pri izradi praktičnog dijela završnog rada, ali i na strpljenju, dobroj volji i odgovoru na svako postavljeno pitanje.*

*Najveće hvala mojoj obitelji i Sebastianu čija me bezuvjetna ljubav i neprestana podrška pratila tijekom cijelog studija. Uz vas su studentski dani bili mnogo lakši i sretniji.*

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Trombociti .....	1
1.2. Hemostaza .....	1
1.3. Primarna hemostaza.....	2
1.4. Ispitivanje poremećaja primarne hemostaze .....	2
1.4.1. Analizator funkcije trombocita PFA-200 .....	3
1.5. Von Willebrandov faktor.....	4
1.6. Verifikacija referentnih intervala .....	4
2. CILJEVI .....	6
3. MATERIJAL I METODE .....	7
3.1. Ustroj studije .....	7
3.2. Ispitanici .....	7
3.3. Materijal .....	7
3.4. Metode.....	7
3.4.1. Analizator funkcije trombocita PFA-200 .....	8
3.4.2. Aktivnost von Willebrandovog faktora .....	8
3.5. Statističke metode.....	9
4. REZULTATI.....	10
5. RASPRAVA .....	14
6. ZAKLJUČCI.....	17
7. SAŽETAK.....	18
8. SUMMARY .....	19
9. LITERATURA .....	21
10. ŽIVOTOPIS .....	23

## 1. UVOD

### 1.1. Trombociti

Trombociti nastaju iz najvećih stanica koštane srži megakariocita. Citoplazma megakariocita se fragmentira u samoj koštanoj srži i nastaju sitne krvne pločice diskoidnog oblika zvane trombociti. Njihov promjer iznosi između 1 i 4  $\mu\text{m}$ . Normalna koncentracija trombocita u krvi iznosi  $150 - 300 \times 10^9/\text{L}$  (1). Trombociti ne sadrže jezgru, no unatoč tome imaju mnoga funkcionalna svojstva jer sadrže brojne proteine prethodno sintetizirane u megakariocitima. Građeni su od membrane i citoplazme s granulama. Membrana je negativno nabijena, a izgrađuju je glikoproteini, glikolipidi, fosfolipidi i kolesterol. Membranu obavija omotač koji se naziva glikokaliks, a ispod membrane se nalaze filamenti aktina i miozina i mikrotubuli. Njihova uloga je izgradnja skeleta trombocita, održavanje diskoidnog oblika trombocita, omogućavanje kretanja, te, po potrebi, promjena oblika trombocita. Citoplazma sadrži dvije vrste granula: alfa granule i guste granule. Alfa granule sadrže trombocitne čimbenike i čimbenike zgrušavanja poput faktora V, faktora XI, fibrinogena i von Willebrandovog faktora. Guste granule sadrže aktivne tvari i metabolite, pri čemu se ističu ADP, ATP, kalcij i serotonin. Glavna funkcija trombocita je sudjelovanje u hemostazi (2, 3).

### 1.2. Hemostaza

Hemostaza je složeni fiziološki proces koji zaustavlja krvarenje stvaranjem ugruška na mjestu ozljede krvne žile i tkiva, a u odsustvu ozljede održava krv u tekućem stanju. Pretjerana aktivnost hemostatskog sustava ili nedostatak fizioloških inhibitora zgrušavanja može dovesti do patoloških trombotičkih događaja poput moždanog udara, infarkta miokarda, arterijske ili duboke venske tromboze i plućne embolije (4). Hemostatski sustav dijeli se na sustav zgrušavanja i fibrinolitički sustav. Zgrušavanje krvi dijeli se na primarnu hemostazu i sekundarnu hemostazu (5). Za uspješnu hemostazu potrebno je zajedničko djelovanje endotelnih stanica krvnih žila, trombocita, faktora zgrušavanja i von Willebrandovog faktora. Primarna i sekundarna hemostaza se događaju istovremeno, te su to procesi koji su međusobno vrlo povezani (6). U primarnoj hemostazi dolazi do kontrakcije krvne žile i stvaranja trombocitnog ugruška na mjestu ozljede. U sekundarnoj hemostazi nastaje fibrin koji učvršćuje ranije nastali trombocitni ugrušak. U posljednjoj fazi hemostaze, fazi fibrinolize, nastali fibrin

se razgrađuje i uklanja pomoću fibrinolitičkog sustava kako bi se spriječilo prekomjerno stvaranje fibrina i osiguralo da se ugrušak stvara samo na mjestu ozljede (5).

### 1.3. Primarna hemostaza

Unutrašnjost krvnih žila obložena je tankim slojem endotelnih stanica. Endotel se nalazi između stijenke krvne žile i krvi koja cirkulira kroz krvne žile (7). Pri normalnom toku krvi trombociti se nalaze u blizini stijenke krvnih žila. To omogućuje brzi odgovor trombocita u slučaju ozljede, a samim time i početak reakcije hemostatskog sustava (8). Ovaj proces može se podijeliti na tri ključna koraka, a to su:

1. Adhezija trombocita
2. Aktivacija trombocita
3. Agregacija trombocita

Adhezija trombocita je prvi korak odgovora hemostatskog sustava na ozljedu. Ovim procesom trombociti iz krvi prijanjaju na kolagen u subendotelu. Za navedenu reakciju neophodni su receptori na trombocitima, pri čemu se ističe glikoproteinski kompleks GP Ib/IX/V. Njegova uloga je vezanje na von Willebrandov faktor. Von Willebrandov faktor sadrži i vezno mjesto za kolagen. Vezanje kolagena na von Willebrandov faktor već povezan s glikoproteinskim kompleksom GP Ib/IX/V rezultira stvaranjem veze između trombocita i kolagena (5, 8). Aktivacija trombocita obilježena je promjenama trombocita koje mogu biti i funkcionalne i morfološke. Morfološke promjene odnose se na promjenu oblika trombocita pri čemu se tipičan diskoidni oblik trombocita zamjenjuje sferičnim oblikom s izdancima. Glikoprotein VI glavni je receptor koji sudjeluje u aktivaciji trombocita na kolagenu. Vezanjem glikoproteina VI za kolagen se aktivira sustav unutarstanične signalizacije i započinje sekrecija alfa i gustih granula u trombocitima. Iz gustih granula se luči ADP. Uz pomoć ADP-a trombocitni receptor  $P2Y_{12}$  održava proces aktivacije trombocita (5, 9). Osim toga, ADP, zajedno s tromboksanom  $A_2$ , sudjeluje kao agonist u procesu agregacije trombocita. To je posljednji proces primarne hemostaze i rezultira sljepljivanjem trombocita čime se stvara trombocitni ugrušak.

### 1.4. Ispitivanje poremećaja primarne hemostaze

Za ispitivanje poremećaja primarne hemostaze ne postoji puno pretraga na raspolaganju. Najčešće pretrage koje se izvode su vrijeme krvarenja, agregacija trombocita s različitim



agonistima i određivanje aktivnosti von Willebrandovog faktora. Zbog niske dijagnostičke osjetljivosti i specifičnosti vremena krvarenja, neprestano se traga za pretragom koja bi bila probirna i sveobuhvatna pretraga za poremećaje primarne hemostaze, a istovremeno imala visoku specifičnost i osjetljivost (10). Jedno od rješenja je analizator funkcije trombocita (engl. platelet function analyzer, PFA). To je analizator koji pomoću jedinstvene tehnologije oponaša hemodinamske uvjete pri leziji krvne žile i na taj način ispituje adheziju i agregaciju trombocita (11).

#### **1.4.1. Analizator funkcije trombocita PFA-200**

Analizator funkcije trombocita Innovance PFA-200 proizvođača Siemens (Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Njemačka) je dio sustava koji se često skraćeno naziva PFA-200. PFA-200 sustav sastoji se od analizatora funkcije trombocita i testnih uložaka. Postoji nekoliko vrsta testnih uložaka, a u ovom istraživanju su korišteni testni ulošci obloženi agonistima trombocita kolagen/adrenalin (COL/EPI) i testni ulošci obloženi agonistima trombocita kolagen/ADP (COL/ADP). Oni su građeni od nekoliko dijelova, uključujući kapilaru, spremnik uzorka i biokemijski aktivnu membranu sa kružnim otvorom u sredini (12). Za analizu krvi jednog ispitanika na oba testna uložka potrebno je 1600  $\mu$ L krvi. Nakon prenošenja krvi u spremnik za uzorak na analizatoru započinje analiza koja je automatizirana. Prvi korak analize je aspiracija krvi iz spremnika uzorka kroz kapilaru i kružni otvor pri čemu se trombociti izlažu simulaciji hemodinamskih uvjeta pri leziji krvne žile. Na membrani testnog uložka trombociti adheriraju na kolagen čime započinje proces aktivacije trombocita. Ovisno o tome koja se vrsta testnog uložka rabi u analizi, membrana je, uz kolagen, obložena i adrenalinom ili ADP-om. Nakon kontakta s navedenim agonistima trombocita, trombociti kreću otpuštati granule. Sekrecija granula rezultira agregacijom, odnosno međusobnim sljepljivanjem trombocita, čime se formira trombocitni ugrušak na otvoru. On uzrokuje smanjenje protoka krvi koje postupno dovodi do potpunog zaustavljanja protoka krvi. Upravo ovo vrijeme potrebno za stvaranje trombocitnog ugruška, vrijeme zatvaranja (engl. closure time, CT), se koristi kao mjera funkcije trombocita na analizatoru PFA-200 (12). Upravo zbog mogućnosti oponašanja hemodinamskih uvjeta pri leziji krvne žile ovaj analizator je odlična metoda za ispitivanje poremećaja primarne hemostaze. Pomoću PFA otkrivaju se stečeni, nasljedni ili lijekovima inducirani poremećaji primarne hemostaze (11). PFA je također osjetljiv na nedostatak ili poremećaj funkcije von Willebrandova faktora, što ga čini dobrim sudionikom u dijagnostici von Willebrandove bolesti (13).

### 1.5. Von Willebrandov faktor

Von Willebrandov faktor je glikoprotein plazme koji se sintetizira u endotelnim stanicama i megakariocitima. Nakon sinteze se izlučuje izravno u krv ili se pohranjuje u Wiebel-Palade tijelima (14). Nakon ozljede endotela pohranjeni von Willebrandov faktor se otpušta. Tada počinje obavljati svoju osnovnu funkciju, a to je posredovanje u adheziji trombocita u primarnoj hemostazi. Važnu ulogu ima i u sekundarnoj hemostazi gdje sudjeluje kao nosač faktora zgrušavanja FVIII u cirkulaciji i sprečava njegovu razgradnju (15). Manjak von Willebrandova faktora u krvnoj plazmi ili poremećaj njegove funkcije (smanjena aktivnost) uzrokuju von Willebrandovu bolest. To je najčešći nasljedni poremećaj zgrušavanja krvi kod ljudi. Istraživanja su pokazala da čak 1 % opće populacije boluje od ove bolesti (16). Najčešći simptomi bolesti su krvarenje u sluznicu i kožu, izrazito obilne menstruacije kod žena, pojačano krvarenje iz rana i nakon stomatoloških zahvata, te postoperativno krvarenje (17).

### 1.6. Verifikacija referentnih intervala

Prilikom uvođenja nove metode u rutinski rad kliničkog laboratorija potrebno je odrediti referentne intervale s kojima će se uspoređivati rezultati analize uzoraka pacijenata. Izrada referentnih intervala je izuzetno zahtjevan i ekonomski neisplativ proces. Upravo iz tih razloga se velik broj laboratorija odluči preuzeti i verificirati referentne intervale koje je odredio proizvođač (18). Institut za kliničko laboratorijske standarde (engl. The Clinical & Laboratory Standards Institute, CLSI) je izdao dokument koji sadrži preporuke koje se odnose na definiranje, uspostavljanje i verifikaciju referentnih intervala. Ove preporuke opisuju tri načina verifikacije referentnih intervala. Prvi način je metoda subjektivne procjene. Ova metoda primjenjiva je samo u slučaju velike sličnosti predanalitičkih koraka, laboratorijskih metoda i obilježja populacije između laboratorija koji provodi postupak verifikacije referentnih intervala i laboratorija koji je izdao referentne intervale. Samo u ovom slučaju nije potrebna analiza uzoraka referentnih osoba, ali ova metoda se ne upotrebljava često. Drugi način je verifikacija pomoću velike skupine referentnih osoba pri čemu se analiza vrši na uzorcima od 60 do 120 osoba. Broj potrebnih uzoraka je vrlo visok i sličan onome koji je potreban za početno određivanje referentnih intervala, pa se ni ovaj način ne koristi često. Najčešće korišteni način verifikacije referentnih intervala je verifikacija pomoću male skupine referentnih osoba. U ovom slučaju prikupljaju se uzorci od 20 osoba koje zadovoljavaju sve kriterije postavljene za referentnu populaciju. Ako  $\leq 2$  od 20 uzoraka odstupaju od referentnih intervala, oni se mogu

prihvatiti i koristiti. Ako 3 ili 4 uzorka odstupaju od referentnih intervala, potrebno je prikupiti dodatnih 20 uzoraka od osoba koje zadovoljavaju sve kriterije postavljene za referentnu populaciju i na njima izvršiti analize. Ako  $\geq 5$  uzoraka odstupa od referentnih intervala oni se odbijaju i potrebno je izraditi nove referentne intervale za ispitivanu populaciju (19).

## 2. CILJEVI

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. Verificirati referentne intervale preuzete od proizvođača analizatora PFA-200 za:
  - a) vrijeme potrebno za nastanak trombocitnog ugruška, tzv. vrijeme zatvaranja (engl. closure time, CT) nakon aktivacije trombocita uporabom testnih uložaka obloženih agonistima trombocita kolagen/adrenalin (COL/EPI).
  - b) vrijeme potrebno za nastanak trombocitnog ugruška, tzv. vrijeme zatvaranja (engl. closure time, CT) nakon aktivacije trombocita uporabom testnih uložaka obloženih agonistima trombocita kolagen/ADP (COL/ADP).
2. Odrediti aktivnost von Willebrandovog faktora i ispitati korelaciju s rezultatima analize na analizatoru funkcije trombocita PFA-200.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Ustroj studije

Ovo istraživanje provedeno je u obliku presječne studije. To je opisno istraživanje koje se izvodi u jednoj određenoj vremenskoj točki i rezultira uvidom u stanje populacije koja se istražuje, a provodi se nad skupinom ispitanika koja pripada ciljanoj populaciji (20).

#### 3.2. Ispitanici

Istraživanje je obuhvatilo 20 zdravih dobrovoljaca (muškaraca i žena), dobi od 18 do 51 godine, bez akutnih i kroničnih bolesti i koji deset dana prije vađenja krvi nisu uzimali sljedeće lijekove: nesteroidne antireumatske lijekove, antibiotike, antihipertenzive, diuretike, beta blokatore, blokatore kalcijevih kanala, vazodilatatore (nitroglicerina i nitroglicerina) i psihofarmake. Svi ispitanici bili su obaviješteni o istraživanju i dobrovoljno su pristali sudjelovati u istraživanju.

#### 3.3. Materijal

Uzorci venske krvi dobrovoljaca prikupljeni su venepunkcijom u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Osijek između 7:30 i 10 sati ujutro, natašte. Uzorci krvi uzeli su se na antikoagulans 3,2 %-tni puferirani natrijev citrat u BD Vacutainer (BD, New Jersey, SAD). Omjer krvi i antikoagulansa bio je 9 : 1. Svi prikupljeni uzorci su bili adekvatni prema kriterijima kvalitete. Za istraživanje su se koristili uzorci pune krvi i krvne plazme ispitanika koji su bili na sobnoj temperaturi do analize. Krvna plazma je pripravljena centrifugiranjem krvi tijekom 15 minuta na 1500 x g na sobnoj temperaturi.

#### 3.4. Metode

Na analizatoru funkcije trombocita PFA-200 se iz pune krvi ispitanika izmjerilo vrijeme potrebno za nastanak trombocitnog ugruška nakon aktivacije trombocita uporabom testnih uložaka obloženih agonistima trombocita kolagen/adrenalin i kolagen/ADP. Ova analiza učinjena je u roku od 2 h nakon uzorkovanja krvi. Iz krvne plazme ispitanika se odredila aktivnost von Willebrandovog faktora s reagensom Innovance VWF Ac na uređaju Sysmex CS-2500. Ova analiza je odrađena je u roku od 4 h od uzorkovanja.

#### 3.4.1. Analizator funkcije trombocita PFA-200

Analizator funkcije trombocita Innovance PFA-200 proizvođača Siemens (Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Njemačka) koristio se za procjenu funkcije trombocita zajedno s testnim ulošcima obloženim s agonistima trombocita kolagenom i adrenalinom (COL/EPI), te kolagenom i ADP-om (COL/ADP). Testni ulošci se, izvan vremena uporabe, pohranjuju u hladnjaku. 15 minuta prije analize svakog uzorka krvi ispitanika ovog istraživanja testni ulošci su se izvadili iz hladnjaka kako bi se zagrijali na sobnoj temperaturi i pripremili za uporabu. Svaki uzorak krvi ispitanika bio je obilježen brojem koji se zajedno s podacima o ispitaniku upisao u program analizatora. S testnih uložaka je uklonjena zaštitna folija i postavili su se na karusel analizatora funkcije trombocita PFA-200. Nakon toga, epruveta pune krvi se promiješala 3 - 4 puta i u spremnik za uzorak na kaseti testnog uložka automatskom pipetom se prenijelo 800  $\mu$ L krvi. Za potpunu analizu krvi jednog ispitanika bilo je potrebno 1600  $\mu$ L krvi, odnosno 800  $\mu$ L za testni uložak COL/EPI i 800  $\mu$ L za testni uložak COL/ADP. Nakon pripreme uzoraka započela je analiza koja je automatizirana. Krajnji cilj analize je formiranje trombocitnog ugruška na otvoru što rezultira potpunim zaustavljanjem protoka krvi. Upravo ovo vrijeme potrebno za stvaranje trombocitnog ugruška, vrijeme zatvaranja (engl. closure time, CT), se koristi kao mjera funkcije trombocita na analizatoru PFA-200. Ovim istraživanjem uzastopno se mjerilo vrijeme zatvaranja na testnim ulošcima COL/EPI i COL/ADP iz uzorka krvi jednog ispitanika. Po završetku analize rezultati su se zabilježili, a testne kasete uklonile.

#### 3.4.2. Aktivnost von Willebrandovog faktora

Aktivnost von Willebrandovog faktora određena je imunoturbidimetrijskom metodom. Upotrijebljen je reagens Innovance VWF Ac proizvođača Siemens (Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Njemačka) i automatski koagulacijski analizator Sysmex CS-2500 proizvođača Sysmex (Sysmex Corporation, Norderstedt, Germany) prema izvornom protokolu proizvođača reagensa. Reagens Innovance VWF Ac sadrži čestice polistirena obložene antitijelima protiv glikoproteina Ib. GPIb je glavni receptor za von Willebrandov faktor na trombocitima. Pri analizi se u reakciju dodaje rekombinantni GPIb koji se veže na antitijela protiv GPIb-a i na von Willebrandov faktor iz uzorka ispitanika. Ovim vezanjem dolazi do reakcije aglutinacije čestica što se mjeri porastom apsorbance. Promjena apsorbance korelira s količinom, tj. aktivnošću von Willebrandovog faktora u uzorku ispitanika (21). Kalibracijska krivulja s kojom je utvrđen odnos aktivnosti von Willebrandovog faktora i promjene apsorbance je načinjena sa humanom plazmom SHP proizvođača Siemens (Siemens Healthcare

Diagnostics, Marburg, Njemačka), a unutarnja kontrola kvalitete je provedena prije svakog mjerenja s kontrolnim plazmama Control N ili Control P proizvođača Siemens (Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Njemačka).

#### **3.5. Statističke metode**

Za statističku analizu koristio se statistički program MedCalc Statistical Software (inačica 22.007, MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; 2023). Podatci su opisani deskriptivnom statistikom. Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je Shapiro-Wilkovim testom. Numeričke varijable koje slijede normalnu raspodjelu opisane su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom, a numeričke varijable koje ne slijede normalnu raspodjelu opisane su medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Međusobna povezanost numeričkih varijabli testirana je i opisana Spearmanovim koeficijentom korelacije. Razina statističke značajnosti bila je postavljena na  $p = 0,05$ .

## 4. REZULTATI

Rezultati analize dobiveni na analizatoru PFA-200 uz uporabu kolagen/adrenalin testnog uloška prikazani su u Tablici 1. Izmjerene vrijednosti nalaze se u intervalu od 81 do 188 sekundi, te prema Shapiro-Wilkovom testu odstupaju od normalne raspodjele. Vrijednost medijana iznosi 108, a interkvartilni raspon kreće se od 100 do 119 sekundi. Predloženi referentni interval za ovu metodu koji je izradio proizvođač je 85 - 165 s. CT-ovi za dva uzorka odstupaju od referentnih intervala i iznose 81 s i 188 s. Oni su podebljano obilježeni u tablici (Tablica 1).

**Tablica 1.** Prikaz vremena potrebnog za nastanak trombotičnog ugruška (CT) na analizatoru funkcije trombocita PFA-200 uz uporabu kolagen/adrenalin (COL/EPI) testnog uloška.

UZORAK	CT uz COL/EPI (s)
UZORAK 1	100
UZORAK 2	109
UZORAK 3	<b>188</b>
UZORAK 4	118
UZORAK 5	161
UZORAK 6	<b>81</b>
UZORAK 7	89
UZORAK 8	106
UZORAK 9	121
UZORAK 10	105
UZORAK 11	109
UZORAK 12	126
UZORAK 13	110
UZORAK 14	102
UZORAK 15	132
UZORAK 16	107
UZORAK 17	112
UZORAK 18	100
UZORAK 19	96
UZORAK 20	98



Rezultati analize dobiveni na analizatoru PFA-200 uz uporabu kolagen/ADP testnog uloška prikazani su u Tablici 2. Izmjerene vrijednosti nalaze se u intervalu od 69 do 114 sekundi, te prema Shapiro-Wilkovom testu slijede normalnu raspodjelu. Aritmetička sredina izmjerenih vrijednosti iznosi 85,7 uz standardnu devijaciju 11,72. Predloženi referentni interval za ovu metodu koji je izradio proizvođač je 71 - 118 s. CT-ovi za dva uzorka odstupaju od referentnih intervala i iznose 69 s i 70 s. Oni su podebljano obilježeni u tablici (Tablica 2).

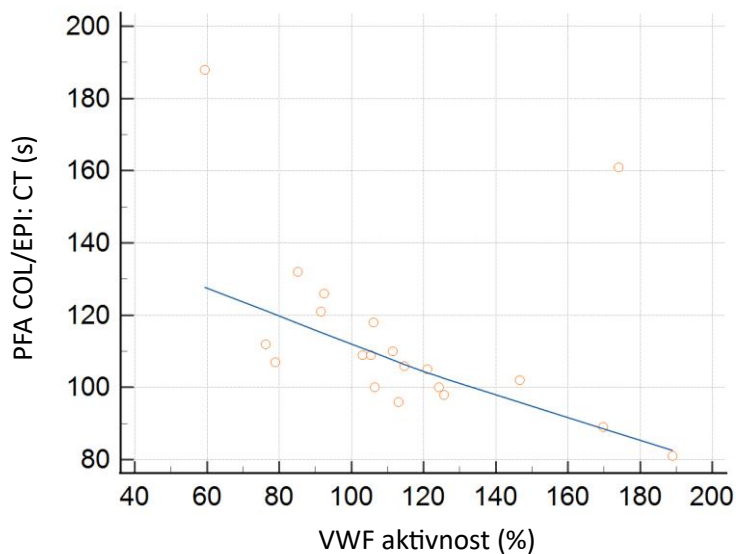
**Tablica 2.** Prikaz vremena potrebnog za nastanak trombocitnog ugruška (CT) na analizatoru funkcije trombocita PFA-200 uz uporabu kolagen/ADP (COL/ADP) testnog uloška.

<b>UZORAK</b>	<b>CT uz COL/ADP (s)</b>
UZORAK 1	83
UZORAK 2	83
UZORAK 3	114
UZORAK 4	89
UZORAK 5	92
UZORAK 6	73
UZORAK 7	76
UZORAK 8	84
UZORAK 9	105
UZORAK 10	85
UZORAK 11	85
UZORAK 12	90
UZORAK 13	71
UZORAK 14	75
UZORAK 15	98
UZORAK 16	93
UZORAK 17	88
UZORAK 18	91
UZORAK 19	<b>69</b>
UZORAK 20	<b>70</b>

Rezultati vrijednosti aktivnosti von Willebrandovog faktora izmjerenih na uređaju Sysmex CS-2500 nalaze se u Tablici 3. Izmjerene vrijednosti nalaze se u intervalu od 59,3 do 189, te prema Shapiro-Wilkovom testu slijede normalnu raspodjelu. Aritmetička sredina izmjerenih vrijednosti iznosi 114,72 uz standardnu devijaciju 33,61. Referentni interval za ovu metodu je 48 - 173 %. Vrijednosti koje odstupaju od referentnih intervala su podebljane u tablici (Tablica 3).

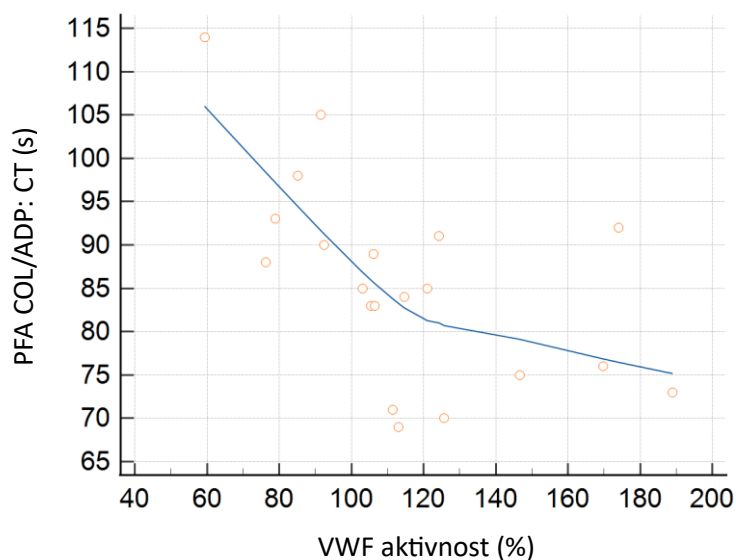
**Tablica 3.** Prikaz vrijednosti aktivnosti von Willebrandovog faktora izmjerenih na uređaju Sysmex CS-2500 s reagensom Innovance VWF Ac.

<b>UZORAK</b>	<b>Aktivnost VWF (%)</b>
UZORAK 1	106,5
UZORAK 2	105,5
UZORAK 3	59,3
UZORAK 4	106,2
UZORAK 5	<b>174,1</b>
UZORAK 6	<b>189,0</b>
UZORAK 7	169,7
UZORAK 8	114,6
UZORAK 9	91,6
UZORAK 10	121,0
UZORAK 11	103,1
UZORAK 12	92,4
UZORAK 13	111,4
UZORAK 14	146,7
UZORAK 15	85,2
UZORAK 16	78,9
UZORAK 17	76,2
UZORAK 18	124,3
UZORAK 19	113,0
UZORAK 20	125,7



**Slika 1.** Međusobna povezanost vremena potrebnog za nastanak trombotičnog ugruška uz COL/EPI testni uložak na PFA-200 i aktivnosti von Willebrandovog faktora.

Rezultati analize povezanosti testiranih varijabli pokazali su negativnu korelaciju. Spearmanov koeficijent korelacije  $\rho = -0,632$  (95 %-tni interval pouzdanosti  $-0,840$  do  $-0,263$ ) uz razinu značajnosti  $P = 0,0028$  (Slika 1).



**Slika 2.** Međusobna povezanost vremena potrebnog za nastanak trombotičnog ugruška uz COL/ADP testni uložak na PFA-200 i aktivnosti von Willebrandovog faktora.

Rezultati analize povezanosti testiranih varijabli pokazali su negativnu korelaciju. Spearmanov koeficijent korelacije  $\rho = -0,588$  (95 %-tni interval pouzdanosti  $-0,818$  do  $-0,196$ ) uz razinu značajnosti  $P = 0,0064$  (Slika 2)

## 5. RASPRAVA

Primarna hemostaza ima vrlo značajnu ulogu u organizmu, a poremećaj njezine funkcije može dovesti do ozbiljnih posljedica za organizam. Pojačana aktivnost hemostatskog sustava može dovesti do patoloških procesa poput infarkta miokarda, moždanog udara, plućne embolije ili arterijske i duboke venske tromboze. Također, u slučaju ozljede krvne žile i tkiva kod osobe čiji hemostatski sustav nije u ravnoteži, može doći do pretjeranog krvarenja i gubitka velike količine krvi s obzirom da u tom slučaju hemostatski sustav ne može obavljati jednu od svojih glavnih uloga, a to je stvaranje trombocitnog ugruška. Kada se navedene komplikacije uzmu u obzir, jasna je ozbiljnost ovih poremećaja. Postojeće pretrage za dijagnozu poremećaja primarne hemostaze su vrijeme krvarenja i agregacija trombocita s različitim agonistima. Naime, vrijeme krvarenja nema visoku specifičnost i osjetljivost, a agregacija trombocita ima. Ipak, ova pretraga je tehnički zahtjevna i obavljaju ju samo specijalizirani laboratoriji, pa je stoga neophodna kvalitetna probirna pretraga za dijagnostiku poremećaja primarne hemostaze. Jedno od rješenja je analizator funkcije trombocita PFA. Prva verzija analizatora PFA, PFA-100, na tržištu i u laboratorijskom radu prisutna je od sredine 1990-ih godina. Trenutno se u kliničke laboratorije uvodi njegov nasljednik, PFA-200. Usporedbom ova dva uređaja može se zaključiti da je novija verzija uređaja, PFA-200, modernija verzija uređaja koji radi na istom principu (22). Upravo s ciljem uvođenja analizatora funkcije trombocita PFA-200 u rad kliničkog laboratorija Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Osijek provedeno je ovo istraživanje. Naime, prije uvođenja analizatora u rutinsku uporabu u kliničkom laboratoriju potrebno je odrediti referentne intervale. Moguće je i verificirati intervale preuzete od proizvođača. To je potrebno učiniti kako bi se provjerilo mogu li se predloženi referentni intervali primijeniti na populaciju određenog područja. Ovo dovodi do prvog cilja ovog istraživanja, a to je verificirati referentne intervale preuzete od proizvođača analizatora funkcije trombocita PFA-200 (18). Odabrana je verifikacija pomoću malog uzorka referentnih osoba, što znači da su se uzorci krvi uzorkovali od 20 zdravih osoba i usporedili s referentnim vrijednostima koje predlaže proizvođač. Prema CLSI smjernicama za ovaj način verifikacije referentnih vrijednosti  $\leq 2$  izmjerene vrijednosti smiju odstupati od referentnih intervala kako bi se oni usvojili (19). Predloženi interval za vrijeme potrebno da bi nastao trombocitni ugrušak na analizatoru funkcije trombocita PFA-200 nakon aktivacije trombocita na kolagenu uz adrenalin (COL/EPI testni uložak) iznosi 85 - 165 sekundi. Od 20 ispitanika našeg istraživanja, izmjerena vrijednost njih 18 uklapa se u predložene referentne intervale. To

znači da se, prema CLSI smjernicama, ovaj referentni interval može prihvatiti i početi primjenjivati u rutinskom radu, odnosno da se ovaj referentni interval može iskazivati na nalazu kako bi se nalazi pacijenata uspoređivali s njim. Ista situacija dogodila se i pri mjerenju vremena potrebnog za nastanak trombotičnog ugruška na uređaju PFA-200 nakon aktivacije trombocita na kolagenu uz ADP (COL/ADP testni uložak). U referentne vrijednosti proizvođača koje iznose 71 - 118 sekundi uklopile su se vrijednosti 18 uzoraka, dok su dva uzorka bila izvan referentnih vrijednosti. To znači da se, prema CLSI smjernicama, i ovi referentni intervali mogu prihvatiti i koristiti u rutini. Ovim zaključcima ispunio se prvi cilj istraživanja i uspješno su se verificirali referentni intervali za analizator funkcije trombocita Innovance PFA-200. Istraživanje s istim ciljem, ali mnogo većim brojem sudionika provedeno je u Australiji. Šest glavnih sastavnica organizacije NSW Health Pathology sudjelovale su u procesu verifikacije referentnih intervala za analizatore PFA-100 i PFA-200. Svaka od njih je analizirala 22 - 48 uzoraka referentnih osoba. Konačne referentne vrijednosti kojima se istraživanje završilo su 90 - 160 s (testni uložak COL/EPI) i 70 - 124 s (testni uložak COL/ADP). Zanimljivo je vidjeti da su referentne vrijednosti verificirane u Osijeku i Australiji vrlo slične s obzirom na to da je udaljenost između navedene dvije lokacije velika i postoji razlika u načinu života. Također, populacija u Australiji se značajno razlikuje od populacije u Hrvatskoj zbog zastupljenosti različitih rasnih grupa, dok u Hrvatskoj značajno dominira bijela rasa (13). Drugi cilj istraživanja bio je odrediti aktivnost von Willebrandovog faktora i ispitati korelaciju s rezultatima analize na analizatoru funkcije trombocita PFA-200. S obzirom da je osnovna funkcija von Willebrandovog faktora posredovanje u adheziji trombocita u primarnoj hemostazi, bitno je uzeti u obzir aktivnost von Willebrandovog faktora kao važan parametar pri dijagnostici poremećaja primarne hemostaze. Budući da je von Willebrandov faktor važan faktor u adheziji trombocita na kolagen, a to se, između ostalog, ispituje pomoću PFA, očekuje se da aktivnost von Willebrandovog faktora korelira s CT-om PFA. Statističkom obradom podataka došlo se do zaključka da testovi rađeni na PFA negativno koreliraju s aktivnošću von Willebrandovog faktora. To pojednostavljeno znači da su obrnuto proporcionalni, odnosno da će, što je niža vrijednost aktivnosti von Willebrandovog faktora, CT biti duži. Ovim saznanjima ispunio se i drugi cilj istraživanja. Slično istraživanje je provedeno i u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Miloš i sur. ispitivali su poremećaje primarne hemostaze koristeći analizator PFA-100, prethodnik analizatora ovog istraživanja. Oni su odredili referentne intervale iz uzoraka 44 zdrave osobe. Za testni uložak COL/EPI referentni interval iznosio je 80 - 160 s, a za COL/ADP 60 - 120 s. Iz navedenog se vidi da su referentne vrijednosti navedenog istraživanja gotovo identične vrijednostima

verificiranih ovim istraživanjem, odnosno 85 - 165 s za testni uložak COL/EPI, a 71 - 118 s za testni uložak COL/ADP. S obzirom da lokacije provedenih istraživanja, Osijek i Zagreb, nisu značajno udaljene pretpostavlja se da su osobine i određeni parametri ispitivane populacije s tih područja slične. To rezultira i visokom podudarnošću referentnih intervala za ispitivane parametre. Miloš i sur. su ispitali i povezanost parametara izmjerenih na PFA-100 sa aktivnošću von Willebrandovog faktora iz uzoraka koji su analizirali. Njihovim istraživanjem oni su također zaključili da postoji negativna korelacija između mjerenih parametara, odnosno  $r = -0,4003$  za COL/EPI i  $r = -0,5223$  za COL/ADP (23). Ove vrijednosti tumače se kao negativne korelacije pri čemu korelacija koeficijenta korelacije  $r = -0,5223$  spada u umjerenu korelaciju, a korelacija koeficijenta korelacije  $r = -0,4003$  spada u slabu korelaciju. Koeficijenti korelacije dobiveni ovim radom su  $r = -0,632$  za COL/EPI i  $r = -0,588$  za COL/ADP. Vidimo da se vrijednosti koeficijenata korelacije COL/EPI s von Willebrandovim faktorom između dva istraživanja značajnije razlikuju u odnosu na vrijednosti koeficijenata korelacije COL/ADP s von Willebrandovim faktorom koje su gotovo jednake. Oba koeficijenta korelacije ovog istraživanja ukazuju na to da je korelacija umjerena. Očekivano je da su korelacije slabe do umjerene jer se vezanje trombocita na kolagen u subendotelu odvija putem nekoliko receptora, a ne isključivo putem von Willebrandovog faktora. Iz tog razloga na rezultat analize na PFA-200 mogu utjecati i ostali mehanizmi adhezije i aktivacije trombocita (24).

## 6. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Verifikacija referentnih intervala preuzetih od proizvođača analizatora funkcije trombocita PFA-200 za vrijeme zatvaranja (CT) uz uporabu testnih uložaka obloženih kolagenom i adrenalinom (COL/EPI) uspješno je provedena i prihvaćaju se svi ispitani referentni intervali.
2. Verifikacija referentnih intervala preuzetih od proizvođača analizatora funkcije trombocita PFA-200 za vrijeme zatvaranja (CT) uz uporabu testnih uložaka obloženih kolagenom i ADP-om (COL/ADP) uspješno je provedena i prihvaćaju se svi ispitani referentni intervali.
3. Potvrđena je negativna korelacija između aktivnosti von Willebrandovog faktora i vremena potrebnog za stvaranje trombocitnog ugruška na analizatoru funkcije trombocita PFA-200 nakon aktivacije trombocita na kolagenu uz adrenalin.
4. Potvrđena je negativna korelacija između aktivnosti von Willebrandovog faktora i vremena potrebnog za stvaranje trombocitnog ugruška na analizatoru funkcije trombocita PFA-200 nakon aktivacije trombocita na kolagenu uz ADP.

## 7. SAŽETAK

### CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Prvi cilj ovog istraživanja je verificirati referentne intervale preuzete od proizvođača analizatora funkcije trombocita PFA-200. Drugi cilj istraživanja je odrediti aktivnost von Willebrandovog faktora i ispitati korelaciju s rezultatima analize na PFA-200.

### NACRT STUDIJE

Ovo istraživanje provedeno je u obliku presječne studije.

### ISPITANICI I METODE

Istraživanje je obuhvatilo 20 dobrovoljnih ispitanika, bez akutnih i kroničnih bolesti, koji 10 dana prije vađenja krvi nisu uzimali lijekove koji bi mogli utjecati na rezultate istraživanja. Iz pune krvi ispitanika na analizatoru funkcije trombocita Innovance PFA-200 se izmjerilo vrijeme potrebno za nastanak trombotičnog ugruška (CT) uz testne uloške COL/EPI i COL/ADP, a iz krvne plazme se odredila aktivnost von Willebrandovog faktora na uređaju Sysmex CS-2500 s reagensom Innovance VWF Ac. Rezultati su obrađeni statističkim programom MedCalc.

### REZULTATI

Rezultati analize funkcije trombocita s testnim ulošcima COL/EPI i COL/ADP na PFA-200 su se usporedili s referentnim intervalima preuzetim od proizvođača. Vrijednost CT-a u 18 od 20 uzoraka obje analize uklopila se u preporučene referentne vrijednosti. Verificirani su referentni intervali 85 - 165 s za COL/EPI, a 71 - 118 s za COL/ADP. Odredila se aktivnost von Willebrandovog faktora, te se ispitala njezina korelacija s rezultatima s PFA. Dobiveni faktori korelacije iznose  $\rho = -0,632$  za COL/EPI i  $\rho = -0,588$  za COL/ADP.

### ZAKLJUČAK

Verifikacija referentnih intervala preuzetih od proizvođača analizatora funkcije trombocita PFA-200 uspješno je provedena i prihvaćaju se svi ispitani referentni intervali. Potvrđena je negativna korelacija između aktivnosti von Willebrandovog faktora i rezultata analize s PFA-200.

### KLJUČNE RIJEČI

hemostaza, primarna hemostaza; PFA-200; von Willebrandov faktor



## 8. SUMMARY

### VERIFICATION OF REFERENCE INTERVALS FOR THE PLATELET FUNCTION ANALYZER INNOVANCE PFA-200

#### OBJECTIVES

The first objective of this research is to verify the reference intervals received from the manufacturer of the platelet function analyzer PFA-200. The second objective of it is to determine the activity of the von Willebrand factor and to examine the correlation between it and the results of the analysis on the PFA-200.

#### STUDY DESIGN

The study was conducted as a cross-sectional study.

#### PARTICIPANTS AND METHODS

The study included 20 voluntary participants without acute and chronic diseases who did not take medications which could affect the study results ten days before blood draws. The time required for platelet plug formation (closure time, CT) was measured in whole blood samples of volunteers on the platelet function analyzer Innovance PFA-200 with test cartridges COL/EPI and COL/ADP. The von Willebrand factor activity was determined in blood plasma samples on the Sysmex CS-2500 device with the Innovance VWF Ac reagent. The results were processed by the statistical program MedCalc.

#### RESULTS

The results of the platelet function analysis with COL/EPI and COL/ADP test cartridges on the PFA-200 were compared with reference intervals received from the manufacturer. The CT value of 18 out of 20 samples from both analyses fit into the recommended reference intervals. Reference intervals of 85 - 165 s for COL/EPI and 71 - 118 s for COL/ADP were verified. The von Willebrand factor activity was determined, and its correlation with the results from the PFA-200 was examined. The resulting correlation factors are  $\rho = -0.632$  for COL/EPI and  $\rho = -0.588$  for COL/ADP.

**CONCLUSION**

Verification of reference intervals received from the manufacturer of the platelet function analyzer PFA-200 was successful, and all tested reference intervals were accepted. A negative correlation between the von Willebrand factor activity and analysis results from the PFA-200 was confirmed.

**KEY WORDS:**

hemostasis, primary hemostasis; PFA-200; von Willebrand factor

**9. LITERATURA**

1. Guyton A.C., Hall J.E. Medicinska fiziologija. 12. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2012.
2. Labar B, i sur. Hematologija. 5. izd. Zagreb: Školska knjiga; 2017.
3. Premužić Lampič M. Hematologija: klinička i laboratorijska. 1. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2000.
4. Gale AJ. Continuing education course #2: current understanding of hemostasis. *Toxicol Pathol.* 2011;39(1):273-80.
5. Topić E, Primorac D, Janković S, Štefanović M, i sur. Medicinska biokemija i laboratorijska medicina u kliničkoj praksi. 2. izd. Zagreb: Medicinska naklada, 2018.
6. Sang Y, Roest M, de Laat B, de Groot PG, Huskens D. Interplay between platelets and coagulation. *Blood Rev.* 2021;46:100733.
7. Aird WC. Endothelial cell heterogeneity. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(1):a006429.
8. Holinstat M. Normal platelet function. *Cancer Metastasis Rev.* 2017;36(2):195-198.
9. Yun SH, Sim EH, Goh RY, Park JI, Han JY. Platelet Activation: The Mechanisms and Potential Biomarkers. *Biomed Res Int.* 2016;2016:9060143.
10. Favalaro EJ. Clinical utility of closure times using the platelet function analyzer-100/200. *Am J Hematol.* 2017;92(4):398-404.
11. Siemens Healthineers. INNOVANCE PFA-200 System. Dostupno na adresi : <https://www.siemens-healthineers.com/hemostasis/systems/innovance-pfa-200>. Datum pristupa: 3.6.2023.
12. Siemens Healthineers. Dade® PFA Collagen/EPI Test Cartridge, Dade® PFA Collagen/ADP Test Cartridge - Rev 10. Upute proizvođača za upotrebu, 2022.
13. Favalaro EJ, Mohammed S, Vong R, Chapman K, Kershaw G, Just S, i sur. Harmonizing platelet function analyzer testing and reporting in a large laboratory network. *Int J Lab Hematol.* 2022;44(5):934-944.

14. Swami A, Kaur V. von Willebrand Disease: A Concise Review and Update for the Practicing Physician. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2017;23(8):900-910.
15. Peyvandi F, Garagiola I, Baronciani L. Role of von Willebrand factor in the haemostasis. *Blood Transfus.* 2011;9(2):3-8.
16. Fogarty H, Doherty D, O'Donnell JS. New developments in von Willebrand disease. *Br J Haematol.* 2020;191(3):329-339.
17. Weyand AC, Flood VH. Von Willebrand Disease: Current Status of Diagnosis and Management. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2021;35(6):1085-1101.
18. Kolić V, Feher Turković L, Šegulja D, Matišić D. Referentni intervali u laboratorijskoj medicini. *Journal of Applied Health Sciences = Časopis za primijenjene zdravstvene znanosti.* 2017;3(1):107-114.
19. Ozarda Y, Higgins V, Adeli K. Verification of reference intervals in routine clinical laboratories: practical challenges and recommendations. *Clin Chem Lab Med.* 2018;57(1):30-37.
20. Wang X, Cheng Z. Cross-Sectional Studies: Strengths, Weaknesses, and Recommendations. *Chest.* 2020;158(1):65-71.
21. Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH. INNOVANCE® VWF Ac – Rev 02. Upute proizvođača za upotrebu, 2011.
22. Favalaro EJ, Pasalic L, Lippi G. Towards 50 years of platelet function analyser (PFA) testing. *Clin Chem Lab Med.* 2022;61(5):851-860.
23. Miloš M, Coen-Herak D, Zadro R. Ispitivanje poremećaja primarne hemostaze uporabom analizatora funkcije trombocita PFA-100. *Biochem Med.* 2006;16(1):107-108.
24. Koeficijent korelacije. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021. Dostupno na adresi:  
<http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=71291>. Datum pristupa: 26. 8. 2023.

## 10. ŽIVOTOPIS

**Ime i prezime:** Larisa Marić

**Datum i mjesto rođenja:** 24. travnja 2000., Osijek, Republika Hrvatska

**Kućna adresa:** Franca Liszta 19, 31300 Beli Manastir

**e-adresa:** larisa.maric8@gmail.com

**Kontakt:** 098 998 5290

### **Obrazovanje:**

2019. - 2023. Medicinski fakultet Osijek, prijediplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika

2015. - 2019. Medicinska škola Osijek, smjer Zdravstvena gimnazija

2007. - 2015. Osnovna škola „Dr. Franjo Tuđman” Beli Manastir