

# Kratka analitička verifikacija metode za određivanje koncentracije PIVKA-II u ljudskom serumu

---

Tisaj, Dora

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:245943>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-10**



Repository / Repozitorij:

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



**Dora Tisaj**

**Kratka analitička verifikacija metode za  
određivanje koncentracije PIVKA-II u ljudskom  
serumu**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Imunokemija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, a izrađen u Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničke bolnice Dubrava pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Anite Somborac Bačura i suvoditeljstvom doc. dr. sc. Lovorke Đerek.

*Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Aniti Somborac Bačura, komentorici doc. dr. sc. Lovorki Đerek te Marijani Jovanović, spec. med. biokemije i lab. medicine na nesebičnom trudu, strpljenju te savjetima koji su uvelike doprinijeli izradi ovog diplomskog rada.*

*Od srca zahvaljujem svojoj obitelji na bezuvjetnoj ljubavi i beskrajnoj podršci u svakome trenutku života. Hvala vam što ste uvijek uz mene na mome putu.*

*Veliko hvala i dragim mi ljudima koji nisu obitelj, ali su velik dio moga života jer svojim postojanjem uljepšavaju svaki dan. Hvala vam što mi stavljate osmijeh na lice.*

*Najbolje stvari u životu nisu stvari, već dragi ljudi oko nas.*

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. PIVKA-II.....	1
1.1.1. Mehanizam nastanka PIVKA-II.....	1
1.2. Klinička pozadina hepatocelularnog karcinoma.....	3
1.2.1. Dijagnostički postupci.....	3
1.2.2. Tumorski biljezi .....	4
1.2.3. Uloga PIVKA-II u hepatokarcinogenezi.....	5
1.3. Imunokemijske metode.....	5
1.3.1. Kemiluminiscentna imunometoda.....	6
1.4. Kratka analitička verifikacija kvantitativnih metoda.....	7
1.4.1. Procjena preciznosti metode.....	9
1.4.2. Preciznost u seriji .....	9
1.4.3. Međupreciznost .....	9
1.4.4. Unutarlaboratorijska preciznost .....	9
1.4.5. Procjena točnosti metode .....	10
1.4.6. Procjena mjerne nesigurnosti metode .....	10
1.4.7. Usporedba dviju metoda.....	11
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	13
3. MATERIJALI I METODE .....	14
3.1. Uzorci .....	14
3.2. Korišteni reagensi .....	14
3.3. Analizator .....	15
3.4. Načelo i izvedba metode.....	15
3.5. Statistička obrada podataka .....	16
3.5.1. Ispitivanje preciznosti metode.....	16
3.5.2. Ispitivanje točnosti metode.....	18

3.5.3.	Procjena mjerne nesigurnosti .....	19
3.5.4.	Usporedba rezultata s rutinskom metodom.....	19
4.	REZULTATI.....	21
4.1.	Rezultati ispitivanja preciznosti metode.....	21
4.2.	Rezultati ispitivanja točnosti metode.....	23
4.3.	Rezultati procjene mjerne nesigurnosti .....	24
4.4.	Rezultati usporedbe ispitivane i rutinske metode .....	26
5.	RASPRAVA .....	30
6.	ZAKLJUČCI.....	33
7.	POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA.....	34
8.	LITERATURA .....	36
9.	SAŽETAK/SUMMARY.....	41

## 1. UVOD

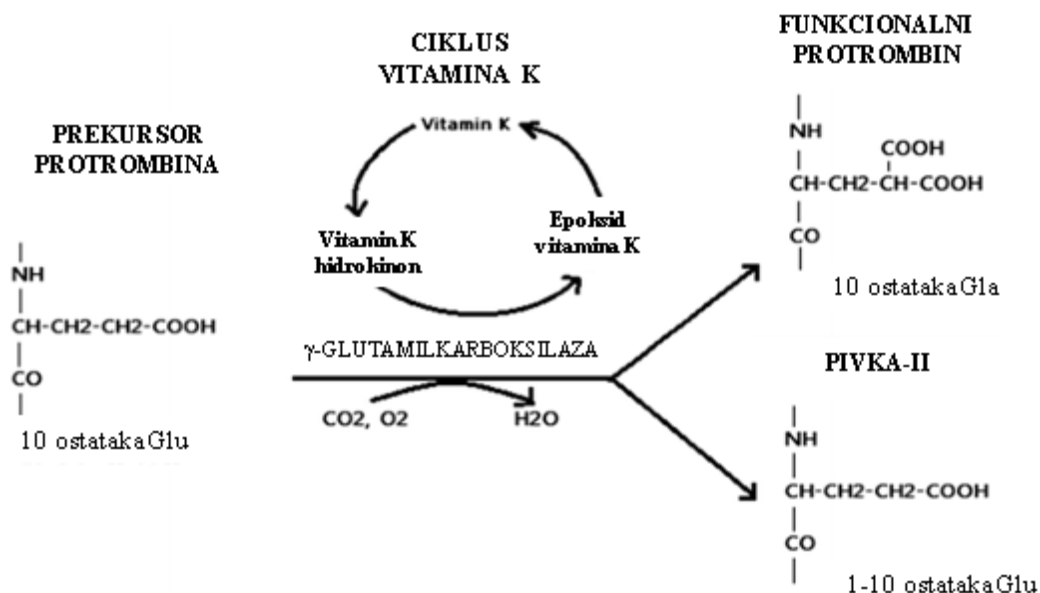
### 1.1. PIVKA-II

PIVKA-II (engl. *Protein Induced by Vitamin K Absence-II or Antagonist-II*), također poznata i pod nazivom DCP (engl. *Des-gamma-Carboxy-Prothrombin*), nezreli je oblik protrombina, koji se sintetizira u jetri u stanju nedostatka vitamina K u organizmu te u prisutnosti antagonista vitamina K. Također, povećane koncentracije PIVKA-II nastaju kao rezultat složenog procesa patogeneze kod hepatocelularnog karcinoma (engl. *Hepatocellular Carcinoma*, HCC) (Marzinke i Dufour, 2020). 1984. godine Liebman i sur. otkrili su da je koncentracija PIVKA-II značajno povećana u serumu bolesnika koji imaju dijagnozu HCC-a zbog čega se počela proučavati korist PIVKA-II kao potencijalnog tumorskog biljega za HCC (Feng i sur., 2021). Nakon što je postala predmetom istraživanja, razne studije su pokazale da je PIVKA-II dijagnostički biljeg visoke specifičnosti i selektivnosti koji se, osim za dijagnozu, koristi i kao prediktor prognoze kod bolesnika oboljelih od HCC-a. Tim je otkrićem PIVKA-II zamijenila dotadašnju upotrebu alfa-fetoproteina (engl. *alpha-fetoprotein*, AFP) kao tumorskog biljega jetrenih bolesti (<http://www.viopath.co.uk/sites/default/files/upload/The%20launch%20of%20a%20new%20pilot%20external%20quality%20assurance%20scheme.pdf>). PIVKA-II obično se koristi u kombinaciji s AFP-om što se pokazalo kao najbolja dijagnostička opcija jer dijagnostička osjetljivost i specifičnost može iznositi i do 94 %, odnosno 98,5 % (Xing. i sur., 2016). Budući da rana dijagnoza poboljšava prognozu bolesti i mogućnost izlječenja, neophodno je pravovremeno utvrditi postojanje bolesti pomoću serumskih biljega koji imaju sposobnost točno, precizno i osjetljivo diferencijalno dijagnosticirati HCC od drugih jetrenih bolesti.

#### 1.1.1. Mehanizam nastanka PIVKA-II

U normalnim fiziološkim okolnostima, prekursor protrombina se karboksilira u jetri putem enzima karboksilaze ovisne o vitaminu K čime se stvara nativni protrombin (<http://www.viopath.co.uk/sites/default/files/upload/The%20launch%20of%20a%20new%20pilot%20external%20quality%20assurance%20scheme.pdf>). Prekursor protrombina ima deset ostataka glutaminske kiseline (engl. *Glutamic acid*, Glu) koji se u jetri posttranslacijski modificiraju u gama-karboksi glutaminsku kiselinu (engl. *Gamma-Carboxyglutamic acid*, Gla) na N-terminalnoj domeni kako bi se stvorila funkcionalna molekula protrombina. Enzim

gama-glutamil karboksilaza zahtijeva vitamin K kao kofaktor koji je u svom aktivnom obliku hidrokinon koji se reciklira u ciklusu vitamina K. U slučajevima nedostatka vitamina K ili u prisutnosti antagonista vitamina K, primjerice antikoagulansa, karboksilacija onemogućena i jetra u cirkulaciju izlučuje nekarboksilirani protrombin koji predstavlja abnormalni koagulacijski čimbenik. Ta nefunkcionalna molekula detektira se kao PIVKA-II (*Slika 1*) (Chan i Sokoll, 2020). Aminokiselinski ostatci Gla ključni su u biološkoj aktivnosti proteina ovisnih o vitaminu K, kao što su faktori koagulacije II, VII, IX i X, proteini C i Z te osteokalcin. Gla aminokiselinski ostatci osiguravaju mjesta kojim će se protein vezati za kalcijeve ione što rezultira aktivirajućom konformacijskom promjenom koja omogućuje povezivanje proteina sa fosfolipidima. Formira se kompleks protrombinaze koji se sastoji od protrombina, faktora Xa, faktora Va i fosfolipida. Kako PIVKA-II predstavlja abnormalnu molekulu protrombina koja ne posjeduje ostatke Gla, takva se molekula ne može vezati za ione kalcija i iz tog razloga predstavlja biološki neaktivnu molekulu u koagulacijskoj kaskadi (<http://www.viopath.co.uk/sites/default/files/upload/The%20launch%20of%20a%20new%20ilot%20external%20quality%20assurance%20scheme.pdf>).



*Slika 1: Mehanizam nastanka PIVKA-II (preuzeto i prilagođeno prema Xing i sur. (2016) uz dopuštenje izdavača).*

## 1.2. Klinička pozadina hepatocelularnog karcinoma

Hepatocelularni karcinom (HCC) jedan je od najčešćih karcinoma u svijetu s visokom stopom smrtnosti i sve većom incidencijom (<https://www.fujirebio.com/en/insights/liver-diseases/pivkaii-a-biomarker-of-liver-cells-for-the-management-of-hepatocellular>).

Drugi je najčešći uzrok smrti od karcinoma kod muškaraca i šesti kod žena u svijetu. Unatoč velikom broju mogućnosti liječenja, 5-godišnje preživljenje bolesnika s HCC-om niže je od 15 %. Loš ishod preživljenja povezan je s činjenicom da se većina slučajeva HCC-a dijagnosticira u uznapredovalom stadiju kada pacijenti nisu podobni za kurativne terapije kao što je kirurška resekcija ili transplantacija jetre (Saitta i sur., 2017). Najčešći uzroci HCC-a su infekcija virusnim hepatitisom (hepatitis B ili C) i ciroza jetre, pri čemu je alkoholizam najčešći uzročnik ciroze jetre (<https://www.fujirebio.com/en/insights/liver-diseases/pivkaii-a-biomarker-of-liver-cells-for-the-management-of-hepatocellular>). Ulogu u karcinogenezi igraju genetički, ali i vanjski čimbenici kao što su toksini iz okoliša, primjerice aflatoksin, arecanut, kontaminacija podzemnih voda industrijskim otpadom te korištenje raznih kancerogenih poljoprivrednih pesticida (Parkash i sur., 2021).

### 1.2.1. Dijagnostički postupci

Šanse za preživljenje oboljelih od HCC-a mogu se značajno povećati pravovremenom dijagnostikom koja bi omogućila odabir najučinkovitijeg liječenja za svakog pojedinog bolesnika. Na temelju te činjenice, međunarodne smjernice preporučuju probir na HCC kod visokorizičnih pacijenata što uključuje pacijente s cirozom bilo koje etiologije pomoću ultrazvuka abdomena dva puta godišnje (Bruix i Sherman, 2011). Međutim, u meta-analizi prospektivnih kohortnih studija, zaključeno je da je ultrazvuk nezadovoljavajuća dijagnostička metoda u otkrivanju HCC-a u ranim fazama, pokazujući ukupnu osjetljivost od samo 63 % (Saitta i sur., 2017).

Ultrazvučne kontrole trebale bi biti nadopunjene dodatnim dijagnostičkim postupcima kako bi postale učinkovite u ranom otkrivanju HCC-a, a to uključuje postupak kompjuterizirane tomografije i magnetske rezonance. No, primjena navedenih tehnika je ograničena zbog njihovih nedostataka kao što su visoka cijena, invazivnost i neosjetljivost na male tumore (Feng i sur., 2021). Iz tog se razloga pribjegava laboratorijskoj dijagnostici pomoću serumskih biljega čija je izvedba manje invazivna, uz zahtjev da korišteni tumorski biljezi posjeduju optimalnu učinkovitost i specifičnost za navedenu bolest. Dostupnost biomarkera koji imaju mogućnost diferencijalne dijagnostike u svrhu razlikovanja regenerativnih i



displastičnih od neoplastičnih čvorova u bolesnika s cirozom i nodularnih lezija dokazanih ultrazvukom bila bi iznimno korisna u kliničkoj praksi (Saitta i sur., 2017).

### 1.2.2. Tumorski biljezi

Jedan od najčešće korištenih serumskih tumorskih biljega za otkrivanje i praćenje HCC-a je AFP. Iako se njegova uloga s vremenom razvijala, brojne studije naglašavaju njegovu suboptimalnu učinkovitost za rano otkrivanje HCC-a. Budući da se serumska koncentracija AFP-a od 20 ng/mL (16,6 kIU/L) smatra graničnom vrijednošću za razlikovanje HCC-a od netumorske patologije, AFP ima visoku stopu lažno negativnih rezultata koja iznosi približno 40 % u otkrivanju tumora u ranom stadiju (Perne i sur., 2023). S druge strane, velik udio bolesnika s cirozom jetre ili kroničnim virusnim hepatitisom bez pridruženog HCC-a često pokazuje lažno pozitivne rezultate. Zaključuje se kako je dijagnostička točnost određivanja koncentracije AFP-a u serumu nezadovoljavajuća zbog niske osjetljivosti koja iznosi između 39 % i 64 % i specifičnosti koja se kreće u rasponu od 76 – 91 % (Perne i sur., 2023).

Tijekom godina dodatno su predloženi potencijalni tumorski biljezi za HCC, kao što je Golgijev protein 73 (engl. *Golgi Protein 73*, GP73), glipikan-3 (engl. *Glypican-3*, GPC3) i citokeratin 19 (engl. *Cytokeratin-19*, CK-19) (Feng i sur., 2021). No, koncentracija GP73 u serumu bolesnika s tumorom jetrenog parenhima može biti povećana, stoga detekcija GP73 nije prikladna za razlikovanje HCC-a i benigne bolesti jetre (Marrero i sur., 2005).

Istraživanjem se došlo do zaključka da su koncentracije GPC3 u serumu povećane u bolesnika s HCC-om, ali da se određivanjem GPC3 ne mogu diferencirati benigne bolesti od ranog stadija HCC-a (Liu i sur., 2010). Nadalje, studije su pokazale da je ekspresija CK-19 povezana s agresivnim napretkom HCC-a uz pojavu metastaza i mikrovaskularne invazije što sugerira da bi se ovaj tumorski biljeg mogao koristiti kao pokazatelj preživljenja i recidiva u bolesnika s HCC-om. Međutim, dodatnim se studijama pokazalo da CK-19 nije dovoljno učinkovit za kliničku primjenu (Kawai i sur., 2015). S druge strane, nakon svog otkrića PIVKA-II postaje novi tumorski biljeg sa svojom dokazanom visokom osjetljivošću i većom specifičnošću za HCC u usporedbi s navedenim potencijalnim biljezima HCC-a (<https://www.synnovis.co.uk/news-and-press/clinical-utility-of-pivka-ii-in-the-diagnosis-of-hepatocellular-carcinoma>).

### 1.2.3. Uloga PIVKA-II u hepatokarcinogenezi

Hepatokarcinogeneza je postupan proces karakteriziran genetskim i molekularnim promjenama u hepatocitima, nakon čega s vremenom slijedi pojava neoplastične lezije koja se može otkriti slikovnim tehnikama (Perne i sur., 2023).

Protrombin, protein koji sudjeluje u kaskadi koagulacije krvi, sintetizira se u jetri. Kako bi se pretvorio u aktivni oblik, nužan je gama-karboksilacijski proces ovisan o vitaminu K.

Međutim, bolesnici s HCC-om imaju poremećeni proces gama-karboksilacije pa se umjesto funkcionalnog protrombina stvara PIVKA-II koja se detektira u serumu (Kinukawa i sur., 2015). Iako odnos između PIVKA-II i pojave HCC-a još uvijek nije u potpunosti razjašnjen, dokazano je da PIVKA-II potiče staničnu proliferaciju jer se veže na receptor čimbenika rasta hepatocita što dovodi do rasta tumora, tumorske invazije i pojave metastaza putem JAK1/STAT3 i ERK1/2 MAPK signalnih putova (Sagar i sur., 2021). Mnoga su istraživanja pokazala da je koncentracija PIVKA-II u serumu povezana s veličinom tumora, vaskularnom invazijom, pojavom intrahepatičkih metastaza te učestalošću recidiva nakon liječenja (Tang i sur., 2005; Koike i sur., 2001; Hamamura i sur., 2000; Imamura i sur., 1999). Zbog toga se PIVKA-II može koristiti kao prognostički prediktor razvoja bolesti te imati bitnu ulogu prilikom odlučivanja o najučinkovitijoj terapiji prema karakterizaciji tumora (Fujita i sur., 2015).

### 1.3. Imunokemijske metode

Imunokemijske metode vrsta su biokemijskih metoda pomoću kojih se identificira i kvantificira nepoznati analit u otopini (uzorku) pomoću specifičnih reakcija između analita (antigen) i protutijela. Reakcija protutijelo-antigen je tipična reverzibilna bimolekularna reakcija koja ima konstante brzine reakcija koje ovise o koncentraciji antigena i protutijela, afinitetu za antigen koji je definiran konstantom asocijacije protutijela za njegov antigen, temperaturi, pH vrijednosti i drugim uvjetima okoline. Imunotestovi temelje se na stvaranju imunokompleksa koji se detektiraju i kvantificiraju različitim fizikalnim i kemijskim metodama pomoću radioaktivnih izotopa, enzima, fluorescentnih tvari ili kemijskih sonda (Darwish, 2006).

### 1.3.1. Kemiluminiscentna imunometoda

Kemiluminiscentna imunometoda (engl. *Chemiluminescence Immunoassay*, CLIA) vrsta je imunokemijske metode pomoću koje se određuje koncentracija analita iz uzorka na temelju intenziteta svjetlosti koju emitira kemijska ili biološka reakcija. CLIA je kombinacija sustava kemiluminiscencije i imunoreakcije jer nastaje kao rezultat specifične reakcije između antigena i protutijela kojom se oslobađa energija koja se očituje kao luminiscencija što omogućuje kvantitativno određivanje željenog analita (Khan i sur., 2023).

Eilhardt Weideman je 1988. prvi osmislio izraz „kemiluminiscencija“, a kemiluminiscentna reakcija odnosi se na emisiju svjetla različitih stupnjeva intenziteta i životnog vijeka koje se uočavaju kao boje koje obuhvaćaju vidljivi spektar zbog kemijskih promjena neke tvari.

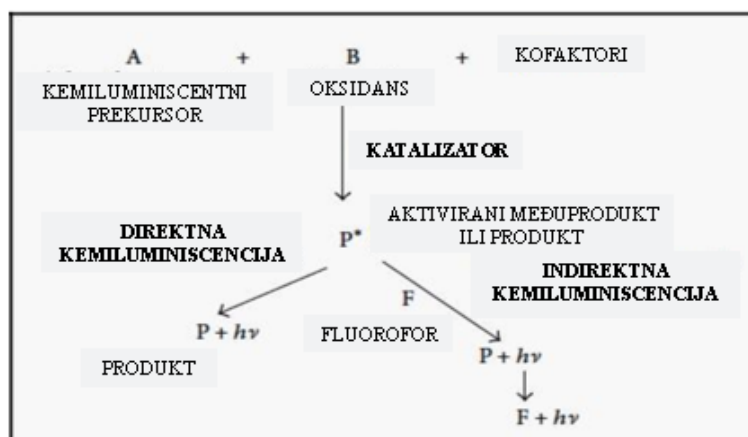
Općenito, kemiluminiscentna reakcija može biti generirana pomoću dva osnovna mehanizma koji uključuju izravnu i neizravnu reakciju nastanka kemiluminiscencije (*Slika 2*).

Zajednički put uključuje da dva reagensa, koji obično predstavljaju supstrat i oksidans, u prisutnosti kofaktora i katalizatora stupaju u reakciju i stvaraju produkt reakcije ili međuprodukt (Azim i sur., 2018). Kao rezultat nastaje emitirana svjetlost koja se naziva luminiscencija, a budući da je izvor energije za pobudu kemijska reakcija radi se o kemiluminiscenciji (Khan i sur., 2023). Najčešći kemiluminiscentni supstrati su luminol, izoluminol i njihovi derivati te derivati akridinijevog estera. Oksidans je molekula enzima koja djeluje na supstrat i tako osigurava katalizu, a najčešće korišteni enzimi jesu alkalna fosfataza i peroksidaza (Azim i sur., 2018).

Direktnom kemiluminiscencijom nastaje produkt reakcije koji je u elektronički pobuđenom stanju i koji izravno prelazi u osnovno stanje uz emisiju fotona.

Kod indirektne kemiluminiscentne reakcije kemiluminiscentni prekursor, odnosno supstrat, pretvara se u elektroničku pobuđenu molekulu (međuprodukt) koja prenosi energiju na fluorofor koji se na taj način pobuđuje te prelazi u svoje osnovno stanje emitirajući foton (Azim i sur., 2018).

CLIA je primjenjiva u različitim područjima znanosti, medicine, farmaceutske industrije i industrije hrane zbog svojih svojstava kao što su visoka osjetljivost, dobra specifičnost, širok raspon primjene, jednostavna oprema i široki linearni raspon (Azim i sur., 2018).



Slika 2: Dva mehanizma kemiluminiscentne reakcije (preuzeto i prilagođeno prema Azim i sur. (2018) uz dopuštenje izdavača).

#### 1.4. Kratka analitička verifikacija kvantitativnih metoda

Cilj rada svakog medicinsko-biokemijskog laboratorija je izdavanje točnih i pouzdanih rezultata svojih aktivnosti. Kako bi se to postiglo, važno je utvrditi sposobnost laboratorija da u svojim uvjetima primjenom odabrane metode postiže željeni cilj. Stoga, potrebno je na prikladan način provjeriti metodu kako bi se utvrdilo ispunjava li ta metoda određene kriterije i je li prikladna za određenu svrhu.

Međunarodna norma ISO 15189 zahtijeva da medicinsko-biokemijski laboratoriji osiguraju pouzdanost i sljedivost rezultata pretraga koje izdaju te da pravodobno procjenjuju njihovu mjernu nesigurnost. Kako bi izdani rezultati laboratorijskih pretraga bili vjerodostojni i međunarodno prihvaćeni, nužna je provedba verifikacije primijenjenih analitičkih metoda. Time se osigurava kvaliteta analitičkog mjerenja jer je tijekom procesa verifikacije moguće uočiti nedostatke pojedine metode tijekom njenog izvođenja te utvrditi moguće uzroke. Dokumentom Direktiva za *in vitro* dijagnostička medicinska sredstva (*Directive on in vitro Diagnostic Medical Devices – IVD 98/79/EC*) na snagu je stupila obaveza svim proizvođačima medicinske opreme koja služe u dijagnostičke svrhe da izvrše potpunu validaciju analitičkih metoda. Iz tog razloga nema potrebe za dodatnom analitičkom validacijom u medicinsko-biokemijskom laboratoriju kojom bi se provjerile sve radne značajke metode, nego je dovoljno provesti verifikaciju primijenjenih analitičkih metoda (Flegar Meštrić, 2010).

Verifikacija već validiranih metoda provodi se u radnim uvjetima laboratorija kako bi se

potvrdila prikladnost i primjenjivost navedenog postupka. Izvodi se uoči prve upotrebe validirane metode u laboratoriju ili kod promjene nekih uvjeta u laboratoriju koji utječu na metodu.

Laboratorij može odabrati smjernice prema kojima će izvršiti proces verifikacije pojedine komponente u cjelokupnom postupku verifikacije analitičke metode. Dostupno je mnogo protokola koji predlažu različit pristup prilikom izvođenja verifikacijskog procesa, a laboratorij mora odrediti optimalni eksperimentalni dizajn koji uravnotežuje kliničku izvedbu i dostupnost resursa (Loh i sur., 2023).

Za postupak verifikacije metode moguće je primijeniti protokol Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (engl. *Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI*). Dokument *EP15-A2 – User Verification of Performance for Precision and Trueness; Approved Guideline-2* predstavlja preporuke u svrhu postizanja visokog stupnja harmonizacije i standardizacije prilikom postupka kratke analitičke verifikacije novouvedene kvantitativne metode. Ovaj protokol koristi terminologiju međunarodno prihvaćenoga mjeriteljskog rječnika VIM 3 (engl. *International Vocabulary and Metrology 3*) koji objedinjuje mjeriteljsku terminologiju u području laboratorijske medicine u svrhu harmonizacije pojmova i definicija u području mjeriteljstva. Protokol opisan u dokumentu *EP15-A2* služi kao pomoć laboratoriju u postupku verifikacije analitičkih metoda koje je validirao proizvođač iscrpnim ispitivanjima (Flegar Meštrić, 2010).

Postupak kratke analitičke verifikacije sastoji se od procjene preciznosti, procjene istinitosti, provjere linearnosti, odnosno mjernog područja, te provjere referentnog intervala. Dodatno, može se napraviti usporedba rezultata s rutinskom metodom. Prije svega navedenog, potrebno je upoznati se s analitičkim sustavom koji obuhvaća upoznavanje s tehničkim karakteristikama analitičkog sustava te postupak kalibracije i provođenja unutrašnje kontrole kvalitete. Na kraju se ocjenjuje provedeni verificirani postupak, odnosno procjenjuje se prihvatljivost dobivenih rezultata. Kriteriji prihvaćanja dobivenih rezultata temelje se na biološkoj varijaciji koji se mogu pronaći u bazama podataka od kojih je najčešće korištena *EFLM Biological Variation Database*. Zbog činjenice što biološki kriteriji prihvatljivosti nisu uvijek dostupni, dobiveni rezultati mogu se ocijeniti usporedbom s kriterijima prihvatljivosti proizvođača reagensa ili rezultatima organizatora vanjske procjene kvalitete (Flegar Meštrić, 2010).

#### 1.4.1. Procjena preciznosti metode

Kroz verifikacijski postupak obuhvaćena je procjena mjerne preciznosti, tj. veličine slučajne pogreške (Flegar Meštrić, 2010). Preciznost se definira kao bliskost slaganja između neovisnih rezultata ispitivanja dobivenih primjenom eksperimentalnog postupka pod propisanim uvjetima. Preciznost se odnosi samo na raspršenje, a ne na odstupanje od prave vrijednosti (Currie i Svehla, 1994).

Veličina slučajne pogreške iskazuje se kao standardno odstupanje (engl. *standard deviation*, S) ili kao koeficijent varijacije (engl. *Coefficient of Variation*, KV). Tijekom kratke analitičke verifikacije određuje se ponovljivost, odnosno preciznost u seriji (engl. *repeatability*), zatim međupreciznost, odnosno preciznost iz dana u dan (engl. *intermediate precision*), te ukupna laboratorijska preciznost, odnosno unutarlaboratorijska preciznost (engl. *within-laboratory*). Podaci za ukupnu laboratorijsku preciznost koriste se za procjenu mjerne nesigurnosti (Flegar Meštrić, 2010).

#### 1.4.2. Preciznost u seriji

Ponovljivost ili preciznost u seriji jest pojam koji opisuje neslaganje u nizu ponovljenih mjerenja kad su sva mjerenja izvedena pod jednakim, nepromijenjenim uvjetima u kojima isti analitičar koristi istu opremu i u istom laboratoriju primjenjuje istu metodu ispitujući istovjetne uzorke kako bi dobio nezavisne rezultate ispitivanja. Ponovljivost se odnosi na varijabilnost koja je posljedica isključivo čimbenika unutar serije (CLSI, 2006).

#### 1.4.3. Međupreciznost

Međupreciznost se definira kao bliskost slaganja između neovisnih rezultata dobivenih istom metodom na identičnom ispitivanom materijalu, ali pod različitim uvjetima što uključuje različite operatere, različite aparate, različiti laboratorije i/ili nakon različitih vremenskih intervala (Currie i Svehla, 1994).

#### 1.4.4. Unutarlaboratorijska preciznost

Unutarlaboratorijska preciznost je parametar kojim se procjenjuje varijabilnost u rezultatima dobivenima unutar istog laboratorija, a koji su podložni različitim utjecajima kao što je

izvođenje analize od strane različitih analitičara tijekom više dana, uz korištenje različitih mjernih instrumenata. Unutarlaboratorijska preciznost procjenjuje se tijekom duljeg vremenskog razdoblja uzimajući u obzir pogrešku ponovljivosti i pogrešku međupreciznosti. (ICH Q2(R1), 2005).

#### 1.4.5. Procjena točnosti metode

Točnost analitičke metode je bliskost slaganja između rezultata ispitivanja i prave vrijednosti (Currie i Svehla, 1994).

Mjera istinitosti numerički se izražava kao sustavna pogreška (eng. *bias*) i/ili iskorištenje, a određuje se usporedbom s referentnom metodom ili primjenom certificiranih referentnih materijala (engl. *Certified Reference Material, CRM*) s iskazanom mjernom nesigurnošću i mjeriteljskom sljedivošću (Flegar Meštrić, 2010).

U slučaju da CRM ne postoji za određeni analit, kao što je slučaj u postupku procjene točnosti metode za kvantitativno određivanje PIVKA-II, točna vrijednost izmjerena referentnom metodom koja se želi postići je nepoznata. U tom se slučaju u izračunu za *bias* koristi vrijednost koncentracije komercijalnog kontrolnog materijala iz navoda proizvođača koja predstavlja ciljnu vrijednost koncentracije analita ili srednja vrijednost kontrolne skupine koja je dobivena iz programa vanjske procjene kvalitete ukoliko u programu sudjeluje značajan broj sudionika s ispitivanom metodom.

S obzirom da nije utvrđena točna koncentracija s kojom bi se vrijednost izmjerena u sklopu verifikacijskog procesa mogla usporediti, vrijednost kriterija prihvatljivosti za točnost je izračunata na temelju kriterija prihvatljivosti za mjernu nesigurnost i dobivene srednje vrijednosti za KV iz procjene preciznosti za obje koncentracijske razine kontrolnih uzoraka.

#### 1.4.6. Procjena mjerne nesigurnosti metode

Prema dokumentu HR EN ISO 15189, mjerna nesigurnost je parametar pridružen rezultatu mjerenja koji karakterizira rasipanje vrijednosti koje se pripisuju mjerenoj veličini.

Pojam mjerne nesigurnosti odnosi se na interval unutar kojeg se, s određenom vjerojatnošću, nalazi rezultat mjerenja (Ćelap, 2015).

Zadaća svakog laboratorija je utvrditi mjerne nesigurnosti za svaki mjerni postupak, definirati zahtjeve izvedbe za mjernu nesigurnost svakog mjernog postupka te redovito ocjenjivati vrijednosti mjerne nesigurnosti (Ćelap, 2015).

Kako bi se izračunala mjerna nesigurnost najprije je potrebno odrediti kriterij prihvatljivosti s kojim će se uspoređivati izračunata vrijednost, a najčešće se dobiva iz podataka za biološku varijabilnost određenog analita. Zatim se utvrđuju i kvantificiraju izvori varijabilnosti, a tu spadaju oni izvori varijabilnosti koji su dio analitičke faze ispitivanja. Prijeanalitičke i poslijeanalitičke izvore nesigurnosti nije moguće kvantificirati, a neke niti kontrolirati. Dva su glavna izvora nesigurnosti u analitičkom dijelu: nesigurnost kao posljedica slučajnih pogrešaka koje se događaju pri izvođenju mjerenja, a koje nije moguće ukloniti, te nesigurnost brojčane vrijednosti mjerene veličine u kalibratoru. Nakon toga slijedi izračun mjerne nesigurnosti u koji ulaze svi izvori varijabilnosti (Ćelap, 2015).

#### 1.4.7. Usporedba dviju metoda

Postupkom usporedbe rezultata s rutinskom metodom ispituje se podudarnost rezultata dobivenih mjerenjem metodom koja je u postupku verifikacije u odnosu na već postojeću metodu, onu koja se do sada koristila u laboratoriju. Primarni cilj usporedbe rezultata dviju metoda je osigurati da promjena metode neće uzrokovati promjenu u laboratorijskim rezultatima pacijenata. Usporedbu metoda može izvršiti proizvođač prilikom validacije nove analitičke metode ili analizatora pri čemu uspoređuje novu metodu sa zlatnim standardom ili referentnom metodom. Usporedbu može vršiti i laboratorij koji uspoređuje novu metodu koja se uvodi u rutinski rad s drugom korištenom metodom (Vuljanić i Saračević, 2022).

Važno je napomenuti kako imunokemijske metode nisu međusobno usporedive te rezultat određivanja koncentracije analita kod istog pacijenta različitim imunokemijskim metodama nije usporediv što u kliničkoj praksi može utjecati na interpretaciju rezultata.

Najčešće korišteni statistički modeli u svrhu procjene usporedivosti metoda su Passing-Bablok i Demingova regresija te Bland-Altmanova analiza (Vuljanić i Saračević, 2022).

Passing-Bablok regresijska analiza je robusna, neparametrijska metoda koja zahtjeva kontinuiranu raspodjelu podataka i linearni odnos između vrijednosti koje su dobivene primjenom dviju analitičkih metoda. Rezultati se prikazuju pravcem regresije uz jednadžbu pravca u kojoj vrijednost odsječka predstavlja konstantno, a vrijednost nagiba proporcionalno odstupanje u mjerenjima. Pomoću vrijednosti granica pouzdanosti od 95 % za odsječak i za nagib dolazi se do zaključka je li razlika statistički značajna na temelju čega se provjerava podudarnost dviju analitičkih metoda te zaključuje o prisutnosti sustavne razlike među njima (Bilić-Zulle, 2011).

Bland-Altmanova analiza grafički prikazuje razliku između uparenih vrijednosti dviju



metoda. Na x-osi (engl. *mean*) nalaze se srednje vrijednosti mjerenja dviju metoda ili samo mjerenja referentne metode, dok se na y-osi (engl. *mean difference*) prikazuje srednja vrijednost razlike mjerenja (Vuljanić i Saračević, 2022). Podaci se prikazuju kao apsolutne razlike, u mjernim jedinicama, ili kao postotak odstupanja između mjerenja. Ovaj se statistički model koristi za procjenu odstupanja između srednjih vrijednosti razlika mjerenja i za procjenu intervala podudarnosti unutar kojeg se nalazi 95 % razlika između mjerenja, ali ne daje informaciju je li interval podudarnosti prihvatljiv. Granice prihvatljivosti se unaprijed definiraju obzirom na kliničke potrebe laboratorija i bioloških razmatranja ili nekih drugih ciljeva (Giavarina, 2015).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Pravovremeno otkrivanje HCC-a postao je pravi izazov zbog čega se posljednjih desetljeća nastoji pronaći specifičan tumorski biljeg. Od 1984. godine kada su znanstvenici uočili povišenu koncentraciju PIVKA-II u HCC-u, ova je molekula postala predmetom brojnih istraživanja. Raznim je studijama zaključeno kako ima veću osjetljivost i specifičnost u odnosu na dotad korišten AFP, što može omogućiti pravodobnu dijagnozu.

U Odjelu za medicinsku biokemiju s analitičkom toksikologijom Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku (KZLD) u Kliničkoj bolnici (KB) Dubrava uvedena je metoda kvantitativnog određivanja PIVKA-II na analizatoru Maglumi 800 (Snibe, Shenzhen, China).

Cilj ovog diplomskog rada je prikazati postupak kratke analitičke verifikacije uvedene metode kroz analitičko ispitivanje preciznosti, točnosti, mjerne nesigurnosti te usporedivosti s rezultatima sustava korištenog u rutinskom radu. Za procjenu preciznosti, točnosti i mjerne nesigurnosti korišteni su komercijalni kontrolni uzorci u dvije koncentracijske razine, a u svrhu ispitivanja usporedivosti novouvedene metode u KZLD KB Dubrava s metodom implementiranom u KBC Rijeka prikupljeno je 40 uzoraka seruma pacijenata upućenih na određivanje PIVKA-II, nakon čega su rezultati obrađeni statističkim metodama.

Svrha verifikacije je donošenje zaključka o analitičkim karakteristikama ispitivane metode prije nego što se ista uvede u rutinski rad kako bi se osiguralo točno i dosljedno određivanje koncentracije PIVKA-II u ljudskom serumu.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Uzorci

Za provedbu kratke analitičke verifikacije korišten je komercijalni kontrolni materijal Maglumi PIVKA-II CONTROL 1 (LOT: 15022011Q1) u kojem je koncentracija PIVKA-II unutar granica referentnog intervala te kontrolni materijal Maglumi PIVKA-II CONTROL 2 (LOT: 15022011Q2) u kojem je koncentracija PIVKA-II izvan granica referentnog intervala. Usporedba je rađena između ispitivanog analizatora Maglumi 800 (Snibe, Shenzhen, China) u KB Dubrava i analizatora Cobas E601 (Roche, Rotkreuz, Switzerland) u KBC Rijeka gdje je prethodno implementirana metoda za određivanje koncentracija PIVKA-II. Usporedba je napravljena na 40 uzoraka seruma pacijenata koji su prikupljeni u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Rijeka.

#### 3.2. Korišteni reagensi

Maglumi® PIVKA-II komplet reagensa koji se koristio u svrhu kratke analitičke verifikacije sastoji se od:

1. 13,5 mL otopine PBS pufera (engl. *Phosphate-Buffered Saline*), sastav: fiziološka otopina s fosfatnim puferom (pH ~ 7,4), natrijev azid ( $\text{NaN}_3$ ) (< 0,1 %) koji se dodaje kako bi se spriječila mikrobna kontaminacija.
2. 2,5 mL otopine magnetskih mikročestica obložene s anti-PIVKA-II monoklonskim protutijelima (~ 10,0 µg/mL) u PBS puferu, dodatak  $\text{NaN}_3$  (< 0,1 %).
3. 2,0 mL otopine kalibratora niske koncentracije, sastav: niska koncentracija PIVKA-II antigena u Tris-HCl puferu,  $\text{NaN}_3$  (< 0,1 %).
4. 2,0 mL otopine kalibratora visoke koncentracije, sastav: visoka koncentracija PIVKA-II antigena u Tris-HCl puferu,  $\text{NaN}_3$  (< 0,1 %).
5. 15,0 mL otopine diluenta, sastav: 0,9 % NaCl.
6. 23,5 mL otopine ABEI (engl. *Amino-Butyl-Ethyl-Isoluminol*), sastav: ABEI konjugiran s anti-PIVKA-II monoklonskim protutijelima (~ 62,5 ng/mL) u PBS puferu,  $\text{NaN}_3$  (< 0,1 %).
7. 2,0 mL kontrolne otopine 1, sastav: niska koncentracija PIVKA-II antigena (50,0 mAU/mL) u Tris-HCl puferu,  $\text{NaN}_3$  (< 0,1 %).

8. 2,0 mL kontrolne otopine 2, sastav: visoka koncentracija PIVKA-II antigena (5000 mAU/mL) u Tris-HCl puferu,  $\text{NaN}_3$  (< 0,1 %).

Svi navedeni reagensi spremni su za upotrebu.

Osim navedenih reagensa, za izvođenje reakcije potrebna je otopina za ispiranje te otopina Starter 1 (NaOH) i otopina Starter 2 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

### 3.3. Analizator

Kratka analitička verifikacija metode za određivanje PIVKA-II provedena je na analizatoru Maglumi 800 (serijski broj: 0101010012022100862). Analizator je proizveden od biomedicinske kompanije Shenzhen New Industries Biomedical Engineering Co., Ltd. (Snibe Co., Ltd).

Maglumi 800 je potpuno automatizirani analizator čiji je princip rada CLIA. Sadrži 40 pozicija na koje se stavljaju uzorci te 9 pozicija za reagense, a oba su dijela analizatora, prostor za uzorke i prostor za reagense, rashlađena. Analiza se vrši pomoću pipetora koji je obložen teflonom kako bi se efekt prijenosa (engl. *carry over*) sveo na minimum. Radna jedinica sastoji se od visoko osjetljivog fotomultiplikatora pomoću kojeg se vrši kemijska reakcija u kivetama ([https://www.snibe.com/zh\\_en/en\\_productArtical.aspx?id=29](https://www.snibe.com/zh_en/en_productArtical.aspx?id=29)).

### 3.4. Načelo i izvedba metode

Metoda kvantitativnog određivanja PIVKA-II u humanom serumu je sendvič CLIA u jednom koraku koja se temelji na reakciji između antigena (PIVKA-II) i protutijela (anti-PIVKA-II), a nastala veza obilježena je ABEI molekulama. ABEI je spoj N-(4-aminobutil)-N-etilizoluminol koji predstavlja kemiluminiscentnu molekulu koja emitira svjetlo u kemijskoj reakciji. Intenzitet svjetla iskazuje se u relativnim jedinicama svjetlosti (engl. *Relative Light Unit*, RLU) na temelju čega se određuje koncentracija analita (antigena, odnosno PIVKA-II molekule).

Prethodno je potrebno izraditi kalibraciju koja uključuje analizu uzoraka poznate koncentracije i za njih se izmjeri intenzitet svjetla koji se izrazi u RLU te se izrađuje kalibracijska krivulja. Uzorcima čiju koncentraciju želimo odrediti izmjeri se intenzitet svjetla izražen u RLU te se pomoću kalibracijske krivulje odredi nepoznata koncentracija uzorka. Test se izvodi tako da se u pomiješa uzorak koji sadrži PIVKA-II čiju koncentraciju želimo

odrediti s puferom i magnetskim mikročesticama koje su obložene anti-PIVKA-II monoklonskim protutijelima. Reakcijska se smjesa inkubira te se ispiru nakon precipitacije u magnetskom polju kako bi se uklonile nespecifično vezane tvari. U kivetu se zatim dodaje drugo anti-PIVKA-II monoklonsko protutijelo obilježeno kemiluminiscentnim spojem ABEI kako bi se formirali “sendvič” kompleksi. Nakon precipitacije u magnetskom polju koje omogućuje da se u kiveti zadrže magnetske čestice na kojima je vezan sendvič kompleks s analitom, supernatant se dekantira i sadržaj reakcijske smjese se ispiru kako bi u kiveti preostale samo magnetske čestice i na njima vezani sendvič kompleksi s analitom. Nakon ciklusa ispiranja, dodaju se otopine Starter 1 (NaOH) i Starter 2 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) koje iniciraju kemiluminiscentnu reakciju i emisiju svjetla. Svjetlosni signal se mjeri fotomultiplikatorom i pretvara u RLU što je proporcionalno koncentraciji PIVKA-II u uzorku. Prema navodima proizvođača, očekivane vrijednosti koncentracija za PIVKA-II izmjerene CLIA metodom iznose < 40 mAU/mL. Budući da rezultati mogu varirati među laboratorijima zbog varijacija u populaciji i metodi, preporuka je da svaki laboratorij izradi svoj referentni interval prilikom verifikacije metode.

### 3.5. Statistička obrada podataka

Za prikaz rezultata i statističku obradu dobivenih rezultata korišten je računalni program Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft, SAD) te statistički program MedCalc (MedCalc Software, Ostend, Belgija).

Pomoću programa Microsoft Office Excel 2003 obrađeni su podaci potrebni za ispitivanje preciznosti, točnosti i mjerne nesigurnosti metode, dok je statistički program MedCalc služio za obradu podataka potrebnih za provedbu usporedbe metoda.

#### 3.5.1. Ispitivanje preciznosti metode

Ispitivanje preciznosti metode provedeno je prema CLSI EP15-A2 protokolu.

Za usporedbu s kriterijima prihvatljivosti koje je deklarirao proizvođač korišteni su komercijalno dostupni kontrolni uzorci u dvije koncentracijske razine – normalnoj i patološkoj. Svaki od dva kontrolna uzorka izmjeren je u triplikatu kroz 5 dana što daje ukupno 15 rezultata po kontrolnom uzorku.

Slučajne pogreške se kvantificiraju mjerenjem nepreciznosti metode i iskazuju kao standardna

devijacija (s) i koeficijent varijacije (KV) (Gašljević, 2010). Koeficijent varijacije iskazuje odnos standardne devijacije prema aritmetičkoj sredini niza mjerenja.

Na temelju usporedbe dobivenih rezultata s tvrdnjama proizvođača donosi se odluka o prihvatljivosti preciznosti metode čime se zaključuje posjeduje li metoda zadovoljavajuću ponovljivost i međupreciznost.

#### a. Ponovljivost

Izračun za ponovljivost (preciznost u seriji) koji predstavlja skupnu standardnu devijaciju izračunatu iz standardnih devijacija dobivenih svakog dana tijekom 5 dana mjerenja:

$$S_r = \sqrt{\frac{S_{d1}^2 + S_{d2}^2 + S_{d3}^2 + S_{d4}^2 + S_{d5}^2}{D}}$$

pri čemu su  $S_{d1}$ ,  $S_{d2}$ ,  $S_{d3}$ ,  $S_{d4}$ ,  $S_{d5}$  standardna odstupanja za svaku seriju određivanja, a D je ukupan broj dana.

Formula za izračun koeficijenta varijacije:

$$KV (\%) = \frac{S_r}{\bar{x}} \times 100$$

pri čemu je  $\bar{x}$  srednja vrijednost svih aritmetičkih sredina kroz 5 dana.

#### b. Međupreciznost

Izračun za međupreciznost (preciznost iz dana u dan) koji predstavlja standardnu devijaciju izračunatu iz aritmetičkih sredina svakog dana određivanja:

$$S_b = \sqrt{\frac{\sum_{d=1}^D (\bar{x}_d - \bar{x})^2}{D - 1}}$$

pri čemu je  $\bar{x}_d$  aritmetička sredina svakog dana određivanja, a  $\bar{x}$  srednja vrijednost svih vrijednosti mjerenja tijekom 5 dana.

Formula za izračun koeficijenta varijacije:

$$KV (\%) = \frac{S_b}{\bar{x}} \times 100$$

pri čemu je  $\bar{x}$  srednja vrijednost svih aritmetičkih sredina kroz 5 dana.

### c. Unutarlaboratorijska preciznost

Izračun za unutarlaboratorijsku preciznost (ukupnu laboratorijsku preciznost) koji sadrži pogrešku ponovljivosti izraženu skupnom standardnom devijacijom ( $S_r$ ) i pogrešku međupreciznosti izraženu standardnom devijacijom između serija ( $S_b$ ):

$$S_1 = \sqrt{\frac{n-1}{n} \times S_r^2 + S_b^2}$$

pri čemu je  $n$  broj ponavljanja u seriji.

Formula za izračun koeficijenta varijacije:

$$KV (\%) = \frac{S_1}{\bar{x}} \times 100$$

pri čemu je  $\bar{x}$  srednja vrijednost svih aritmetičkih sredina kroz 5 dana.

### 3.5.2. Ispitivanje točnosti metode

Za procjenu točnosti metode korišteni su komercijalni kontrolni uzorci poznate koncentracije koji su analizirani u triplikatu tijekom pet dana, a međusoban odnos prikazuje se kroz apsolutno i relativno odstupanje (*bias*) izračunato prema sljedećim formulama:

$$\text{bias (abs)} = |\bar{x} - x_c|$$

$$\text{bias (rel)} = \left| \frac{\bar{x} - x_c}{x_c} \right| \times 100 \%$$

pri čemu  $\bar{x}$  označava srednju vrijednost svih srednjih vrijednosti mjerenja kroz 5 dana, a  $x_c$  označava ciljnu koncentraciju analita dobivenu od proizvođača.

Dobivena vrijednost uspoređuje se s kriterijem prihvatljivosti koji je dobiven računski preko sljedeće formule:  $BIAS = a - 1,96 \times b$ , pri čemu  $a$  označuje kriterij prihvatljivosti za mjernu nesigurnost dobiven iz literaturnih podataka, a  $b$  je vrijednost dobivena izračunom srednje vrijednosti za KV (aritmetička sredina vrijednosti KV za svaku razinu).

### 3.5.3. Procjena mjerne nesigurnosti

U svrhu postupka kratke analitičke verifikacije metode za određivanje PIVKA-II za izračun mjerne nesigurnosti korišten je tzv. *top down* pristup kojim se direktno procjenjuje mjerna nesigurnost cijelog mjernog sustava.

Sastavljena relativna standardna mjerna nesigurnost ( $U_c$ ) je veličina koja predstavlja ukupnu mjernu nesigurnost, a odnosi se na mjernu nesigurnost uzrokovanu nepreciznošću ( $U$  nepreciznosti) čiji je uzrok slučajna pogreška, mjernu nesigurnost uzrokovanu sustavnom greškom ( $U_{bias}$ ) koja se izražava *biasom*, mjernu nesigurnost kalibratora ( $U_{kalibratora}$ ) te mjernu nesigurnost koju čine ostali izvori pogreške ( $U_{ostalo}$ ), a izračunava se prema formuli:

$$U_c = 2 \times \sqrt{U_{nepreciznosti}^2 + U_{bias}^2 + U_{kalibratora}^2 + U_{ostalo}^2}$$

Kako bi se kvantificirala ukupna količina analitičkih pogrešaka, procjenjuje se veličina ukupne pogreške (engl. *total error*, TE) koja se pripisuje nepreciznosti i netočnosti te predstavlja kombinaciju slučajnih i sustavnih pogrešaka.

Za razliku od mjerne nesigurnosti koja predstavlja raspon varijacije između izmjerene vrijednosti i očekivane ili stvarne vrijednosti, ukupna pogreška predstavlja razliku između izmjerene vrijednosti i stvarne ili očekivane vrijednosti.

Izračun za srednju ukupnu grešku, koja se izražava u postotku, u obzir uzima srednju vrijednost *biasa* i srednju vrijednost koeficijenta varijacije:

$$TE = |\overline{bias}| + 1,96 \times \overline{KV}$$

### 3.5.4. Usporedba rezultata s rutinskom metodom

U svrhu usporedbe dviju metoda, uzorci seruma 40 pacijenata različite dobi i spola u širokom mjernom rasponu najprije su analizirani na Roche Cobas E601 analizatoru u KBC Rijeka, a nakon toga na Maglumi 800 analizatoru u KB Dubrava.

Referentni interval za PIVKA-II čije su koncentracije izmjerene u KB Dubrava iznosi < 40 mAU/mL, dok referentni interval za koncentraciju PIVKA-II čije su vrijednosti izmjerene u KBC Rijeka iznose < 27,8 mAU/mL za žene, odnosno < 28,6 mAU/mL za muškarce.

Cilj usporedivosti je procijeniti razliku između već postojeće metode i one koja se želi uvesti u rutinski rad. Za statističku obradu rezultata korišten je Bland-Altman prikaz i Passing-Bablokova regresijska analiza.

U svrhu međulaboratorijske usporedbe koriste se 95 %-tni intervali pouzdanosti. Procjena 95



%-tnog intervala pouzdanosti osigurava da će se, ponovi li se mjerenje više puta, prava ili prosječna vrijednost u 95 % slučajeva nalaziti unutar ovog intervala. Za procjenu slaganja između dvije metode, vrijednost 0 za odsječak na ordinati i 1 za nagib pravca moraju biti unutar 95 %-tnog intervala pouzdanosti. Ukoliko se 0 ne nalazi unutar 95 %-tnog intervala pouzdanosti, postoji konstantna razlika u metodama za odsječak na ordinati, a u slučaju da vrijednost 1 nije unutar 95 %-tnog intervala pouzdanosti, za nagib pravca postoji proporcionalno odstupanje. Na temelju dobivenih rezultata određuje se vrijednost konstantne i proporcionalne pogreške te se na temelju toga donosi zaključak jesu li one statistički i/ili klinički značajne.

Budući da Passing-Bablokova regresijska analiza zahtjeva linearan odnos između dva skupa mjerenja podataka, Cusum testom (engl. *Cumulative Sum*) procjenjuje se valjanost linearnog modela. P vrijednost dobivena Cusum testom koja iznosi manje od 0,05 ukazuje na značajno odstupanje od linearnosti, a nelinearan odnos između dvaju skupova podataka ukazuje na nepodudarnost metoda (Bilić-Zulle, 2011).

## 4. REZULTATI

### 4.1. Rezultati ispitivanja preciznosti metode

*Tablica 1: Rezultati ispitivanja preciznosti koje uključuje ponovljivost (preciznost u seriji), međupreciznost (preciznost iz dana u dan) te unutarlaboratorijsku preciznost za kontrolni uzorak s niskom koncentracijom PIVKA-II na analizatoru Maglumi 800.*

Kontrolni uzorak	MAGLUMI PIVKA-II CONTROL 1				
D = 5 dana; n = 3 (triplikat)	Dan 1	Dan 2	Dan 3	Dan 4	Dan 5
Mjerenje 1	41,86	43,98	43,81	43,14	39,37
Mjerenje 2	43,33	40,53	43,04	42,74	42,46
Mjerenje 3	43,42	43,25	44,39	43,65	41,93
<b>PONOVLJIVOST (PRECIZNOST U SERIJI)</b>					
Aritmetička sredina svake serije određivanja, $\bar{x}_d$	42,87	42,59	43,75	43,18	41,25
Standardno odstupanje za svaku seriju određivanja: $S_{d1}, S_{d2}, S_{d3}, S_{d4}, S_{d5}$	0,88	1,82	0,68	0,46	1,65
Skupno standardno odstupanje, za 5 dana, $S_r$	1,10				
Koeficijent varijacije, KV (%)	2,57				
<b>MEĐUPRECIZNOST (PRECIZNOST IZ DANA U DAN)</b>					
Srednja vrijednost svih srednjih vrijednosti mjerenja kroz 5 dana, $\bar{x}$	42,73				
Standardno odstupanje između serija, $S_b$	0,93				
Koeficijent varijacije, KV (%)	2,18				
<b>UNUTARLABORATORIJSKA PRECIZNOST</b>					
Unutarlaboratorijsko standardno odstupanje, $S_l$	1,29				
Koeficijent varijacije, KV (%)	<b>3,02</b>				
Kriterij prihvatljivosti prema proizvođaču (%)	<b>5,2</b>				

Ostvareni KV za unutarlaboratorijsku preciznost za kontrolni uzorak s niskom koncentracijom PIVKA-II na analizatoru Maglumi 800 iznosi 3,02 % te kao takav zadovoljava postavljeni kriterij prihvatljivosti koji je preuzet od proizvođača i koji iznosi 5,2 %.

Tablica 2: Rezultati ispitivanja preciznosti koje uključuje ponovljivost (preciznost u seriji), međupreciznost (preciznost iz dana u dan) te unutarlaboratorijsku preciznost za kontrolni uzorak s patološkom koncentracijom PIVKA-II na analizatoru Maglumi 800.

Kontrolni uzorak	MAGLUMI PIVKA-II CONTROL 2				
D = 5 dana; n = 3 (triplikat)	Dan 1	Dan 2	Dan 3	Dan 4	Dan 5
Mjerenje 1	5355,5	5412,6	5280,7	5340,6	5461,8
Mjerenje 2	5399,9	5552,6	5423,7	5468,8	5283,4
Mjerenje 3	5494,0	5553,7	5430,3	5419,7	5370,3
<b>PONOVLJIVOST (PRECIZNOST U SERIJI)</b>					
Aritmetička sredina svake serije određivanja, $\bar{x}_d$	5416,5	5506,3	5378,2	5409,7	5371,8
Standardno odstupanje za svaku seriju određivanja: $S_{d1}, S_{d2}, S_{d3}, S_{d4}, S_{d5}$	70,72	81,15	84,53	64,68	89,21
Skupno standardno odstupanje, za 5 dana, $S_r$	78,06				
Koeficijent varijacije, KV (%)	1,44				
<b>MEĐUPRECIZNOST (PRECIZNOST IZ DANA U DAN)</b>					
Srednja vrijednost svih srednjih vrijednosti mjerenja kroz 5 dana, $\bar{x}$	5416,51				
Standardno odstupanje između serija, $S_b$	53,78				
Koeficijent varijacije, KV (%)	0,99				
<b>UNUTARLABORATORIJSKA PRECIZNOST</b>					
Unutarlaboratorijsko standardno odstupanje, $S_l$	83,39				
Koeficijent varijacije, KV (%)	<b>1,54</b>				
Kriterij prihvatljivosti prema proizvođaču (%)	<b>5,2</b>				

Ostvareni KV za unutarlaboratorijsku preciznost za kontrolni uzorak s patološkom koncentracijom PIVKA-II na analizatoru Maglumi 800 iznosi 1,54 % te kao takav zadovoljava postavljeni kriterij prihvatljivosti koji je preuzet od proizvođača i koji iznosi 5,2 %.

Srednja vrijednost za KV dobivena izračunom aritmetičke sredine iz KV za dvije koncentracijske razine iznosi 2,28 % te kao takva zadovoljava postavljeni kriterij prihvatljivosti preuzet od proizvođača koji iznosi 5,2 %.

#### 4.2. Rezultati ispitivanja točnosti metode

*Tablica 3: Rezultati ispitivanja točnosti za kontrolni uzorak s niskom koncentracijom PIVKA-II na analizatoru Maglumi 800.*

Kontrolni uzorak	MAGLUMI PIVKA-II CONTROL 1
Ciljna vrijednost proizvođača, $x_c$	50,0 mAU/mL
Srednja vrijednost svih srednjih vrijednosti mjerjenja kroz 5 dana, $\bar{x}$	42,73
<i>Bias</i> (abs)	-7,27
<i>Bias</i> (rel) (%)	<b>-14,54</b>
Kriterij prihvatljivosti dobiven računski (%)	<b>11,7</b>

Ostvarena relativna vrijednost *biasa* za kontrolni uzorak s niskom koncentracijom PIVKA-II na analizatoru Maglumi 800 iznosi -14,54 % te kao takva ne zadovoljava kriterij prihvatljivosti koji je dobiven računski, a iznosi 11,7 %.

*Tablica 4: Rezultati ispitivanja točnosti za kontrolni uzorak s patološkom koncentracijom PIVKA-II na analizatoru Maglumi 800.*

Kontrolni uzorak	MAGLUMI PIVKA-II CONTROL 2
Ciljna vrijednost proizvođača, $x_c$	5000 mAU/mL
Srednja vrijednost svih srednjih vrijednosti mjerjenja kroz 5 dana, $\bar{x}$	5416,51

<i>Bias</i> (abs)	416,51
<i>Bias</i> (rel) (%)	<b>8,33</b>
Kriterij prihvatljivosti dobiven računski (%)	<b>11,7</b>

Ostvarena relativna vrijednost *biasa* za kontrolni uzorak s patološkom koncentracijom PIVKA-II na analizatoru Maglumi 800 iznosi 8,33 % te kao takva zadovoljava kriterij prihvatljivosti koji je dobiven računski, a iznosi 11,7 %.

Srednja vrijednost za *bias* dobivena izračunom aritmetičke sredine iz *biasa* za dvije koncentracijske razine iznosi 11,44 % te kao takva zadovoljava postavljeni kriterij prihvatljivosti dobiven računski koji iznosi 11,7 %.

#### 4.3. Rezultati procjene mjerne nesigurnosti

*Tablica 5: Rezultati procjene mjerne nesigurnosti za kontrolni uzorak s niskom koncentracijom PIVKA-II na analizatoru Maglumi 800.*

Kontrolni uzorak	MAGLUMI PIVKA-II CONTROL 1
Mjerna nesigurnost uzrokovana nepreciznošću, $U$ nepreciznosti	3,02 %
Mjerna nesigurnost uzrokovana sustavnom pogreškom, $U$ <i>bias</i>	14,54 %
Mjerna nesigurnost kalibratora, $U$ kalibratora	0,00 %
Mjerna nesigurnost uzrokovana ostalim izvorima pogreške, $U$ ostalo	0,00 %
Ukupna mjerna nesigurnost, $U_c$	<b>29,7 %</b>
Kriterij prihvatljivosti	<b>16,2 %</b>

Ostvarena ukupna mjerna nesigurnost za kontrolni uzorak s niskom koncentracijom PIVKA-II na analizatoru Maglumi 800 iznosi 29,7 % što ne ostvaruje zadani kriterij prihvatljivosti preuzet iz literature (Bayart i sur., 2020) koji iznosi 16,2 %.

*Tablica 6: Rezultati procjene mjerne nesigurnosti za kontrolni uzorak s patološkom koncentracijom PIVKA-II na analizatoru Maglumi 800.*

Kontrolni uzorak	MAGLUMI PIVKA-II CONTROL 2
Mjerna nesigurnost uzrokovana nepreciznošću, U nepreciznosti	1,54 %
Mjerna nesigurnost uzrokovana sustavnom pogreškom, U <i>bias</i>	8,33 %
Mjerna nesigurnost kalibratora, U kalibratora	0,00 %
Mjerna nesigurnost uzrokovana ostalim izvorima pogreške, U ostalo	0,00 %
Ukupna mjerna nesigurnost	<b>16,9 %</b>
Kriterij prihvatljivosti	<b>16,2 %</b>

Ostvarena ukupna mjerna nesigurnost za kontrolni uzorak s patološkom koncentracijom PIVKA-II na analizatoru Maglumi 80 iznosi 16,9 % što ne ostvaruje zadani kriterij prihvatljivosti preuzet iz literature (Bayart i sur., 2020) koji iznosi 16,2 %.

*Tablica 7: Kriterij prihvatljivosti za srednju ukupnu grešku*

Srednja ukupna greška, <i>total error</i> (%)	15,91
Kriterij prihvatljivosti prema literaturnim podacima (%)	16,2

Izračunata srednja ukupna greška iznosi 15,91 % što ostvaruje postavljeni kriterij prihvatljivosti preuzet iz literature (Bayart i sur., 2020) koji iznosi 16,2 %.

4.4. Rezultati usporedbe ispitivane i rutinske metode

*Tablica 8: Rezultati mjerenja koncentracije PIVKA-II u serumu na analizatorima Roche Cobas E601 i Maglumi 800.*

Redni broj uzorka	Spol	Koncentracija PIVKA-II – Roche Cobas E601 (mAU/mL)	Koncentracija PIVKA-II – Maglumi 800 (mAU/mL)
1	M	2751,0	4509,5
2	M	119,2	48,6
3	M	18,1	11,6
4	Ž	36,6	170,8
5	M	549,8	847,1
6	M	20,6	10,1
7	Ž	17,5	48,0
8	M	398,1	222,0
9	Ž	20,0	113,4
10	Ž	24,5	59,3
11	Ž	13,1	3,2
12	Ž	28,2	17,5
13	M	131,8	72,9
14	M	304,9	109,9
15	Ž	26,8	17,7
16	M	462,8	229,7
17	Ž	25,2	59,5
18	M	2376,0	7624,0
19	M	33,2	73,7
20	M	1832,0	466,9
21	Ž	21,1	20,2
22	Ž	36,0	48,1
23	Ž	46,0	206,6
24	M	159,2	134,1
25	Ž	21,2	92,6
26	M	25,4	84,8

27	Ž	23,3	94,2
28	Ž	22,8	137,0
29	Ž	30,9	36,4
30	M	182,0	53,2
31	M	901,4	405,3
32	M	324,9	234,8
33	M	309,8	214,0
34	M	138,1	37,9
35	M	508,6	258,9
36	M	38,2	17,8
37	M	43,4	25,2
38	Ž	46,0	45,5
39	M	1680,0	1088,6
40	M	67,5	16,7

Vidljivo je kako kod pojedinih pacijenata dolazi do nesklada među rezultatima dobivenim različitim metodama što uzrokuje klinički različito tumačenje rezultata. Primjerice, u uzorku broj 9 vrijednost koncentracije koja je izmjerena u KBC Rijeka iznosi 20,0 mAU/mL što se smatra urednim nalazom (referentna vrijednost za žensku osobu iznosi < 27,8 mAU/mL), no vrijednost koncentracije dobivena na analizatoru u KB Dubrava iznosi 113,4 mAU/mL što spada u patološku vrijednost (referentna vrijednost iznosi < 40 mAU/mL). Slučajevi u kojima se uočava oprečnost u rezultatima bojom su istaknuti u tablici u *Tablici 8*.

*Tablica 9: Passing-Bablockova regresijska analiza za PIVKA-II dobivena korištenjem MedCalc programa.*

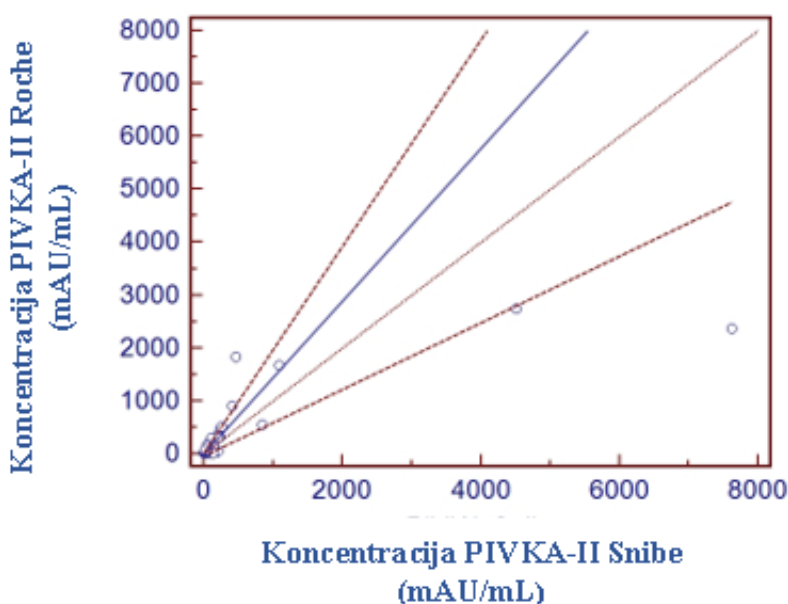
$y = -3,7830 + 1,4453 x$	
Konstantno odstupanje	
Odsječak na osi y (A)	-3,7830
95 % CI	-41,4890 do 16,4259
Proporcionalno odstupanje	
Nagib pravca (B)	1,4453
95 % CI	0,6286 do 1,9510



Cusum test linearnosti	Nema značajnog odstupanja od linearnosti ( $P > 0,10$ )
------------------------	---

Iz Passing-Bablockove regresijske analize vidljivo je da odsječak na osi ordinata iznosi -3,7830 što ulazi u 95 %-tni interval pouzdanosti za odsječak, dok nagib pravca iznosi 1,4453 što također ulazi u 95 %-tni interval pouzdanosti za nagib pravca (Slika 3).

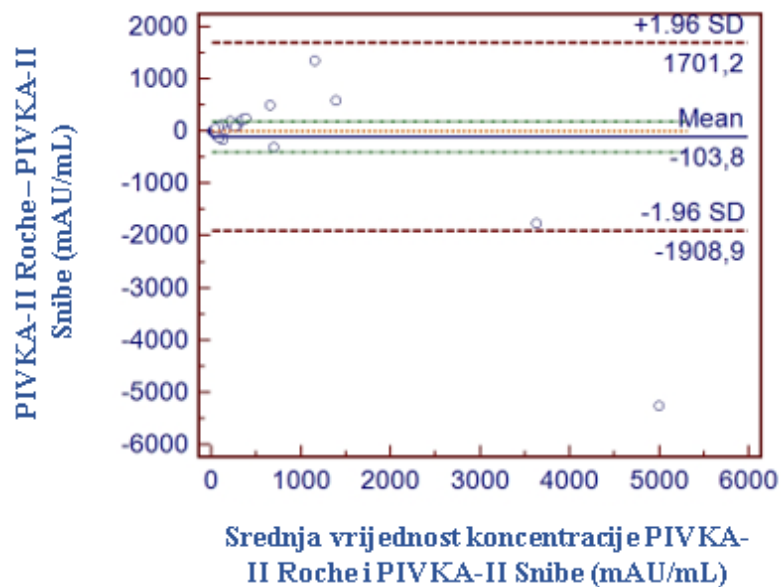
Cusumov test linearnosti ne ukazuje na postojanje značajnog odstupanja linearnog odnosa između dvije metode određivanja koncentracije PIVKA-II zbog P vrijednosti koja iznosi  $> 0,10$ .



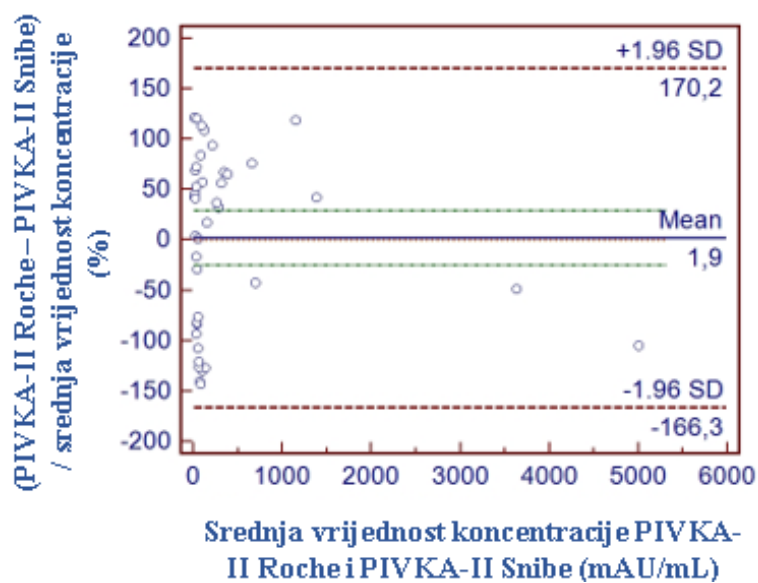
Slika 3: Passing-Bablockova regresijska analiza. Na osi apscisa prikazane su izmjerene vrijednosti koncentracije PIVKA-II u serumu na analizatoru Snibe Maglumi 800, dok su na osi ordinata prikazane vrijednosti koncentracije PIVKA-II u serumu izmjerene na analizatoru Roche Cobas E601.

Iz Bland-Altmanovog prikza vidljivo je kako granice intervala pouzdanosti unutar kojeg se nalazi 95 % razlika između mjerenja obuhvaćaju nulu. Srednja razlika između mjerenja PIVKA-II na dva različita analizatora iznosi 103,8 mAU/mL (Slika 4).

Relativno odstupanje između srednjih vrijednosti razlika mjerenja iznosi 1,9 % što se nalazi unutar kriterija prihvatljivosti za *bias* koji iznosi 11,7 % (Slika 5).



Slika 4: Bland-Altmanov prikaz apsolutnog odstupanja (konstantna greška). Na osi apscisa su prikazane srednje vrijednosti koncentracija PIVKA-II u serumu izmjerenih na analizatorima Snibe Maglumi 800 i Roche Cobas E601, dok su na osi ordinata prikazane razlike u mjerenjima dobivenim na analizatorima Snibe Maglumi 800 i Roche Cobas E601.



Slika 5: Bland-Altmanov prikaz relativnog odstupanja (proporcionalna greška). Na osi apscisa su prikazane srednje vrijednosti koncentracija PIVKA-II u serumu izmjerenih na analizatorima Snibe Maglumi 800 i Roche Cobas E601, dok su na osi ordinata prikazane relativne razlike u mjerenjima dobivenim na analizatorima Snibe Maglumi 800 i Roche Cobas E601.

## 5. RASPRAVA

Prije nego li nova analitička metoda ili analizator postane dio rutinskog laboratorijskog rada, neophodno je provesti verifikaciju kako bi se potvrdilo zadovoljava li ta metoda ili analizator željene uvjete i kriterije prihvatljivosti. Prilikom uvođenja nove pretrage u KZLD KB Dubrava koja uključuje kvantitativno određivanje koncentracije PIVKA-II u humanom serumu na analizatoru Snibe Maglumi 800, nužna je bila provedba kratke analitičke verifikacije novouvedene metode. Verifikacija je provedena sukladno protokolu CLSI EP15-A2, a obuhvatila je procjenu preciznosti, točnosti i mjerne nesigurnosti za pojedinu koncentracijsku razinu te međulaboratorijsku usporedbu između analizatora Snibe Maglumi 800 i analizatora Roche Cobas E601 na 40 uzoraka koji su prikupljeni u kliničkom laboratoriju KBC-a Rijeka.

Rezultati ispitivanja preciznosti za komercijalne kontrolne uzorke u dvije koncentracijske razine prikazani su kao koeficijenti varijacije za ponovljivost (preciznost u seriji), međupreciznost (preciznost iz dana u dan) te unutarlaboratorijsku preciznost.

Preciznost analitičke metode ovisi isključivo o distribuciji slučajne pogreške koja je rezultat neizbježne nesavršenosti analitičara i mjernog uređaja. Izvor slučajnih pogrešaka leži u samom mjerenju i one se mogu smanjivati, ali se ne mogu potpuno izbjeći. Preciznost ne daje informaciju o stvarnoj koncentraciji analita u uzorku i o točnosti metode, a nepreciznost mjerenja je veća što su dobivena vrijednost standardnog odstupanja i KV veći.

Srednja vrijednost za KV koja je dobivena za unutarlaboratorijsku preciznost uspoređena je s KV dobivenim tijekom validacije metode od strane proizvođača. Ostvarena srednja vrijednost za KV zadovoljava postavljene kriterije prihvatljivosti.

Rezultati procjene točnosti metode prikazani su kao odstupanje (*bias*). Budući da za PIVKA-II ne postoji CRM niti podatak o srednjoj vrijednosti koncentracije dobiven iz programa vanjske kontrole kvalitete, točna vrijednost s kojom bi se dobivena vrijednost mogla usporediti je nepoznata. Zbog toga je dobivena srednja vrijednost za *bias* uspoređena s kriterijem prihvatljivosti koji je dobiven računski na osnovi kriterija prihvatljivosti za mjernu nesigurnost te srednje vrijednosti za KV u svrhu donošenja zaključka o prihvatljivosti metode. Ispitivanje točnosti pretrage djelomično je zadovoljilo postavljen kriterij prihvatljivosti jer se samo kontrolni uzorak visoke koncentracijske razine PIVKA-II, kao i dobivena srednja vrijednost za *bias*, nalaze unutar postavljenog kriterija prihvatljivosti. Kontrolni uzorak s

niskom koncentracijskom razinom PIVKA-II ne ispunjava računski dobiven kriterij prihvatljivosti zbog velike relativne vrijednosti *biasa* čiji uzrok leži u sustavnoj pogrešci.

U izračun ukupne mjerne nesigurnosti za svaku koncentracijsku razinu u obzir se uzima mjerna nesigurnosti čiji je uzrok nepreciznost, mjerna nesigurnost koja je uzrokovana sustavnom pogreškom čija je vrijednost izražena *biasom*, mjerna nesigurnost brojčane vrijednosti mjerene veličine u kalibratoru, te mjerna nesigurnost uzrokovana ostalim izvorima pogreške. Izračunate mjerne nesigurnosti za obje koncentracijske razine ne zadovoljavaju kriterij prihvatljivosti zbog visoke vrijednosti *biasa* za svaku koncentracijsku razinu, a zaključuje se kako mjerna nesigurnost uzrokovana sustavnom pogreškom predstavlja glavni izvor varijabilnosti.

U svrhu kvantifikacije ukupne količine analitičkih pogrešaka izračunata je srednja ukupna analitička pogreška (TE) čiji je izvor nepreciznost i netočnost metode. Stoga, izračun sadrži srednju vrijednost *biasa* i srednju vrijednost koeficijenta varijacije, a dobiveni rezultat zadovoljava kriterij prihvatljivosti preuzet iz literaturnih podataka.

Usporedba dviju metoda provedena je analizom 40 uzoraka na analizatoru Roche Cobas E601, a zatim na analizatoru Snibe Maglumi 800. Koncentracije PIVKA-II u serumu dobivene dvjema metodama analizirane su statističkim programom MedCalc i grafički prikazane pomoću Passing-Bablockove regresijske analize te Bland-Altmanovog prikaza kako bi se zaključilo o usporedivosti navedenih metoda.

Cilj je utvrditi postojanje statistički značajne razlike između dvije metode, a ona ne postoji ukoliko odsječak na ordinati uključuje 0, a nagib pravca uključuje 1.

Iz Passing-Bablockove regresijske analize vidljivo je da 95 %-tni intervali pouzdanosti za odsječak obuhvaćaju 0, a 95 %-tni intervali pouzdanosti za nagib pravca obuhvaćaju 1 što dovodi do zaključka da ne postoje ni konstantna niti proporcionalna razlika između dvije metode i da su metode međusobno usporedive.

Bland-Altmanovim prikazom uočava se da apsolutno odstupanje, odnosno srednja razlika između mjerenja iznosi 103,8 mAU/mL te da granice intervala pouzdanosti obuhvaćaju nulu.

Relativno odstupanje iznosi 1,9 %, a dobivena je vrijednost unutar kriterija za *bias*.

Na temelju rezultata dobivenih grafičkim prikazima, zaključuje se kako postojanje konstantne i proporcionalne greške nije statistički značajno.

Unatoč dobroj usporedivosti dobivenoj na temelju statističke analize, pregledom i

usporedbom pojedinih rezultata dobivenih različitim metodama, uočava se kako kod pojedinih pacijenata dolazi do različitog kliničkog tumačenja rezultata. Primjerice, rezultat dobiven u KB Dubrava se prema referentnom intervalu svrstava u normalnu koncentraciju, dok se kod istog pacijenta izmjerena koncentracija PIVKA-II drugom metodom u KBC Rijeka smatra patološkom. Navedene diskrepancije u rezultatima koje postoje između različitih metoda određivanja PIVKA-II potvrđuju tvrdnju da su imunokemijske metode međusobno neusporedive. Zbog toga se preporučuje da se svaki pacijent laboratorijski prati uvijek istom metodom kako bi dobiveni rezultati bili reproducibilni i vjerodostojni te klinički relevantni.

## 6. ZAKLJUČCI

Postupci procjene preciznosti, točnosti, mjerne nesigurnosti te međulaboratorijske usporedbe provedeni su u sklopu kratke analitičke verifikacije kako bi se utvrdilo zadovoljava li novouvedena metoda postavljene kriterije prihvatljivosti. Na temelju statističke obrade dobivenih rezultata ispitivanja doneseni su sljedeći zaključci:

1. Ostvarena vrijednost unutarlaboratorijske preciznosti zadovoljava postavljeni kriterij prihvatljivosti preuzet od proizvođača.
2. Ispitivanje točnosti analitičke metode djelomično je zadovoljilo računski dobiven kriterij prihvatljivosti.
3. Izračunate ukupne mjerne nesigurnosti za obje koncentracijske razine ne zadovoljavaju postavljeni kriterij prihvatljivosti zbog velike sustavne pogreške koja je izražena *biasom*.
4. Rezultat procjene srednje ukupne greške zadovoljava kriterij prihvatljivosti preuzet iz literaturnih izvora.
5. Passing-Bablokova regresijska analiza te Bland-Altmanov prikaz ukazuju da postojanje proporcionalne i konstante pogreške nije statistički značajno.
6. Uočeno je kako rezultati dobiveni dvjema različitim imunokemijskim metodama mogu uzrokovati klinički različitu interpretaciju rezultata.
7. Zbog neusporedivosti imunokemijskih metoda, neophodno je istom metodom laboratorijski pratiti pacijenta.
8. Novouvedena metoda za određivanje PIVKA-II na analizatoru Maglumi 800 zadovoljava kriterije prihvatljivosti te se kao takva može koristiti u rutinskoj laboratorijskoj praksi kao pomoć u dijagnostici i praćenju osoba oboljelih od HCC-a.

## 7. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

ABEI – N-(4-aminobutil)-N-etilizoluminol; engl. *Amino-Butyl-Ethyl-Isoluminol*

AFP – alfa-fetoprotein; engl. *alpha-fetoprotein*

CI – interval pouzdanosti; engl. *Confidence Interval*

CK-19 – citokeratin-19; engl. *Cytokeratin-19*

CLIA – kemiluminiscentna imunometoda; engl. *Chemiluminescence Immunoassay*

CLSI – Institut za kliničke i laboratorijske standarde; engl. *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CRM – certificirani referentni materijal; engl. *Certified Reference Material*

Cusum – test za procjenu valjanosti linearnog modela; engl. *Cumulative Sum*

DCP – des-gama-karboksi protrombin; engl. *Des-gamma-Carboxy-Prothrombin*

Gla – gama-karboksi glutaminska kiselina; engl. *Gamma-Carboxyglutamic Acid*

Glu – Glutaminska kiselina; engl. *Glutamic Acid*

GPC3 – glipikan 3; engl. *Glypican-3*

GP73 – Golgijev protein 73; engl. *Golgi Protein 73*

HCC – hepatocelularni karcinom; engl. *Hepatocellular Carcinoma*

KB – Klinička bolnica

KBC – Klinički bolnički centar

KV – koeficijent varijacije; engl. *Coefficient of Variation*

KZLD – Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku

NaN<sub>3</sub> – natrijev azid

PIVKA-II – engl. *Protein Induced by Vitamin K Absence-II or Antagonist-II*

PBS – fiziološka otopina s fosfatnim puferom; engl. *Phosphate-Buffered Saline*

RLU – relativna jedinica svjetlosti; engl. *Relative Light Unit*

S – standardno odstupanje; engl. *standard deviation*

$S_b$  – međupreciznost (preciznost iz dana u dan); engl. *Intermediate Precision*

$S_1$  – unutarlaboratorijsko standardno odstupanje

$S_r$  – ponovljivost (preciznost u seriji); engl. *Repeatability*

$S_{d1}, S_{d2}, S_{d3}, S_{d4}, S_{d5}$  – standardna odstupanja za svaku seriju određivanja

TE – ukupna pogreška mjerenja; engl. *total error*

$U_c$  – sastavljena relativna standardna mjerna nesigurnost

VIM – Međunarodni mjeriteljski rječnik; engl. *International Vocabulary and Metrology*

$x_c$  – ciljna koncentracija analita

$\overline{x_d}$  – aritmetička sredina svakog dana određivanja

$\bar{x}$  – srednja vrijednost svih aritmetičkih sredina kroz 5 dana

$\bar{\bar{x}}$  – srednja vrijednost svih vrijednosti mjerenja tijekom 5 dana



## 8. LITERATURA

Azim M, Hasan M, Ansari IH, Nasreen F. Chemiluminescence Immunoassay: Basic Mechanism and Applications. *Bangladesh Journal of Nuclear Medicine*, 2018, 18, 171-178.

Bayart JL, Mairesse A, Gruson D, van Dievoet MA. Analytical performances and biological variation of PIVKA-II (des-ycarboxy-prothrombin) in European healthy adults. *Clinica Chimica Acta*, 2020, 509, 264-267.

Bilić-Zulle L. Comparison of method: Passing and Bablok regression. *Biochemia Medica*, 2011, 21, 49-52.

Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology*, 2011, 53, 1020-1022.

Chan DW, Sokoll LJ. Tumor markers. U: Contemporary Practice in Clinical Chemistry (Fourth Edition). Clarke W, Marzinke MA, urednici, Academic Press, 2020, str. 779-793.

Clinical utility of PIVKA-II in the diagnosis of hepatocellular carcinoma, 2017., <https://www.synnovis.co.uk/news-and-press/clinical-utility-of-pivka-ii-in-the-diagnosis-of-hepatocellular-carcinoma>, pristupljeno 11.8.2023.

CLSI. User Verification of Performance for Precision and Trueness; Approved Guideline – Second Edition. CLSI document EP15-A2. Wayne, PA, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006.

Currie, LA, Svehla, G. Nomenclature for the presentation of results of chemical analysis (IUPAC recommendations 1994). *Pure and Applied Chemistry*, 1994, 66, 595-608.

Ćelap I. Mjerna nesigurnost, Predavanje, 8. kongres Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu, Rijeka, 2015.

Darwish IA. Immunoassay Methods and their Applications in Pharmaceutical Analysis: Basic Methodology and Recent Advances. *International Journal of Biomedical Science*, 2006, 2,

217-235.

Feng H, Li B, Li Z, Wei Q, Ren L. PIVKA-II serves as a potential biomarker that complements AFP for the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer*, 2021, 401, 1-10.

Flegar Meštić Z. Postupci ispitivanja (5.5.) – kratka analitička validacija. U: Akreditacija medicinsko biokemijskog laboratorija priručnik. Galjanić S, Vukasinović I, Flegar Meštić Z, urednici, Zagreb, Medicinska naklada, 2010, str. 123-133.

Fujita K, Kinukawa H, Ohno K, Ito Y, Saegusa H, Yoshimura T. Development and evaluation of analytical performance of a fully automated chemiluminescent immunoassay for protein induced by vitamin K absence or antagonist II. *Clinical Biochemistry*, 2015, 48, 1330-1336.

Gašljević V. Validacija i mjerna nesigurnost. *Biochemia Medica*, 2010, 20, 57-63.

Giavarina D. Understanding Bland Altman analysis. *Biochemia Medica*, 2015, 25, 141-151.

Hamamura, K., Shiratori, Y., Shiina, S., Imamura, M., Obi, S., Sato, S., Yoshida, H., Omata, M. Unique clinical characteristics of patients with hepatocellular carcinoma who present with high plasma des- $\gamma$ -carboxy prothrombin and low serum  $\alpha$ -fetoprotein. *Cancer*, 2000, 88, 1557-1564.

ICH Q2(R1). Validation of analytical procedures: Text and methodology. ICH Harmonised Tripartite Guideline. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Chicago, USA, 2005, str. 10.

Imamura H, Matsuyama Y, Miyagawa Y, Ishida K, Shimada R, Miyagawa S, Makuuchi M, Kawasaki S. Prognostic significance of anatomical resection and des-gamma-carboxy prothrombin in patients with hepatocellular carcinoma. *British Journal of Surgery*, 1999, 86, 1032-1038.

Kawai T, Yasuchika K, Ishii T, Katayama H, Yoshitoshi EY, Ogiso S, Kita S, Yasuda K,

Fukumitsu K, Mizumoto M, Hatano E, Uemoto S. Keratin 19, a Cancer Stem Cell Marker in Human Hepatocellular Carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 2015, 21, 3081–3091.

Khan M, Shah SH, Salman M, Abdullah M, Hayat F, Akbar S. Enzyme-linked immunosorbent assay versus chemiluminescent immunoassay: A general overview. *Global Journal of Medical Pharmaceutical and Biomedical Update*, 2023, 18, 1.

Kinukawa H, Shirakawa T, Yoshimura T. Epitope characterization of an anti-PIVKA-II antibody and evaluation of a fully automated chemiluminescent immunoassay for PIVKA-II. *Clinical Biochemistry*, 2015, 48, 1120-1125.

Koike, Y., Shiratori, Y., Sato, S., Obi, S., Teratani, T., Imamura, M., Yoshida, H., Shiina, S., Omata, M. Des- $\gamma$ -carboxy prothrombin as a useful predisposing factor for the development of portal venous invasion in patients with hepatocellular carcinoma: A prospective analysis of 227 patients. *Cancer*, 2001, 91, 561-569.

Liu H, Li P, Zhai Y, Qu CF, Zhang LJ, Tan YF, Li N, Ding HG. Diagnostic value of glypican-3 in serum and liver for primary hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 2010, 16, 4410-4415.

Loh TP, Cooke BR, Markus C, Zakaria R, Tran MTC, Ho CS, Greaves RF. Method evaluation in the clinical laboratory. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2023, 61, 751-758.

Marrero JA, Romano PR, Nikolaeva O, Steel L, Mehta A, Fimmel CJ, Comunale MA, D'Amelio A, Lok AS, Block TM. GP73, a resident Golgi glycoprotein, is a novel serum marker for hepatocellular carcinoma. *Journal of hepatology*, 2005, 43, 1007-1012.

Marzinke MA, Dufour DR. Laboratory diagnosis of liver disease. U: Contemporary Practice in Clinical Chemistry (Fourth Edition). Clarke W, Marzinke MA, urednici, Academic Press, 2020, str. 545-559.

Parkash A, Singla P, Ahirwar AK. Assessment of Pivka II as Tumour Marker in Hepatocellular Carcinoma. *International Journal of Cancer and Clinical Research*, 2021, 8,

151.

Perne MG, Sitar-Tăut AV, Alexescu TG, Ciumărnean L, Milaciu MV, Coste SC, Vlad CV, Cozma A, Sitar-Tăut DA, Orășan OH, Crăciun A. Diagnostic Performance of Extrahepatic Protein Induced by Vitamin K Absence in the Hepatocellular Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Diagnostics*, 2023, 13, 816.

PIVKA-II, a biomarker of liver cells for the management of hepatocellular carcinoma (HCC), 2015., <https://www.fujirebio.com/en/insights/liver-diseases/pivkaii-a-biomarker-of-liver-cells-for-the-management-of-hepatocellular>, pristupljeno 12.8.2023.

Products – Maglumi 800, [https://www.snibe.com/zh\\_en/en\\_productArtical.aspx?id=29](https://www.snibe.com/zh_en/en_productArtical.aspx?id=29), pristupljeno 25.7.2023.

Sagar VM, Herring K, Curbishley S, Hodson J, Fletcher P, Karkhanis S, Mehrzad H, Punia P, Shah T, Shetty S, Ma YT. The potential of PIVKA-II as a treatment response biomarker in hepatocellular carcinoma: a prospective United Kingdom cohort study. *Oncotarget*, 2021, 12, 2338-2350.

Saitta C, Raffa G, Alibrandi A, Brancatelli S, Lombardo D, Tripodi G, Raimondo G, Pollicino T. PIVKA-II is a useful tool for diagnostic characterization of ultrasound-detected liver nodules in cirrhotic patients. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96, e7266.

Tang, W., Kokudo, N., Sugawara, Y., Guo, Q., Imamura, H., Sano, K., Karako, H., Qu, X., Nakata, M., Makuuchi, M. Des- $\gamma$ -carboxyprothrombin expression in cancer and/or non-cancer liver tissues: Association with survival of patients with resectable hepatocellular carcinoma. *Oncology Reports*, 2005, 13, 25-30.

The launch of a new pilot external quality assurance scheme for PIVKA-II determination, 2019., <http://www.viopath.co.uk/sites/default/files/upload/The%20launch%20of%20a%20new%20pilot%20external%20quality%20assurance%20scheme.pdf>, pristupljeno 7.8.2023.

Vuljanić D, Saračević A. Usporedba kvantitativnih metoda, Predavanje, kolegij: Evaluacija

instrumenata postupaka i reagensa, Merlin 22/23, Zagreb, 2022.

Xing H, Yan C, Cheng L, Wang N, Dai S, Yuan J, Lu W, Wang Z, Han J, Zheng Y, Yang T. Clinical application of protein induced by vitamin K antagonist-II as a biomarker in hepatocellular carcinoma. *Tumor Biology*, 2016, 37, 15447-15456.

## 9. SAŽETAK/SUMMARY

### SAŽETAK

PIVKA-II (engl. *Protein Induced by Vitamin K Absence-II or Antagonist-II*) abnormalni je oblik protrombina koji se sintetizira u stanju nedostatka vitamina K ili u prisutnosti njegovog antagonista koji inhibira aktivnost enzima gama-karboksilaze ovisne o vitaminu K. Povišene koncentracije PIVKA-II u neoplastičnim stanicama hepatocelularnog karcinoma (HCC) nastaju kao posljedica oštećenog procesa karboksilacije protrombinskog prekursora. U složenom procesu hepatokarcinogeneze PIVKA-II pospješuje staničnu proliferaciju, tumorski rast te pojavu metastaza. Nakon svoga otkrića ova je molekula postala predmetom istraživanja, a njene analitičke odlike poput zadovoljavajuće osjetljivosti i specifičnosti čine je optimalnim tumorskim biljekom u dijagnostici, nadzoru i liječenju HCC-a, bolesti koja bilježi visoku incidenciju i visoku stopu smrtnosti.

Cilj ovog diplomskog rada bio je procijeniti prihvatljivost analitičke metode za kvantitativno određivanje PIVKA-II u humanom serumu na analizatoru Snibe Maglumi 800 procesom verifikacije prije nego ona postane dio rutinskog rada u laboratoriju Kliničke bolnice Dubrava.

Za određivanje koncentracije PIVKA-II korištena je kemiluminiscentna imunometoda (CLIA), a verifikacija metode provedena je prema CLSI EP15-A2 smjernicama koristeći dva kontrolna uzorka čija se koncentracija mjerila u triplikatu tijekom 5 dana mjerenja. Proces verifikacije uključivao je procjenu preciznosti, točnosti, mjerne nesigurnosti te usporedbu s metodom implementiranom u Kliničkom bolničkom centru Rijeka.

Ostvareni rezultati za preciznost, točnost te srednju ukupnu pogrešku zadovoljili su postavljene kriterije prihvatljivosti. Rezultati usporedbe ispitivane metode s postojećom metodom prikazani Bland-Altmanovim prikazom te Passing-Bablockovom regresijskom analizom ne pokazuju postojanje ni konstantne niti proporcionalne pogreške koje bi bile statistički značajne. Međutim, uočen je nesklad u rezultatima kod nekih pacijenata zbog primjene različitih metoda određivanja istog analita što je dokaz neusporedivnosti imunokemijskih metoda. Kako bi se izbjegao rizik od klinički različitog tumačenja rezultata, potrebno je svakog pacijenta laboratorijski pratiti uvijek istom metodom.

Na temelju rezultata verifikacije, zaključuje se da novouvedena metoda kvantitativnog određivanja PIVKA-II u serumu zadovoljava postavljene kriterije prihvatljivosti te se kao takva može koristiti u rutinskom laboratorijskom radu.

## SUMMARY

PIVKA-II (*Protein Induced by Vitamin K Absence-II or Antagonist-II*) is an abnormal form of prothrombin that is synthesized in the state of vitamin K deficiency or in the presence of its antagonist that inhibits the activity of vitamin K-dependent carboxylase. Elevated concentrations of PIVKA-II in neoplastic cells of hepatocellular carcinoma (HCC) occur as a result of a damaged process of carboxylation of the prothrombin precursor. In the complex process of hepatocarcinogenesis PIVKA-II promotes cell proliferation, tumor growth and the occurrence of metastases. After its discovery, this molecule became the subject of research, and its analytical features, such as satisfactory sensitivity and specificity, make it an optimal tumor marker in the diagnosis, monitoring and treatment of HCC, a disease with a high incidence and high mortality rate.

The aim of this study was to assess the acceptability of the analytical method for the quantitative determination of PIVKA-II in human serum on the Snibe Maglumi 800 analyzer through the verification process before it becomes a part of the routine work in the laboratory of the Clinical Hospital Dubrava.

The chemiluminescence immunoassay (CLIA) was used for determination of PIVKA-II concentration, and verification of the method was performed according to CLSI EP15-A2 guidelines using two control samples whose concentration was measured in triplicate during 5 days of measurement. The verification process included an assessment of precision, accuracy, measurement uncertainty and a comparison with the method implemented in Clinical Hospital Center Rijeka.

The achieved results for precision, accuracy and mean total error met the set acceptance criteria. The results of the comparison of the tested method with the existing method shown by the Bland-Altman representation and the Passing-Bablok regression analysis do not show the existence of either constant or proportional error that would be statistically significant. However, a discrepancy was observed in the results of some patients due to the application of different methods of determination of the same analyte, which is proof of the incomparability of immunochemical methods. In order to avoid the risk of different clinical interpretation of the results, it is necessary to always monitor each patient using the same method in the laboratory.

Based on the verification results, it is concluded that the newly introduced method of quantitative determination of PIVKA-II in serum meets the set acceptance criteria and can be used in routine laboratory work.

# Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

## Kratka analitička verifikacija metode za određivanje koncentracije PIVKA-II u ljudskom serumu

**Dora Tisaj**

### SAŽETAK

PIVKA-II (engl. Protein Induced by Vitamin K Absence-II or Antagonist-II) abnormalni je oblik protrombina koji se sintetizira u stanju nedostatka vitamina K ili u prisutnosti njegovog antagonista koji inhibira aktivnost enzima gama-karboksilaze ovisne o vitaminu K. Povišene koncentracije PIVKA-II u neoplastičnim stanicama hepatocelularnog karcinoma (HCC) nastaju kao posljedica oštećenog procesa karboksilacije protrombinskog prekursora. U složenom procesu hepatokarcinogeneze PIVKA-II pospješuje staničnu proliferaciju, tumorski rast te pojavu metastaza. Nakon svoga otkrića ova je molekula postala predmetom istraživanja, a njene analitičke odlike poput zadovoljavajuće osjetljivosti i specifičnosti čine je optimalnim tumorskim biljekom u dijagnostici, nadzoru i liječenju HCC-a, bolesti koja bilježi visoku incidenciju i visoku stopu smrtnosti.

Cilj ovog diplomskog rada bio je procijeniti prihvatljivost analitičke metode za kvantitativno određivanje PIVKA-II u humanom serumu na analizatoru Snibe Maglumi 800 procesom verifikacije prije nego ona postane dio rutinskog rada u laboratoriju Kliničke bolnice Dubrava.

Za određivanje koncentracije PIVKA-II korištena je kemiluminiscentna imunometoda (CLIA), a verifikacija metode provedena je prema CLSI EP15-A2 smjernicama koristeći dva kontrolna uzorka čija se koncentracija mjerila u triplikatu tijekom 5 dana mjerenja. Proces verifikacije uključivao je procjenu preciznosti, točnosti, mjerne nesigurnosti te usporedbu s metodom implementiranom u Kliničkom bolničkom centru Rijeka.

Ostvareni rezultati za preciznost, točnost te srednju ukupnu pogrešku zadovoljili su postavljene kriterije prihvatljivosti. Rezultati usporedbe ispitivane metode s postojećom metodom prikazani Bland-Altmanovim prikazom te Passing-Bablockovom regresijskom analizom ne pokazuju postojanje ni konstantne niti proporcionalne pogreške koje bi bile statistički značajne. Međutim, uočen je nesklad u rezultatima kod nekih pacijenata zbog primjene različitih metoda određivanja istog analita što je dokaz neusporedivnosti imunokemijskih metoda. Kako bi se izbjegao rizik od klinički različitog tumačenja rezultata, potrebno je svakog pacijenta laboratorijski pratiti uvijek istom metodom.

Na temelju rezultata verifikacije, zaključuje se da novouvedena metoda kvantitativnog određivanja PIVKA-II u serumu zadovoljava postavljene kriterije prihvatljivosti te se kao takva može koristiti u rutinskom laboratorijskom radu.

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

Rad sadrži: 42 stranice, 5 grafičkih prikaza, 9 tablica i 36 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: PIVKA-II, imunokemijske metode, verifikacija, preciznost, točnost, mjerna nesigurnost, usporedba metoda

Mentor: **Dr. sc. Anita Somborac Bačura**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*;  
**dr. sc. Lovorka Đerek**, *naslovna docentica Medicinskog fakulteta Hrvatskog katoličkog sveučilišta*.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Anita Somborac Bačura**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*.  
**Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky**, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*.  
**Dr. sc. Lovorka Đerek**, *naslovna docentica Medicinskog fakulteta Hrvatskog katoličkog sveučilišta*.

Rad prihvaćen: studeni, 2023.



## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Medical biochemistry  
Department of Medical Biochemistry and Hematology  
Kneza Domagoja 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### Brief analytical verification of the method for determination of PIVKA-II concentration in human serum

**Dora Tisaj**

#### SUMMARY

PIVKA-II (Protein Induced by Vitamin K Absence-II or Antagonist-II) is an abnormal form of prothrombin that is synthesized in the state of vitamin K deficiency or in the presence of its antagonist that inhibits the activity of vitamin K-dependent carboxylase. Elevated concentrations of PIVKA-II in neoplastic cells of hepatocellular carcinoma (HCC) occur as a result of a damaged process of carboxylation of the prothrombin precursor. In the complex process of hepatocarcinogenesis PIVKA-II promotes cell proliferation, tumor growth and the occurrence of metastases. After its discovery, this molecule became the subject of research, and its analytical features, such as satisfactory sensitivity and specificity, make it an optimal tumor marker in the diagnosis, monitoring and treatment of HCC, a disease with a high incidence and high mortality rate.

The aim of this study was to assess the acceptability of the analytical method for the quantitative determination of PIVKA-II in human serum on the Snibe Maglumi 800 analyzer through the verification process before it becomes a part of the routine work in the laboratory of the Clinical Hospital Dubrava.

The chemiluminescence immunoassay (CLIA) was used for determination of PIVKA-II concentration, and verification of the method was performed according to CLSI EP15-A2 guidelines using two control samples whose concentration was measured in triplicate during 5 days of measurement. The verification process included an assessment of precision, accuracy, measurement uncertainty and a comparison with the method implemented in Clinical Hospital Center Rijeka.

The achieved results for precision, accuracy and mean total error met the set acceptance criteria. The results of the comparison of the tested method with the existing method shown by the Bland-Altman representation and the Passing-Bablok regression analysis do not show the existence of either constant or proportional error that would be statistically significant. However, a discrepancy was observed in the results of some patients due to the application of different methods of determination of the same analyte, which is proof of the incomparability of immunochemical methods. In order to avoid the risk of different clinical interpretation of the results, it is necessary to always monitor each patient using the same method in the laboratory.

Based on the verification results, it is concluded that the newly introduced method of quantitative determination of PIVKA-II in serum meets the set acceptance criteria and can be used in routine laboratory work.

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

Thesis includes: 42 pages, 5 figures, 9 tables and 36 references. Original is in Croatian language.

Keywords: PIVKA-II, immunochemical methods, verification, precision, accuracy, measurement uncertainty, method comparison

Mentor: **Anita Somborac Bačura, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry;  
**Lovorka Đerek, Ph.D.** Assistant Professor, The Medical School of the Catholic University of Croatia.

Reviewers: **Anita Somborac Bačura, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.  
**Lidija Bach-Rojecky, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.  
**Lovorka Đerek, Ph.D.** Assistant Professor, The Medical School of the Catholic University of Croatia.

The thesis was accepted: November 2023.