

Andelka Milakara

**Usporedba metoda za određivanje aktivnosti
aminotransferaza sa i bez dodatka piridoksal-
fosfata**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Klinička biokemija organa i organskih sustava 2 na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a izrađen je na Kliničkom zavodu za kemiju KBC Sestre milosrdnice u Zagrebu pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Nade Vrkić

Zahvala

Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Nadi Vrkić koja je svojim znanjem predanošću, strpljenjem i prijateljskim pristupom omogućila izradu ovoga rada. Hvala dr. sc. Nori Nikolac koja je bila moj neposredni voditelj, na velikoj pomoći pri izradi ovoga rada. Hvala svim mojim kolegama i prijateljima na svim lijepim trenucima po kojima ću doživotno pamtiti godine studiranja. Veliko hvala i dr.sc. Sonji Perkov, spec.med.biokemije iz Kliničke bolnice Merkur na nesebičnoj pomoći, korisnim i prijateljskim savjetima koji su uvelike pomogli pri razumijevanju biomedicinske struke, a time i izradi ovoga rada. Na kraju, veliko hvala mojoj obitelji, roditeljima i sestri. Rad posvećujem Gigiju i nećakinji Evi koju pratim od prvog udara i dolaska na ovaj svijet i zbog koje su mi zadnji mjeseci studiranja provedeni u bezuvjetnoj ljubavi i nekontroliranom smijehu koji mi je došao kao svojevrsna antistres terapija. *Bonjour mon chéri!*

Sadržaj:

1. UVOD	1
1.1. Aminotransferaze.....	1
1.1.1 Struktura i funkcija AST-a	2
1.1.2 Struktura i funkcija ALT-a.....	3
1.2. Piridoksal-fosfat.....	5
1.2.1 Struktura i funkcija PLP-a	5
1.3. Klinička značajnost određivanja aminotransferaza i PLP-a	7
1.3.1 Deficit PLP - a.....	10
1.4. Validacija i verifikacija metode.....	10
2.OBRAZLOŽENJE TEME	13
3. MATERIJALI I METODE	14
3.1. Ispitanici i uzorci.....	14
3.2. Metoda određivanja aminotransferaza	15
3.2.1 Standardizacija.....	16
3.3. Verifikacija analitičkih značajki metode.....	18
3.3.1. Preciznost mjerna nesigurnost	18
3.3.2. Istinitost.....	19
3.3.3 Stabilnost.....	20
3.3.4 Usporedivost.....	20
3.4. Statistička obrada podataka.....	21
3.4.1. Kriteriji prihvatljivosti	25
4.REZULTATI.....	27
4.1. Preciznost i mjerna nesigurnost	27
4.2. Istinitost i usporedivost	33
4.3. Stabilnost.....	44
5. RASPRAVA.....	46
6. ZAKLJUČAK	49
7. LITERATURA.....	53
8. SAŽETAK/SUMMARY	50
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

POPIS KRATICA

ALT – alanin aminotferaza (engl. *alanine aminotferase*)

AST – aspartat aminotferaza (engl. *aspartate aminotferase*)

aALT – aktivirana alanin aminotferaza (engl. *activated alanine aminotferase*)

aAST – aktivirana aspartat aminotferaza (engl. *activated aspartate aminotferase*)

CI –interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*)

CLSI – Klinički i laboratorijski institut za standarde (engl. *Clinical and Laboratory Standards Institute*)

CROQALM - Hrvatski centar za vrednovanje kvalitete u laboratorijskoj medicini (engl. *Croatian Cente for Quality Assessment in Laboratory Medicine*)

HDMBLM - Hrvatsko društvo za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu

HR EN ISO – hrvatska norma prema europskoj i međunarodnoj organizaciji za standardizaciju (engl. *International Organization for Standardization*)

IFCC – Međunarodna federacija za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu (engl. *International Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*)

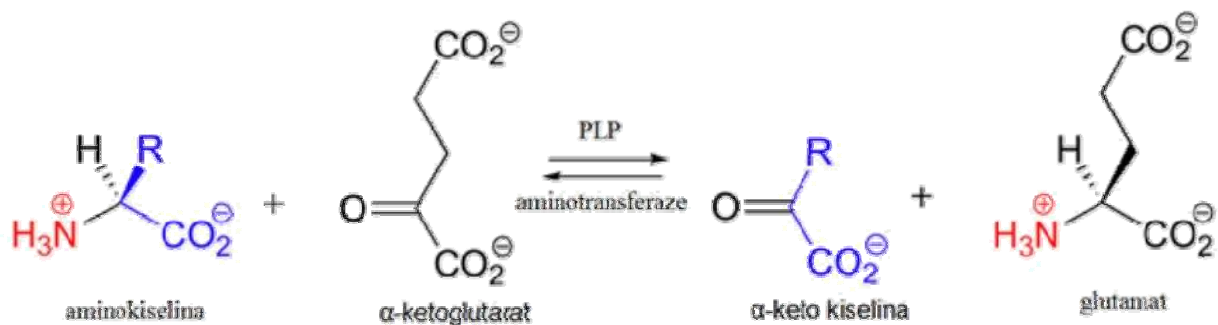
PLP – piridoksal-fosfat (engl. *pyridoxal phosphate*)

SD – standardna devijacija

1. UVOD

1.1. Aminotransferaze

Aminotransferaze su enzimi iz skupine transferaza i kataliziraju reverzibilni prijenos amino skupine s aminokiseline na ketokiselinu (α -ketoglutarat) . Pri tome nastaje nova aminokiselina i time ti enzimi sudjeluju u jednom od najvažnijih procesa u metabolizmu proteina. Ta reakcija transaminacije (Slika 1.) predstavlja početni korak u razgradnji aminokiselina. Piridoksal-fosfat (PLP) je prostetička skupina aminotransferaza u spomenutoj reakciji.

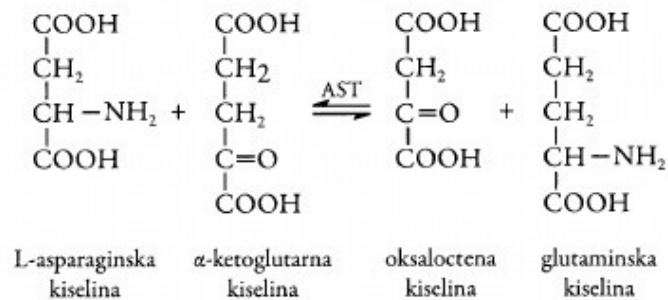


SLIKA 1. Početni korak razgradnje aminokiselina; PLP – piridoksal-fosfat (preuzeto iz Radonjić, 2015)

U organizmu ima više aminotransferaza koje prenose aminoskupine s raznih α -aminokiselina, no samo su dvije aminotransferaze široko rasprostranjene u organizmu. To su aspartat aminotransferaza (EC 2.6.1.1; L-aspartat- α -ketoglutarat-aminotransferaza; AST) i alanin aminotransferaza (EC 2.6.1.2; L-alanin- α -ketoglutarat-aminotransferaza; ALT).

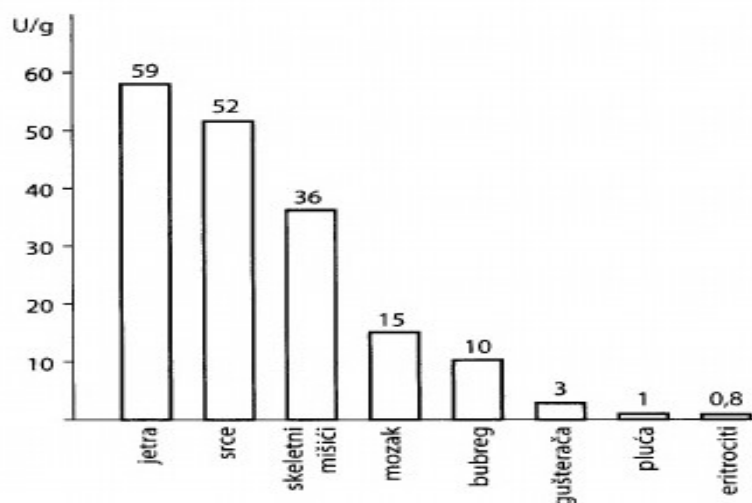
1.1.1 Struktura i funkcija AST-a

Ovaj enzim katalizira reverzibilnu reakciju transaminacije između L-asparaginske kiseline i α -ketoglutarne kiseline.



SLIKA 2. Reakcija katalizirana aspartat aminotransferazom (preuzeto iz Štraus i sur., 2009)

AST-a ima najviše u jetri, srčanom mišiću i skeletnim mišićima te u manjim aktivnostima u mozgu, bubrezima, gušterači, plućima i nizu ostalih tkiva. Nema ga u kostima i zubnoj caklini. Nalazi se i u krvi, mokraći, likvoru, žuči i u drugim tjelesnim tekućinama. U krvnom je serumu aktivnost za oko 10 000 puta manja negoli u srčanom mišiću što je vidljivo na Slici 3.



SLIKA 3. Raspodjela AST-a u čovječjim organima (preuzeto iz Štraus i sur., 2009)

AST se javlja u dva oblika. Enzim je u stanicama lokaliziran oko 40% u citoplazmi, (koji se

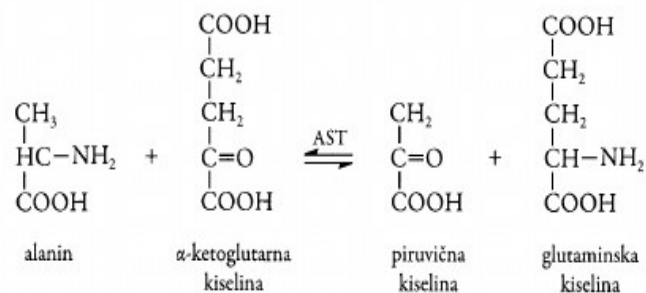
uglavnom nalazi u serumu zdravih osoba, ali i u bolesnika s akutnim hepatitisom), te 60% u mitohondrijima koji se oslobađa u stanjima dugotrajne nekroze stanica, kao što je ciroza jetre, ali i u akutnom infarku miokarda. To su ujedno i izoenzimi AST-a te se razlikuju po pokretljivosti pri elektroforezi, osjetljivosti na promjene pH i termostabilnost.

Citoplazmatski izoenzim ima oznaku AST-1, a mitohondrijski AST-2. Osim po elektroforetičkoj pokretljivosti, ta se dva izoenzima razlikuju i po kromatografskim i imunokemijskim svojstvima, utjecaju pH na aktivnost, termostabilnosti i afinitetu prema supstratu. AST-2 ima veći afinitet prema asparaginskoj kiselini nego AST-1 te je također termolabilniji. AST-1 ima znatno manju aktivnost kod pH6 nego kod optimalnog pH, dok AST-2 nije tako osjetljiv te u rasponu pH od 6 do 9 ne pokazuje znatnije promjene aktivnosti. Ta svojstva izoenzima AST vidljiva su ako se ispituju serumi zdravih osoba i bolesnika s infarktom miokarda, jetrenom cirozom ili akutnim virusnim hepatitisom (Štraus i sur., 2009).

1.1.2 Struktura i funkcija ALT-a

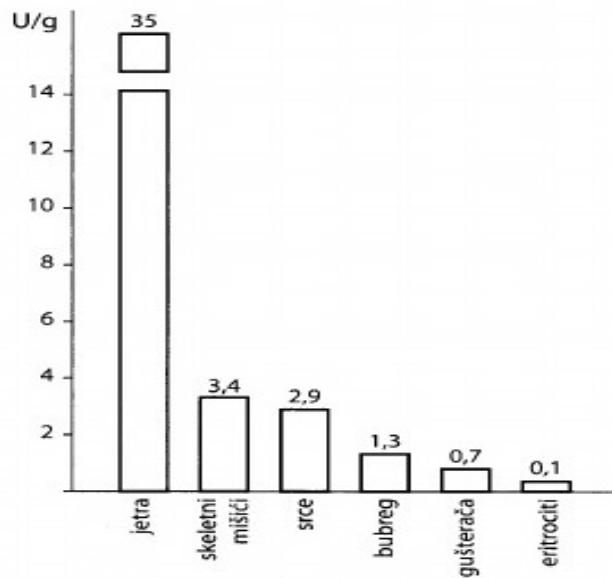
Alanin aminotransferaza katalizira reverzibilnu reakciju transaminacije između L-alanina i α -ketoglutarne kiseline (Slika 4.).

Kao i AST, i ALT ima vrlo važnu ulogu u metabolizmu aminokiselina i proteina te ugljikohidrata.



SLIKA 4. Reakcija katalizirana alanin aminotransferazom (preuzeto iz Štraus i sur., 2009)

ALT je najzastupljeniji u citoplazmi jetrenih stanica, stoga se smatra specifičnim biljekom jetrenog oštećenja (Slika 5.). Osim u jetri, nalazi se u gotovo svim organima, osim u kostima i zubima. Najviše ga je u jetri, skeletnim mišićima, srcu, bubrezima, gušterači, eritrocitima.



SLIKA 5. Raspodjela ALT-a u čovječjim organima (preuzeto iz Štraus i sur., 2009)

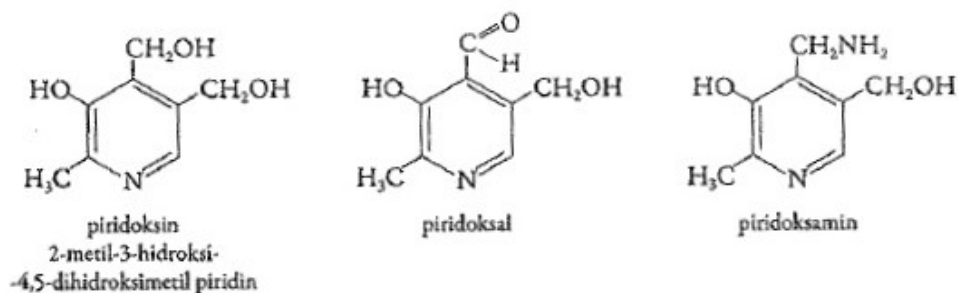
Iako je jetra nešto bogatija AST-om nego ALT-om ipak se ALT smatra specifičnim jetrenim enzimom jer ga u ostalim organima ima relativno malo, mnogo manje nego AST-a (npr. u miokardu). U serumu je 50 000 puta manje ALT-a nego u jetri. Kako je ALT tipičan citoplazmatski enzim, čak i pri manjim oštećenjima tkiva enzim izlazi iz citoplazme u izvanstaničnu tekućinu odnosno cirkulaciju.

1.2. Piridoksal-fosfat

Sve aminotransferaze, kao prostetsku skupinu tj, koenzim, imaju piridoksal-fosfat (PLP).

1.2.1 Struktura i funkcija PLP-a

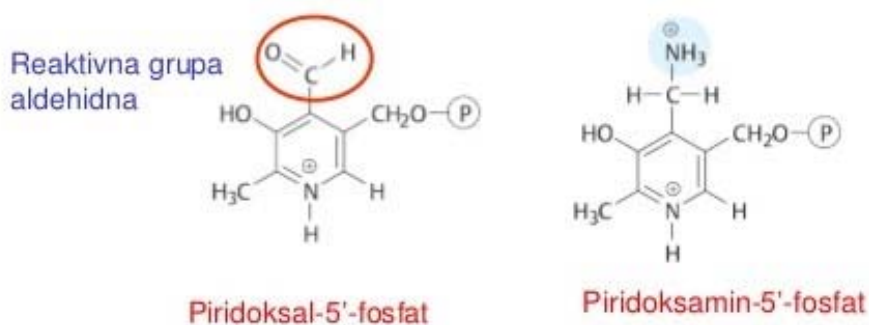
Piridoksal-fosfat potječe od vitamina B6, odnosno piridoksina koji se u stanicama nalazi u obliku PLP-a. Vitamin B6 (Slika 6.) čini skupina od nekoliko strukturno sličnih spojeva: piridoksin (piridoksol) – primarni alkohol, piridoksal – aldehyd i piridoksamin – amin. Vitamin B6 ili piridoksin derivat je piridina (Petlevski, 2009).



SLIKA 6. Spojevi koji čine vitamin B6 (preuzeto iz Štraus i sur., 2009)

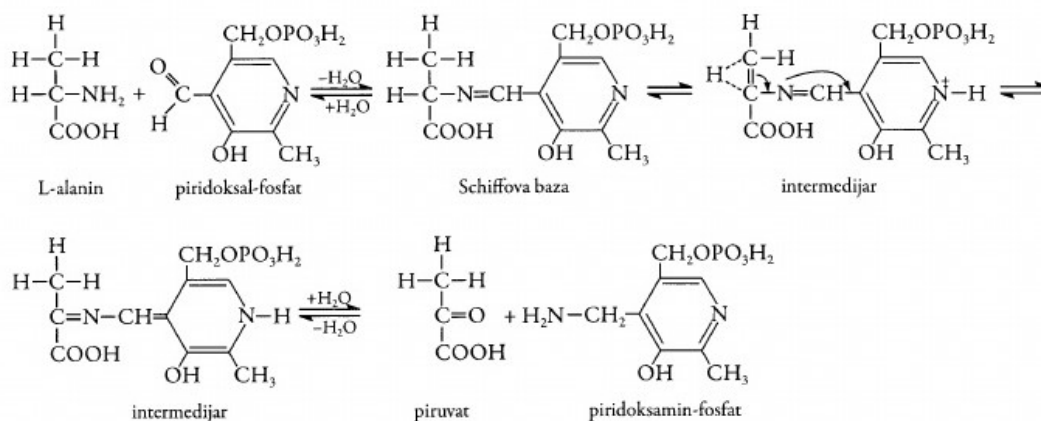
U mješovitoj prehrani malokad dolazi do manjka tog vitamina. Potreba čovjeka za vitaminom B6 iznosi oko 2 mg na dan. Vitamin B6 učinkovit je kao piridoksal-fosfat te on djeluje kao koenzim za brojne kemijske reakcije u metabolizmu aminokiselina i bjelančevina, npr. za aminooksidaze, dehidraze, hidrolaze i sintetaze. Najvažnija mu je uloga da kao koenzim sudjeluje u procesu transaminacije pri sintezi aminokiselina (Guyton i Hall, 2012).

U svim reakcijama, PLP djeluje tako što se njegova aldehydna skupina, (ujedno i najvažnija funkcionalna skupina PLP-a), veže na aminoskupinu aminokiseline na koju enzim djeluje te nastaje međuprodukt – stabilna Schiffova baza s aminokiselinom.



SLIKA 7. Prikaz najvažnije funkcionalne skupine piridoksal-fosfata (PLP-a) (preuzeto s: www.slideshare.net)

Nakon toga dolazi do izmjene dvostruke veze u intermedijarnome spoju. To oslabi veze C-atoma u α - položaju koji će se zbog toga lakše odcijepiti te se intermedijer u prisutnosti vode raspada na ketokiselinu i piridoksamin- fosfat (Slika 7. i 8.) (Petlevski, 2009).



SLIKA 8. Mehanizam reakcije aminokiselina i PLP-a (preuzeto iz Štraus i sur., 2009)

1.3. Klinička značajnost određivanja aminotransferaza i PLP-a

Povišene aminotransferaze u serumu predstavljaju najčešći biokemijski poremećaj u svakodnevnoj kliničkoj praksi. Aktivnosti AST i ALT su povišene u većini jetrenih oboljenja odnosno bolestima hepatobilijarnoga trakta, pri čemu su vrijednosti ALT uglavnom više, izuzev u alkoholnom hepatitisu, cirozi jetre i tumoru jetre (Burtis i sur., 2012).

Oba enzima mogu dostići vrijednost i do 100 puta veću od gornje granice referentnog intervala, ali najčešće su one vrijednosti koje su veće od 10 – 40 puta. Najveća je dijagnostička specifičnost i osjetljivost (>95%) postignuta za vrijednosti do 7 puta veće od gornje granice referentnog intervala. Vršne vrijednosti nisu povezane uz prognozu bolesti te mogu opadati i pored pogoršanja stanja pacijenta (Burtis i sur., 2012).

Ne smijemo zaboraviti da vitamin B6, koenzim aminotransferaza, mora biti prisutan kako bi osigurao funkcioniranje ovih enzima. Naime, nedostatak piridoksal-fosfata, (zbog malnutricije, bubrežne disfunkcije, autoimune bolesti, alkoholizma, hiperhomocisteinemije, upotrebe oralnih kontraceptiva, kompetitivne inhibicije i sl.), rezultira u desaturaciji enzima i smanjenju aminotransferazne aktivnosti (Siest G i sur., 1975; Lopez i sur., 2015).

Osim što je značajan kao koenzim za enzime gdje sudjeluje u sintezi i katabolizmu neurotransmitera, piridoksal-fosfat sudjeluje i u transulfuraciji homocisteina, metabolizmu ostalih aminokiselina, masti te glikogena, regulira aktivaciju hormona i utječe na imunosnu sposobnost. Stoga nam je određivanje njegove koncentracije vrlo bitno, a između ostalog neke studije pokazuju kako upravo deficit ovog vitamina može doprinijeti bolesnom stanju uključujući i kardiovaskularnu bolest (Morris i sur., 2008).

U prilog tome svakako ide i uputa temeljena na preporukama Međunarodne federacije za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu, IFCC-a (engl. *International Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*) koja u svrhu optimizacije i kontrole faktora koji utječu na brzinu odvijanja kemijske reakcije, preporuča dodatak piridoksal-fosfata za optimiranje metode za određivanje aminotransferaza. Dodavanje piridoksal-fosfata reakcijskoj smjesi doprinosi maksimalnoj katalitičkoj aktivnosti aminotransferaza. Nedostatak vitamina B6, a time i piridoksal-fosfata može se očekivati u pacijenata s kroničnom bubrežnom bolesti koji su na hemodijalizi. Pokazano je da dodatak PLP-a u reakcijsku smjesu prilikom određivanja aminotransferazne aktivnosti kod takvih pacijenata, uzrokuje značajno povišenje tih enzima

čime bi se eliminirala pojava lažno sniženih vrijednosti tih enzima uslijed deficita PLP-a uzrokovanog bubrežnom bolesti (Sharma i sur., 2014).

Stoga je klinički značaj određivanja aminotransferaza vrlo bitan jer, osim jetrenih oštećenja, treba imati na umu da na njihovu aktivnost u serumu utječu brojni čimbenici poput fizičke aktivnosti i režima prehrane te dob i spol pa je stoga aktivnost aminotransferaza u serumu u muškaraca viša nego u žena (Siest i sur., 1975; Zhengtao i sur., 2014).

Također, neki lijekovi mogu dovesti do prolaznog povišenja aktivnosti aminotransferaza.

Aktivnost aminotransferaza može varirati i s obzirom na lokalni zemljopisni položaj i etničku pripadnost.

Istraživanja su pokazala da se u oko 6 % zdravih ljudi mogu naći povišene aktivnosti jetrenih enzima. No, može postojati značajno oštećenje jetre (npr. u cirozi ili kroničnom hepatitisu C s nalazima koji su u granicama normale (Balen, 2011).

Isto tako, uočeno je da su vrijednosti blago povišene u bolesnika s masnom jetrom, u nealkoholnom steatohepatitisu i kroničnom virusnom hepatitisu, premda se mogu javiti i tijekom akutnog hepatitisa. Umjereno povišene vrijednosti karakteristične su za cirozu, tumor jetre i hepatitis uzrokovan kroničnim alkoholizmom. U autoimunom hepatitisu aktivnost aminotransferaza srednje je do izrazito povišena, a pogotovo ALT-a koji se u ovom slučaju smatra presudnim ne-invazivnim markerom upale u takvih pacijenata. Uz to, ovaj enzim također prognozira utjecaj imunosupresivne terapije i u konačnici, dugoročno preživljenje pacijenata te je i indikator oštećenja jetre u pacijenata s akutnim i kroničnim virusnim hepatitisom (Zhengtao i sur., 2014).

Povećanje aktivnosti obiju aminotransferaza prati virusni hepatitis i pojavljuje se i do 3 tjedna prije ostalih kliničkih i laboratorijskih znakova bolesti. Pri tome je aktivnost ALT-a uvijek veća od AST-a, a De Ritisov je omjer manji od 1 (u prosjeku oko 0,65). Aktivnost ALT-a se poveća i do 70 – 100 puta iznad gornje granice referentnog intervala, a smanjuje se tijekom bolesti. Za razliku od akutnog, u kroničnom je hepatitisu aktivnost obično normalna ili vrlo malo povećana.

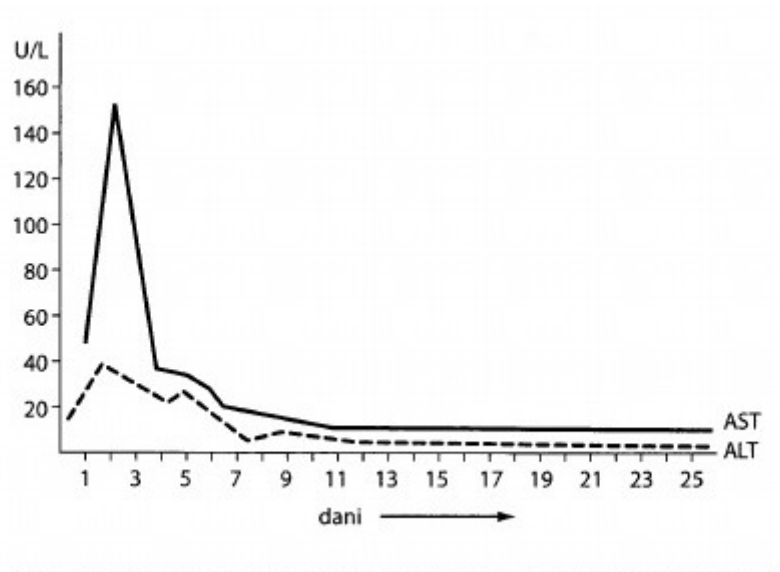
Povećanu aktivnost ovog enzima nalazimo i u gušteračnim bolestima, npr. akutnom i kroničnom pankreatitisu i karcinomu gušterače gdje porast ALT-a potječe iz oštećene gušterače, ali i iz jetre jer često nastaje sekundarno oštećenje jetre.

Poluživot za AST iznosi između 12 i 22 sata, a za ALT od 37 do 57 sati što znači da povišene vrijednosti ALT-a perzistiraju dulje u odnosu na povišene vrijednosti AST-a koje se smanjuju brže upravo zbog kratkog poluživota (Štraus i sur., 2009).

Stoga, i De Ritisov omjer AST/ALT se mijenja s vremenom te postaje manje koristan. Nije ni čudo što se mnogi znanstvenici pitaju je li zaista nužno u rutinskoj praksi potraživati i AST uz ALT te smatraju kako bi se upotreba AST-a trebala reducirati (Larsson i Tryding, 2011).

Međutim, korisnost upotrebe **AST-a** se ne može anulirati. U procesima u kojima dolazi do oštećenja tkiva bogatih AST-om, enzim prelazi u cirkulaciju, što se odražava povećanjem aktivnosti AST-a u serumu. Mjerenje AST-a indicirano je u dijagnozi, razlikovanju i nadzoru hepatobilijarne bolesti, bolesti srca te infarkta miokarda, mišićnih bolesti (mišićna distrofija, dermatomiozitis), emboliji pluća itd.

Na Slici 9. prikazan je tipični slučaj aktivnosti AST-a pri infarktu miokarda. AST se povećava već 6 sati nakon infarkta i doseže maksimum relativno brzo – nakon 24 do 48 sati (maksimalno 10 puta veće od gornje granice referentnog intervala). Nakon toga se, zbog kratkog poluvijeka, relativno brzo smanjuje i vraća na vrijednost unutar referentnog intervala u roku od 3 do 5 dana. Povišenje aktivnosti je razmjerno masi miokarda zahvaćena infarkt.



SLIKA 9. Aktivnost AST-a pri infarktu miokarda (preuzeto iz Štraus i sur., 2009)

Zaključno, aminotransferaze i PLP se, osim u dijagnostici određenih bolesti, koriste i u procjeni rizika te kao prognostički biljezi, ali i kao 'alat' za praćenje terapije.

1.3.1 Deficit PLP - a

Deficit *piridoksal-fosfata* nalazimo u svim skupinama ljudi - u djece i odraslih te u bolesnika kao i u onih koji nisu bolesni. Najčešće nailazimo na manjak PLP-a i to u hospitaliziranih pacijenata (djece i odraslih) zbog bubrežne disfunkcije, oštećenja jetre, autoimune bolesti, alkoholizma, hiperhomocisteinemije, kardiovaskularne bolesti, gušteračnih bolesti, raka dojke, operacija, epilepsije, manjka piridoksin fosfat oksidaze. U zdravih ljudi deficit PLP-a javlja se najčešće zbog malnutricije, upotrebe lijekova, oralnih kontraceptiva te u starijih ljudi (Siest G i sur., 1975; Lopez i sur., 2015; Morris i sur., 2008; Potera i sur., 1977; Albersen i sur., 2015; Huang i sur., 2002).

Povišene vrijednosti PLP-a javljaju se manje i povezane su s povećanom antioksidativnom aktivnošću enzima u kritično bolesnih pacijenata (Cheng i sur., 2013).

1.4. Validacija i verifikacija metode

Cilj svakog medicinsko-biokemijskog laboratorija je kontinuirano praćenje i podizanje ukupna kvalitete usluga koje pruža svojim korisnicima te pravovremeno izdavanje točnih, preciznih i vjerodostojnih nalaza na temelju kojih će biti postavljena ispravna dijagnoza. Jedan od načina podizanja kvalitete usluga je i uvođenje novih metoda i/ili analitičkih sustava u rutinski rad. Kod takvog postupka, bitno je utvrditi je li uvođenje novog sustava potrebno, a i prilikom odabira, obratiti pozornost na kliničku prihvatljivost, praktične zahtjeve (npr. „mrtvi“ volumen uzorka - volumen uređaja od komore za miješanje otapala do početka obrade uzorka prije puštanja na analizator) i cijenu sustava. Prije korištenja novih metoda i/ili analitičkih sustava u rutinskom radu, potrebno je odrediti kriterije prihvatljivosti za određene značajke metode i napraviti postupak evaluacije. Evaluacija je postupak koji nam služi za neovisnu, objektivnu procjenu ili utvrđivanje karakteristika same metode koju uvodimo u rutinski rad, te saznanje jesu li one primjenjive za kliničku svrhu za koju je metoda i namjenjena. Dobiveni eksperimentalni rezultati postupka evaluacije, statistički se obrađuju, te se procjenjuje pogreška metode. Pogreška metode se zatim uspoređuje sa unaprijed određenim kriterijima prihvatljivosti, i na temelju usporedbe, donosi se odluka o (ne)uvođenju nove metode u rutinski rad. Ovisno o opsežnosti postupka evaluacije razlikujemo validaciju i verifikaciju.

Validacija je postupak ispitivanja općih karakteristika određene metode i, s laboratorijskog gledišta, najčešće je provodi sam proizvođač. Za razliku od validacije, **verifikacija** podrazumijeva postupak potvrđivanja općih karakteristika analitičke izvedbe metode koju je postavio proizvođač. Validaciju metode analitičkih sustava provodi uglavnom proizvođač, a korisnik provodi verifikaciju kojom potvrđuje da su sve karakteristike dokazane validacijom primjenjive u svakodnevnom radu laboratorija. Ukoliko medicinski biokemičar metodu proizvođača modificira ili uvodi potpuno novu metodu postavljenu u vlastitom laboratoriju (tzv. *in-house* metoda), potrebno je provesti validaciju.

Postupak validacije sastoji se od ispitivanja sljedećih karakteristika metode:

1. *Preciznost* – slaganje niza nezavisnih mjerenja izvedenih u određenim uvjetima; nepreciznost metode se izražava koeficijentom varijacije (CV %) uz određenu srednju vrijednost ispitivanog analita
2. *Istinitost* – bliskost slaganja između srednje vrijednosti niza vrijednosti dobivenih opetovanim mjerenjem neke veličine i referentne vrijednosti te veličine; mjera istinitosti je odstupanje (engl. *bias*) odnosno razlika dobivenih rezultata ispitivanom metodom u određenim uvjetima i poznate vrijednosti certificiranog referentnog materijala ili vrijednosti izmjerene usporednom metodom
3. *Linearnost* – sposobnost metode unutar određenog područja daje rezultat koji je proporcionalan koncentraciji analita u uzorku
4. *Granica detekcije* – najniža vrijednost analita koja se može detektirati u uzorku
5. *Granica kvantifikacije* – najniža vrijednost analita koja se u odgovarajućim uvjetima može kvantitativno odrediti s odgovarajućom preciznosti i istinitosti
6. *Referentni interval* – interval koji omeđuje vrijednosti za pojedine analite koje se tipično nalaze u određenoj zdravoj populaciji
7. *Analitička specifičnost* – sposobnost metode da ispravno identificira ili mjeri željeni analit u prisutnosti ostalih komponenata uzorka
8. *Utjecaj matrice* – kombinirani učinak svih komponenti uzorka osim analita na rezultat mjerenja
9. *Interferencije* – učinak pojedinih tvari prisutnih u uzorku koje uzrokuju odstupanje izmjerene vrijednost u odnosu na pravu vrijednost

10. *Druge značajke* (test iskorištenja (engl. *recovery*), procjena prenosivosti prethodnog uzorka (engl. *carry over*), dijagnostička osjetljivost i specifičnost, prihvatljivost i stabilnost uzorka i sl.)

Ukoliko se u laboratorij uvodi nova originalna metoda proizvođača s dokazima o provedenoj validaciji od strane proizvođača, dovoljno je provesti verifikaciju metode.

Tijekom postupka **verifikacije** dovoljno je u laboratorijskim uvjetima provjeriti sljedeće značajke (Šimundić, 2013; Saračević, 2013):

1. Preciznost – u koju spada ponovljivost, međulaboratorijska preciznost i mjerna nesigurnost
2. Istinitost
3. Linearnost
4. Referentne intervale

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Uvođenjem nove metode i/ili analitičkog sustava, potrebno je prije njegova korištenja u rutinskom radu laboratorija provesti postupak verifikacije, odnosno potrebno je potvrditi analitičke značajke izvedbe metode i/ili analitičkog sustava. Analitičke značajke izvedbe neke metode i/ili analitičkog sustava zadane su od proizvođača koji ih je ispitao. Postupak verifikacije treba barem obuhvaćati sljedeće analitičke značajke izvedbe metode: nepreciznost, istinitost, linearnost i referentne intervale.

Metoda određivanja aktivnosti aminotransferaza s dodatkom piridoksal-fosfata (aktivirani ALT i aktivirani AST s PLP) prema preporuci Međunarodne udruge za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu (IFCC) uključuje postupak verifikacije te usporedbu s metodom bez dodatka PLP. Smisao primjene PLP jest zbog onih ispitanika koji imaju deficit PLP da bi se izbjegla nedostatna koncentracija PLP u njihovu serumu, a time i prosudba o stvarnom sadržaju enzima.

U skladu s mogućim deficitom PLP cilj ovoga rada bio je provesti istraživanje na skupini bolesnika kod kojih je predvidiv mogući deficit PLP te na skupini ispitanika kod kojih se ne očekuje deficit PLP.

Dio ovog rada uključivao je postupak verifikacije reagensa za aktivirani AST i ALT (aAST i aALT). U tu svrhu određena je preciznost u seriji (ponovljivost), preciznost iz dana u dan (međulaboratorijska preciznost) i mjerna nesigurnost. Također je provjerena i stabilnost aALT-a i aAST-a na sobnoj temperaturi te na temperaturi od 4 – 8 °C kroz 10 dana.

Drugi dio ovog rada uključivao je usporedbu rezultata analize aminotransferaza s obje metode na odabranim skupinama ispitanika te provjeru istinitosti i ostvarivosti deklariranih proizvođačevih specifikacija u uvjetima kliničke primjene na specifičnom analitičkom sustavu.

Specifični ciljevi istraživanja:

- Provesti verifikaciju reagensa za aAST i aALT na planu preciznosti, odstupanja i mjerne nesigurnosti
- Ispitati stabilnost aAST-a i aALT-a kroz 10 dana
- Ispitati istinitost i usporedivost dviju metoda
- Utvrditi stupanj odstupanja rezultata aktivnosti aminotransferaza u ovisnosti o sastavu skupine ispitanika

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanici i uzorci

Tijekom izrade ovog rada korišteni su ostatni uzorci krvi preostali nakon rutinske laboratorijske analize bolničkih pacijenata zaprimljenih u laboratoriju Kliničkog zavoda za kemiju KBC Sestre milosrdnice. Pacijentima su bile u sklopu rutinske obrade ordinirane pretrage ALT i AST. Uzorci su prikupljeni s različitih odjela KBC Sestre milosrdnice (Tablica 1.).

Uzorke smo podijelili u 3 skupine. Uključni je kriterij bila vjerojatnost sadržaja piridoksal-fosfata (PLP) u serumu ispitanika:

1. skupina : uzorci s kliničkih odjela za intenzivnu skrb (vjerojatnost deficita PLP)
2. skupina : uzorci s Klinike za pedijatriju (vjerojatnost snižene koncentracije PLP)
3. skupina : uzorci s različitih kliničkih jedinica kod kojih se ne očekuje deficit PLP (poliklinički bolesnici upućeni iz ordinacija obiteljske medicine, Klinika za kožne i spolne bolesti, Klinika za reumatologiju, fizikalnu medicinu i rehabilitaciju)

Krv je uzorkovana u epruvetu s podtlakom i dodatkom aktivatora zgrušavanja (Vacuette, Griener Bio-one, Austrija). Uzorci su prikupljeni od 2. svibnja do 29. rujna 2016. godine. Odmah po uzimanju krvi uzorci su centrifugirani u laboratorijskoj centrifugi (Universal 32, Hettich, Njemačka) brzinom od 3500 okretaja u minuti kroz 15 minuta te je odvojen serum.

Obradeno je ukupno 211 uzoraka krvi od isto toliko pacijenata, a analitički postupak proveden je za svaki od uzoraka najkasnije za dva sata od primitka. Po primitku, uzorci su analizirani biokemijskim analizatorom (Architect c8000, Abbott, SAD) koji je u rutinskoj primjeni, a nalazi svakog uzorka računalno su pohranjeni kako bi se mogli koristiti u daljnjoj statističkoj obradi. U nastavku analitičkog postupka uslijedilo je određivanje aktivnosti metodom aAST-a i aALT-a na istom analitičkom sustavu, a dobiveni rezultati su se zapisali i pohranili. Rezultati za svaki ispitivani parametar upisani su u računalni program Excel 2007.

TABLICA 1. Popis kliničkih odjela iz kojih su uzeti uzorci pacijenata u KBC Sestre milosrdnice

SKUPINA 1 Bolesnici iz stacionara i dnevnih bolnica te bolesnici iz hitnih ambulanti	SKUPINA 2 Pedijatrijski bolesnici	SKUPINA 3 Ostali ispitanici i bolesnici
Dnevne bolnice Klinike za unutarnje bolesti (za dijabetologiju, endokrinologiju, nefrologiju i imunologiju) Dnevna bolnica i poliklinika Klinike za bolesti srca i krvne žile	Odjeli Klinike za pedijatriju	Odjeli Klinike za kožne i spolne bolesti
Odjeli Klinike za unutarnje bolesti (Hematoonkološki odjel, Odjel intenzivne skrbi, Interventna gastroenterologija, Odjel intervencijske gastroenterologije Zavod za endokrinologiju, Zavod za nefrologiju, Zavod za kliničku imunologiju te Hematološka ambulanta)	Dnevne bolnice i ambulante Klinike za pedijatriju (za endokrinologiju, za gastroenterologiju, za hematologiju, za neurologiju, za pulmologiju te za reumatologiju)	Poliklinički bolesnici upućeni iz obiteljske medicine na laboratorijsku obradu
Hitna neurološka ordinacija Hitna psihijatrijska ordinacija	Hitna pedijatrijska ordinacija	Dnevna bolnica Klinike za kožne i spolne bolesti
Odjeli Klinike za bolesti srca i krvnih žila (Zavod za intenzivnu kardiološku skrb, Zavod za postkoronarnu skrb i aritmije)		Odjeli Klinike za reumatologiju, fizikalnu medicinu i rehabilitaciju

3.2. Metoda određivanja aminotransferaza

Sa svrhom osiguravanja točnih, reproducibilnih i pouzdanih rezultata ne samo unutar pojedinog laboratorija, već i na međunarodnoj razini, ključan je proces harmonizacije. Unatoč primjeni raznovrsnih metoda u provođenju pretraga, različitoj opterećenosti pojedinih sustava

brojem pacijenata, financijskim mogućnostima, zajednički cilj jest postići globalnu harmonizaciju koja bi izjednačila kvalitetu usluge na svjetskoj razini.

3.2.1. Standardizacija

Harmonizacija podrazumijeva prepoznavanje, razumijevanje i objašnjavanje razlika među pojedinim laboratorijima s ciljem postizanja uniformnosti. Sukladno tomu, javila se potreba za revizijom dosadašnjih dokumenata u kojima su opisani postupci provedbe validacije metoda. CLSI (engl. *Clinical and Laboratory Standards Institute*) jedna je od vodećih organizacija koja globalno povezuje sve laboratorije s pomoću specifičnih protokola kojima se žele standardizirati procesi laboratorijskog rada. Takvi protokoli daju smjernice za sve oblike i područja laboratorijskog rada kao što su primjerice smjernice za evaluaciju kvantitativnih mjernih procedura i uređaja (Krower i sur., 2014) ili statistički pristup kontroli kvalitete za kvantitativne mjerne postupke (Curtis i sur., 2016). Navedeni institut redovito izdaje i dopunjuje standarde i smjernice novim izdanjima.

Konačni uspjeh standardizacije i primjene jedinstvenih protokola očituje se u akreditaciji kojom se dodjeljuje certifikat kao potvrda o ispunjavanju svih zahtjeva u upravljanju kvalitetom laboratorija.

Koncentracije aktiviranog aAST određene su kinetičkom spektrofotometrijskom UV metodom primjenom reagensa AST uz dodatak piridoksal-fosfata (engl. *Pyridoxal Phosphate Liquid reagent*) tvrtke Abbott (Abbott Park, USA). Metoda je temeljena na preporukama Međunarodne federacije za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu (IFCC), a vrijednosti ASTa dobivene ovom metodom sljede su prema IFCC referentnoj metodi.

Načelo metode: AST katalizira transaminaciju aspartata i 2-oksoglutarata stvarajući L-glutamat i oksalacetat. Dodavanje piridoksal fosfata reakcijskoj smjesi jamči maksimalnu katalitičku aktivnost AST-a.

Oksalacetat se reducira L-malatdehidrogenazom (MDH) u L-malat, a NADH se istovremeno reducira u NAD⁺. Smanjenje apsorpcije zbog potrošnje NADH mjeri se spektrofotometrijski pri 340 nm i proporcionalno je aktivnosti AST-a u uzorku. Endogeni piruvat uklanja se uz enzim LD tijekom razdoblja inkubacije.

Koncentracije aktiviranog aALT određene su kinetičkom spektrofotometrijskom UV metodom za kvantitativno određivanje katalitičke koncentracije enzima alanin aminotransferaze u serumu.

Načelo metode: Metoda je bazirana na preporukama IFCC-a. ALT katalizira prijenos aminogrupe iz alanina u 2-oksoglutarat pri čemu se svara piruvat i glutamat.

Dodavanje piridoksal-fosfata (PLP) reakcijskoj smjesi doprinosi maksimalnoj katalitičkoj aktivnosti ALT.

Piruvat ulazi u reakciju kataliziranu laktat-dehidrogenazom (LD) s NADH-om pri čemu nastaje produkt laktat i NAD⁺. Smanjenje apsorpcije svjetla zbog potrošnje NADH mjeri se pri 340 nm i proporcionalno je aktivnosti ALT u uzorku. Endogeni piruvat uklanja se tijekom razdoblja inkubacije (Schumann i sur., 2005).

Koncentracije AST određene su fotometrijskom UV metodom (supstrat je L-aspartat bez piridoksal-fosfata).

Načelo metode: Načelo je u bitnom kemizmu identično kao i za aAST metodu. Razlikuje se jedino u izostanku PLP u reakcijskoj smjesi.

Koncentracije ALT određene su fotometrijskom UV metodom (supstrat je L-alanin bez piridoksal-fosfata).

Načelo metode: Načelo je u bitnom kemizmu identično kao i za aALT metodu. Razlikuje se jedino u izostanku PLP u reakcijskoj smjesi.

3.3. Verifikacija analitičkih značajki metode

Verifikacija podrazumijeva postupak potvrđivanja općih karakteristika analitičke izvedbe metode koju je postavio proizvođač. Tijekom postupka verifikacijedovoljno je u laboratorijskim uvjetima provjeriti sljedeće značajke (Šimundić, 2013; Saračević, 2013):

1. Preciznost – u koju spada ponovljivost, međulaboratorijska preciznost i mjerna nesigurnost
2. Istinitost
3. Linearnost
4. Referentne intervale

3.3.1. *Preciznost i mjerna nesigurnost*

Procjena preciznosti metode provedena je prema CLSI protokolu *User Verification of Performance for Precision and Trueness* (CLSI, 2005) upotrebom komercijalnih kontrolnih uzoraka Technopath Multichem S plus Level 1, 2 i 3 pripremljenih u dvije koncentracijske razine na takav način da pokrivaju klinički relevantna koncentracijska područja. Potom su analizirani u triplikatu tijekom pet uzastopnih dana na biokemijskom analizatoru Abbott Architect c8000 (Abbott Park, USA).

Preciznost se definira kao bliskost slaganja između nezavisnih rezultata mjerenja provedenih u propisanim uvjetima. Ovisi isključivo o distribuciji slučajne pogreške i ne govori o točnosti metode i ispravnoj vrijednosti. U ovom istraživanju procjena preciznosti izražava se kao nepreciznost u seriji (ponovljivost) te nepreciznost iz dana u dan (međupreciznost) koja je prikazana kao standardna devijacija i koeficijent varijacije. Ponovljivost je kvantitativna vrijednost koja govori o neslaganju vrijednosti ponovljenih mjerenja odrađenih u identičnim uvjetima. Za razliku od ponovljivosti, međupreciznost ukazuje na neslaganja unutar laboratorija u duljem periodu, pri čemu dolazi do promjene uvjeta tijekom izvedbe metode (promjena serije reagensa, serije kalibratora, analitičara ili drugih izvanjskih uvjeta) (CLSI, 2005).

Usporedbom dobivenih vrijednosti s vrijednostima koje je deklarirao proizvođač donesen je zaključak o prihvatljivosti preciznosti metode te je utvrđeno ima li metoda zadovoljavajuću ponovljivost i međupreciznost.

Potreba za izračunom *mjerne nesigurnosti* proizlazi iz potrebe za usporedivošću rezultata laboratorijskih pretraga. Prema HRN EN ISO 15189 (točka 3.17.), mjerna nesigurnost je parametar povezan s rezultatom mjerenja, koji obilježava raspršenost vrijednosti koje bi se mogle opravdano pripisati mjerenoj veličini. Odnosno, mjerna nesigurnost opisuje raspon vrijednosti unutar koje se nalazi rezultat mjerenja, pri čemu se on s istom vjerojatnošću nalazi unutar cijelog raspona. Mjerna nesigurnost nije pokazatelj pogreške mjernog sustava već promjenjivosti mjernih uvjeta i stoga je svojstvo rezultata mjerenja.

Izvor varijabilnosti u laboratorijskom procesu je svaka pojava koja doprinosi nesigurnosti rezultata mjerenja, a možemo ih pronaći u svim segmentima – prijeanalitičkom, analitičkom i poslijeanalitičkom.

Pomoću proširene mjerne nesigurnosti uz $k=2$ iskazuje se mjerna nesigurnost za 95% rezultata mjerenja. Podatak o mjernoj nesigurnosti ima praktičnu primjenu u ocjeni značajnosti razlike između dva mjerenja, kao i u ocjeni postavljenih analitičkih ciljeva kvalitete (Ćelap I, 2015).

Proširena mjerna nesigurnost U računa se prema formuli u kojoj CV znači koeficijent varijacije.

$$U = 2 \times CV_u \quad [1]$$

Dobivena vrijednost uspoređuje se s odabranim kriterijem prihvatljivosti.

3.3.2. Istinitost

Istinitost mjerenja ukazuje na bliskost slaganja između srednje vrijednosti dobivene iz većeg broja ponavljanih mjerenja i prihvaćene referentne vrijednosti. Numerički se istinitost najčešće prikazuje kao **bias (od engleske riječi bias = jednostrana sklonost, naginjanje)**, a koji predstavlja razliku između očekivane vrijednosti i prihvaćene referentne vrijednosti.

U ovom istraživanju odstupanje je ispitano usporedbom metode aAST i aALT s metodom AST i ALT bez dodatka PLP za svaku od tri skupine ispitanika.

Postojeća razlika izražava se kao odstupanje (engl. *bias*). Bias se sa svojim intervalima pouzdanosti uspoređuje s kriterijima prihvatljivosti. Treba napomenuti da smo kriterije prihvatljivosti kod ispitivanja istinitosti odredili prema poželjnim, odnosno optimalnim specifikacijama za istinitost temeljenim na biološkoj varijabilnosti (www.westgard.com).

3.3.3. Stabilnost

Mjerenje stabilnosti uzorka provedeno je za aAST i aALT uzastopno kroz 10 dana te su se dobivene vrijednosti uspoređivale s uputstvima proizvođača.

3.3.4. Usporedivost

Prilikom usporedbe dviju metoda korisna je primjena *Passing- Bablok* te *Bland-Altman* analize kojom se dobivaju informacije o slaganju dviju metoda i mogućoj sistemskoj pogriješci između njih. *Passing-Bablok* regresijskom analizom rezultati se iskazuju točkastim slikovnim prikazom i pravcem regresije te jednadžbom pravca gdje vrijednost odsječka predstavlja konstantno, a vrijednost nagiba proporcionalno odstupanje u mjerenjima. Vrijednosti granica pouzdanosti od 95% za odsječak i za nagib upućuju na zaključak je li vrijednost odsječka različita od nule, a vrijednost nagiba od jedan samo slučajaj, odnosno je li razlika statistički značajna, na temelju čega se donosi zaključak o podudarnosti metoda i mogućim korektivnim postupcima. Slikovni prikaz ostataka, odnosno reziduala upućuje na postojanje vrijednosti koje su znatno izvan skupa podataka i mogući nelinearan odnos među podacima (Bilić-Zulle, 2011).

Ako se korištenjem dviju metoda dobiju dvije skupine podataka koje dobro koreliraju, odnosno imaju visoki koeficijent korelacije s mogućim sličnim varijancama ne može se sa sigurnošću tvrditi kako se te metode slažu. Visoka korelacija može biti posljedica velikog distribucijskog raspona jedne skupine podataka. Kao alternativni put kojim je moguće analizirati takve razlike metoda vrlo često se primjenjuje *Bland Altman* analiza. Rezultat *Bland Altman* analize je grafikon (engl. *difference plot*) koji prikazuje odnos razlike mjerenja između dviju metoda i vrijednosti mjerenja dobivene bez i sa referentnom metodom (u ovom istraživanju to je ona metoda u čiju reakcijsku smjesu dodajemo PLP). U odnosu na *Passing-Bablok* regresijsku metodu *Bland-Altman* metoda nije robustna, odnosno važno je kako su podaci raspodijeljeni jer se srednja vrijednost razlike mjerenja prikazuje samo kod neproporcionalnih odstupanja (kod normalne raspodjele po Gaussu) (Giavarinan, 2015).

3.4. Statistička obrada podataka

Za prikaz rezultata i statističku obradu podataka korišteni su računalni programi Excel 2007, Microsoft office (Microsoft, USA) i MedCalc v. 17.8.6 (MedCalc Software, Ostend, Belgija). Uporabom programa Microsoft Office Excel 2007 obrađeni su podaci potrebni za procjenu analitičkih značajki uređaja (preciznosti, istinitosti, mjerne nesigurnosti) te potom uspoređivani s kriterijima prihvatljivosti koje je deklarirao proizvođač.

Korištenjem deskriptivne analize prikazani su dobiveni podaci, a skupovi podataka ispitani su Kolmogorov-Smirnovljevim statističkim testom na normalnost raspodjele. Ukoliko je razdioba bila normalna primjereni su parametrijski testovi, a podaci se prikazuju kao srednja vrijednost (aritmetička sredina) i standardna devijacija, a ako distribucija nije normalna primjenjuju se neparametrijski testovi, a varijable izražavaju medijanom i interkvartilnim rasponom (Šimundić, 2006). Primjereni su i grafički prikazi koji slikovito prikazuju raspodjelu podataka.

Statistička značajnost procjenjivana je na razini $P < 0,05$.

Procjenu preciznosti izračunavamo prema formulama za nepreciznosti u seriji (ponovljivost) i nepreciznost iz dana u dan (međupreciznost). Preciznost isključivo ovisi o distribuciji slučajne pogreške te ne govori o točnosti i pravoj vrijednosti. Nepreciznost se izražava kao standardna devijacija (SD) ili koeficijent varijacije koji govori o odnosu standardne devijacije prema aritmetičkoj sredini (koliko % od aritmetičke sredine iznosi standardna devijacija) (Šimundić, 2006).

a) Ponovljivost (preciznost u seriji)

Skupno standardno odstupanje za 5 dana ($D=5$).

$$S_r = \sqrt{\frac{Sd_1^2 + Sd_2^2 + Sd_3^2 + Sd_4^2 + Sd_5^2}{D}} \quad [2]$$

gdje je $Sd_1, Sd_2, Sd_3, Sd_4, Sd_5$ standardno odstupanje za svaku seriju od tri mjerenja, a S_r standardno odstupanje za 5 dana.

KV je koeficijent varijacije, a \bar{x} aritmetička sredina.

$$KV(\%) = \frac{Sr \times 100}{\bar{x}} \quad [3]$$

Aritmetička sredina daje podatak o prosječnoj vrijednosti, tj. srednjoj vrijednosti serije podataka, dok standardna devijacija govori o prosječnom odstupanju od srednje vrijednosti, tj. o mjeri raspršenja serije podataka. S obzirom kako je standardna devijacija to veća što je veći broj s kojim opisujemo mjerenje, bolji pokazatelj jest koeficijent varijacije. Koeficijent varijacije (KV) je statistička mjera rasipanja podataka oko srednje vrijednosti. Definira se kao omjer standardne devijacije i srednje vrijednosti, a izražava se kao postotak.

b) Međupreciznost (preciznost iz dana u dan)

Međupreciznost se računa preko varijance srednjih vrijednosti mjerenja (S_b) izračunatih za svaki dan eksperimenta.

S_b – međupreciznost; standardno odstupanje aritmetičkih sredina dobivenih za svaki dan (seriju) mjerenja ($D=5$) te predstavlja validacijsku međupreciznost kod ponavljanih mjerenja.

c) Ukupna laboratorijska preciznost (unutar-laboratorijska preciznost)

Ukupna laboratorijska preciznost se izražava kao S_1 i znači unutarlaboratorijsko standardno odstupanje.

Dobiveni rezultat (KV – koeficijent varijacije) predstavlja unutarlaboratorijsku preciznost metode i uspoređuje se s odabranim kriterijem prihvatljivosti.

d) Usporedivost

Usporedba metode s postojećim sustavom uključuje:

- 1) Izračun srednjeg odstupanja (istinitost)
- 2) Bland-Altmanovu analizu
- 3) Passing. Bablokovu regresijsku analizu

1) IZRAČUN SREDNJE OdstUPANJA

Kod ispitivanja istinitosti, izračunato je srednje odstupanje između metoda (engl. *bias*, %) koje se računa prema formuli:

$$BIAS = (Metoda\ 2 - Metoda\ 1) / Metoda\ 1 \times 100 \quad [4]$$

Metoda 1: Postojeća metoda

Metoda 2: Nova metoda

Izračuna se odstupanje za svaki par rezultata pojedinačno. Da bi se izbjeglo poništavanje pozitivnih i negativnih rezultata, izračuna se apsolutna vrijednost za svako odstupanje. Srednje odstupanje se računa kao srednja vrijednost apsolutnih vrijednosti pojedinačnih odstupanja. Prilikom procjene istinitosti nastojali smo zadovoljiti barem poželjne kriterije prihvatljivosti (www.westgard.org), a ispunjavanje poželjnih i optimalnih kriterija ukazuje na izvrsnu podudarnost rezultata nove metode u odnosu na staru.

Procjena istinitosti napravljena je i uporabom MedCalc softvera u kojem su podaci obrađeni Passing Bablok regresijom i Bland-Altman analizom. Na temelju dobivenih grafikona doneseni su zaključci o (ne)postojanju konstantne i/ili proporcionalne razlike u izmjerenim vrijednostima dobivenima upotrebom nove metode (referentne metode s dodatkom PLP-a) u odnosu na staru metodu (bez dodatka PLP-a).

2) BLAND-ALTMANOVA ANALIZA

Bland-Altmanova analiza je slikovna statistička metoda za usporedbu dviju analitičkih metoda. Ova se analiza izrađuje u statističkom programu MedCalc. Prilikom izrade analize potrebno je u opcijama prikaza odabrati parametre tako da se na osi x prikazuju rezultati metode bez PLP (stara metoda), a na osi y omjer rezultata s dvije metode (AST-aAST/ALT) izražen kao postotak (%). Ovaj postotak predstavlja odstupanje nove metode (s PLP) od stare metode.

Nakon izrade grafičkog prikaza procjenjuje se ukazuje li ova analiza na postojanje proporcionalnog ili konstantnog odstupanja. Provjeri se u kojem su koncentracijskom rasponu

odstupanja najveća. Rezultat se izražava opisno i služi za orijentacijsku procjenu odstupanja na različitim koncentracijskim razinama.

Navedena metoda odgovara na pitanje je li postojeća razlika između dviju metoda statistički značajna. Ako ne postoji razlika u mjerenjima dviju metoda, srednja vrijednost svih razlika mjerenja (engl. *mean*) iznosi 0. Ako su razlike mjerenja normalno distribuirane, očekujemo da 95% razlika ulazi u područje $\pm 1,96$ SD. Da bismo zaključili postoji li sistematsko neslaganje između dvije metoda, srednja vrijednost svih razlika mjerenja mora biti različita od 0 čime razlika između dviju metoda postoji te zaključujemo da postoji statistički značajna razlika.

3) PASSING-BABLOKOVA REGRESIJSKA ANALIZA

Ova analiza je kvantitativna statistička metoda za usporedbu dviju metoda od kojih ni jednu ne možemo smatrati referentnom, već su obje jednakovrijedne. Izrađuje se u statističkom programu MedCalc te omogućuje utvrđivanje statistički značajnog konstantnog ili proporcionalnog odstupanja.

Rezultat Passing- Bablokove regresijske analize je jednadžna pravca u obliku:

$$y = a (95\% CI) + b (95\% CI) x \quad [5]$$

a - odsječak na osi y

b - koeficijent smjera pravca

95% CI – 95%-tni interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*)

e) *Stabilnost*

U sklopu ovoga rada nije se provjeravala stabilnost na -20 °C jer je prema uputstvima proizvođača na toj temperaturi deklarirana dugotrajna stabilnost. Za provjeru stabilnosti odabrali smo 4 uzorka s povišenim vrijednostima aAST i aALT kako je prikazano u Tablici 2. Svim uzorcima je mjerena aktivnost oba enzima jednom dnevno tijekom 10 dana.

TABLICA 2. Priprema uzoraka za procjenu stabilnosti

<i>UZORAK</i>	<i>NAČIN OBRADE</i>
Uzorak 1	Alikvotirati serum i pohraniti na sobnu temperaturu
Uzorak 2	Alikvotirati serum i pohraniti na 4-8 °C
Uzorak 3	Ostaviti uzorak seruma na stanicama i pohraniti na sobnu temperaturu
Uzorak 4	Ostaviti uzorak seruma na stanicama i pohraniti na 4-8 °C

TABLICA 3. Kriteriji prihvatljivosti za stabilnost prema deklaraciji proizvođača

PRETRAGA	SOBNA TEMPERATURA	4-8 ° C
aALT	3 dana	7 dana
aAST	4 dana	7 dana

3.4.1. Kriteriji prihvatljivosti

U vanjskoj procjeni analitičke kvalitete medicinsko-biokemijskih laboratorija u Europi kao kriteriji prihvatljivosti dobivenih rezultata koriste se različite ciljne vrijednosti ovisno o organizatoru i namjeni programa. Definirane su prema veličini biološke varijacije, aktualnom stanju struke, kliničkim kriterijima ili kombinaciji navedenog ovisno o pojedinim područjima laboratorijske dijagnostike. Na međunarodnoj konferenciji u Stockholmu 1999. godine “Strategies to Set Global Analytical Quality Specifications in Laboratory Medicine“ postignut je dogovor o hijerarhiji analitičkih ciljeva kvalitete u laboratorijskoj medicini prema kojem se na vrhu ljestvice nalaze klinički i biološki kriteriji. Ciljne vrijednosti definirane temeljem bioloških kriterija zadovoljavaju medicinske potrebe u postavljanju diferencijalne dijagnoze, pretraživanju populacije, praćenju učinka terapije te kliničkom praćenju bolesnika za veliki broj laboratorijskih pretraga (Flegar-Meštrić i sur., 2005).

Kriterij prihvatljivosti za ponovljivost određen je prema deklaraciji proizvođača, za unutarlaboratorijsku preciznost i istinitost prema poželjnim kriterijima za nepreciznost i

istinitost temeljenim na biološkoj varijabilnosti, a dostupni su na www.westgard.com te u "Current databases on biologic variation: pros, cons and progress" (Ricos i sur., 1999).

Za usporedbu, mjernu nesigurnost i stabilnost, kriteriji prihvatljivosti definirani su prema CROQALM-u (Hrvatski centar za vrednovanje kvalitete u laboratorijskoj medicini, HDMBLM). Tablica 4. prikazuje korištene kriterije prihvatljivosti u ovome radu.

Tablica 4. Kriteriji prihvatljivosti za aALT i aAST korišteni u ovome radu

		aAST	aALT
PONOVLJIVOST (%)		<i>6,00</i>	<i>6,00</i>
UNUTARLABORATORIJSKA PRECIZNOST (%)		<i>6,15</i>	<i>9,70</i>
USPOREDIVOST (%)		<i>17,00</i>	<i>14,00</i>
MJERNA NESIGURNOST (%)		<i>17,00</i>	<i>14,00</i>
BIAS (%)	POŽELJNI	<i>6,54</i>	<i>11,48</i>
	OPTIMALNI	<i>3,3</i>	<i>5,7</i>

4. REZULTATI

4.1. Preciznost i mjerna nesigurnost

TABLICA 5. Ispitivanje preciznosti za aALT za kontrolni uzorak Multichem S level 1

Kontrolni uzorak Multichem S – Level 1 za aALT (U/L)					
Dan	1	2	3	4	5
Mjerenje 1	23	22	23	22	23
Mjerenje 2	23	22	24	24	23
Mjerenje 3	23	22	23	25	23
Aritmetička sredina (\bar{x})	23,0	22,0	23,3	23,7	23,0
Standardno odstupanje za svaku seriju od tri mjerenja: Sd1, Sd2, Sd3, Sd4, Sd5	0	0	0,57	1,52	0
PONOVLJIVOST (CV) (nepreciznost u seriji)			3,18%		
MEĐUPRECIZNOST (CV) (nepreciznost iz dana u dan)			3,75%		
MJERNA NESIGURNOST (U, k = 2)			8%		

CV je koeficijent varijacije, U je proširena mjerna nesigurnost, a k je faktor kojim je obuhvaćen raspon za 95% mjerenja.

Izmjerene nepreciznosti za kontrolni uzorak Multichem S Level 1 za aALT nalaze se unutar vrijednosti koje je odredio proizvođač. Nepreciznost u seriji za ovaj kontrolni uzorak iznosi 3,18%, a nepreciznost iz dana u dan 3,75% te obje vrijednosti kao i mjerna nesigurnost od 8% nalaze se unutar kriterija prihvatljivosti.

TABLICA 6. Ispitivanje preciznosti za aALT za kontrolni uzorak Multichem S level 2

Kontrolni uzorak Multichem S – Level 2 za aALT (U/L)					
Dan	1	2	3	4	5
Mjerenje 1	96	96	98	97	95
Mjerenje 2	99	96	98	98	96
Mjerenje 3	99	97	98	98	97
Aritmetička sredina (\bar{x})	98,0	96,3	98,0	97,7	96,0
Standardno odstupanje za svaku seriju od tri mjerenja: Sd1, Sd2, Sd3, Sd4, Sd5	1,73	0,58	0,00	0,58	1,00
PONOVLJIVOST (CV) (nepreciznost u seriji)			0,99%		
MEĐUPRECIZNOST (CV) (nepreciznost iz dana u dan)			1,28%		
MJERNA NESIGURNOST (U,k = 2)			3%		

CV je koeficijent varijacije, U je proširena mjerna nesigurnost, a k je faktor kojim je obuhvaćen raspon za 95% mjerenja.

Izmjerene nepreciznosti za kontrolni uzorak Multichem S Level 2 za aALT nalaze se unutar vrijednosti koje je odredio proizvođač. Nepreciznost u seriji za ovaj kontrolni uzorak iznosi 0,99%, a nepreciznost iz dana u dan 1,28% te obje vrijednosti kao i mjerna nesigurnost od 3% nalaze se unutar kriterija prihvatljivosti.

TABLICA 7. Ispitivanje preciznosti za aALT za kontrolni uzorak Multichem S level 3

Kontrolni uzorak Multichem S – Level 3 za aALT (U/L)					
Dan	1	2	3	4	5
Mjerenje 1	240	239	231	238	234
Mjerenje 2	239	240	233	239	235
Mjerenje 3	241	239	233	240	235
Aritmetička sredina (\bar{x})	240,0	239,3	232,3	239,0	234,7
Standardno odstupanje za svaku seriju od tri mjerenja: Sd1, Sd2, Sd3, Sd4, Sd5	1,00	0,58	1,15	1,00	0,58
PONOVLJIVOST (CV)(nepreciznost u seriji)			0,38%		
MEĐUPRECIZNOST (CV)(nepreciznost iz dana u dan)			1,46%		
MJERNA NESIGURNOST (U,k = 2)			3%		

CV je koeficijent varijacije, U je proširena mjerna nesigurnost, a k je faktor kojim je obuhvaćen raspon za 95% mjerenja.

Izmjerene nepreciznosti za kontrolni uzorak Multichem S Level 3 za aALT nalaze se unutar vrijednosti koje je odredio proizvođač. Nepreciznost u seriji za ovaj kontrolni uzorak iznosi 0,38%, a nepreciznost iz dana u dan 1,46% te obje vrijednosti kao i mjerna nesigurnost od 3% nalaze se unutar kriterija prihvatljivosti.

TABLICA 8. Ispitivanje preciznosti za aAST za kontrolni uzorak Multichem S level 1

Kontrolni uzorak Multichem S – Level 1 za aAST (U/L)					
Dan	1	2	3	4	5
Mjerenje 1	41	41	40	42	41
Mjerenje 2	41	41	40	40	40
Mjerenje 3	40	40	40	41	41
Aritmetička sredina (\bar{x})	40,7	40,7	40,0	41,0	40,7
Standardno odstupanje za svaku seriju od tri mjerenja: Sd1, Sd2, Sd3, Sd4, Sd5	0,57	0,57	0	1	0,57
PONOVLJIVOST (CV)(nepreciznost u seriji)			1,56%		
MEĐUPRECIZNOST (CV) (nepreciznost iz dana u dan)			1,56%		
MJERNA NESIGURNOST (U,k = 2)			3%		

CV je koeficijent varijacije, U je proširena mjerna nesigurnost, a k je faktor kojim je obuhvaćen raspon za 95% mjerenja.

Izmjerene nepreciznosti za kontrolni uzorak Multichem S Level 1 za aAST nalaze se unutar vrijednosti koje je odredio proizvođač. Nepreciznost u seriji za ovaj kontrolni uzorak iznosi 1,56%, a nepreciznost iz dana u dan 1,56% te obje vrijednosti kao i mjerna nesigurnost od 3% nalaze se unutar kriterija prihvatljivosti.

TABLICA 9. Ispitivanje preciznosti za aAST za kontrolni uzorak Multichem S level 2

Kontrolni uzorak Multichem S – Level 2 za aAST (U/L)					
Dan	1	2	3	4	5
Mjerenje 1	127	125	127	127	126
Mjerenje 2	126	126	128	127	126
Mjerenje 3	127	126	126	128	126
Aritmetička sredina (\bar{x})	126,7	125,7	127,0	127,3	126,0
Standardno odstupanje za svaku seriju od tri mjerenja: Sd1, Sd2, Sd3, Sd4, Sd5	0,57	0,57	1	0,57	0
PONOVLJIVOST (CV)(nepreciznost u seriji)			0,50%		
MEĐUPRECIZNOST (CV)(nepreciznost iz dana u dan)			0,68%		
MJERNA NESIGURNOST (U,k = 2)			1%		

CV je koeficijent varijacije, U je proširena mjerna nesigurnost, a k je faktor kojim je obuhvaćen raspon za 95% mjerenja.

Izmjerene nepreciznosti za kontrolni uzorak Multichem S Level 2 za aAST nalaze se unutar vrijednosti koje je odredio proizvođač. Nepreciznost u seriji za ovaj kontrolni uzorak iznosi 0,50%, a nepreciznost iz dana u dan 0,68% te obje vrijednosti kao i mjerna nesigurnost od 1% nalaze se unutar kriterija prihvatljivosti.

TABLICA 10. Ispitivanje preciznosti za aAST za kontrolni uzorak Multichem S level 3

Kontrolni uzorak Multichem S – Level 3 za aAST (U/L)					
Dan	1	2	3	4	5
Mjerenje 1	256	255	259	256	255
Mjerenje 2	256	255	261	257	255
Mjerenje 3	258	255	261	259	256
Aritmetička sredina (\bar{x})	256,7	255,0	260,3	257,3	255,3
Standardno odstupanje za svaku seriju od tri mjerenja: Sd1, Sd2, Sd3, Sd4, Sd5	1,15	0,00	1,15	1,53	0,58
PONOVLJIVOST (CV)(nepreciznost u seriji)			0,40%		
MEĐUPRECIZNOST (CV)(nepreciznost iz dana u dan)			0,89%		
MJERNA NESIGURNOST (U,k = 2)			2%		

CV je koeficijent varijacije, U je proširena mjerna nesigurnost, a k je faktor kojim je obuhvaćen raspon za 95% mjerenja.

Izmjerene nepreciznosti za kontrolni uzorak Multichem S Level 3 za aAST nalaze se unutar vrijednosti koje je odredio proizvođač. Nepreciznost u seriji za ovaj kontrolni uzorak iznosi 0,40%, a nepreciznost iz dana u dan 0,89% te obje vrijednosti kao i mjerna nesigurnost od 2% nalaze se unutar kriterija prihvatljivosti.

4.2. Istinitost i usporedivost

1. SKUPINA ISPITANIKA

Dobiveno srednje odstupanje (apsolutni bias) između metoda (ALT i aALT) u 1. skupini ispitanika iznosi 11,77% što nije u skladu s definiranim kriterijima prihvatljivosti od optimalno 5,7% odnosno poželjno 11,48%.

Passing-Bablok regresija za ALT

N=108

Jednadžba pravca: $y = -3,038462 (-4,0000 \text{ do } -1,7969) + 1,115385 (1,0938 \text{ do } 1,1429) x$

Test linearnosti: Nema odstupanja (P=0,8)

Jednadžba pravca u zagradama navodi 95%-tni interval pouzdanosti (95% CI).

Postoji konstantna razlika u izmjerenim vrijednostima ALT i aALT (95% CI ne sadrži 0) čime se odbija hipoteza da je $A=0$ te se zaključuje da je 95%-tni interval pouzdanosti za odsječak A različit od nule te da se metode razlikuju (nisu suglasne), tj. postoji konstantna pogreška. 95%-tni interval pouzdanosti za nagib pravca ne sadrži 1 što dokazuje da se metode razlikuju za neku vrijednost, tj. da postoji i proporcionalna pogreška.

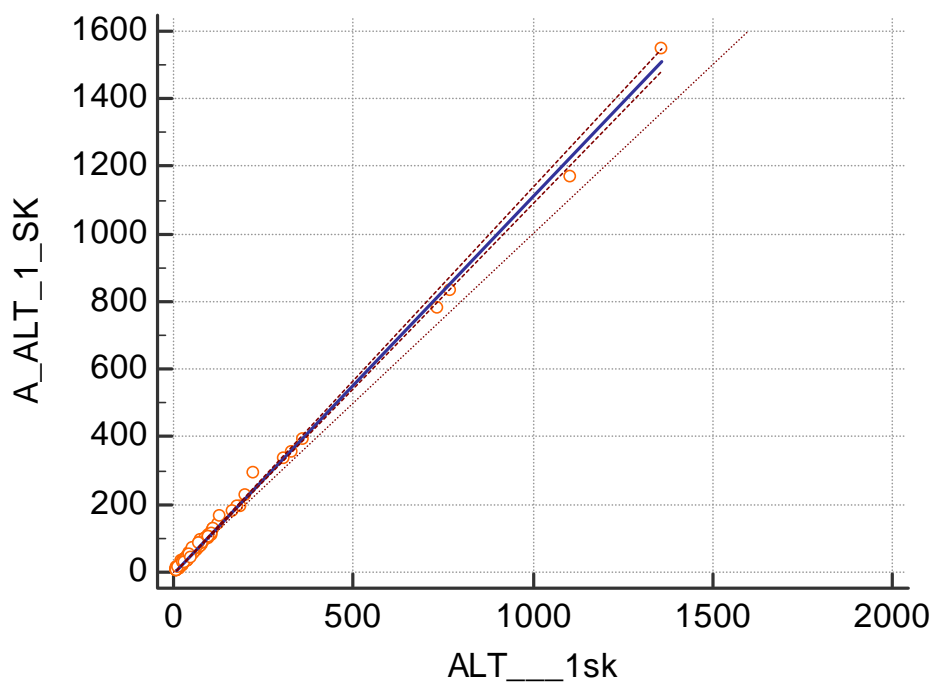
Grafikon za Passing-Bablok regresijsku analizu prikazan je na Slici 10.

Plava crta predstavlja regresijski pravac, a crvena isprekidana crta je linija jednakosti. Passing-Bablok regresijska analiza ukazuje na proporcionalno odstupanje dviju metoda.

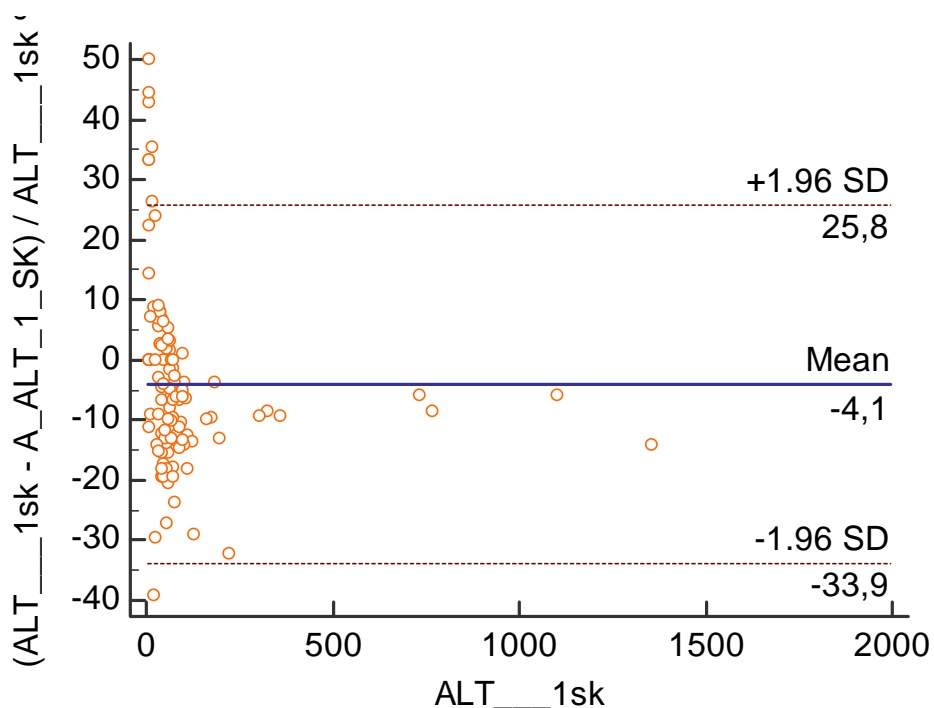
Bland-Altman analiza za ALT

N=108

Na slici 11. Prikazan je Bland-Altmanov grafikon za usporedbu metoda. Plava crta predstavlja srednju vrijednost odstupanja između 2 mjerenja, a crvene iscrtkane linije prikazuju granice prihvatljivosti odnosno raspon od $\pm 1,96$ standardne devijacije (SD).



SLIKA 10. Passing- Bablokova regresijska analiza. Na osi x prikazane su vrijednosti ALT izmjerene bez PLP-a, a na osi y vrijednosti uz dodatak PLP-a



SLIKA 11. Bland-Altmanov grafikon za usporedbu dviju metoda. Na x osi prikazane su srednje vrijednosti mjerenja ALT-a sa starom metodom, a na y osi razlike između dva mjerenja ALT-a sa starom i aALT metodom u omjeru prema staroj metodi (ALT-aALT/ALT%)

Dobiveno srednje odstupanje (apsolutni bias) između metoda (AST i aAST) u 1.skupini ispitanika iznosi 23,34% što nije u skladu s definiranim kriterijima prihvatljivosti od optimalno 3,3% odnosno poželjno 6,54%.

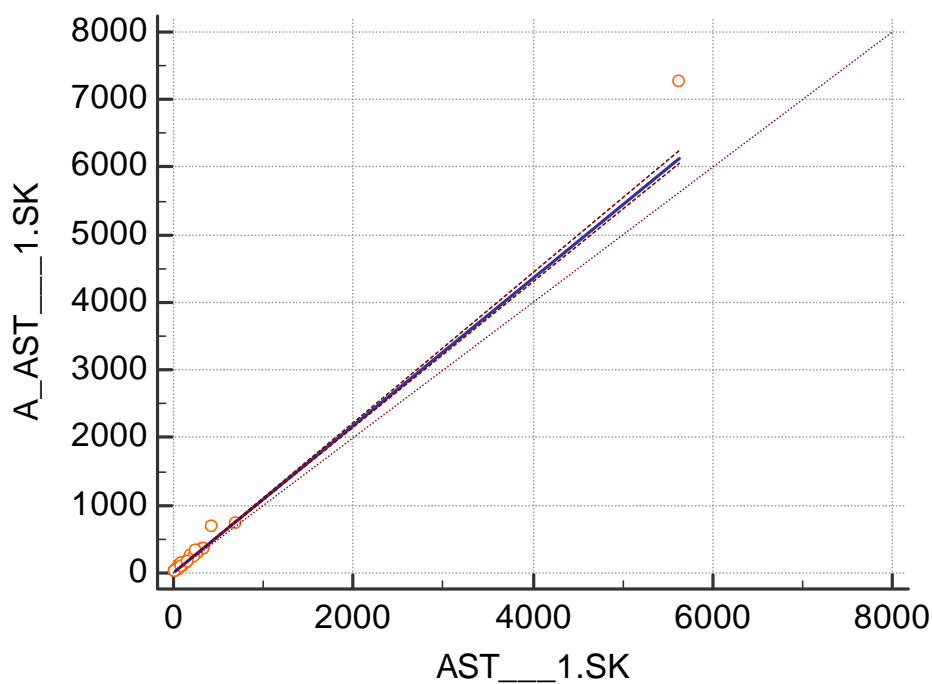
Passing-Bablok regresija za AST

N=108

Jednadžba pravca: $y = 4,037415 (2,9567 \text{ do } 5,0125) + 1,088435 (1,0750 \text{ do } 1,1106) x$

Test linearosti: Nema odstupanja (P=0,4)

Postoji i konstantno i i proporcionalno odstupanje mjerenih rezultata. A je značajno različit od 0, a B je različit od 1.

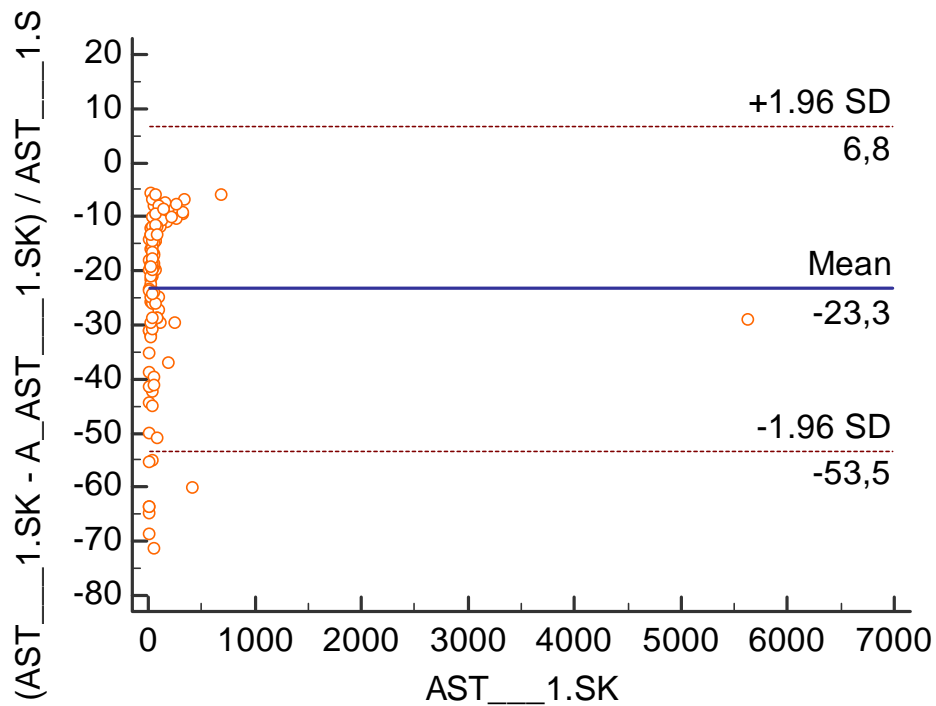


SLIKA 12. Passing- Babloкова regresijska analiza. Na osi x prikazane su vrijednosti AST izmjerene bez PLP-a, a na osi y vrijednosti uz dodatak PLP-a.

Bland-Altman analiza za AST

N=108

Na Slici 13. prikazana je Bland-Altmanova analiza za AST u 1. skupini ispitanika.



SLIKA 13. Bland-Altmanov grafikon za usporedbu dviju metoda. Na x osi prikazane su srednje vrijednosti mjerenja AST-a sa starom metodom, a na y osi razlike između dva mjerenja AST-a sa starom i aAST metodom u omjeru prema staroj metodi (AST-aAST/AST%)

2. SKUPINA ISPITANIKA

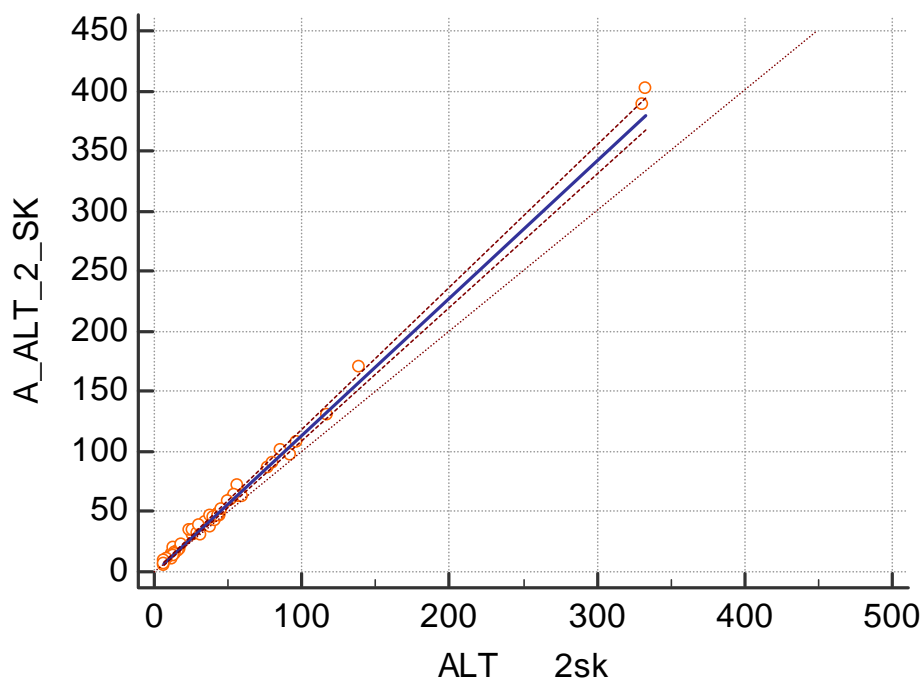
Dobiveno srednje odstupanje (apsolutni bias) između metoda (ALT i aALT) u 2. skupini ispitanika iznosi 14,94% što nije u skladu s definiranim kriterijima prihvatljivosti od optimalno 5,7% odnosno poželjno 11,48%.

Passing-Bablok regresija za ALT

N= 50

Jednadžba pravca: $y = -0,510949 (-1,8524 \text{ do } 0,6607) + 1,140735 (1,1071 \text{ do } 1,18109) x$

Test linearnosti: Nema odstupanja (P=0,4)



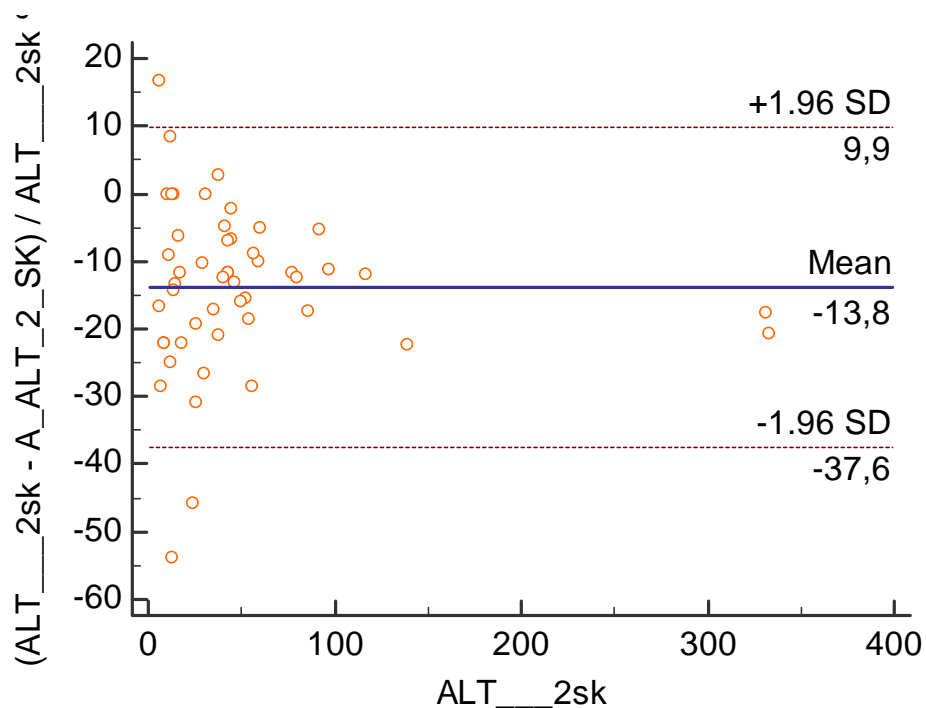
SLIKA 14. Passing-Bablokova regresijska analiza. Na osi x prikazane su vrijednosti ALT izmjerene bez PLP-a, a na osi y vrijednosti uz dodatak PLP-a u 2. skupini ispitanika

Nema značajne konstantne razlike (95% CI sadrži 0), ali postoji proporcionalna razlika (95% CI ne sadrži 1) u vrijednostima izmjerenih aktivnosti aminotransferaza ispitivanima novom metodom u odnosu na staru.

Bland-Altman analiza za ALT

N=50

Na Slici 15. prikazana je Bland-Altmanova analiza za ALT u 2. skupini ispitanika.



SLIKA 15. Bland-Altmanov grafikon za usporedbu dviju metoda. Na x osi prikazane su srednje vrijednosti mjerenja ALT-a sa starom metodom, a na y osi razlike između dva mjerenja ALT-a sa starom i aALT metodom u omjeru prema staroj metodi (ALT-aALT/ALT%)

Dobiveno srednje odstupanje između metoda (AST i aAST) u 2. skupini ispitanika iznosi 22,42% što nije u skladu s definiranim kriterijima prihvatljivosti od optimalno 3,3% odnosno poželjno 6,54%.

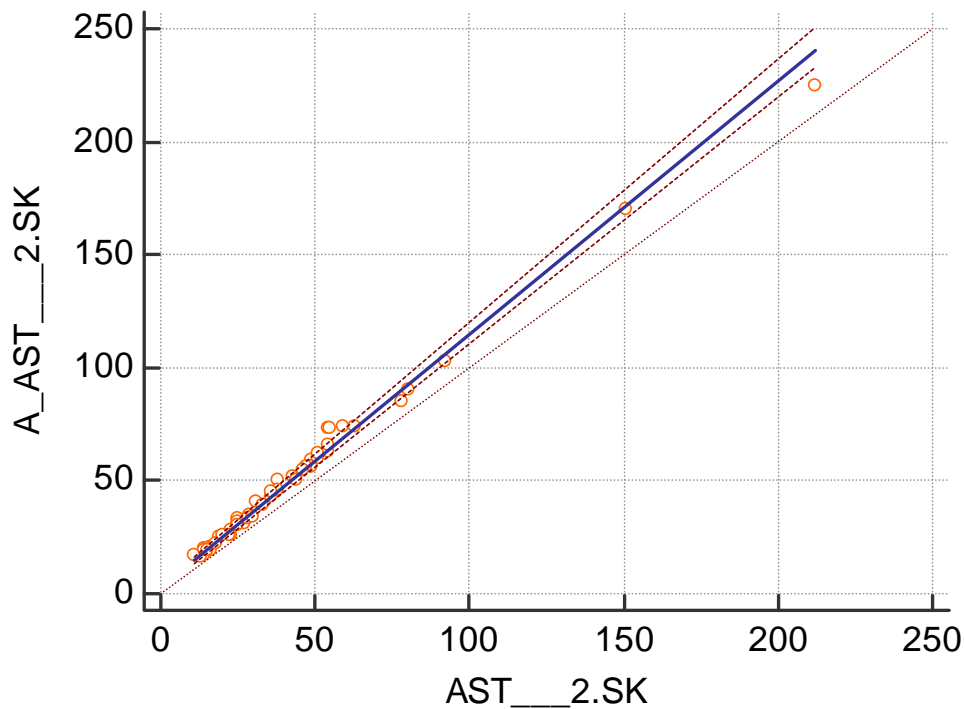
Passing-Bablok regresija za AST

N= 50

Jednadžba pravca: $y = 2,732588 (1,1667 \text{ do } 3,6462) + 1,121090 (1,0923 \text{ do } 1,1667) x$

Test linearnosti: Nema odstupanja (P=0,6)

Postoji i konstantno i proporcionalno odstupanje.

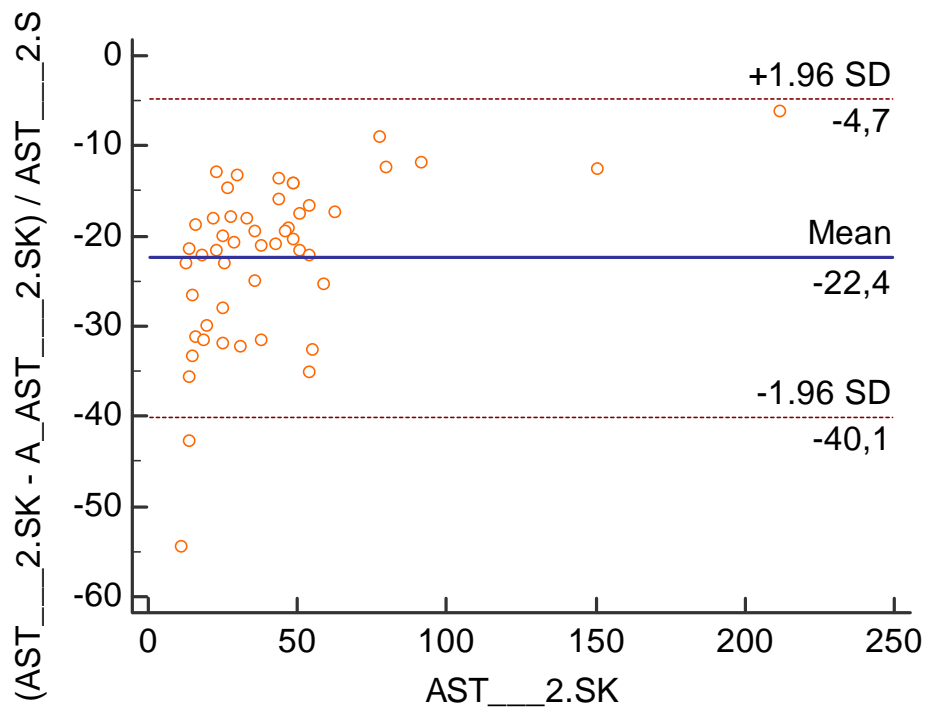


SLIKA 16. Passing- Babloкова regresijska analiza. Na osi x prikazane su vrijednosti AST izmjerene bez PLP-a, a na osi y vrijednosti uz dodatak PLP-a u 2. skupini ispitanika

Bland-Altman analiza za AST

N=50

Na Slici 17. prikazana je Bland-altmanova analiza za rezultate mjerenja AST u 2. skupini ispitanika.



SLIKA 17. Bland-Altmanov grafikon za usporedbu dviju metoda. Na x osi prikazane su srednje vrijednosti mjerenja AST-a sa starom metodom, na y osi razlike između dva mjerenja AST-a sa starom i aAST metodom u omjeru prema staroj metodi ($AST-aAST/AST\%$)

3. SKUPINA ISPITANIKA

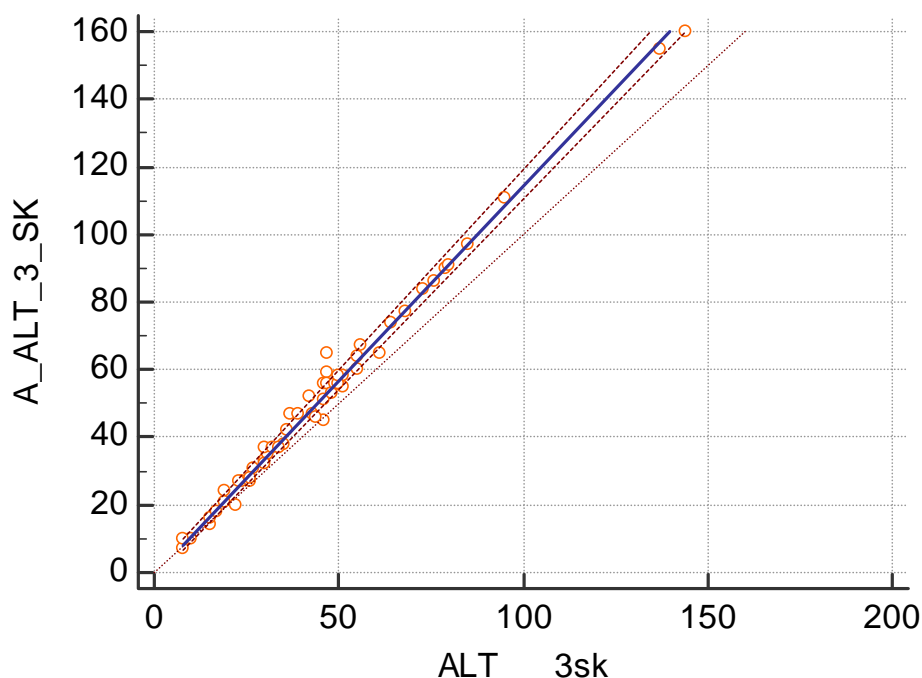
Dobiveno srednje odstupanje (apsolutni bias) između metoda (ALT i aALT) u 3.skupini ispitanika iznosi 13,78% što nije u skladu s definiranim kriterijima prihvatljivosti od optimalno 5,7% odnosno poželjno 11,48%.

Passing-Bablok regresija za ALT

Broj uzoraka: 53

Jednadžba pravca: $y = -1,448331 (-2,5094 \text{ do } 0,3191) + 1,158216 (1,1277 \text{ do } 1,1887) x$

Test linearnosti: Nema odstupanja (P=0,9)

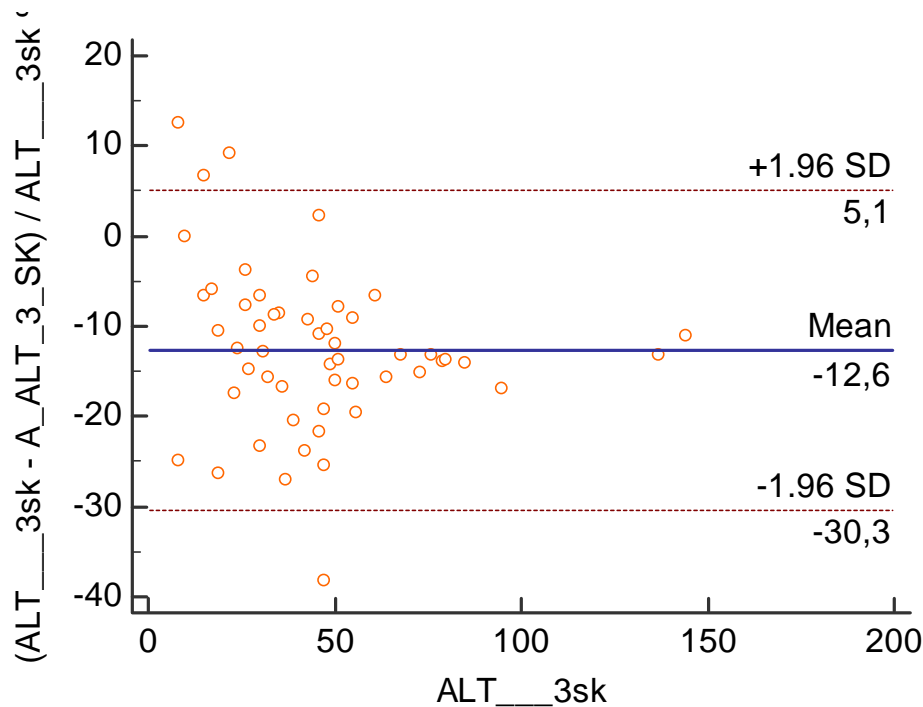


SLIKA 18. Passing- Bablokovska regresijska analiza. Na osi x prikazane su vrijednosti ALT izmjerene bez PLP-a, a na osi y vrijednosti aALT uz dodatak PLP-a u 3. skupini ispitanika

Ne postoji konstantna razlika (95% CI odsječka sadrži 0) u vrijednostima izmjerenih aktivnosti aminotransferaza novom metodom u odnosu na staru, ali postoji proporcionalna razlika (95% CI nagiba ne sadrži 1).

Bland-Altman analiza za ALT

N=53



SLIKA 19. Bland-Altmanov grafikon za usporedbu dviju metoda. Na x osi prikazane su srednje vrijednosti mjerenja ALT-a sa starom metodom, na y osi prikazane su razlike između dva mjerenja ALT-a sa starom i referentnom metodom u omjeru prema staroj metodi (ALT-aALT/ALT)

Dobiveno srednje odstupanje (apsolutni bias) između metoda (AST i aAST) u 3.skupini ispitanika iznosi 28,97% što nije u skladu s definiranim kriterijima prihvatljivosti od optimalno 3,3% odnosno poželjno 6,54%.

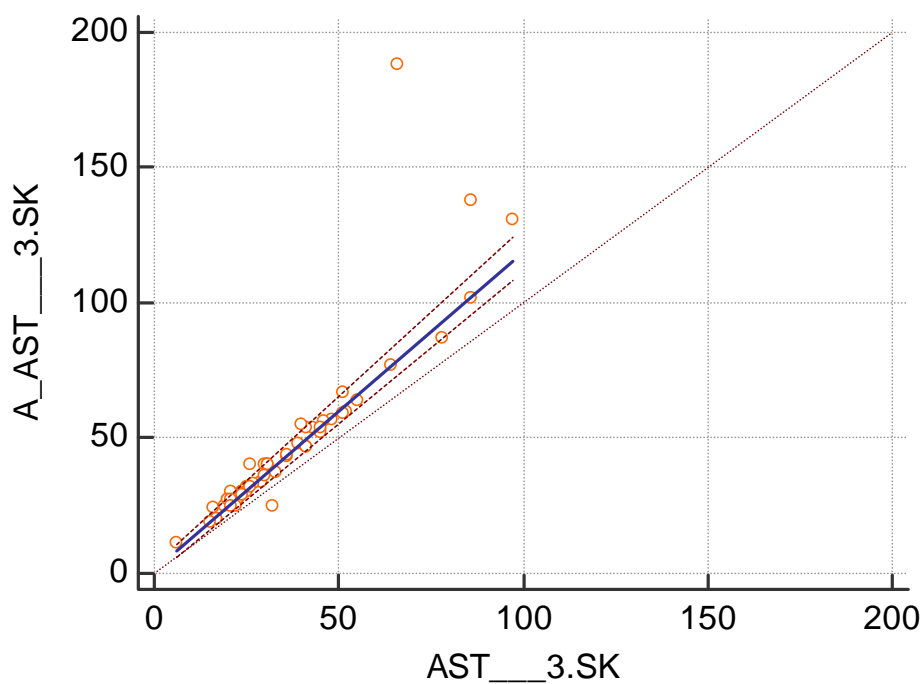
Passing-Bablok regresija za AST

Broj uzoraka: 53

Jednadžba pravca: $y = 1,391304 (-0,7500 \text{ do } 3,0909) + 1,173913 (1,1212 \text{ do } 1,2500) x$

Test linearnosti: Nema odstupanja (P=0,9)

Slika 20. prikazuje Passing-Bablokovu regresijsku analizu za AST u 3. skupini ispitanika



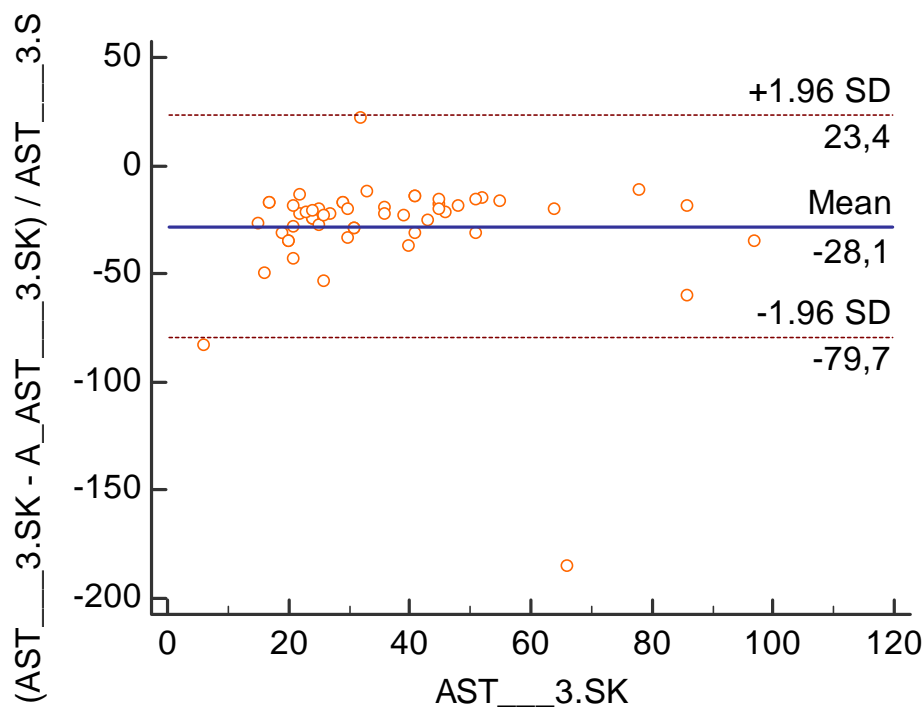
SLIKA 20. Passing- Bablokova regresijska analiza. Na osi x prikazane su vrijednosti AST izmjerene bez PLP-a, a na osi y vrijednosti uz dodatak PLP-a u 3. skupini ispitanika

Ne postoji konstantna razlika (95% CI odsječka sadrži 0) u vrijednostima izmjerenih aktivnosti aminotransferazana novom metodom u odnosu na staru, ali postoji proporcionalna razlika (95% CI nagiba ne sadrži 1).

Bland-Altman analiza za AST

N=53

Na Slici 21. prikazana je Bland-Altmanova analiza za mjerenja AST-a u 3. skupini ispitanika



SLIKA 21. Bland-Altmanov grafikon za usporedbu dviju metoda. Na x osi prikazane su srednje vrijednosti mjerenja AST-a sa starom metodom, a na y osi razlike između dva mjerenja AST-a sa starom i aAST metodom u omjeru prema staroj metodi (AST-aAST/AST%)

4.3. Stabilnost aminotransferaza

Pokus za ispitivanje stabilnosti započeo je 23. svibnja 2016.

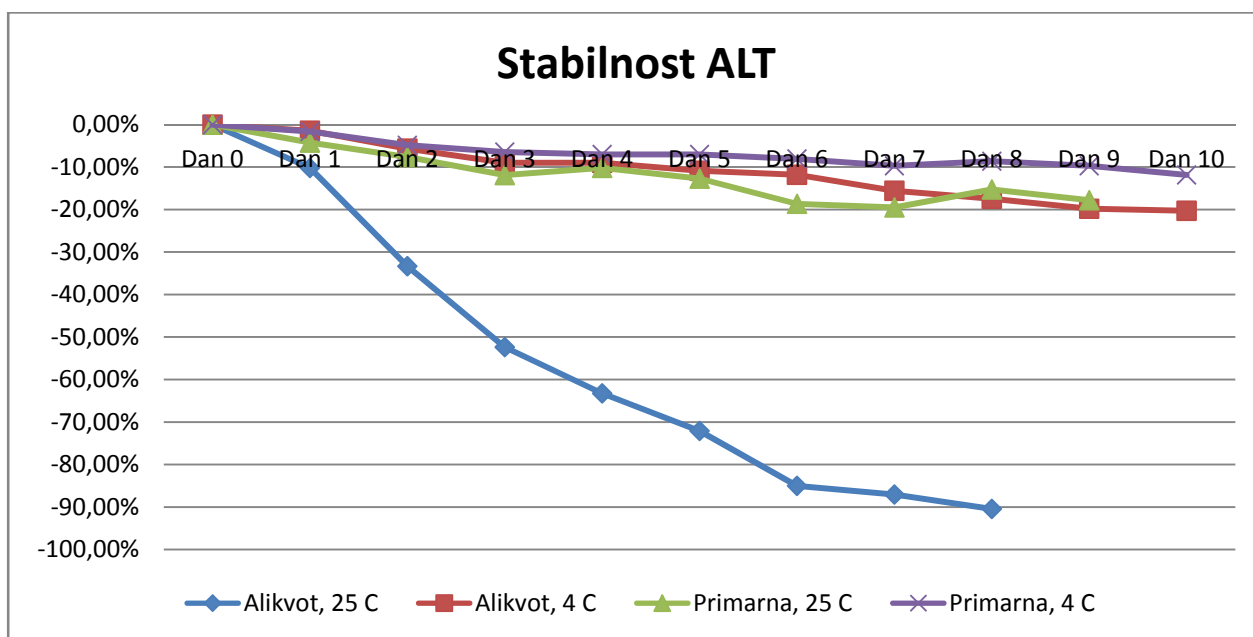
Uzorci su bili podvrgnuti različitim uvjetima pohrane i u njima je svakodnevno, kroz 10 dana, mjerena aktivnost aminotransferaza aktiviranom metodom s PLP.

UZORAK 1 = alikvot, sobna temp.

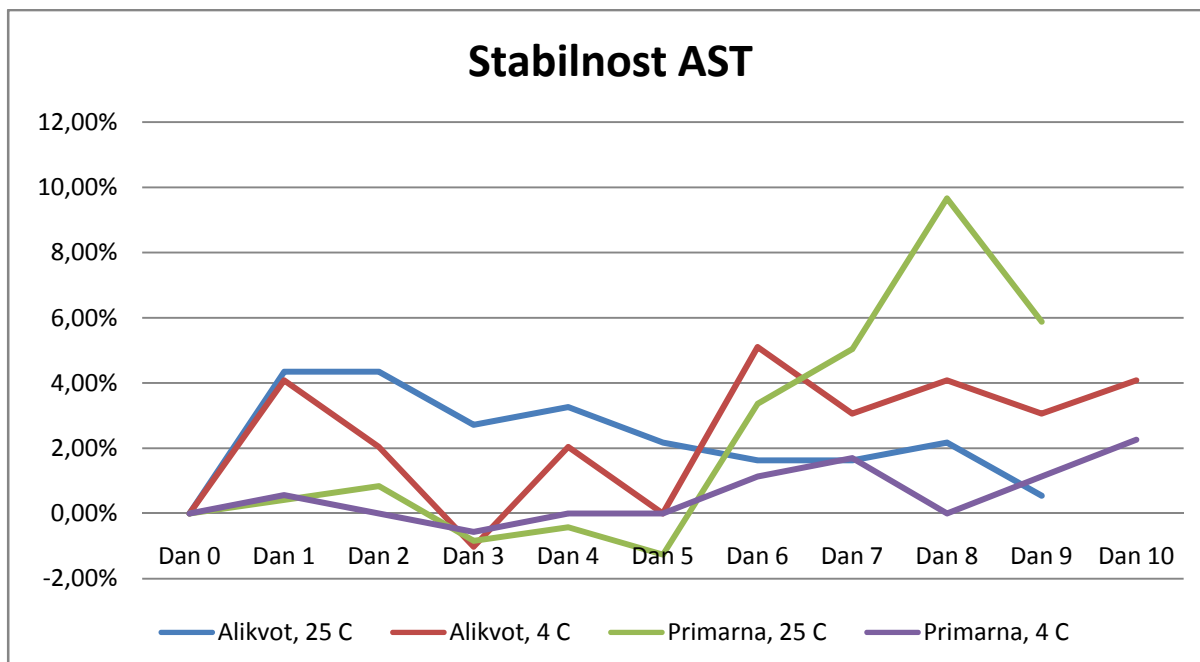
UZORAK 2 = alikvot, 4-8 °C

UZORAK 3 = primarni uzorak (na krvnim stanicama), sobna temp.

UZORAK 4 = primarni uzorak (na krvnim stanicama), 4-8 °C



SLIKA 22. Grafički prikaz stabilnosti enzima ALT mjerenih metodom aAST kroz 10 dana pri različitim temperaturama



SLIKA 23. Grafički prikaz stabilnosti enzima AST mjerenih metodom aAST kroz 10 dana pri različitim temperaturama

5. RASPRAVA

Uvođenjem nove metode i/ili analitičkog sustava, potrebno je prije njegova korištenja u rutinskom radu laboratorija provesti postupak verifikacije, odnosno potrebno je potvrditi analitičke značajke izvedbe metode i/ili analitičkog sustava. Provođenjem verifikacije reagensa Architect za aktivirani AST i ALT, (uz dodatak piridoksal-fosfata) cilj je bio ispitati može li se ova nova metoda inače referentna metoda po IFCC-u implementirati u rutinski rad te poslužiti kao zamjena postojećoj staroj metodi koja se već koristi u rutini, a koja ne sadrži piridoksal-fosfat. Odnosno, htjeli smo utvrditi hoće li implementacijom metode za aktivirani AST i ALT u laboratorij, određena skupina ispitanika pokazivati očekivano višu vrijednost aktivnosti AST-a i ALT-a od one skupine ispitanika kojoj je ALT i AST određen metodom bez piridoksal-fosfata te kakve su razlike između skupina.

Verifikacijom smo ispitali nekoliko analitičkih značajki metoda: preciznost, istinitost, usporedivost i stabilnost. Svi uzorci uzeti su od ostalih bolničkih i ambulantnih pacijenata iz KBC Sestre Milosrdnice.

Rezultati ispitivanja preciznosti, prikazani kao nepreciznost u seriji, nepreciznost iz dana u dan i povećana mjerna nesigurnost pokazali su kako sve dobivene vrijednosti zadovoljavaju kriterije prihvatljivosti koje je deklarirao proizvođač (ponovljivost), CROQALM (Hrvatski centar za vrednovanje kvalitete u laboratorijskoj medicini HDMBLM) –(za usporedbu, mjernu nesigurnost, stabilnost) te Ricos i sur. za unutarlaboratorijsku preciznost. Zaključujemo da metode za aktivirani ALT i aktivirani AST kojima se određuje aktivnost na Abbott Architect c8000 analizatoru imaju zadovoljavajuću ponovljivost (nepreciznost u seriji), međupreciznost (nepreciznost iz dana u dan) te mjernu nesigurnost. Potrebno je naglasiti kako preciznost ovisi isključivo o distribuciji slučajne pogreške te ne daje informacije o točnosti i pravoj vrijednosti. Porast vrijednosti standardnog odstupanja (SD) i koeficijenta varijacije (KV) upućuje na porast nepreciznosti mjerenja.

Međutim, ispitivanje istinitosti između metoda ni u jednoj skupini nije zadovoljilo kriterije prihvatljivosti prema www.westgard.com. Analiza je provedena iz sveukupno 211 uzoraka pacijenata podijeljenih u 3 skupine. Procjena istinitosti provedena je izračunom srednjeg odstupanja (bias) vrijednosti dobivenih novom (preporučenom) metodom u odnosu na staru. Možemo zaključiti kako se izmjerena odstupanja između obadvije metode ne nalaze unutar definiranih kriterija prihvatljivosti.

Osim usporedbe srednjih odstupanja mjerenja s kriterijima prihvatljivosti, razlike između dviju metoda prikazali smo i Passing-Bablok regresijom i Bland-Altmanovom analizom. Linearnost metoda provjerili smo testom linearnosti (tzv. CUSUM - statistička veličina od engl. *cumulative sum*) i zaključili da za sve parametre nema odstupanja od linearnosti, pa je moguće dalje govoriti o podudarnosti metoda.

Passing-Bablokovom regresijom uočeno je postojanje male proporcionalne razlike između dviju metoda u 3. skupini ispitanika, ali ne i konstantne razlike. Isto je potvrđeno i u 2. skupini ispitanika, ali samo između ALT-a i aALT-a. Zato je u 1. skupini ispitanika pokazano da osim proporcionalne pogreške postoji i konstantna pogreška odnosno razlika u izmjerenim vrijednostima između dviju metoda, kao i u 2. skupini ali između AST-a i aAST-a.

Bland Altmanova analiza pokazuje za sve skupine negativno odstupanje srednje vrijednosti razlika između metoda. Najviše je izraženo za AST (od 23,3% do -40,1%), a manje za ALT (od -4,1% do -13,8%). Skupine kod kojih smo predviđali deficit ili nedostatak PLP nije se razlikovala od skupine koja nije kompromitirana stanjem mogućeg deficita PLP. Sve skupine su Bland Altmanovom analizom pokazale apsolutnu sistematsku pogrešku, odnosno raspršene rezultate razlika metoda unutar granica limita slaganja metoda. Jedina srednje izražena proporcionalna razlika zapažena je kod skupine pedijatrijske populacije za analizu AST, a poboljšano slaganje u višim koncentracijama nađeno je u 1. skupini za pretragu ALT. Područje slaganja koje omeđuju vrijednosti $\pm 1,96$ SD sadržava raspršene rezultate za sva ostala mjerenja. Razlike nisu konstantne niti pokazuju trend proporcionalnosti ovisan o visini enzimske aktivnosti. Pozitivna granica neslaganja u većini mjerenja ne prelazi +9%, ali ipak na dva mjesta (ALT za 1. skupinu i AST za 3. skupinu) prelazi +20% (23,4% i 25,8%). Ne postoji konzistentan odnos dvije metode bez obzira o kojoj se populacijskoj skupini radi. Nema proporcionalnog ni konstantnog sustavnog odnosa, a zajednički rezultat negativnog trenda srednje razlike ne osigurava ujednačenost jer su razlike podjednako raspršene i u području pozitivnih razlika. Konačni je rezultat Bland Altmanovih analiza da metode nisu usporedive te da se ne može jedna zamijeniti s drugom. Za kliničku primjenu važan je to podatak i znak liječnicima da ne mogu longitudinalno pratiti nalaze u vremenu prelaska na drugu metodu.

Provjera stabilnosti uzorka provedena je mjerenjem aktivnosti enzima AST i ALT metodom aAST i aALT. Metodom aALT dokazana je stabilnost ALT-a 7 dana pri temperaturi od 4-8°C čime je ispunjen zahtjev proizvođača, međutim valja naglasiti da 7. dan alikvot gubi 15,57%

svoje stabilnosti u odnosu na početnu što je na granici kriterija prihvatljivosti prema CROQALM-u (14%). Pri sobnoj temperaturi ovaj enzim već prvog dana pokazuje manju stabilnost za 10%, a drugi dan je nestabilniji za nešto više od 30% u odnosu na početnu vrijednost. Prema deklaraciji proizvođača stabilnost za ovaj enzim bi trebala biti 3 dana čime je ovaj kriterij neispunjen kao i kriterij CROQALM-a. Također, trend neispunjavanja kriterija prihvatljivosti proizvođača i CROQALM-a prati i AST svojom nestabilnošću (mjereno metodom aAST-a). Umjesto da bude stabilan 4 dana na sobnoj i 7 dana na 4-8°C kako je deklarirao proizvođač, ovaj enzim već prvi dan povećava stabilnost za oko 4% i to na objema temperaturama, a već drugi dan smanjuje tu stabilnost za oko 2% (na temperaturi od 4-8°C) dok se na sobnoj temperaturi trend padanja stabilnosti nastavlja, ali sporije. Zaključujemo da enzimi variraju u stabilnosti te mjerene vrijednosti ne ispunjavaju kriterije prihvatljivosti proizvođača, a ni CROQALM-a.

Možda se razlog ovakve varijabilnosti AST-a može tražiti u kratkom poluzivotu ovoga enzima. Uostalom, tu nije odgovornost samo na reagensu i dosegu metode već i na nestabilnosti enzima u ispitivanim uvjetima. Pritom se moglo ponadati da novi reagens s PLP omogućuje mjerenje aktivnosti nakon određenih uvjeta u kojima se gubi aktivnost enzima.

6. ZAKLJUČAK

Provedbom verifikacije reagensa za aAST i aALT analizatorom Abbott Architect c8000 te detaljnom statističkom obradom i interpretacijom rezultata zaključujemo sljedeće:

- 1.) metode za aALT i aAST imaju zadovoljavajuću ponovljivost (nepreciznost u seriji), međupreciznost (nepreciznost iz dana u dan) te mjernu nesigurnost
- 2.) enzimi variraju u stabilnosti te mjerene vrijednosti ne ispunjavaju kriterije prihvatljivosti
- 3.) ispitivanje istinitosti između metoda ni u jednoj skupini nije zadovoljilo kriterije prihvatljivosti
- 4.) Passing-Bablokovom regresijom uočeno je u 3. skupini ispitanika (mala vjerojatnost da imaju deficit piridoksal-fosfata) postojanje male proporcionalne razlike između metoda, ali ne i konstantne razlike. Isto je potvrđeno i u skupini pedijatrijskih ispitanika, ali samo između ALT-a i aALT-a. U 1. skupini težih i kroničnih bolesnika pokazano je da osim proporcionalne pogreške postoji i konstantna pogreška, kao i u 2. skupini, ali samo za analize AST..
- 5.) Sve skupine su Bland Altmanovom analizom pokazale apsolutnu sistematsku pogrešku, odnosno raspršene rezultate razlika metoda unutar granica limita slaganja metoda koje nisu konstantne niti pokazuju trend proporcionalnosti ovisan o visini enzimske aktivnosti.

Konačno, metode nisu usporedive te se ne može jedna zamijeniti s drugom. Klinički gledano, važan je to podatak i znak liječnicima da ne mogu longitudinalno pratiti nalaze u vremenu prelaska na drugu metodu.

7. LITERATURA

Albersen M, Bosma M, Jans JJM, Hofstede FC, Hasselt PM, Sain van der Velden MGM, Visser G, Verhoeven-Duif NM. Vitamin B6 in Plasma and Cerebrospinal Fluid of Children. *PloS One*, 2015, 10(3).

Balen S, Dvornik Š. Laboratorijska dijagnostika bolesti jetre. *Med Flum*, 2011, 47(3), 246-259.

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

Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. Serum Enzymes. U: Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, urednici, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, 2012, str. 573-576.

Cheng CH, Huang SC, Chiang TY, Wong Y, Huang YC. Higher Plasma Pyridoxal Phosphate Is Associated with Increased Antioxidant Enzyme Activities in Critically Ill Surgical Patients. *Biomed Res Int*, 2013, 2013.

CLSI Guidelines. User Verification of Performance for Precision and Trueness: Approved Guideline, CLSI Document EP15-A2, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005.

Curtis AP, Nils BP et al. Statistical Quality Control for Quantitative Measurement Procedures: Principles and Definitions, 4th edition Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2016

Ćelap I, Mjerna nesigurnost. U: Upravljanje kvalitetom laboratorijskog rada. *Biochem Med*, 2015, 25(1), 53–54.

Desirable Specifications for Total Error, Imprecision, and Bias, derived from intra- and inter-individual biologic variation, 2014., <http://www.westgard.com>, pristupljeno 22.9.2017.

Flegar-Meštrić Z, Nazor A, Parag G, Sikirica M, Perkov S, Juretić D. Ciljevi analitičke kvalitete u vanjskoj procjeni kvalitete rada medicinsko-biokemijskih laboratorija u Republici Hrvatskoj. *Biochem Med*, 2005, 15, 15-25.

Giavarinan D. Understanding Bland Altman analysis. *Biochem Med*, 2015, 25, 141-51.

Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija udžbenik. Dvanaesto izdanje, Zagreb, Medicinska naklada, 2012, str. 853-856.

Huang YC, Lan PH, Cheng CH, Lee BJ, Kan MN. Vitamin B6 intakes and status of mechanically ventilated critically ill patients in Taiwan. *Eur J Clin Nutr*, 2002, 56, 387-392.

Krower JS, Cembrowski GS, Tholen GW. Preliminary Evaluation of Quantitative Clinical Laboratory Measurement Procedures, 3rd Edition Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2014

Larsson A, Tryding N. Letter. *Clin Chem*, 2001, 47(6), 1133-1135.

Lopez JM, Florea D, Quintero-Osso B, Perez de la Cruz A, Rodriguez Elrvira M, Planells del Pozo E. Pyridoxal-5'-phosphate deficiency is associated with hyperhomocysteinemia regardless of antioxidant, thiamine, riboflavin, cobalamine and folate status in critically ill patients. *Clin Nutr*, 2015, 1-7.

Morris MS, Picciano MF, Jacques PF, Selhub J. Plasma pyridoxal 5'-phosphate in the US population: the National Health and Nutrition Examination Survey, 2003-2004. *Am J Clin Nutr*, 2008, 87, 1446-1454.

Petlevski R. Vitamini. U: Štrausova medicinska biokemija. Čvorišćec D, Čepelak, urednici, Zagreb, Medicinska naklada, 2009, str. 379 – 381.

Potera C, Rose DP, Brown RR. Vitamin B6 deficiency in cancer patients. *Am J Clin Nutr*, 1977, 30(10), 1677-1679.

Radonjić A. Značajnost određivanja aminokiselina u dijagnostici i praćenju poremećaja ciklusa ureje, Zagreb, 2015, str. 4.

Ricos C, Alvarez V, Cava F, Garcia-Lario JV, Hernandez A, Jimenez CV, Minchinela J, Perich C, Simon M. Current databases on biologic variation: pros, cons and progress. *Scand J Clin Lab Invest*, 1999, 59, 491-500.

Saračević A. Validacija i verifikacija metoda. U: Upravljanje kvalitetom laboratorijskog rada. Šimundić AM, Zagreb, Medicinska naklada, 2013, str. 7-20.

Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, Féraud G, Ferrero CA, Franck PFH. IFCC Primary Reference Procedures for the Measurement of Catalytic Activity Concentrations of Enzymes at 37°C. Reference Procedure for the Measurement of Catalytic Concentration of Aspartate Aminotransferase. *Clin Chem Lab Med*, 2005, 40(7), 725–733.

Sharma LK, Baruah A, Thakur B, Mohapatra H, Sharma N. Effects of pyridoxal phosphate in analysis of aminotransferase activity in patients undergoing hemodialysis. *Int J Biomed Adv Res*, 2014, 5(5), 226-229.

Siest G, Schiele F, Galteau MM, Panek E, Steinmetz J, Fagnani F, Gueguen R. Aspartate Aminotransferase and Alanine Aminotransferase Activities in Plasma: Statistical Distributions, Individual Variations, and Reference Values. *Clin Chem*, 1975, 21(8), 1077-1087.

Šimundić AM. Statistički testovi za ispitivanje usporedivosti metoda. U: Upravljanje kvalitetom laboratorijskog rada. Šimundić AM, Zagreb, Medicinska naklada, 2013, str. 21-32.

Šimundić AM, Tipovi podataka i raspodjela. *Acta Med Croatica*, 2006, 60, 17-35.

Štraus B. Enzimi. U: Štrausova Medicinska biokemija. Čvorišćec D, Čepelak, urednici, Zagreb, Medicinska naklada, 2009, str. 282-289.

Zhengtao L, Que S, Xu J, Peng T. Alanine Aminotransferase Old Biomarker and New Concept: A review. *Int J Med Sci*, 2014, 9, 925-935.

8. SAŽETAK/SUMMARY

Uvođenje nove metode u rutinski rad laboratorija obavezno zahtijeva provedbu verifikacije kako bi se ispitale analitičke značajke analizatora koje je utvrdio proizvođač. Metoda određivanja aktivnosti aminotransferaza s dodatkom piridoksal-fosfata (aktivirani ALT i aktivirani AST s PLP) prema preporuci Međunarodne udruge za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu (IFCC) uključuje postupak verifikacije, provjeru istinitosti i stabilnosti te usporedbu s metodom bez dodatka PLP. U tu svrhu određena je preciznost u seriji (ponovljivost), preciznost iz dana u dan (međulaboratorijska preciznost), mjerna nesigurnost, stabilnost aALT-a i aAST-a na sobnoj temperaturi te na temperaturi od 4 – 8 °C te usporedivost dviju metoda. Smisao primjene PLP jest zbog onih ispitanika koji imaju deficit PLP da bi se izbjegla nedostatna koncentracija PLP u njihovu serumu, a time i prosudba o stvarnom sadržaju enzima. U skladu s mogućim deficitom PLP cilj ovoga rada bio je provesti istraživanje na skupini bolesnika kod kojih je predvidiv mogući deficit PLP te na skupini ispitanika kod kojih se ne očekuje deficit PLP. Tijekom izrade ovog rada korišteni su ostatni uzorci krvi preostali nakon rutinske laboratorijske analize bolničkih pacijenata zaprimljenih u laboratoriju Kliničkog zavoda za kemiju KBC Sestre milosrdnice. Za ispitivanje preciznosti korišteni su komercijalni kontrolni uzorci u dvije koncentracijske razine. Rezultati analitičke verifikacije pokazali su da metode imaju zadovoljavajuću ponovljivost, međupreciznost te mjernu nesigurnost dok im stabilnost nije ispunila definirane kriterije prihvatljivosti.

Ispitivanjem istinitosti procjenom srednjeg odstupanja, obradom rezultata Passing-Bablok regresijom i Bland-Altman analizom pokazano je postojanje razlike mjerenja aktivnosti aALT i aAST u odnosu na AST i ALT u ispitivanim skupinama. Metoda s dodanim PLP u pravilu daje više vrijednosti, ali i niže u odnosu na metodu bez dodatka PLP te nismo utvrdili sustavni proporcionalni ili konstantni odnos. Stoga nije moguće tvrditi da je ova metoda poželjna u rutinskom radu laboratorija u hospitaliziranih te teško bolesnih pacijenata kako bi se izbjegla prosudba o lažno sniženim vrijednostima aminotransferaza. Zbog navedenog, rezultati mjerenja novom metodom (s PLP) nisu usporedivi sa starom (bez PLP) ni u jednoj skupini ispitanika te se ne bi smjeli naizmjenično izdavati rezultati s obje metode. Za kliničku primjenu važan je to podatak i znak liječnicima da ne mogu longitudinalno pratiti nalaze u vremenu prelaska na drugu metodu.

The introduction of a new analytical analyzer into routine clinical biochemistry laboratories requires verification in order to test the analyzer's analytical features as defined by the manufacturer. The method of determining the activity of aminotransferases with the addition of pyridoxal phosphate (activated ALT and activated AST with PLP) according to the recommendation of the International Association for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) includes the verification procedure, trueness checkup and stability, and comparison with the method without the addition of PLP. For this purpose, precision was determined in the series (repeatability), day-to-day precision (interlaboratory precision), measurement uncertainty, stability of aALT and aAST at room temperature and at a temperature of 4-8 °C as well as comparability of the two methods. The meaning of PLP is due to those who have a deficit of PLP to avoid the inadequate concentration of PLP in their serum, and thus to estimate the actual enzyme content. According to possible PLP deficit, the aim of this study was to conduct a study on a group of patients with predictable possible deficit of PLP and on a group of subjects with no PLP deficit expected. During the work of this study, remaining blood samples were used after routine laboratory analysis of hospital patients received in the laboratory of the Clinical Institute of Chemistry KBC Sestre milosrdnice. Commercial control samples were used in two concentration levels for precision testing. The results of the analytical verification showed that the methods had satisfactory repeatability, interdependence and measurement uncertainty while their stability did not meet the defined eligibility criteria.

Examination of trueness by estimation of mean deviation, processing of the results by Passing-Bablok regression and Bland-Altman analysis showed the existence of difference in measurement of aALT and aAST compared to AST and ALT in the investigated groups. The PLP method generally gives higher activity values but also lower than the method without PLP addition, and we have not found a systematic proportional or constant relationship. Therefore, it is not possible to claim that this method is desirable in the routine work of laboratories in hospitalized and critically ill patients to avoid judging false lower values of aminotransferases. Because of this, the results of the new method (with PLP) are not comparable to the old (without PLP) in either of investigated groups, and the results of both methods should not be published alternately. This is an important data and sign to doctors that they won't be able to longitudinally track the findings at the time of transition to another method.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

USPOREDBA METODA ZA ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI AMINOTRANSFERAZA SA I BEZ DODATKA PIRIDOKSAL-FOSFATA

Andelka Milakara

SAŽETAK

Uvođenje nove metode u rutinski rad laboratorija obavezno zahtijeva provedbu verifikacije kako bi se ispitala analitičke značajke koje je utvrdio proizvođač. Metoda određivanja aktivnosti aminotransferaza s dodatkom piridoksal-fosfata (PLP) uključuje postupak verifikacije (ponovljivost, međulaboratorijska preciznost, mjerna nesigurnost), provjeru istinitosti i stabilnosti te usporedbu s metodom bez dodatka PLP. PLP se primjenjuje zbog onih ispitanika koji imaju deficit PLP da bi se izbjegla lažna prosudba o stvarnom sadržaju enzima. Cilj rada bio je provesti istraživanje na skupini bolesnika kod kojih je predviđen deficit PLP te na skupini ispitanika kod kojih se ne očekuje deficit PLP. Korišteni su ostati uzorci krvi preostali nakon rutinske laboratorijske analize bolničkih pacijenata u laboratoriju Kliničkog zavoda za kemiju KBC Sestre milosrdnice. Rezultati analitičke verifikacije pokazali su da metoda imaju zadovoljavajuću ponovljivost, međupreciznost te mjernu nesigurnost dok za mjerenje stabilnosti nije ispunila kriterije prihvatljivosti koje je naveo proizvođač. Ispitivanjem istinitosti te obradom rezultata Passing-Bablok regresijom i Bland-Altman analizom pokazano je značajno postojanje razlike mjerenja enzimske aktivnosti između metoda u svim ispitivanim skupinama. Metoda s dodanim PLP mjeri češće više vrijednosti, ali i niže u odnosu na metodu bez PLP. Stoga zaključujemo da rezultati mjerenja s dodatkom PLP nisu usporedivi s metodom bez dodatka PLP te se rezultati ne bi smjeli jednakovrijedno izdavati. To je važan podatak jer liječnicima onemogućuje longitudinalno praćenje nalaza u vremenu prelaska na drugu metodu.

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

Rad sadrži: 54 stranice, 23 grafička prikaza, 10 tablica i 28 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: piridoksal-fosfat, aminotransferaze, verifikacija, preciznost, istinitost, stabilnost, usporedba, Passing-Bablok regresija, Bland-Altman analiza

Mentor: **Dr. sc. Nada Vrkić**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Nada Vrkić**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Roberta Petlevski, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan 2017.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

COMPARISON OF METHODS FOR THE DETERMINATION OF ACTIVITY AMINOTRANSFERASES WITH AND WITHOUT ADDITION OF PYRIDOXAL PHOSPHATE

Andelka Milakara

SUMMARY

The introduction of a new analytical analyzer into routine clinical biochemistry laboratories requires verification in order to test the analyzer's analytical features as defined by the manufacturer. The method of determining aminotransferase activity with the addition of pyridoxal phosphate (PLP) involves the verification procedure (repeatability, interlaboratory precision, measurement uncertainty), trueness checkup, stability and comparison with a method without the addition of PLP. PLP is used for those who have a deficit of PLP and to avoid a false assessment of the actual enzyme content. The aim of the study was to conduct a study on a group of patients with predictable deficit of PLP and on a group of subjects with no PLP deficit expected. Remaining blood samples were used after routine laboratory analysis of hospital patients at the Clinical Institute of Chemistry KBC Sestre milosrdnice. The results of the analytical verification showed that the methods had satisfactory repeatability, interpersonality and measurement uncertainty while their stability did not meet the eligibility criteria. By verifying the trueness and processing the results of Passing-Bablok regression and Bland-Altman analysis, there was a significant difference in measurement of enzyme activity between the methods in all the investigated groups. The PLP method measures higher values of the enzyme activity but also lower than the method without PLP. Therefore, we conclude that the results of the measurements with the addition of PLP are not comparable to the method without the addition of PLP and the results should not be published alternately. This is important to doctors because they won't be able to longitudinally track the findings at the time of transition to another method.

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

Thesis includes: 54 pages, 23 figures, 10 tables and 28 references. Original is in Croatian language.

Keywords: pyridoxal phosphate, aminotransferases, verification, precision, trueness, stability, comparison, Passing and Bablok regression, Bland and Altman analysis

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

Reviewers: **Nada Vrkić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Sandra Šupraha Goreta, Ph.D. Assistant Profesor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Robert Petlevski, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2017.