

Kvantitativna analiza fekalnog kalprotektina novom kemiluminiscentnom metodom na analizatoru Bio-Flash (Inova Diagnostics)

Beljan, Anamarija

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:840166>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-03**



Repository / Repozitorij:

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



Anamarija Beljan

**Kvantitativna analiza fekalnog kalprotektina
novom kemiluminiscentnom metodom na
analizatoru Bio-Flash (Inova Diagnostics)**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, godina 2022.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju „Klinička biokemija organa i organskih sustava 2“ Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Kliničkom zavodu za kemiju KBC-a Sestre milosrdnice pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Donatelle Verbanac, dipl. ing. med. biokemije i suvoditeljstvom doc. dr. sc. Andree Tešija Kuna, spec. med. biokemije.

SADRŽAJ

1. UVOD	6
1.1. UPALNE BOLESTI CRIJEVA	6
1.1.1. CROHNOVA BOLEST	6
1.1.2. ULCEROZNI KOLITIS	7
1.1.3. DIJAGNOSTIKA UPALNIH BOLESTI CRIJEVA	7
1.2. FEKALNI KALPROTEKTIN	7
1.2.1. METODE ODREĐIVANJA FEKALNOG KALPROTEKTINA U UZORKU STOLICE	9
1.3. VALIDACIJA I VERIFIKACIJA METODA	10
1.3.1. VALIDACIJA METODA	10
1.3.2. VERIFIKACIJA METODA	12
2. OBRAZLOŽENJE TEME	13
3. MATERIJALI I METODE	14
3.1. MATERIJALI	14
3.1.1. UZORCI	14
3.1.1.1. EKSTRAKCIJA UZORAKA STOLICE	14
3.1.2. METODE	16
3.1.2.1. QUANTA Flash® Calprotectin	16
3.1.2.1. Bühlmann fCAL® turbo	17
3.2. STATISTIČKE METODE	18
3.2.1. PROVJERA PRECIZNOSTI	18
3.2.2. USPOREDBA METODE S POSTOJEĆIM SUSTAVOM	20
3.2.2.1. IZRAČUN SREDNJEG ODSUPANJA	20
3.2.2.2. INTERVAL POUZDANOSTI	21
3.2.2.3. PASSING-BABLOKOVA REGRESIJA	21
3.2.2.4. BLAND-ALTMANOVA ANALIZA	23
3.2.2.5. PROVJERA LINEARNOSTI	24
3.2.2.6. PROVJERA PODUDARNOSTI U KATEGORIZACIJI REZULTATA	25
4. REZULTATI I RASPRAVA	26
4.1. PRECIZNOST	26
4.2. USPOREDBA METODA	29
4.2.1. USPOREDBA KONCENTRACIJA FEKALNOG KALPROTEKTINA IZMJERENIH S OBJE METODE	29

4.2.2. PROVJERA PODUDARNOSTI U INTERPRETATIVNIM KATEGORIJAMA KONCENTRACIJA IZMJERENIH S OBJE METODE	33
4.3. LINEARNOST	36
4.4. RASPRAVA.....	38
5. ZAKLJUČCI.....	40
6. LITERATURA.....	41
7. SAŽETAK/SUMMARY	43
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	45

1. UVOD

Broj oboljelih od upalnih bolesti crijeva u svijetu porastao je od 1990. do 2017. godine s 3,7 milijuna na više od 6,8 milijuna (Alatab i sur., 2020) te se i dalje bilježi trend porasta. Naročito je to karakteristično za ekonomski razvijenije zemlje. Glavne dvije skupine upalnih bolesti crijeva jesu Crohnova bolest i ulcerozni kolitis.

1.1. UPALNE BOLESTI CRIJEVA

Kao što je prethodno navedeno, upalne bolesti crijeva obuhvaćaju Crohnovu bolest i ulcerozni kolitis. Te bolesti i stanja spadaju u skupinu idiopatskih kroničnih bolesti gastrointestinalnog sustava nepoznate etiologije. Najčešće se manifestiraju bolovima u abdomenu, konstipacijom, dijarejom i nadutosti, simptomima sličnim kao i u slučaju sindroma iritabilnog crijeva, skupinom bolesti uzrokovanom motoričkim, funkcionalnim poremećajem probavnog sustava. Postavljanje pravovremene i ispravne dijagnoze predstavlja izazov, ali i veliki značaj u daljnjoj kvaliteti života pacijenta (Petrač i sur., 2009).

1.1.1. CROHNOVA BOLEST

Crohnova bolest kronična je upalna bolest stijenke probavnog sustava koja se može pojaviti uzduž cijele probavne cijevi, od usta do anusa, te zahvatiti sve slojeve stijenke. Smatra se da je uzrok nekontrolirani imunološki odgovor na endoluminalne antigene što dovodi do dugotrajne upale. Prolongirani upalni odgovor može dovesti do fibroznih procesa u stijenci čime se stvaraju nepovratne promjene i oštećenja gastrointestinalnog sustava. Karakteristična su upalna razdoblja koji se izmjenjuju s razdobljima remisije te se manifestiraju grčevitim bolovima u donjem kvadrantu trbuha, proljevom, subfebrilnom temperaturom, gubitkom tjelesne mase, nadutosti i pretakanjem. Dijagnoza se postavlja na temelju kliničke slike, laboratorijskih nalaza (leukocitoza, trombocitoza uz ubranu sedimentaciju, povišene koncentracije C-reaktivnog proteina i fibrinogena), slikovnih-radioloških tehnika te endoskopskih pretraga pri kojima se često uzima uzorak promijenjene sluznice za histološku potvrdu (verifikaciju). Diferencijalna dijagnoza izrazito je složena i ovisna o aktivnosti bolesti i lokalizaciji u probavnoj crijevi zbog čega je lako moguće, ukoliko je upala lokalizirana u području debelog crijeva, zamijeniti ju ulceroznim kolitisom (Petrač i sur., 2009).

1.1.2. ULCEROZNI KOLITIS

Ulcerozni kolitis kronična je upalna bolest stijenke probavnog sustava, a koja je, za razliku od Crohnove bolesti, ograničena na sluznicu debelog crijeva. Etiološkim čimbenicima smatraju se utjecaj okoline, genetike i imunološkog odgovora. Ono zbog čega je tu bolest teško razlikovati od Crohnove bolesti jest izmjena remisija i recidiva, nejasna klinička slika, laboratorijski nalazi te moguće i endoskopski prikaz (Petrač i sur., 2009).

1.1.3. DIJAGNOSTIKA UPALNIH BOLESTI CRIJEVA

Endoskopija i kolonoskopija zlatni su standard u dijagnostici upalnih bolesti crijeva, ali i invazivne metode izrazito neugodne te često nedostupne zbog čega se pacijenti teško odlučuju na pregled što često dovodi do odgođenog postavljanja dijagnoze i početka terapije. Pravovremeno postavljanje dijagnoze ima značajan utjecaj na uvođenje terapije, a shodno tome i daljnju kvalitetu života pacijenta. Budući da je mnogo oboljelih dijagnosticirano u mlađoj dobi i čeka ih dugotrajno praćenje bolesti, česte kontrole endoskopskim metodama i općenito smanjena kvaliteta života, iznalaženje neinvazivnog biomarkera kojim će se omogućiti rana diferencijacija između upalnih i funkcionalnih bolesti crijeva te praćenje aktivnosti bolesti i odgovora na terapiju, od velikog je značaja (Rodrigues i sur., 2020).

1.2. FEKALNI KALPROTEKTIN

Kalprotektin je cink- i kalcij-vezujući oligopeptid S-100 porodice proteina. Građen je od dvije lake (11kDa) i jedne teške (13kDa) podjedinice ukupne molekulske mase 36,5kDa. U neutrofilima čini 60% od ukupnih citosolnih proteina, te je u manjoj mjeri prisutan u monocitima i makrofazima. Kao protein akutne faze, ima važnu ulogu u upalnom odgovoru, ali sudjeluje i u drugim fiziološkim procesima poput stanične diferencijacije, regulacije imunološkog odgovora, tumorigeneze i apoptoze. U upalnom odgovoru sudjeluje na način da inducira ekspresiju staničnih receptora koji su odgovorni za migraciju, adheziju i fagocitozu neutrofilnih granulocita. Ujedno, kalprotektin potiče kemotaksiju neutrofila i uključen je u urođeni imunološki odgovor.

Uslijed infekcije ili upale mukoze probavnog trakta dolazi do njezine povećane permeabilnosti što omogućava infiltraciju lumena granulocitima i monocitima privučenih kemotaktičnim supstancama oslobođenima na mjestu upale uslijed lokalnog imunološkog odgovora. Osim

kemotaktičnih supstanci, mikrobiota također pridonosi oslobađanju medijatora iz granula leukocita na mjestu upale. Koncentracija fekalnog kalprotektina, pored ostalih enzima sadržanih u granulama leukocita, na taj način raste u crijevnoj mukozi, a posljedično tome i u fecesu.

Velika količina endogenih i egzogenih proteaza u gastrointestinalnom traktu uzrokuje razgradnju velikog broja proteina akutne faze upale. Otpornost na razgradnju proteazama čini fekalni kalprotektin izrazito stabilnim analitom. Ispitana stabilnost iznosi do tjedan dana na sobnoj temperaturi što omogućava pohranu i transport uzorka na analizu te čini samu pretragu dostupnijom većem broju pacijenata. Izravni kontakt crijevnog sadržaja s intestinalnom mukozom omogućava homogenu raspodjelu sadržaja oslobođenog iz granula leukocita tijekom upale u uzorku. Homogena raspodjela zajedno sa stabilnošću omogućava dobru korelaciju koncentracije fekalnog kalprotektina sa stupnjem upale mukoze gastrointestinalnog sustava.

S obzirom da se fekalni kalprotektin oslobađa tijekom upale, mjerenjem povišenih koncentracija može se otkloniti sumnja na sindrom iritabilnog crijeva koji se ispoljava na klinički vrlo sličan način kao i upalne bolesti crijeva. Sindrom iritabilnog crijeva je, za razliku od upalnih bolesti crijeva koje su organskog podrijetla, funkcionalni poremećaj nastao uslijed poremećaja motiliteta crijeva te uglavnom nije prisutna upala mukoze gastrointestinalnog sustava.

Iako povišene koncentracije mogu diferencirati organski od motoričkog poremećaja gastrointestinalnog trakta, fekalni kalprotektin nije dovoljno specifičan biljeg upalnih bolesti crijeva s obzirom da povišene koncentracije mogu biti posljedica, osim Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa, malignih bolesti gastrointestinalnog sustava, infekcija, polipa, ali i korištenja nesteroidnih protuupalnih lijekova. Ono što se ipak dodatno može saznati mjerenjem koncentracije fekalnog kalprotektina jest način na koji dolazi do obnavljanja crijevne mukoze budući da postoji visok stupanj korelacije s rezultatima dobivenim endoskopskim pregledom. Dodatna prednost jest da se može otkriti i mikroskopska aktivnost bolesti čak i u fazi makroskopskog zacjeljivanja, što je značajno za praćenje odgovora na terapiju, ali i predviđanja sljedećeg relapsa. Za pacijente s asimptomatskom upalnom bolesti crijeva u kojih su zabilježene visoke koncentracije fekalnog kalprotektina postoji vjerojatnost od 80% za pojavu relapsa unutar šest mjeseci. Takav pokazatelj omogućava pravovremenu intervenciju liječnika, ali i pacijentu povećava kvalitetu života pravilno doziranom terapijom i smanjenjem broja endoskopskih pregleda (Pathirana W. G. W. i sur., 2018).

1.2.1. METODE ODREĐIVANJA FEKALNOG KALPROTEKTINA U UZORKU STOLICE

Unatoč sve većem interesu i rastućem broju studija i dalje ne postoje univerzalne preporuke za upotrebu fekalnog kalprotektina u dijagnostici upalnih bolesti crijeva. U nekoliko posljednjih desetljeća razvilo se nekoliko različitih metoda za kvantitativno određivanje koncentracije fekalnog kalprotektina u uzorku stolice, uključujući i metode primjenjive u formi tzv. *point-of-care* testova. Uz enzimsku imuno metodu (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA), standardnu metodu za određivanje koncentracije fekalnog kalprotektina, na popularnosti u zadnjih nekoliko godina dobivaju i metoda kemiluminiscencije (engl. *chemiluminescence immunoassay*, CLIA) te imunoturbidimetrija, uz upotrebu mikro/nanočestica čime se povećava osjetljivost metoda (Padoan A. i sur., 2018). Veliki problem s pojavom sve većeg broja različitih testova jest nedostatak standardizacije i verifikacije predanalitičke i analitičke faze postupka, od same pripreme uzorka do metodologije određivanja koncentracije, što dovodi do velike varijabilnosti između dostupnih testova (Juričić G. i sur., 2019.). Zbog izrazito slabog slaganja kvantitativnih rezultata dobivenih različitim imunokemijskim metodama, vrijednosti dobivene različitim metodama ne mogu se međusobno uspoređivati te nisu zamjenjive jedna s drugom. (Oyaert M. i sur., 2017) Unatoč tome, granične koncentracije koje se najčešće koriste razlikuju se ovisno o dobi i svrsi (dijagnostika, odgovor na terapiju, rizik od relapsa upale). Koncentracije ispod 50 µg/g za odrasle osobe i 100 µg/g za djecu isključuju postojanje intestinalne upale s visokom negativnom prediktivnom vrijednosti, a koncentracije veće od 150 µg/g za odrasle i 300 µg/g u djece pokazale su se kao visoko osjetljive (> 90 %) u detekciji upalne bolesti crijeva kod nekoliko ispitivanih testova za određivanje koncentracije fekalnog kalprotektina. Koncentracije više od 250 µg/g za odrasle i 500 µg/g u djece visoko su specifične za upalne bolesti crijeva. Osim u dijagnostičke svrhe, određivanje fekalnog kalprotektina ima klinički značaj i u praćenju bolesnika s potvrđenom dijagnozom, u smislu procjene aktivnosti bolesti, rizika od relapsa te odgovora na primijenjenu terapiju. (Padoan A. i sur., 2018)

1.3. VALIDACIJA I VERIFIKACIJA METODA

Osiguravanjem kvalitete provođenja postupka analize i dobivanjem rezultata analize koji istinito odražavaju stanje organizma pacijenta omogućava se ispravno donošenje odluka u postavljanju dijagnoze i liječenju, a posljedično tome povećanje kvalitete života pacijenta. Prije uvođenja novog analitičkog sustava i/ili metode u rutinski rad, potrebno je prethodno provesti objektivnu procjenu kojom se utvrđuje posjeduje li metoda zadovoljavajuću analitičku kvalitetu koja osigurava pouzdan i vjerodostojan rezultat. Postupak procjene obuhvaća pribavljanje eksperimentalnih podataka koji nakon statističke obrade daju objektivan dokaz analitičke kvalitete metode. Prema opsežnosti postupka razlikuju se validacija i verifikacija metode. Validacija metode podrazumijeva prikupljanje dokaza da su specificirani zahtjevi prikladni za primjenu, opsežnija je i obavezan ju je provesti proizvođač proizvoda namijenjenog u dijagnostičke svrhe. Takvi proizvodi imaju oznaku IVD/CE. Postupku validacije podliježu i proizvodi s takvom oznakom čiji je originalni protokol modificiran od strane korisnika u laboratoriju, kao i metode uspostavljene u vlastitom laboratoriju (tzv. *in-house* metode). Verifikacija metoda pak podrazumijeva prikupljanje objektivnih dokaza da analitičke značajke metode zadovoljavaju specifikacije koje je deklarirao proizvođač i obavezan ju je provesti medicinski biokemičar.

1.3.1 VALIDACIJA METODA

Postupak validacije obuhvaća ispitivanje sljedećih analitičkih značajki metode:

1. Preciznost

Preciznost označava slaganje rezultata niza nezavisnih mjerenja izvedenih u određenim uvjetima te nije mjera točnosti i ovisi samo o nasumičnoj pogrešci mjerenja. Ponovljivost ili preciznost u seriji (*engl. within-run*) bliskost je slaganja rezultata mjerenih u seriji pod jednakim uvjetima. Ukupna ili unutarlaboratorijska preciznost (*engl. within-laboratory*) odnosi se na ukupnu preciznost unutar jednog laboratorija koristeći se istom opremom pri čemu se uzima u obzir utjecaj različitih uvjeta kao što su serije reagensa, operateri, itd. Pod pojmom preciznosti smatra se varijacija oko središnje vrijednosti, a zapravo se izračunava nepreciznost i izražava standardnom devijacijom (SD) i koeficijentom varijacije (CV%).

2. Istinitost

Pojam istinitosti metode podrazumijeva bliskost slaganja srednje vrijednosti veličine dobivene većim brojem opetovanih mjerenja i referentne vrijednosti veličine. Mjera istinitosti je odstupanje (engl. *bias*) i predstavlja razliku srednje vrijednosti rezultata opetovanih mjerenja ispitivanom metodom u odnosu na deklarirane vrijednosti certificiranog referentnog materijala. Kako su certificirani materijali za pojedine analite rijetko dostupni, istinitost se ispituje usporedbom sa srednjom vrijednošću rezultata opetovanih mjerenja napravljenih metodom koja je već uspostavljena u rutinskom radu laboratorija.

3. Linearnost

Linearnost analitičkog postupka podrazumijeva sposobnost metode da unutar određenog mjernog područja daje signal izravno proporcionalan koncentraciji određenog analita, odnosno da između izmjerenog signala i koncentracije analita u uzorku postoji odnos koji se može prikazati jednadžbom pravca.

4. Granica detekcije (engl. *Limit of detection, LoD*)

Najmanja je količina analita koja se može pouzdano detektirati u utvrđivanju prisutnosti/odsutnosti analita.

5. Granica kvantifikacije (engl. *Limit of Quantification, LoQ*)

Najmanja je količina analita koja se može pouzdano kvantificirati, tj. mjeriti metodom sa zadovoljavajućom pouzdanosti.

Granicu detekcije i granicu kvantifikacije potrebno je provjeriti za one analite koji nisu prisutni u uzorcima zdravih ljudi pa detekcija i najmanje količine takvog analita može upućivati na postojanje patološkog procesa.

6. Referentne intervale

Referentni interval predstavlja centralni interval koncentracija analita omeđen koncentracijama referentnih granica s određenim percentilom, odnosno odnosi se na skup koncentracija koje se tipično nalaze u zdravoj populaciji

7. Analitičku specifičnost

Sposobnost metode da ispravno identificira ili mjeri željeni analit u prisutnosti ostalih komponenti u uzorku

8. Utjecaj matriksa

Matriks čine sve komponente u uzorku izuzev analita koji određujemo pa se pod utjecajem matriksa podrazumijeva kombinirani učinak svih ostalih komponenti osim analita na rezultat mjerenja

9. Interferencije

Učinak pojedinih tvari u uzorku, bilo endogenog ili egzogenog porijekla, koji uzrokuje odstupanje izmjerene koncentracije u odnosu na pravu koncentraciju.

10. Ostalo

Ostale značajke koje mogu biti obuhvaćene validacijom ovisno o specifičnostima analita, kliničkoj primjeni metode ili specifičnostima analitičkog sustava su: test iskorištenja (engl. *recovery*), dijagnostička osjetljivost i specifičnost, ispitivanje prenosivosti prethodnog uzorka u seriji (engl. *carry over*) (Šimundić, ured., 2013.).

1.3.2 VERIFIKACIJA METODA

Postupak verifikacije u opsegu je manji u odnosu na validaciju i dovoljno je provjeriti sljedeće značajke metode:

1. Preciznost
2. Istinitost
3. Linearnost
4. Referentne intervale

i) Iako je preporuka da svaki laboratorij napravi ocjenu primjenjivosti referentnih intervala na svojoj populaciji, vrlo često se iz ekonomskih razloga primjenjuje subjektivna procjena prijenosa referentnih intervala na vlastitu populaciju ili verifikacija na manjem broju referentnih ispitanika ($N = 20$).

Statistička obrada prikupljenih eksperimentalnih podataka daje procjenu pogreške metode koju uspoređujemo s unaprijed definiranim kriterijima prihvatljivosti te se na osnovu toga donosi odluka o uvođenju nove analitičke metode u rutinski rad laboratorija (Šimundić, ured., 2013.).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Rezultati laboratorijske analize imaju veliki značaj za zdravlje, a nerijetko i sam život pacijenta. Osiguranje kvalitete provođenja analize te pouzdanost i vjerodostojnost rezultata nosi veliku odgovornost. Provođenjem verifikacije prije uvođenja i primjene nove metode u rutinski rad osigurava se daljnja kvalitetna obrada uzoraka i prema tome dobivanje vjerodostojnih rezultata koji neće kompromitirati liječenje te posljedično zdravlje pacijenta. Dužnost laboratorija je provoditi mjerenja vrhunske kvalitete.

U rutinskom radu Kliničkog zavoda za kemiju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice, koncentracija fekalnog kalprotektina u uzorku stolice određuje se metodom imunoturbidimetrije dijagnostičkim testom Bühlmann fCAL® turbo (Bühlmann, Schönenbuch, Switzerland) na analizatoru Abbot Architect c8000 (Abbott S.r.l., Roma, Italy). Cilj ovog rada bilo je provesti verifikaciju nove kvantitativne metode za određivanje fekalnog kalprotektina koja se zasniva na principu kemiluminiscencije (QUANTA Flash® Calprotectin, INOVA Diagnostics, San Diego, CA, USA) na analizatoru Bio-Flash (Biokit S.A.©, Španjolska), te na osnovu rezultata verifikacije ocijeniti je li metoda prihvatljiva za primjenu u rutinskom radu. Postupkom verifikacije obuhvaćeno je ispitivanje preciznosti, isitinitosti te provjera linearnosti metode.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

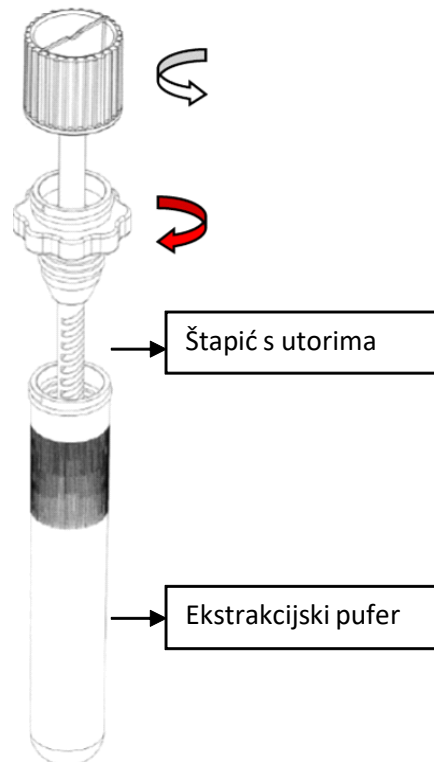
3.1.1. UZORCI

Za provjeru preciznosti korišteni su komercijalni kontrolni uzorci proizvođača (QUANTA Flash® Calprotectin controls) u dvije koncentracijske razine od kojih viša pokriva klinički značajno koncentracijsko područje. Za provjeru istinitosti analizirano je 59 ostatnih uzoraka stolica pacijenata zaprimljenih u Klinički zavod za kemiju, KBC Sestre milosrdnice u Zagrebu, za koje je zatraženo određivanje fekalnog kalprotektina. Svi uzorci stolica dostavljeni su u laboratorij unutar 3 dana, što je u skladu s preporukom proizvođača koja navodi da se uzorak mora dostaviti unutar 10 dana na temperaturi <math><30^{\circ}\text{C}</math>. Po primitku, mali dio stolice je odmah uzorkovan sa štapićem iz komercijalne ekstrakcijske tube (Fecal Collection Device) u svrhu ispitivanja istinitosti QUANTA Flash® Calprotectin metode. U ekstrahiranom uzorku stolice je istog dana izmjerena koncentracija fekalnog kalprotektina na analizatoru Bio-Flash (Biokit S.A.©, Španjolska). Preostali uzorak stolice pohranjen je na $2 - 8^{\circ}\text{C}$ te je u roku od 4 dana od zaprimanja materijala, provedena ekstrakcija komercijalnom ekstrakcijskom tubom, CALEX® *Cap extraction device*, po preporuci proizvođača Bühlmann fCAL®Turbo reagensa i mjerenje je napravljeno imunoturbidimetrijskom metodom (Bühlmann fCAL®Turbo, na analizatoru Architect c8000).

3.1.1.1. EKSTRAKCIJA UZORAKA STOLICE

Zlatnim standardom smatra se ekstrakcija odvajnutog uzorka stolice (od 80 – 120 mg), ali je ovaj postupak nepraktičan i dugotrajan pa ga sve više zamjenjuju komercijalni uređaji za ekstrakciju koji već sadrže ekstrakcijski pufer i štapiće s utorima kojima se uzorkuje standardizirana masa stolice. Za ekstrakciju uzorka stolice u ovom radu korišten je komercijalni uređaj za ekstrakciju, Fecal Collection Device, preporučen od proizvođača reagensa QUANTA Flash® Calprotectin. Uređaj za ekstrakciju sastoji se od štapića s utorima koji se po završetku uzorkovanja pohranjuje u plastični spremnik već ispunjen određenim volumenom QUANTA Flash® Calprotectin ekstrakcijskog pufera (Slika 1.) Utori na štapiću su napravljeni na način da zaprimaju određenu količinu uzorka stolice koji će se potom razrijediti u puferu u odgovarajućem omjeru za provođenje analize. Štapić je potrebno uroniti u uzorak i okretati dok nisu u potpunosti ispunjeni svi utori stolicom. Višak uzorka se odstranjuje trenjem o unutrašnju stijenkiju prilikom umetanja štapića u otvor spremnika s ekstrakcijskim puferom. U slučaju da

je stolica tekuća, ne koristi se štapić s utorima već se pipetom aspirira 56 μL uzorka te ispusti u spremnik s puferom. Spremnik s ekstrakcijskim puferom se miješa na mješalici prema uputama proizvođača, minimalno 30 sekundi, a maksimalno 4 minute kako bi se uzorak stolice oslobodio iz utora te homogenizirao s puferom. Po završetku miješanja, štapić se uklanja, epruveta zatvori čepom te centrifugira 10 minuta na 3000 g. Cetrifugiranjem se talože nehomogenizirani ostaci stolice, a supernatant se otpipetira u čiste epruvete koje se potom stavljaju u uređaj BIO-FLASH® na analizu kako ne bi došlo do kontaminacije uređaja ostacima stolice.



Slika 1 Komercijalni uređaj za ekstrakciju stolice (engl. Fecal Collection Device) (preuzeto iz originalne specifikacije uređaja za ekstrakciju, Fecal Extraction Device, Ref 504837, Inova Diagnostics, A Werfern company).

3.1.2. METODE

3.1.2.1. QUANTA Flash® Calprotectin

QUANTA Flash® Calprotectin reagens (Inova Diagnostics, Inc, San Diego, CA, USA) kompatibilan je s BIO-FLASH® kemiluminescentnim analizatorom (Biokit, S.A.©) te služi za kvantitativno određivanje koncentracije fekalnog kalprotektina u ekstraktu uzorka stolice. Reagensni paket uključuje QUANTA Flash® Calprotectin reagens, QUANTA Flash® Calprotectin kalibratore i QUANTA Flash® Calprotectin kontrole. U barkodu reagensa pohranjena je *Master* krivulja koju softver automatski učitava i pohranjuje u trenutku postavljanja reagensa na analizator. Prije mjerenja kontrolnih uzoraka i uzoraka bolesnika radi se tzv. radna kalibracijska krivulja mjerenjem koncentracije kalprotektina u uzorcima kalibratora na tri koncentracijske razine (mjerenje svakog kalibratora se radi u duplikatu). Radna krivulja se automatski uspoređuje s *Master* krivuljom i u slučaju neprihvatljivog odstupanja odbacuje te je potrebna rekaliibracija. Softver koristi kalibracijsku krivulju da bi se dobiveni svjetlosni signal preveo u koncentraciju kalprotektina. QUANTA Flash® Calprotectin kontrole koriste se za kontrolu kvalitete mjerenja kalprotektina u ekstrahiranim uzorcima stolice.

QUANTA Flash® Calprotectin set reagensa pohranjen je u kaseti koja sadrži tri odjeljka: u prvom odjeljku su u puferu suspendirane paramagnetske čestice obložene anti-kalprotektin antitijelima, drugi odjeljak sadrži pufersku otopinu TBS-a (pufer koji sadrži Tris pufer i NaCl), detergenta Tween 20, proteinskih stabilizatora i prezervativa, a treći odjeljak otopinu izoluminolom obilježenih anti-kalprotektin monoklonskih antitijela u puferu s proteinskim stabilizatorima i prezervativima. Uz QUANTA Flash® Calprotectin set reagensa, kalibratore i kontrole, za izvođenje analize korišten je i QUANTA Flash® Special Wash otopina za ispiranje te dva tzv. "trigger" reagensa kojima se oksidira izoluminol.

Test je temeljen na principu tzv. „sendvič“ imunokemijske kemiluminescentne reakcije (CLIA) na paramagnetskim mikročesticama. Paramagnetske mikročestice obložene su kalprotektin-specifičnim vezujućim antitijelima. Prethodno analizi, sam uređaj razrjeđuje ekstrakt stolice s puferom u jednokratnoj plastičnoj kiveti u omjeru 1:23. Za analizu se aspirira mali volumen razrijeđenog ekstrakta stolice, mikročestica te puferske otopine te ih se pomiješa u novoj kiveti koja se potom inkubira na 37°C. Mikročestice se magnetiziraju te ispiru nekoliko puta. Potom se u reakcijsku smjesu dodaju monoklonska anti-kalprotektin antitijela konjugirana s izoluminolom te ponovno inkubira na 37°C. Mikročestice se magnetiziraju te ispiru nekoliko

puta. Konjugat izoluminola se oksidira dodatkom dva triger reagensa (Fe(III)koproporfirin u otopini natrijeva hidroksida i urea-hidrogen peroksid u otopini natrijeva klorida) te time dolazi do stvaranja luminescentnog svjetlosnog signala koji se mjeri optičkim sustavom uređaja i izražava u relativnim svjetlosnim jedinicama (RLU, *engl. relative light units*). Količina oslobođene svjetlosti proporcionalna je količini vezanog izoluminol-konjugata koji je pak proporcionalan količini kalprotektina iz uzorka vezanog za poliklonska anti-kalprotektin antitijela na mikročesticama. Koncentracija kalprotektina u *ng/mL* u uzorku automatski se izračunava iz pohranjene kalibracijske krivulje. Za pretvorbu iz *ng/mL* u *mg/kg*, dobiveni rezultati automatski se množe s prethodno unesenim faktorom 1,15. Prema preporuci proizvođača, negativnim rezultatima smatraju se koncentracije fekalnog kalprotektina < 50 *mg/kg*, graničnima koncentracije u rasponu $50 - 120$ *mg/kg*, a pozitivnima koncentracije ≥ 120 *mg/kg*.

3.1.2.2. Bühlmann fCAL®Turbo

Imunoturbidimetrijska metoda na česticama (eng. *Homogeneous Particle-Enhanced Turbidimetric Immunoassay, PETIA*), imunokemijska je metoda temeljena na mjerenju zamućenosti otopine, odnosno turbidimetriji. Nanočestice prekrivene antitijelima vežu na sebe antigen od interesa (kalprotektin) iz uzorka. Zamućenost otopine raste vezanjem antigena za antitijela na česticama te međusobnim umreženjem imunokompleksa čime dolazi do aglutinacije. Uređaj emitira monokromatsku svjetlost u rasponu od 290 do 410 nm koja prolazi kroz otopinu uzorka te se njezin intenzitet smanjuje prolaskom kroz zamućenu otopinu zbog apsorpcije i refleksije svjetlosti. Intenzitet prolaznog svijetla mjeri fotodioda smještena u smjeru ulazne zrake svijetlosti, pod kutem od 180° te se dobiveni signal upotrebom kalibracijske krivulje prevodi u koncentraciju analita u uzorku (Dodig 2015; <https://www.gentian.com/news/petia>).

Proizvođač predlaže referentne intervale koji se interpretiraju kao normalni (negativni), granični i povišeni (pozitivni). Koncentracije fekalnog kalprotektina < 80 *mg/kg* interpretiraju se kao normalne (negativne), koncentracije u rasponu $80 - 160$ *mg/kg* kao granične, a sve koncentracije > 160 *mg/kg* kao povišene (pozitivne).

3.2. STATISTIČKE METODE

Statističke metode u postupku verifikacije korištene su u svrhu ispitivanja preciznosti i linearnosti metode, za usporedbu nove metode s postojećom te provjere podudarnosti u kategorizaciji rezultata. Svi statistički izračuni i grafovi izrađeni su korištenjem programa Microsoft Excel i MedCalc verzija software-a 19.1.5 (MedCalc Software Ltd, Ostend Belgium).

3.2.1. PROVJERA PRECIZNOSTI

Preciznost metode ispitana je prema preporukama CLSI (engl. Clinical and Laboratory Standards Institute) protokola EP15-A2 (CLSI, 2005.). Mjerenje oba kontrolna uzorka u niskom i visokom koncentracijskom području rađeno je u triplikatu tijekom pet uzastopnih dana. Kontrolne uzorke su na analizator postavljale različite osobe u različito doba dana kako bi se obuhvatila maksimalna varijabilnost analitičkog sustava (Chesher, 2008.).

Standardna devijacija mjera je nepreciznosti za normalnu distribuciju rezultata mjerenja, a može se koristiti i varijanca, drugi korijen standardne devijacije. Koeficijent varijacije (CV) izražava standardnu devijaciju s obzirom na srednju vrijednost te predstavlja ponovljivost metode i uspoređuje s odabranim kriterijem prihvatljivosti za svaku od koncentracijskih razina. Za kriterij prihvatljivosti uzete su vrijednosti iz deklaracije proizvođača – 4% za ponovljivost i 5,5% za unutarlaboratorijsku preciznost.

Za izračun ponovljivosti za svaki kontrolni uzorak potrebno je izračunati aritmetičku sredinu vrijednosti dobivenih mjerenjem tijekom pet uzastopnih dana u triplikatu, za svaki od pet dana:

$$\text{Aritmetička sredina } (\bar{x}) = \frac{x_1 + x_2 + x_3}{3}$$

Dobivene aritmetičke sredine vrijednosti mjerenja u triplikatu za svaki od pet uzastopnih dana uvrštavaju se u formulu za izračun standardnog odstupanja (S_d) za svaki od pet dana, gdje je $n = 3$, a $X - \bar{X}$ odstupanje svakog mjerenja u danu od srednje vrijednosti u danu:

$$\text{Standardno odstupanje } (S_d) = \sqrt{\frac{\sum(X - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

Dobivena standardna odstupanja za svaki od pet dana služe za izračun standardnog odstupanja za 5 dana (S_r):

$$\text{Standardno odstupanje za 5 dana } (S_r) = \sqrt{\frac{S_{d1}^2 + S_{d2}^2 + S_{d3}^2 + S_{d4}^2 + S_{d5}^2}{5}}$$

Naposlijetku, dobiveno standardno odstupanje za svih pet dana omogućava izračun koeficijenta varijacije (CV_p):

$$\text{Koeficijent varijacije } (CV_p) = (S_r/\bar{X}) \times 100$$

Dobiveni koeficijent varijacije predstavlja ponovljivost metode i uspoređuje se s odabranim kriterijem prihvatljivosti koji prema deklaraciji proizvođača iznosi 4%. Ukoliko je izračunati koeficijent manji od ili jednak 4%, zaključuje se da metoda ima zadovoljavajuću ponovljivost.

Za izračun unutarlaboratorijske preciznosti, također se izračunavaju aritmetičke sredine vrijednosti dobivenih mjerenjem u triplicatu kroz pet dana. Potom se izračunava ukupna aritmetička sredina svih pet izračunatih aritmetičkih sredina (*Grand mean*), gdje je $D = 5$:

$$(\bar{X}) = \frac{\bar{x}_1 + \bar{x}_2 + \bar{x}_3 + \bar{x}_4 + \bar{x}_5}{D}$$

Za izračun unutarlaboratorijskog odstupanja potrebno je izračunati validacijsku međupreciznost kod ponavljanih mjerenja (S_b):

$$\text{Validacijska međupreciznost kod ponavljanih mjerenja } (S_b) = \sqrt{\frac{\sum_{d=1}^D (\bar{x}_d - \bar{x})^2}{D - 1}}$$

Unutarlaboratorijsko standardno odstupanje (S_l) izračunava se uz standardno odstupanje (S_r) i validacijsku međupreciznost kod ponavljanih mjerenja (S_b) prema formuli, gdje je $n = 3$:

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

Koeficijent varijacije (CV_u) izračunava se pomoću unutarlaboratorijskog standardnog odstupanja i ukupne aritmetičke sredine:

$$\text{Koeficijent varijacije } (CV_u) = (S_l/\bar{X}) \times 100$$

Izračunati koeficijent varijacije predstavlja unutarlaboratorijsku preciznost metode i uspoređuje se s odabranim kriterijem prihvatljivosti koji prema deklaraciji proizvođača iznosi 5,5% (CLSI, 2005).

3.2.2. USPOREDBA METODE S POSTOJEĆIM SUSTAVOM

Cilj usporedbe metoda je procjena sistematske, konstante i proporcionalne razlike između dviju uspoređivanih metoda kako bi se ustvrdilo moguće postojanje značajne razlike između njihovih relativnih točnosti prilikom korištenja stvarnih uzoraka pacijenata. Ukoliko je razlika između dviju metoda unutar kriterija koji se obično uzima od nekog od organizatora programa vanjske kontrole kvalitete i klinički je prihvatljiva, moguće je postojeću metodu zamijeniti ispitivanom, odnosno smatrati ju jednakovrijednom (Bilić-Zulle, 2011.).

Za potrebe usporedbe analizirano je 59 uzoraka čije koncentracije fekalnog kalprotektina pokrivaju čitavo mjerno područje metode koje prema navodima proizvođača iznosi 16,1 – 3500 mg/kg. Za statističku obradu podataka izračunato je srednje odstupanje dviju metoda te su provedene Passing-Bablokova regresija i Bland-Altmanova analiza.

3.2.2.1. IZRAČUN SREDNJEG ODSUPANJA

Uspoređuju se koncentracije dobivene za svaki uzorak postojećom (Bühlmann fCAL®Turbo metoda, dalje u tekstu Metoda 1) i novom metodom (QUANTA Flash® Calprotectin metoda, dalje u tekstu Metoda 2) te se pojedinačno za svaki par izračunava odstupanje. Odstupanje između metoda (tzv. *bias*) računa se prema formuli:

$$Bias = ((Metoda 2 - Metoda 1) / Metoda 1) \times 100\%$$

Bias za svaki par koncentracija je automatski izračunat unosom koncentracija objiju metoda u Microsoft Excel tablicu u kojoj je primijenjena navedena formula.

Srednje odstupanje se računa kao srednja koncentracija svih pojedinačnih odstupanja.

Za kriterij prihvatljivosti odstupanja između metoda za kalprotektin uzet je kriterij organizatora vanjske kontrole kvalitete (*External Quality Control Assessment, Labquality, Helsinki, Finland*) u čiji modul je KZZK uključen s postojećom metodom (Bühlmann fCAL®Turbo), a iznosi 30 %.

3.2.2.2. INTERVAL POUZDANOSTI

Interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*, *CI*) predstavlja raspon mogućih vrijednosti unutar kojega se s određenom vjerojatnosti nalazi statistička mjera populacije te je objektivna procjena (ne)preciznosti i veličine uzorka nekog istraživanja. Ukoliko interval pouzdanosti iznosi 95%, to znači da samo u 5% slučajeva interval pouzdanosti neće obuhvatiti pravu srednju vrijednosti populacije. Pomoću *Z* vrijednosti, standardne devijacije uzorka i veličine uzorka, *N*, izračunavaju se granice intervala pouzdanosti prema formuli:

$$Z \times \frac{SD}{\sqrt{N}}$$

Iznos *Z* vrijednosti ovisi o odabranoj razini pouzdanosti, a za interval pouzdanosti 95% ona iznosi 1,96. Za izračun donje granice intervala, od srednje vrijednosti oduzima se izračunati iznos iz gornje formule. Isti iznos se zbraja sa srednjom vrijednosti za izračun gornje granice (Šimundić, 2008).. Za definiciju 95%-tnog intervala pouzdanosti koristi se izraz:

$$95\%CI = \left(\bar{X} - Z \times \frac{SD}{\sqrt{N}} \right) - \left(\bar{X} + Z \times \frac{SD}{\sqrt{N}} \right)$$

3.2.2.3. PASSING-BABLOKOVA REGRESIJA

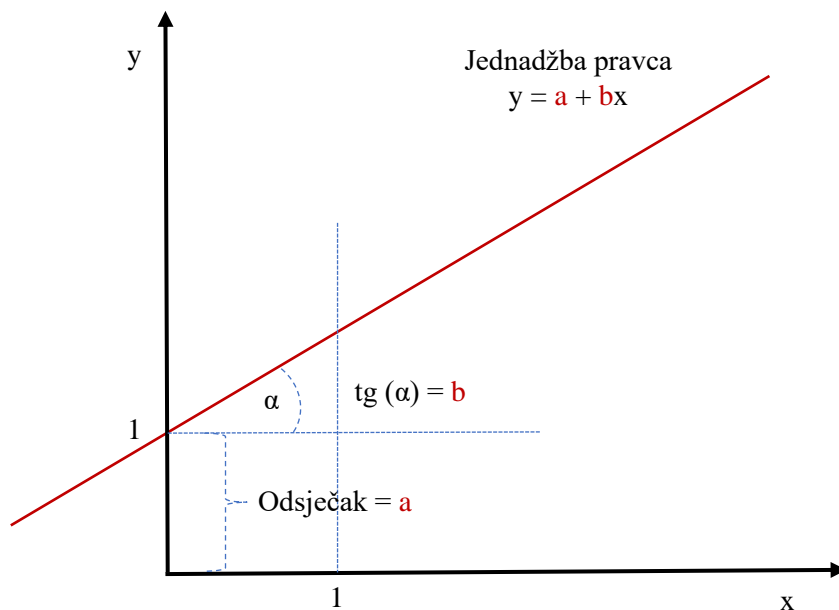
Passing-Bablokova regresijska analiza statistička je metoda koja omogućava procjenu slaganja rezultata te mogući sistematski *bias* između dviju analitičkih metoda. Tip je linearne regresije u kojoj nema zavisne i nezavisne varijable, a čiji su preduvjeti za izvođenje da su obje varijable numeričke i u linearnom odnosu. Rezultati analize se prikazuju u koordinatnom sustavu u kojemu se na osi *x* nalaze koncentracije dobivene Metodom 1, a na osi *y* koncentracije dobivene Metodom 2 te se dobiva regresijski pravac s pripadajućim intervalima pouzdanosti čija jednačba glasi:

$$y = a (95\% CI) + b (95\% CI) x$$

Intervali pouzdanosti služe za identifikaciju konstantne ili proporcionalne pogreške između metoda. Matematički otklon između dviju ispitivanih metoda koji je jednak u svim koncentracijskim područjima i odgovara odsječku na osi *y* (*a*) predstavlja konstantno odstupanje. Ukoliko 95%-tni interval pouzdanosti za varijablu *a* ne obuhvaća nulu, zaključuje se da postoji statistički značajno konstantno odstupanje između dviju metoda. Za razliku od konstantnog, proporcionalno odstupanje definira matematički otklon između metoda ovisan o veličini koncentracijskog područja te odgovara koeficijentu smjera pravca (*b*), tj. tangensu kuta

što ga pravac zatvara s osi x (Slika 2). Ukoliko 95%-tni interval pouzdanosti za varijablu b ne obuhvaća jedinicu, zaključuje se da postoji statistički značajno proporcionalno odstupanje između dviju metoda (Topić, 2018).

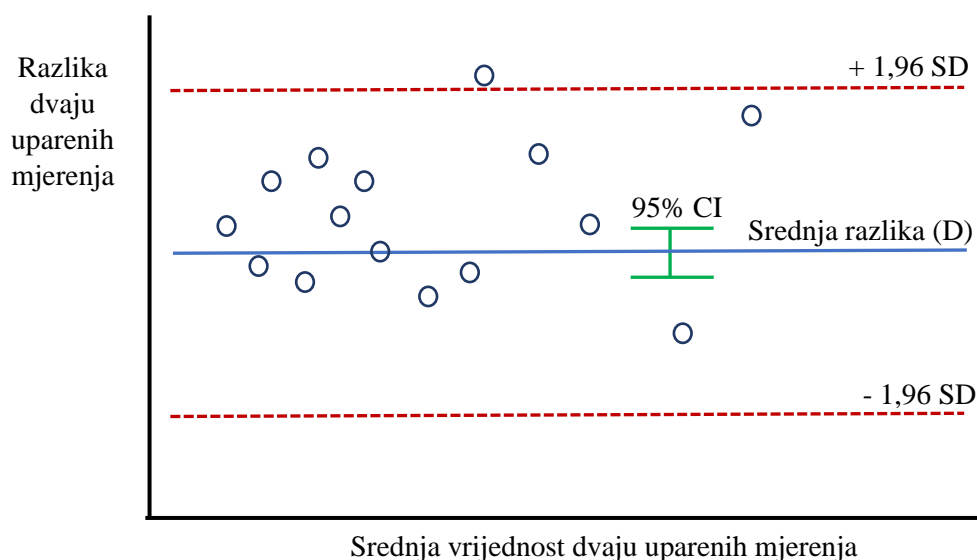
Passing Bablok analizom izračunava se i CUSUM (engl. *cumulative sum*) test linearnosti koji pokazuje jesu li vrijednosti nasumično raspoređene iznad i ispod regresijskog pravca. Dobivena P vrijednost govori postoji li statistički značajno odstupanje od linearnosti između dviju metoda. Ukoliko je P vrijednost manja od 0.05, to znači da postoji statistički značajno odstupanje od linarnosti (Bilić-Zulle, 2011.)



Slika 2 Jednadžba regresijskog pravca.

3.2.2.4. BLAND-ALTMANOVA ANALIZA

Bland-Altmanova analiza slikovni je prikaz statističkog postupka koji omogućava procjenu slaganja između dviju metoda. Srednja razlika (engl. *mean difference*, D) dvaju mjerenja prikazuje se na grafikonu uz odgovarajuće intervale pouzdanosti. Rezultati mjerenja prikazuju se grafikonom na kojemu su na os y nanesene razlike dvaju uparenih mjerenja, a na os x njihova srednja vrijednost (Slika 3). Za procjenu konstantnog odstupanja, na y osi su prikazane razlike u apsolutnim vrijednostima, a za procjenu proporcionalnog odstupanja, razlike su prikazane u postotcima. Ukoliko granice 95%-tnog intervala pouzdanosti za srednju razliku obuhvaćaju nulu, ne postoji statistički značajno konstantno ili proporcionalno odstupanje. Osim srednje razlike izračunava se i vrijednost standardne devijacije razlika (s). Ako su razlike mjerenja normalno distribuirane, očekujemo da 95 % razlika ulazi u područje $\pm 1,96$ SD. Na grafu je prikazano područje unutar kojeg se nalazi 95 % razlika mjerenja omeđeno granicama slaganja (engl. *limits of agreement*) koje iznose $D \pm 1,96$ SD. Procjena udjela vrijednosti unutar granica prihvatljivosti daje informaciju o podudarnosti između metoda. Što su granice bliže, a raspon uži, to je podudarnost između dviju ispitivanih metoda bolja. Suprotno, široki raspon ukazuje na lošije podudaranja metoda. Kriterij za prihvatljivost širine intervala slaganja između metoda mora biti definiran u skladu s kliničkim značenjem. (Giavarina, 2015.)



Slika 3 Bland-Altman grafikon.

3.2.2.5. PROVJERA LINEARNOSTI

Linearnost se provjerava na 5 koncentracijskih točaka unutar deklariranog područja linearnosti (Šimundić, ured., 2013.) Koncentracijske točke dobivene su razrjeđenjem uzorka visoke koncentracije (H) ispitivanog analita, a koja je manja od gornje granice mjernog raspona s otopinom za ispiranje QUANTA Flash® Special Wash koja u sebi ne sadrži analit imitirajući na taj način rad samog analizatora u slučaju rezultata iznad granice mjernog područja. Rezultat izmjeren QUANTA Flash® Calprotectin metodom za uzorak visoke koncentracije zabilježava se kao očekivana vrijednost. Preostale četiri koncentracijske točke prvo se izračunavaju kako bi se pokrilo cijelo mjerno područje te znalo u kojim omjerima je potrebno razrijediti uzorak visoke koncentracije za dobivanje izračunatih očekivanih vrijednosti. Nakon što su sve točke i omjeri razrjeđenja računski određeni, napravljena su razrjeđenja miješanjem određene koncentracije uzorka visoke koncentracije i otopine za ispiranje. U dobivenim razrjeđenjima, zajedno s uzorkom visoke koncentracije, izmjerena je koncentracija fekalnog kalprotektina ispitivanom metodom u duplikatu te izračunata srednja vrijednost. Za svako razrijeđenje izračunat je pototak odstupanja, tj. *bias*, između očekivane i izmjerene koncentracije prema formuli:

$$\text{Odstupanje} = ((\text{Izmjerena} - \text{Očekivana}) / \text{Očekivana}) \times 100\%$$

Za metodu se zaključuje da je linearna u rasponu koncentracija za koje su odstupanja unutar odabranog kriterija prihvatljivosti za usporedbu metoda (*bias*). Rezultati se također prikazuju grafički nanošenjem očekivanih vrijednosti na apscisu, a izmjerenih koncentracija na ordinatu te se dobiva pravac i jednadžba pravaca. Srednje odstupanje, graf i jednadžba pravca dobiveni su unošenjem izračunatih i dobivenih vrijednosti u programu Microsoft Excel (CLSI, 2005).

3.2.2.6. PROVJERA PODUDARNOSTI U KATEGORIZACIJI REZULTATA

Ono što je od kliničkog značaja jest interpretacija vrijednosti dobivenih mjerenjem koncentracija analita istih uzoraka dvjema metodama, bilo kao normalne (unutar referentnog intervala) ili kao patološke (ispod ili iznad referentnog intervala). U tom slučaju može se provesti provjera podudarnosti u kategorizaciji rezultata kako bi se ispitalo nose li dobiveni rezultati jednako kliničko značenje (kategoriju) neovisno o podudaranju brojčanih vrijednosti. Provjera podudarnosti u kategorizaciji rezultata (engl. *inter-rater agreement kappa*) statistička je metoda kojom se mjeri podudarnost u kategorizaciji podataka za metode koje imaju međusobno neusporediva mjerna područja i pripadajuće referentne intervale. U ovome slučaju, provjerava se podudarnost kategorizacije dobivenih vrijednosti mjerenja dviju metoda u normalne i patološke, tj. vrijednosti unutar referentnog i iznad referentnog intervala definiranog za svaku metodu. Rezultat analize su kappa vrijednosti koje se mogu nalaziti u području od -1 do +1, a interpretiraju se za vrijednosti 0 – 0,20 slučajna podudarnost; 0,21 – 0,39 minimalna podudarnost, 0,40 – 0,59 slaba podudarnost, 0,60 – 0,79 osrednja podudarnost, 0,80 – 0,90 kao snažna podudarnost i $> 0,90$ kao savršena podudarnost. Kao kriterij prihvatljivosti definirana je donja granica 95% CI za izračunati kappa koeficijent na razini osrednje podudarnosti ($\geq 0,60$) (McHugh, 2012; CLSI, 2005).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. PRECIZNOST

Rezultati ispitivanja preciznosti metode mjerenjem kalprotektina u komercijalnim kontrolnim uzorcima niske i visoke koncentracije prikazani su u Tablicama 1 i 2. Za svaki dan provedenih mjerenja je izračunata srednja vrijednost tri mjerenja te u konačnici srednja vrijednost dobivenih srednjih vrijednosti za svih pet dana

Tablica 1. Prikaz rezultata mjerenja koncentracija kontrolnog uzorka niske koncentracije u triplikatu kroz pet dana uz izračun srednjih vrijednosti za svaki triplikat, ukupne srednje vrijednosti, ponovljivosti i unutarlaboratorijske preciznosti.

Datum	28.09.2020.	29.09.2020.	01.10.2020.	02.10.2020.	05.10.2020.
Mjerenje 1	51,5	53,9	55,2	53,3	64,9
Mjerenje 2	60,1	53,5	55,1	54,0	51,3
Mjerenje 3	53,7	51,3	54,5	52,9	53,1
Aritmetička sredina (\bar{x})	55,1	52,9	54,9	53,4	56,4
Srednja vrijednost svih 5 dana	54,5				
S_d	4,5	1,4	0,4	0,6	7,4
S_d^2	20,0	2,0	0,1	0,3	54,7
S_r^2	15,4				
Razlika \bar{x} i srednje vrijednosti svih 5 dana	-0,5	1,6	0,4	1,2	-1,9
Kvadrati razlike	0,3	2,7	0,2	1,4	3,6
S_b^2	2,0				
S_r	4,0				
S_l	3,5				
Ponovljivost (CV)	7,2 %				
Unutarlaboratorijska preciznost (CV)	6,4 %				

S_d – standardno odstupanje, S_b - validacijska međupreciznost kod ponavljanih mjerenja, S_r - standardno odstupanje za 5 dana, S_l - unutarlaboratorijsko standardno odstupanje, CV – koeficijent varijacije

Tablica 2. Prikaz rezultata mjerenja koncentracija kontrolnog uzorka visoke koncentracije u triplikatu kroz pet dana uz izračun srednjih vrijednosti za svaki triplikat, ukupne srednje vrijednosti, ponovljivosti i unutarlaboratorijske preciznosti.

Datum	28.09.2020.	29.09.2020.	01.10.2020.	02.10.2020.	05.10.2020.
Mjerenje 1	260,5	284,7	293,8	292,8	280,5
Mjerenje 2	264,9	273,3	300,2	292,1	274,6
Mjerenje 3	260,2	263,3	296,7	271,2	288,6
Aritmetička sredina (\bar{x})	261,9	273,8	296,9	285,4	281,2
Srednja vrijednost svih 5 dana	279,8				
S_d	2,6	10,7	3,2	12,3	7,0
S_d^2	6,9	114,1	10,3	151,3	49,5
S_r^2	66,4				
Razlika \bar{x} i srednje vrijednosti svih 5 dana	18,0	6,1	-17,1	-5,6	-1,4
Kvadrati razlike	322,2	36,7	290,8	31,0	1,9
S_b^2	170,6				
S_r	8,2				
S_l	14,7				
Ponovljivost (CV)	2,9 %				
Unutarlaboratorijska preciznost (CV)	5,2 %				

S_d – standardno odstupanje, S_b - validacijska međupreciznost kod ponavljanih mjerenja, S_r - standardno odstupanje za 5 dana, S_l - unutarlaboratorijsko standardno odstupanje, CV – koeficijent varijacije.

Izmjerena ponovljivost za nisku koncentracijsku razinu iznosi 7,2%, a za visoku koncentracijsku razinu 2,9%. Ponovljivost niske koncentracijske razine veća je od odabranog kriterija prihvatljivosti koji iznosi 4,0% te je zaključeno da metoda nema zadovoljavajuću ponovljivost u niskom koncentracijskom području. Ponovljivost visoke koncentracijske razine manja je od odabranog kriterija prihvatljivosti koji iznosi 4,00% te je zaključeno da metoda ima zadovoljavajuću ponovljivost u visokom koncentracijskom području.

Odabrani kriterij prihvatljivosti za unutarlaboratorijsku preciznost iznosi 5,5%. Izračunata unutarlaboratorijska preciznost za nisku koncentracijsku razinu iznosi 6,4 % (Tablica 1), a visoku 5,2 % (Tablica 2). Vrijednost niske koncentracijske razine veća je od vrijednosti kriterija prihvatljivosti te je zaključeno da metoda nema zadovoljavajuću unutarlaboratorijsku preciznost u niskom koncentracijskom području. Vrijednost visoke koncentracijske razine manja je od kriterija prihvatljivosti te je zaključeno da metoda ima zadovoljavajuću unutarlaboratorijsku preciznost u visokom koncentracijskom području.

4.2. USPOREDBA METODA

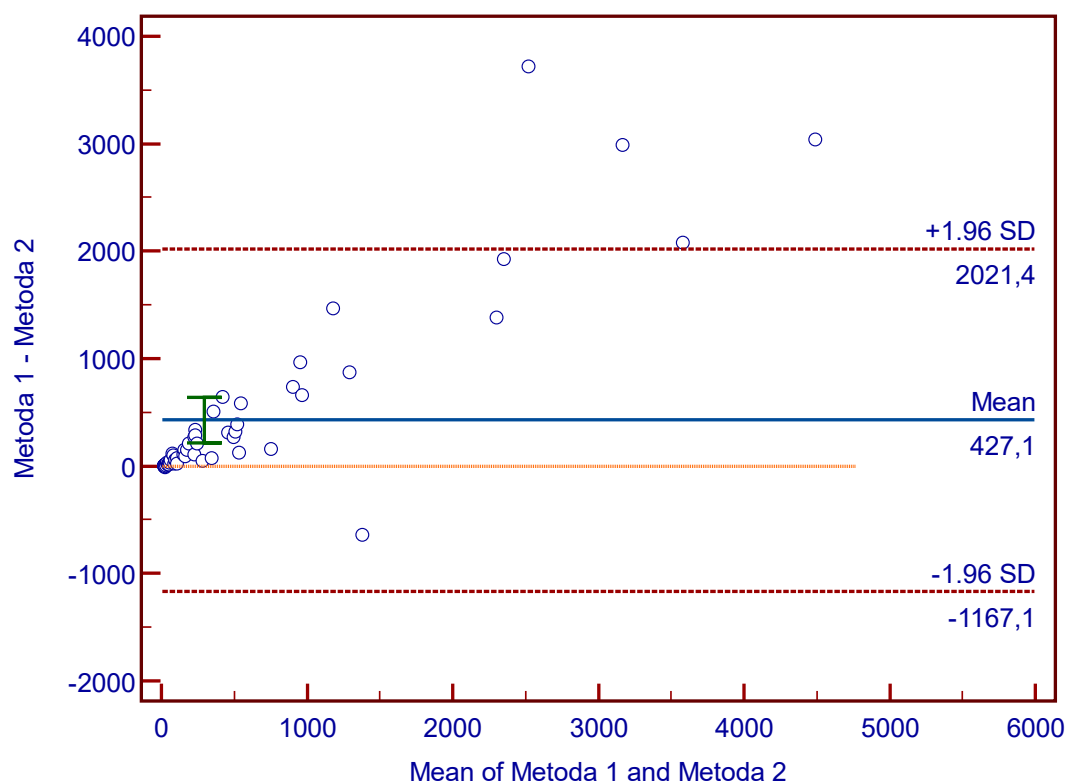
4.2.1 USPOREDBA KONCENTRACIJA FEKALNOG KALPROTEKTINA IZMJERENIH S OBJE METODE

Pojedinačni rezultati dobiveni mjerenjem Metodom 1, odnosno Metodom 2 te izračunata odstupanja (*bias*) navedeni su u Tablici 3. Dobiveno ukupno srednje odstupanje, srednji *bias*, između dviju metoda iznosi -3,95%. Međutim, uvidom u pojedinačna odstupanja vidljivo je da >5% parova usporedbi odstupa od zadanog kriterija prihvatljivosti od 30%.

Tablica 3. Koncentracije kalprotektina u 59 uzoraka izmjerene Metodom 1 i Metodom 2, bias uparenih rezultata, ukupne srednje vrijednosti mjerenja dobivenih Metodom 1 i Metodom 2 te srednji bias.

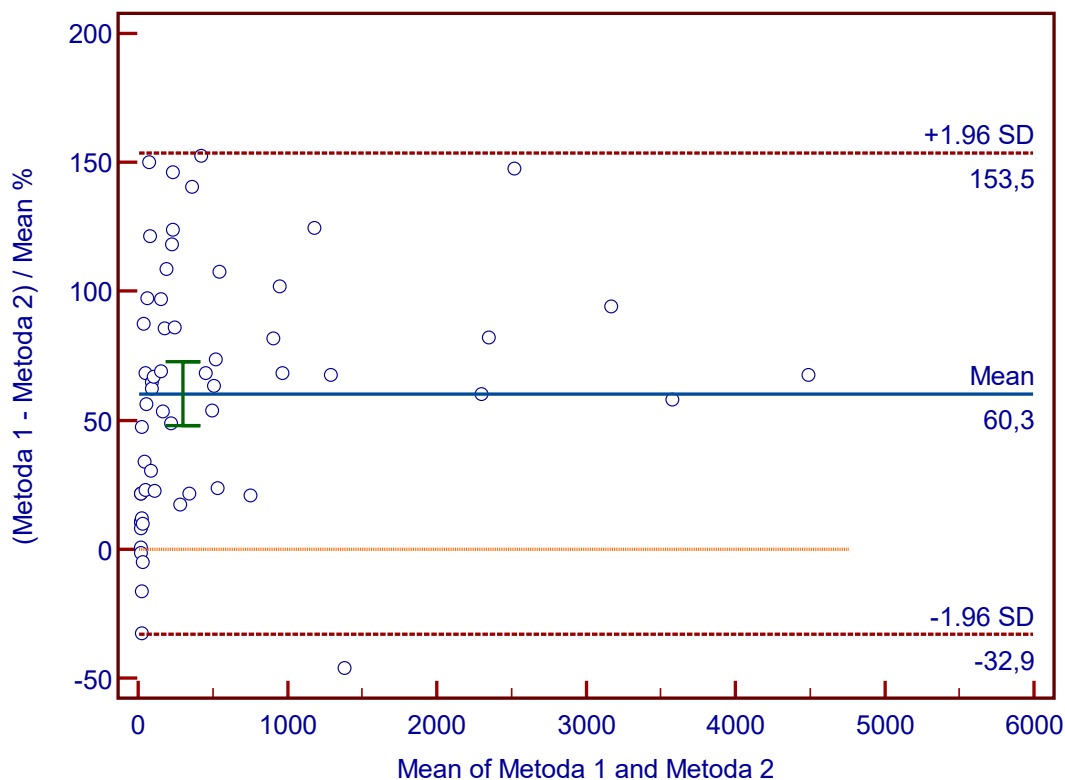
Br	Metoda 1	Metoda 2	Bias (%)	Br.	Metoda 1	Metoda 2	Bias (%)
1	53,1	20,8	-60,8%	31	229,8	79,6	-65,4%
2	253,2	101,5	-59,9%	32	4381,1	662,7	-84,9%
3	121,6	96,9	-20,3%	33	3315,1	1386,2	-58,2%
4	130,9	18,7	-85,7%	34	6006,1	2967,8	-50,6%
5	350,2	139,7	-60,1%	35	4659,9	1674,7	-64,1%
6	362,2	93,3	-74,3%	36	831,1	675,6	-18,7%
7	2994,1	1608,1	-46,3%	37	1274,0	535,6	-58,0%
8	609,	299,4	-50,9%	38	836,0	251,1	-70,0%
9	664,4	345,1	-48,1%	39	715,1	330,4	-53,8%
10	1726,5	853,3	-50,6%	40	379,6	306,1	-19,4%
11	631,2	363,9	-42,4%	41	106,8	612,2	473,2%
12	1299,3	636,9	-51,0%	42	16,1	20	24,2%
13	597,1	471,1	-21,1%	43	19,9	20	0,6%
14	1436,0	466,0	-67,6%	44	16,1	20	24,2%
15	1060,6	1699,1	60,2%	45	20,3	20	-1,6%
16	379,5	89,3	-76,5%	46	75,0	101,8	35,6%
17	306,1	257,8	-15,8%	47	45,8	57,6	25,7%
18	277,5	168,7	-39,2%	48	63,4	124,2	95,8%
19	29,9	18,5	-38,3%	49	18,4	20	8,5%
20	140,7	70,3	-50,0%	50	100,2	744,8	643,0%
21	1914,3	444,8	-76,8%	51	87,3	295,1	238,2%
22	52,2	37,1	-28,9%	51	25,1	21,3	-15,1%
23	404,4	63,1	-84,4%	53	28,9	27,4	-5,0%
24	63,10	30,96	-50,94%	54	18,009	20	11,06%
25	123,10	64,63	-47,50%	55	27,7955	20	-28,05%
26	210,10	121,43	-42,20%	56	17,9745	20	11,27%
27	4618,40	2541,49	-44,97%	57	27,715	30,6	10,41%
28	126,40	30,84	-75,60%	58	20,378	23	12,87%
29	205,40	100,07	-51,28%	59	31,3835	90,9	189,64%
30	69,20	38,76	-43,99%	\bar{x}	756,017	380,511	-3,95%

Rezultati Bland-Altman analize prikazani su na Grafu 1. Na grafikonu su istaknute srednja razlika svih razlika uparenih mjerenja (engl. *mean*) plavom linijom, 95%-tni interval pouzdanosti za srednju razliku zelenim linijama te vrijednost 0 svijelo-ružičastom linijom, a granice prihvatljivosti crvenim isprekidanim linijama ($\pm 1,96$ SD) . Srednja razlika iznosi 427,1 mg/kg, a 95%-tni interval pouzdanosti 215,1 – 639,1 mg/kg. Interval u kojem se nalazi 95% razlika uparenih mjerenja iznosi 427,1 mg/kg \pm 1594,3 mg/kg. Pošto 95%-tni interval pouzdanosti za srednju vrijednost razlika mjerenja ne sadrži 0, zaključuje se da je prisutno statistički značajno konstantno odstupanje. Iz grafa je vidljivo da porastom koncentracije analita u uzorku značajno raste i razlika između koncentracija dobivenih Metodom 1 i Metodom 2 te su koncentracije dobivene Metodom 1 veće od koncentracija dobivenih Metodom 2.



Graf 1. Bland-Altmanova analiza konstantnog odstupanja.

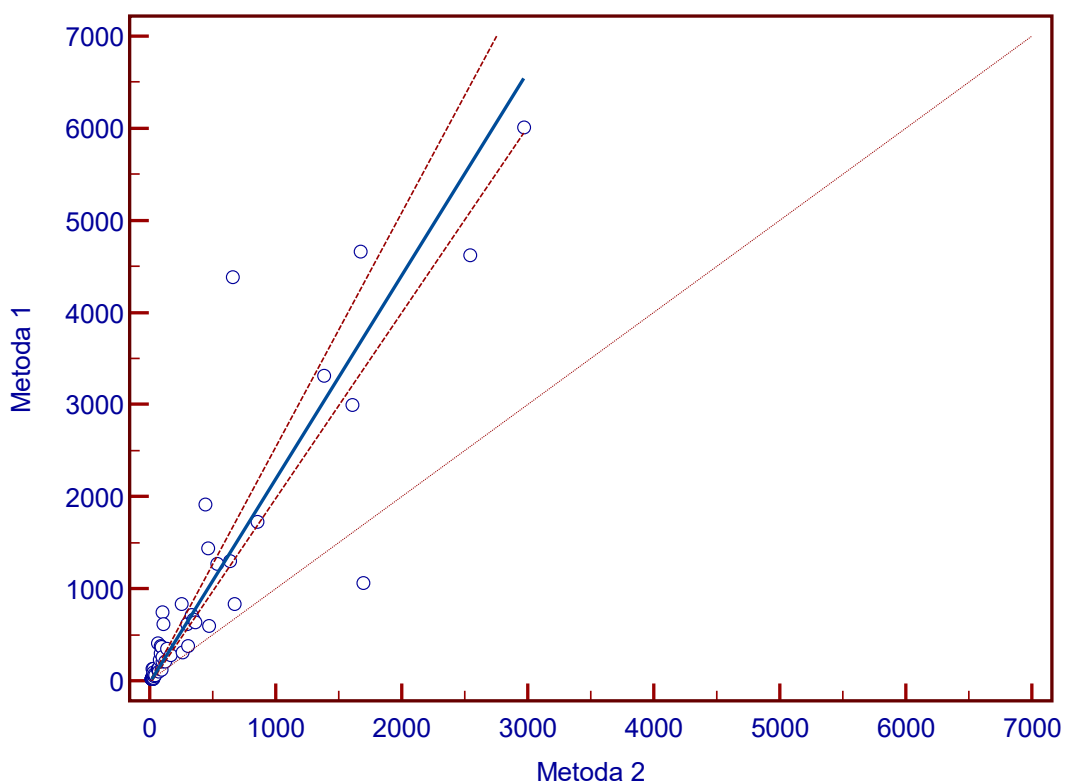
Za ispitivanje proporcionalnog odstupanja, u grafičkom prikazu se na ordinati nalaze vrijednosti razlike dviju metoda u postotku (Graf 2). Prosječna vrijednost razlike uparenih mjerenja iznosi 60,3 %, 95%-tni interval pouzdanosti 47,9 – 72,7 %. Raspon u kojem se nalazi 95% razlika mjerenja je $60,3\% \pm 93,2\%$. Pošto 95%-tni interval pouzdanosti za srednju vrijednost razlika mjerenja ne sadrži 0, zaključuje se da postoji statistički značajno proporcionalno odstupanje.



Graf 2. Bland-Altmanova analiza proporcionalnog odstupanja.

Passing-Bablok analizom dobiven je graf raspršenja na kojemu su istaknuti regresijski pravac plavom bojom sa svojim granicama 95%-tnog intervala pouzdanosti označenih iscrtkanom crvenom linijom (Graf 3.). Također je istaknut i referentni pravac (idealno slaganje metoda) za lakšu vizualizaciju i usporedbu dobivenih podataka. Usporedbom dobivenog i referentnog pravca vidljivo je da postoji pozitivno odstupanje koncentracija izmjerenih Metodom 1 od koncentracija izmjerenih Metodom 2. Regresijskom analizom dobivene su vrijednosti odsjeka na osi y, vrijednosti a, i koeficijenta smjera pravca, vrijednosti b. Kao rezultat analize, dobivena je jednadžba pravca (Tablica 4). Interval pouzdanosti odsjeka na osi y obuhvaća raspon

vrijednosti $-37,3 - -7,2$. S obzirom da interval ne obuhvaća vrijednost 0, postoji konstantna razlika između dviju uspoređivanih metoda. Interval pouzdanosti za koeficijent smjera pravca b obuhvaća vrijednosti u rasponu $2,0 - 2,5$. Pošto intervalom nije obuhvaćena vrijednost 1, postoji proporcionalna razlika između dviju ispitivanih vrijednosti. Testom linearnosti, CUSUM, dobivena je vrijednost P koja iznosi $0,54$ te znači da ne postoji statistički značajno odstupanje od linearnosti.



Graf 3. Grafički prikaz odnosa rezultata dobivenih Metodom 1 i Metodom 2.

Tablica 4. Jednadžba regresijskog pravca s vrijednostima 95%-tnih intervala pouzdanosti za odsječak na osi y i nagib pravca.

y = -19,73 + 2,21x	
Konstantno odstupanje	
Odsječak na osi y, a	-19,73
95% CI	-37,26 - -7,25
Proporcionalno odstupanje	
Nagib, b	2,21
95% CI	2,02 - 2,55
Linearnost	
CUSUM test linearnosti	P = 0,54

4.2.2. PROVJERA PODUDARNOSTI U INTERPRETATIVNIM KATEGORIJAMA KONCENTRACIJA IZMJERENIH S OBJE METODE

Za potrebu provjere podudarnosti u kategorizaciji rezultata (engl. *inter-rater agreement kappa*), rezultati Metode 1 i 2 klasificirani su u tri kategorije – negativno (1), granično (2), pozitivno (3). Koncentracije fekalnog kalprotektina dobivene mjerenjem Metodom 1 interpretirale su se kao negativne ukoliko su manje od 80 mg/kg, granične ukoliko su u rasponu od 80 do 160 mg/kg i kao pozitivne ukoliko su veće od 160 mg/kg. Koncentracije fekalnog kalprotektina dobivene mjerenjem Metodom 2 se interpretiraju kao negativne ukoliko su manje od 50 mg/kg, granične ukoliko su u rasponu od 50 do 120 mg/kg te kao pozitivne ukoliko su ≥ 120 mg/kg. Postotak podudarnosti je izračunat u statističkom programu MedCalc na način da se broj podudarnih rezultata za svaku kategoriju zbrojio i podijelio s ukupnim brojem uzoraka. Kao rezultat analize dobiva se tablica s prikazanim postotcima podudarnosti u kategorizaciji rezultata, kappa vrijednost te standardna pogreška i 95%-tni interval pouzdanosti.

Od ukupno 59 uzoraka, mjerenjem Metodom 1, 18 rezultata (30,5%) kategorizirano je kao negativno, 8 (13,6%) kao granično te 33 (55,9%) kao pozitivno. Metodom 2 je 21 rezultat (35,6%) kategoriziran kao negativan, 14 (23,7%) kao graničano te 24 (40,7%) kao pozitivno.

Tablica 5. Apsolutna vrijednost i postotak rezultata svrstanih u 3 kategorije (1 - negativan rezultat, 2 - granični rezultat, 3 - pozitivan rezultat) za Metodu 1 i Metodu 2.

	Metoda 1			
Metoda 2	1	2	3	
1	18	3	0	21 (35,6%)
2	0	5	9	14 (23,7%)
3	0	0	24	24 (40,7%)
	18 (30,5%)	8 (13,6%)	33 (55,9%)	59

Tablica 3. Kappa vrijednost, standardna pogreška i 95%-tni interval pouzdanosti za dobivenu kappa vrijednost podudarnosti u kategorizaciji rezultata u tri kategorije.

Kappa vrijednost	0,787
Standardna pogreška	0,05611
95% CI	0,677 - 0,897

Dobivena kappa vrijednost 0,787 nalazi se unutar intervala 0,61 – 0,80 u skladu s čime se interpretira kao osrednja podudarnost u kategorizaciji rezultata kao negativnih, graničnih te pozitivnih i prihvatljiva je s obzirom na postavljeni kriterij od 0,60 za donju granicu 95%CI kappa koeficijenta.

S obzirom na mali broj uzoraka u kategoriji graničnih koncentracija (minimalan zahtjev za ovaj statistički test je 10 uzoraka po kategoriji), dodatno je provedeno ispitivanje podudaranja u kategorizaciji rezultata Metode 1 i 2 u samo dvije kategorije – negativno (1) i pozitivno (2). U ovome se slučaju pod negativnim koncentracijama obuhvaćaju one prvobitno definirane kao negativne te granične koncentracije. Stoga, koncentracije fekalnog kalprotektina dobivene mjerenjem Metodom 1 kategorizirane su kao negativne ukoliko im je koncentracija manja od 160 mg/kg i kao pozitivne ukoliko im je koncentracija veća od 160 mg/kg. Također, koncentracije fekalnog kalprotektina dobivene mjerenjem Metodom 2 se interpretiraju kao

negativne ukoliko im je koncentracija manja od 120 mg/kg te kao pozitivne ukoliko im je koncentracija 120 mg/kg ili veća.

Od ukupno 59 rezultata mjerenja Metodom 1, 18 rezultata (30,5%) kategorizirano je kao negativno, a 41 (69,5%) kao pozitivan. Od 59 rezultata mjerenja Metodom 2, 21 rezultat (35,6%) kategoriziran je kao negativan, a 38 (64,4%) kao pozitivan.

Tablica 4. Apsolutna vrijednost i postotak rezultata svrstanih u 2 kategorije (1 - negativan rezultat, 2 – pozitivni rezultat) za Metodu 1 i Metodu 2.

	Metoda 1		
Metoda 2	1	2	
1	18	3	21 (35,6%)
2	0	38	38 (64,4%)
	18 (30,5%)	41 (69,5%)	59

Tablica 8. Kappa vrijednost, standardna pogreška i 95%-tni interval pouzdanosti za dobivenu kappa vrijednost podudarnosti u kategorizaciji rezultata u 2 kategorije.

Kappa vrijednost	0,885
Standardna pogreška	0,064
95% CI	0,760 - 1,000

Dobivena kappa vrijednost za samo dvije kategorije rezultata iznosi 0,885 te pripada intervalu 0,81 – 0,99, a interpretira se kao snažna podudarnost. Podudarnost u kategorizaciji rezultata bolja je u slučaju dvije kategorije rezultata u odnosu na podudarnost rezultata u tri kategorije.

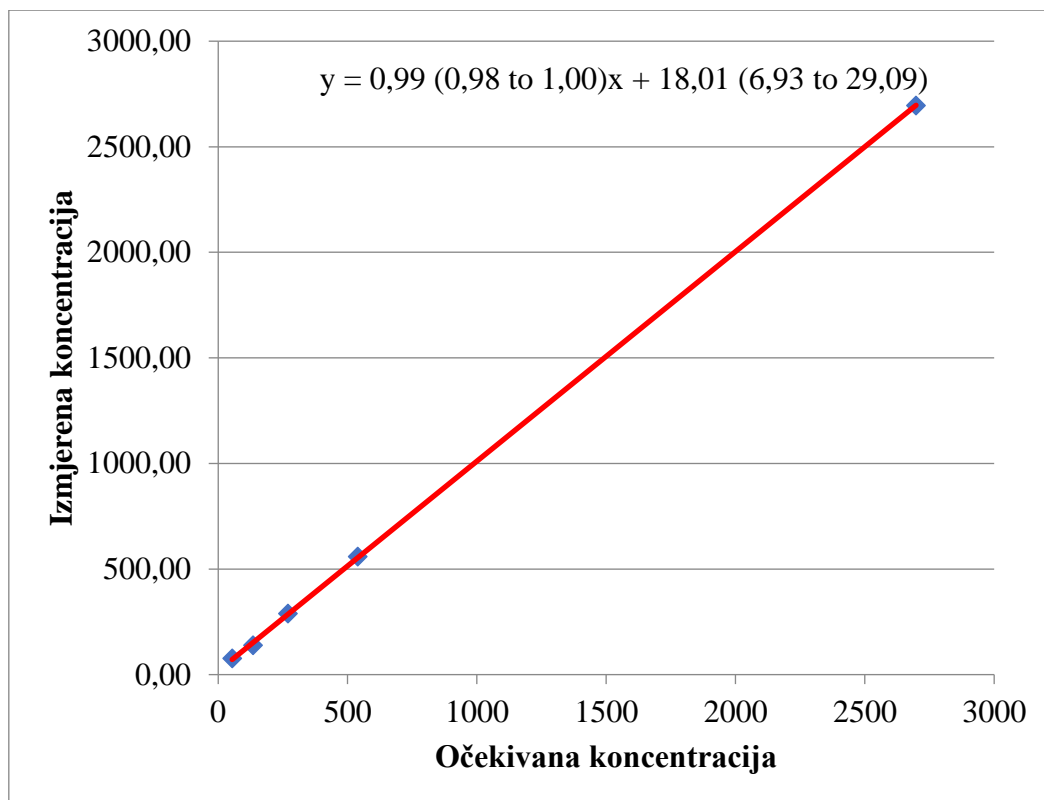
4.3. LINEARNOST

Očekivane i dobivene koncentracije mjerenja u duplikatu te njihova srednja vrijednost prikazani su u Tablici 9. Izračunati *bias* za svaku koncentracijsku razinu također je prikazan te su izračunate vrijednosti uspoređene s unaprijed određenim kriterijem prihvatljivosti za usporedbu metoda koji iznosi 30 %. Iz podataka u tablici vidljivo je da je za prve četiri koncentracijske razine *bias* niži od 30 % (-0,08 – 7,15 %). Za očekivanu koncentracijsku razinu 53,96 mg/kg, *bias* dobivene koncentracije iznosi 42,8%, a za koncentracijsku razinu 17,99 mg/kg, najbližu donjoj granici deklariranog područja linearnosti metode, iznosi čak 101,31% što je tri puta više od odabranog kriterija prihvatljivosti. Pošto su dvije koncentracijske razine veće od zadanog kriterija prihvatljivosti, može se zaključiti da je metoda linearna u području između 54,0 mg/kg i 134,9 mg/kg. Rezultati su također prikazani grafički gdje su na apscisu nanese vrijednosti očekivane koncentracije, a ordinatu vrijednosti izmjerene koncentracije (Graf 4.). Dobivena je jednačba pravca: $y = 0,9928 (0,983 - 1,00)x + 18,011 (6,929 - 29,091)$.

Tablica 9. Izračun očekivanih vrijednosti koncentracije feklanog kalprotektina u različitim omjerima razrjeđenja s dobivenim vrijednostima mjerenja Metodom 1 i Metodom 2, srednja vrijednost dvaju uparenih mjerenja te njihov *bias*.

Očekivana vrijednost	Srednja vrijednost	X ₁	X ₂	Bias
2697,9	2695,7	2697,9	2693,4	-0,1 %
539,6	559,5	556,5	562,5	3,7 %
269,8	289,1	288,7	289,5	7,2 %
134,9	138,0	141,5	134,6	2,3 %
54,0	77,0	77,1	77,1	42,8 %
18,0	36,2	36,1	36,4	101,3 %

X_1 = prvo mjerenje, X_2 = drugo mjerenje



Graf 4. Grafički prikaz odnosa izmjerene koncentracije šest razrijeđenja uzorka fekalnog kalprotektina i i izračunate očekivane koncentracije.

4.4. RASPRAVA

Usporedbom dobivenih vrijednosti s prethodno postavljenim kriterijima prihvatljivosti, ustanovljeno je da ispitivana, nova kemiluminescentna metoda QUANTA Flash® Calprotectin (INOVA Diagnostics, San Diego, CA, USA) ima zadovoljavajuću unutarlaboratorijsku preciznost i ponovljivost u visokom koncentracijskom području, ali ne i u niskom koncentracijskom području. Preciznost metoda deklarirana od proizvođača vrlo često je precijenjena pa treba kritički procijeniti odstupanje eksperimentalno dobivene preciznosti od one koju deklarira proizvođač i uzeti u obzir ima li veličina odstupanja kliničkog značaja u ispitivanom koncentracijskom području te usporediti s dostupnim literaturnim podacima. Tako je u studiji Oyaert i sur. (2017.) koji su usporedili analitičke karakteristike 6 različitih testova za kvantitativno određivanje fekalnog kalprotektina, također ponovljivost određena na kontrolnom uzorku niske koncentracijske razine Inova QuantaFlash metodom bila iznad one deklarirane od proizvođača (5,6%). Budući da da unutarlaboratorijska preciznost, ukupna preciznost, uzima u obzir više čimbenika koji utječu na njezinu preciznost (mjerenja provedena kroz više dana, u različito vrijeme i pod rukovanjem više operatera) i zadovoljavajuća je u visokom koncentracijskom području koje nosi klinički značaj, zaključeno je da metoda ima prihvatljivu nepreciznost.

Usporedbom koncentracija kalprotektina izmjerenih s obje metode vidljivo je već samim pregledom brojčanih vrijednosti značajno odstupanje u koncentracijama s većim vrijednostima dobivenima Metodom 1 u odnosu na one dobivene ispitivanom metodom. Iako je srednji *bias* manji od postavljenog kriterija prihvatljivosti, više od 5 % uparenih rezultata razlikuje se za više od 30 %. Bland-Altmanova analiza pokazala je da između metoda postoji statistički značajno konstantno i proporcionalno odstupanje između koncentracija dobivenih Metodom 1 i Metodom 2, te da odstupanje između vrijednosti koncentracija raste s porastom koncentracije fekalnog kalprotektina u uzorku. Passing-Bablok analizom također je potvrđeno postojanje konstantne i proporcionalne razlike između dviju uspoređivanih metoda te pozitivno odstupanje vrijednosti dobivenih mjerenjem Metodom 1 od vrijednosti dobivenih mjerenjem Metodom 2. Postojanje konstantnog i proporcionalnog odstupanja jednako kao niže vrijednosti dobivene CLIA metodom u usporedbi s turbidimetrijskom pokazala je i studija Padoan i sur.

Općenito, slaba usporedivost kvantitativnih rezultata dobivenih različitim imunokemijskim metodama posljedica je više čimbenika: upotrebe različitih antitijela u smislu monoklonskih ili poliklonskih, njihovog različitog animalnog porijekla, usmjerenosti na različite epitope ciljne

molekule. Također, imunokemijske metode kojima se određuju antitijela u uzorku razlikuju se i u korištenom antigenu (rekombinantni ili pročišćeni nativni iz različitih izvora). Zbog nestandardiziranosti različitih testova za određivanje fekalnog kalprotektina u uzorku stolice, predanalitički faktori poput metode ekstrakcije, vrste pufera, načina pohrane ili razrijeđenja uzorka u ekstrakcijskom puferu, također mogu imati značajan utjecaj na varijaciju koncentracije između različitih testova. Slaba podudarnost u brojčanim vrijednostima između različitih testova onemogućuje da se vrijednosti dobivene jednom metodom zamijene vrijednostima dobivenima drugom metodom (Oyaert M. i sur., 2017)

Unatoč značajanim brojčanim odstupanjima te konstantnoj i proporcionalnoj razlici između vrijednosti koncentracija fekalnog kalprotektina dobivenih mjerenjem dvjema metodama, provjerom podudarnosti u interpretaciji izmjerenih koncentracija ustanovljena je prihvatljiva, a u slučaju samo dvije kategorije i snažna podudarnost između metode u rutinskoj upotrebi i ispitivane metode.

Ispitivana metoda nije zadovoljila prethodno postavljene kriterije linearnosti za cijelo deklarirano područje od 16.1 mg/kg do 3500.0 mg/kg, već samo u području od 134,9 - 2697,9 mg/kg. Međutim, navedeni raspon se slaže s rasponom iznad gornje granice referentnog intervala kojeg je predložio proizvođač kao pozitivan rezultat (> 120 mg/kg). Vrijednosti iznad gornje granice referentnog intervala bitne su za daljnje postavljanje dijagnoze upalne bolesti crijeva, te u pacijenata s već potvrđenom dijagnozom u svrhu daljnjeg praćenja aktivnosti bolesti, odgovora na terapiju i predviđanja relapsa te je zadovoljena linearnost u tom području od velikog značaja za kvalitetno donošenje odluka o liječenju pacijenta.

Iako se brojčani rezultati dobiveni mjerenjem CLIA metodom, dijagnostičkim testom QUANTA Flash® Calprotectin, ne mogu smatrati istovjetnima onim dobivenim turbidimetrijskom metodom, dijagnostičkim testom Bühlmann fCAL® turbo, niti se rezultati mogu međusobno zamijeniti, interpretacija dobivenih rezultata u skladu s preporučenim referentnim intervalima proizvođača biti će gotovo uvijek istovjetna. Stoga bi prilikom praćenja tijekom bolesti koncentraciju fekalnog kalprotektina za jednog pacijenta trebalo uvijek određivati istim testom, a ovisno o svrsi određivanja (dijagnostika, praćenje odgovora na terapiju ili predviđanje relapsa bolesti) primjenjivati različite granične vrijednosti za interpretaciju dobivenih rezultata (Laserna-Mendieta i sur., 2019).

5. ZAKLJUČCI

1. Nepreciznost ispitivanog dijagnostičkog testa za kvantitativno određivanje fekalnog kalprotektina, QUANTA Flash® Calprotectin zadovoljava zadane kriterije i čini test prihvatljivim za kliničku primjenu.
2. Postoji statistički značajno odstupanje između vrijednosti koncentracija dobivenih CLIA metodom (dijagnostičkim testom QUANTA Flash® Calprotectin) i turbidimetrijskom metodom (dijagnostičkim testom Bühlmann fCAL® turbo). Brojčane vrijednosti fekalnog kalprotektina u uzorku stolice dobivene različitim metodama ne mogu se međusobno uspoređivati ili zamijeniti jedna drugu.
3. Dijagnostički testovi QUANTA Flash® Calprotectin i Bühlmann fCAL® turbo značajno se podudaraju u kategorizaciji rezultata u dvije interpretativne kategorije (negativno/pozitivno).
4. Mjerenje koncentracije fekalnog kalprotektina za istog pacijenta u svrhu praćenja aktivnosti bolesti i odgovora na terapiju, uvijek bi se trebalo provoditi istim dijagnostičkim testom.
5. Možemo zaključiti da se ispitivana metoda može koristiti u rutinskom radu iako brojčani rezultati mjerenja nisu istovjetni rezultatima metode koja je trenutno u rutinskoj primjeni.

6. LITERATURA

Alatab S., Sepanlou S. G., Ikuta K., Vahedi H., Bisignano C., Safiri S., Sadeghi A., Nixon M. R., Abdoli A., Abolhassani H., Alipour V., Almadi M. A. H., Almasi-Hashiani A., Anushiravani A., Arabloo J., Atique S., Awasthi A., Badawi A., Baig A. A., Bhala N., Bijani A., Biondi A., Borzi A. M., Burke K. E., Carvalho F., Daryani A., Dubey M., Eftekhari A., Fernandes E., Fernandes J. C., Fischer F., Haj-Mirzaian A., Haj-Mirzaian A., Hasanzadeh A., Hashemian M., Hay S. I., Hoang C. L., Househ M., Ilesanmi O. S., Jafari Balalami N., James S. L., Kengne A. P., Malekzadeh M. M., Merat S., Meretoja T. J., Mestrovic T., Mirrakhimov E. M., Mirzaei H., Mohammad K. A., Mokdad A. H., Monasta L., Negoï I., Nguyen T. H., Nguyen C. T., Pourshams A., Poustchi H., Rabiee M., Rabiee N., Ramezanzadeh K., Rawaf D. L., Rawaf S., Rezaei N., Robinson S. R., Ronfani L., Saxena S., Sepehrimanesh M., Shaikh M. A., Sharafi Z., Sharif M., Siabani S., Reza Sima A., Singh J. A., Soheili A., Sotoudehmanesh R., Ansar Rasul Suleria H., Tesfay B. E., Tran B., Tsoi D., Vacante M., Wondmieneh A. B., Zarghi A., Zhang Z.-J., Dirac M., Malekzadeh R., Naghavi M. The global, regional, and national burden of inflammatory bowel disease in 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2020, 5, 17-30.

Bilić-Zulle L. Comparison of methods: Passing and Bablok regression. *Biochem Med*, 2011, 21(1), 49-52.

Chesher D. Evaluating assay precision. *Clin Biochem Rev*, 2008, 29(Suppl 1), S23–S26.

CLSI. User Verification of Performance for Precision and Trueness; Approved Guideline—Second Edition. CLSI document EP15-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.

Dodig S. Imunokemija. Zagreb, Medicinska naklada, 2015.

Gentian Insight: PETIA, 2020., <https://www.gentian.com/news/petia>, pristupljeno 10.5.2022.

Giavarina D. Understanding Bland Altman analysis. *Biochem Med*, 2015, 25(2), 141–151.

Inova Diagnostics, A Werfern company. Fecal Extraction Device, Ref 504837.

Juričić G., Brenčić T., Tešija Kuna A., Njegovan M., Honović L. Faecal calprotectin determination: impact of preanalytical sample treatment and stool consistency on within- and between-method variability. *Biochem Med*, 2019, 29(1), 010707.

Laserna-Mendieta, E. J., Lucendo, A. J.. Faecal calprotectin in inflammatory bowel diseases: a review focused on meta-analyses and routine usage limitations. *Clin Chem Lab Med*, 2019, 57(9), 1295-1307.

McHugh ML. Interrater reliability: the kappa statistic. *Biochem Med*, 2012, 22(3), 276-82.

Oyaert, M., Boel, A., Jacobs, J., Van den Brent, S., De Sloovere, M., Vanpoucke, H., & Van Hoovels, L. Analytical performance and diagnostic accuracy of six different faecal calprotectin assays in inflammatory bowel disease. *Clin Chem Lab Med*, 2017, 55(10).

Padoan A., D'Inca R., Scapellato M. L., De Bastiani R., Caccaro R., Mescoli C., Moz S., Bozzato D., Zambon C. F., Lorenzon G., Rugge M., Plebani M., Basso D. Improving IBD diagnosis and monitoring by understanding preanalytical, analytical and biological fecal calprotectin variability. *Clin Chem Lab Med*, 2018, 56(11), 1926-1935.

Petrač D. i sur. Interna medicina. Zagreb, Medicinska naklada, 2009, str. 226-232

Rodrigues, B. L., Mazzaro, M. C., Nagasako, C. K., Ayrizono, M., Fagundes, J. J., Leal, R. F. Assessment of disease activity in inflammatory bowel diseases: Non-invasive biomarkers and endoscopic scores. *World J Gastrointest Endosc*, 2020, 12(12), 504–520.

Šimundić A. Interval pouzdanosti. *Biochem Med*, 2008, 18(2), 154–6.

Šimundić, A. (ur.) Upravljanje kvalitetom laboratorijskog rada. Zagreb, Medicinska naklada, 2013.

Topić E., Primorac D., Janković S., Štefanović M. i sur. Medicinska biokemija i laboratorijska medicina u kliničkoj praksi. Zagreb, Medicinska naklada, 2018, str. 53-54.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Fekalni kalprotektin prepoznat je kao specifičan i vrlo osjetljiv biomarker upale crijevne sluznice koji omogućuje razlikovanje upalnih bolesti crijeva od sindroma iritabilnog crijeva. Dijagnostički testovi pojedinih proizvođača temeljeni su na različitim imunokemijskim metodama te još uvijek ne postoji standardiziran postupak ekstrakcije uzorka, pohrane i analize što dovodi do velike varijacije u dobivenim rezultatima i otežava njihovu međusobnu usporedbu.

U ovome radu opisano je provođenje postupka verifikacije kvantitativne kemiluminiscentne metode QUANTA Flash® Calprotectin (INOVA Diagnostics, San Diego, CA, USA) za određivanje koncentracije fekalnog kalprotektina u uzorku stolice na analizatoru Bio-Flash (Biokit S.A.©, Španjolska) i usporedbe s postojećim dijagnostičkim testom u rutinskoj primjeni Bühlmann fCAL® turbo (Bühlmann, Schönenbuch, Switzerland) na analizatoru Abbott Architect c8000 (Abbott S.r.l., Roma, Italy) u KBC-u Sestre Milosrdnice. Mjerenja su vršena na 59 ostatnih uzoraka stolica pacijenata kod kojih je zatraženo određivanje fekalnog kalprotektina. Nepreciznost ispitivane metode zadovoljila je zadane kriterije što ju čini prihvatljivom za kliničku primjenu. Unatoč statistički značajnom odstupanju vrijednosti dobivenih ispitivanom i postojećom metodom, podudaranje u kategorizaciji rezultata u dvije interpretativne kategorije pokazalo se snažnim. Zaključeno je da se ispitivana metoda može koristiti u rutinskom radu, ali je preporučljivo za istog pacijenta koncentraciju fekalnog kalprotektina uvijek mjeriti istim testom kako bi rezultati bili međusobno usporedivi jer rezultati dobiveni različitim imunokemijskim metodama nisu međusobno usporedivi i zamjenjivi.

Fecal calprotectin was recognized as a specific and sensitive biomarker of intestinal inflammation, making it easier to differentiate inflammatory bowel diseases from irritable bowel syndrome. Numerous existing assays based on different immunochemical methods, along with the lack of standardization of sample extraction, storage, and analysis, have led to significant variation in assays results and exacerbated assay comparability.

This thesis describes the verification process of quantitative chemiluminescent method QUANTA Flash® Calprotectin assay (INOVA Diagnostics, San Diego, CA, USA) on analyzer Bio-Flash (Biokit S.A.ã, Spain) and comparison to Bühlmann fCAL® turbo assay (Bühlmann, Schönenbuch, Switzerland) on Abbott Architect c8000 (Abbott S.r.l., Roma, Italy) analyzer which is routinely used within the Department of Clinical Chemistry, University Hospital Centre "Sestre Milosrdnice", Zagreb. Samples used for measurement were obtained from remainders of 59 stool samples of patients for whom the clinicians requested the analysis of fecal calprotectin. Assay imprecision met the set criteria, which makes it acceptable for clinical use. Despite statistically significant bias of obtained values, the classification of results of both methods into two categories (positive and negative) proved that the agreement between the two methods is reliable. In conclusion, QUANTA Flash® Calprotectin assay can be used routinely. For follow-up of the same patient, it is advisable always to use the same diagnostic test since the results obtained by different methods are not comparable or interchangeable.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Verifikacija kemiluminiscentne metode određivanja koncentracije fekalnog kalprotektina na analizatoru Bio-Flash (Inova Diagnostics)

Anamarija Beljan

SAŽETAK

Fekalni kalprotektin prepoznat je kao specifičan i vrlo osjetljiv biomarker upale crijevne sluznice koji omogućuje razlikovanje upalnih bolesti crijeva od sindroma iritabilnog crijeva. Dijagnostički testovi pojedinih proizvođača temeljeni su na različitim imunokemijskim metodama te još uvijek ne postoji standardiziran postupak ekstrakcije uzorka, pohrane i analize što dovodi do velike varijacije u dobivenim rezultatima i otežava njihovu međusobnu usporedbu.

U ovome radu opisano je provođenje postupka verifikacije kvantitativne kemiluminiscentne metode QUANTA Flash® Calprotectin (INOVA Diagnostics, San Diego, CA, USA) za određivanje koncentracije fekalnog kalprotektina u uzorku stolice na analizatoru Bio-Flash (Biokit S.A.©, Španjolska) i usporedbe s postojećim dijagnostičkim testom u rutinskoj primjeni Bühlmann fCAL® turbo (Bühlmann, Schönenbuch, Switzerland) na analizatoru Abbott Architect c8000 (Abbott S.r.l., Roma, Italy) u KBC-u Sestre Milosrdnice. Mjerenja su vršena na 59 ostalih uzoraka stolica pacijenata kod kojih je zatraženo određivanje fekalnog kalprotektina. Nepreciznost ispitivane metode zadovoljila je zadane kriterije što ju čini prihvatljivom za kliničku primjenu. Unatoč statistički značajnom odstupanju vrijednosti dobivenih ispitivanom i postojećom metodom, podudaranje u kategorizaciji rezultata u dvije interpretativne kategorije pokazalo se snažnim. Zaključeno je da se ispitivana metoda može koristiti u rutinskom radu, ali je preporučljivo za istog pacijenta koncentraciju fekalnog kalprotektina uvijek mjeriti istim testom kako bi rezultati bili međusobno usporedivi jer rezultati dobiveni različitim imunokemijskim metodama nisu međusobno usporedivi i zamjenjivi.

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

Rad sadrži: 44 stranice, 4 grafička prikaza, 9 tablica i 18 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: fekalni kalprotektin, verifikacija metode, usporedba metoda, QUANTA Flash Calprotectin, upalne bolesti crijeva

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

Sumentor: **Nasl. doc. dr. sc. Andrea Tešija Kuna**, *spec. med. biochem.* Klinički bolnički centar Sestre milosrdnice, Zagreb

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

Dr. sc. Andrea Tešija Kuna, *spec. med. biochem.* Klinički bolnički centar Sestre milosrdnice, Zagreb

Prof. dr. sc. Lidija Bach Rojecky, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: kolovoz 2022.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medical Biochemistry
Department of Medical Biochemistry and Haematology
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Quantitative analysis of faecal calprotectin using a new chemiluminescent method for the Bio-Flash analyzer (Inova Diagnostics)

Anamarija Beljan

SUMMARY

Fecal calprotectin was recognized as a specific and sensitive biomarker of intestinal inflammation, making it easier to differentiate inflammatory bowel diseases from irritable bowel syndrome. Numerous existing assays based on different immunochemical methods, along with the lack of standardization of sample extraction, storage, and analysis, have led to significant variation in assays results and exacerbated assay comparability.

This thesis describes the verification process of quantitative chemiluminescent method QUANTA Flash® Calprotectin assay (INOVA Diagnostics, San Diego, CA, USA) on analyzer Bio-Flash (Biokit S.A.ã, Spain) and comparison to Bühlmann fCAL® turbo assay (Bühlmann, Schönenbuch, Switzerland) on Abbott Architect c8000 (Abbott S.r.l., Roma, Italy) analyzer which is routinely used within the Department of Clinical Chemistry, University Hospital Centre "Sestre Milosrdnice", Zagreb. Samples used for measurement were obtained from remainders of 59 stool samples of patients for whom the clinicians requested the analysis of fecal calprotectin. Assay imprecision met the set criteria, which makes it acceptable for clinical use. Despite statistically significant bias of obtained values, the classification of results of both methods into two categories (positive and negative) proved that the agreement between the two methods is reliable. In conclusion, QUANTA Flash® Calprotectin assay can be used routinely. For follow-up of the same patient, it is advisable always to use the same diagnostic test since the results obtained by different methods are not comparable or interchangeable.

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

Thesis includes: 44 pages, 4 figures, 9 tables and 18 references. Original is in Croatian language.

Keywords: faecal calprotectin, method verification, method comparison, QUANTA Flash Calprotectin, inflammatory bowel disease

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

Co-mentor: **Andrea Tešija Kuna, Ph.D.**, *spec. med. biochem.* University Hospital Center Sisters of Mercy, Zagreb

Reviewers: **Donatella Verbanac, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Andrea Tešija Kuna, Ph.D., *spec. med. biochem.* University Hospital Center Sisters of Mercy, Zagreb

Lidija Bach Rojecky, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: August 2022.