

Verifikacija nefelometrijske metode određivanja anti-TNF-alfa

Otmačić, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:337589>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-25**



Repository / Repozitorij:

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



Iva Otmačić

**Verifikacija nefelometrijske metode određivanja
anti-TNF-alfa**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu 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 Tešije Kune, spec. med. biokemije.

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Donatelli Verbanac dipl. ing. med. biokemije na stručnom vodstvu pri izradi ovog diplomskog rada te zahvaljujem doc. dr. sc. Andrei Tešiji Kuni spec. med. biokemije na pomoći u izvođenju eksperimentalnog dijela rada. Hvala Vam na susretljivosti, zalaganju i danim savjetima.

Zahvaljujem se prijateljima i obitelji na podršci tijekom cijelog studiranja.

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1. FAKTOR TUMORSKE NEKROZE ALFA (TNF- α)	1
1.1.1. ULOGA TNF- α U UPALNIM BOLESTIMA CRIJEVA.....	2
1.1.2. ULOGA TNF- α U REUMATOIDNOM I PSORIJATIČNOM ARTRITISU	3
1.1.3. ULOGA TNF- α U PSORIJAZI.....	4
1.2. ANTI TNF- α LIJEKOVI	5
1.2.1. STRUKTURA I MEHANIZAM	5
1.2.2. INDIKACIJE, NAČIN PRIMJENE, DOZIRANJE.....	6
1.2.3. IMUNOGENIČNOST	7
1.3. TERAPIJSKO PRAĆENJE KONCENTRACIJE ANTAGONISTA TNF- α	8
1.3.1. METODE ODREĐIVANJA ANTI-TNF- α U UZORKU SERUMA	9
1.4. VALIDACIJA I VERIFIKACIJA KVANTITATIVNIH METODA.....	10
2. OBRAZLOŽENJE TEME	13
3. MATERIJALI I METODE	14
3.1. UZORCI.....	14
3.2. KALIBRATORI	14
3.3. KONTROLNI UZORCI.....	14
3.4. OPREMA I REAGENSI	15
3.4.1. OPREMA I UREĐAJI.....	15
3.4.2. REAGENSI I OSTALI PRIBOR.....	16
3.5. METODE	17
3.5.1. N LATEX aTNF α	17
3.5.2. ELISA	18
3.6. STATISTIČKE METODE.....	20
3.6.1. PROVJERA PRECIZNOSTI.....	20
3.6.2. USPOREDBA METODE S POSTOJEĆIM SUSTAVOM.....	23
3.6.2.1. IZRAČUN SREDNJEG ODPUSANJA	24
3.6.2.2. BLAND – ALTMANOVA ANALIZA	24
3.6.2.3. PASSING – BABLOKOVA REGRESIJSKA ANALIZA.....	25
3.6.2.4. USPOREBA KATEGORIJA REZULTATA	27
3.6.3. PROVJERA GRANICE KVANTIFIKACIJE.....	28

4. REZULTATI I RASPRAVA	29
4.1. PRECIZNOST.....	29
4.2. USPOREDBA METODA	32
4.3. ISPITIVANJE GRANICE KVANTIFIKACIJE	41
4.4. RASPRAVA	43
5. ZAKLJUČCI.....	45
6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA.....	46
7. LITERATURA.....	48
8. SAŽETAK / SUMMARY	51
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTACION CARD.....	52

1. UVOD

Antagonisti faktora tumorske nekroze su se pokazali klinički učinkovitima i značajno promijenili liječenje autoimunih bolesti poput upalnih bolesti crijeva i reumatoidnog artritisa, u čijoj patogenezi ovaj pro-upalni citokin ima ključnu ulogu. Aktivno terapijsko praćenje koncentracije ovih lijekova predstavlja novu strategiju s brojnim kliničkim prednostima.

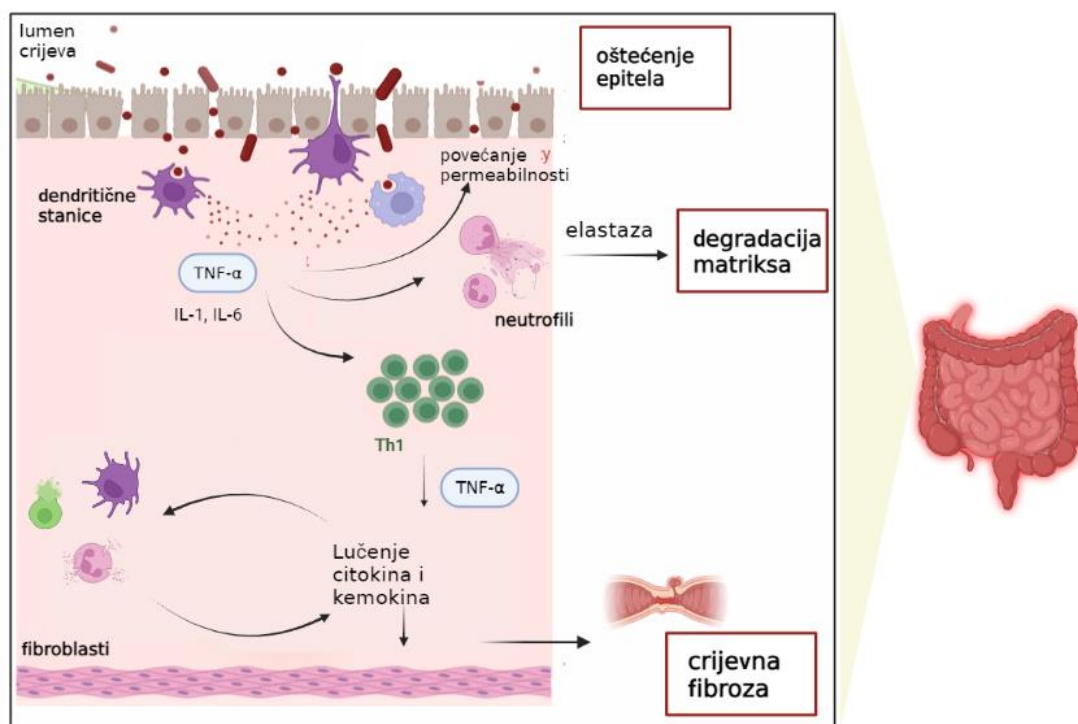
1.1.FAKTOR TUMORSKE NEKROZE ALFA (TNF- α)

Faktor tumorske nekroze alfa (TNF- α , engl. *Tumor Necrosis Factor alpha*) je prepoznat kao glavni regulator upalnog odgovora. Uključen je u patogenezu nekih upalnih i autoimunih bolesti kao citokin s plejotropnim učinkom na različite vrste stanica. U upali potiče sintezu niza upalnih molekula, uz citokine i kemokine. Postoje dvije vrste ovog proteina – transmembranski i topljivi oblik. Transmembranski TNF- α (tmTNF- α) je prekursorski oblik iz kojeg nastaje topljivi TNF- α (sTNF- α , engl. *Soluble TNF-alpha*) djelovanjem metaloproteinaze TNF- α konvertirajućeg enzima. Transmembranski TNF- α je homotrimerni protein koji se sastoji od 233 aminokiseline, dok se topljivi TNF- α sastoji se od 157 aminokiselina. Stvaraju ga uglavnom aktivirani makrofagi, i Th1 limfociti, ali i prirodne stanice ubojice (NK stanice, engl. *Natural Killer Cells*) te neutrofili.

Transmembranski i topljivi TNF- α djeluju preko svojih receptora tipa 1 (TNFR1) i receptora tipa 2 (TNFR2). TNFR1 je eksprimiran u većini stanica sisavaca, a njegova aktivacija potiče stvaranje različitih signalnih kompleksa koji induciraju upalnu reakciju i citotoksični odgovor, koji dovodi do nekroze. TNF- α aktivira transkripcijski faktor NF- κ B (engl. *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of Activated B Cells*) i MAP kinazu (engl. *Mitogen Activated-protein kinase*) čime aktivira fagocite koji uklanjaju uzročnika infekcije i povećavaju ekspresiju adhezijskih molekula čime potiče migraciju neutrofila i makrofaga na mjesto upale. TNFR1 mogu aktivirati i sTNF- α i tmTNF- α . TNFR2 je eksprimiran na stanicama imunskog sustava s funkcijom olakšavanja prijenosa međustaničnog odgovora. Pretpostavlja se da ga aktivira samo tmTNF- α u kontekstu interakcije stanica. TNFR2 ne može izravno inducirati programiranu staničnu smrt pa je uglavnom odgovoran za homeostazu jer potiče regeneraciju tkiva, staničnu proliferaciju i preživljavanje stanica (Jang i sur., 2021).

1.1.1. ULOGA TNF- α U UPALNIM BOLESTIMA CRIJEVA

Upalne bolesti crijeva (IBD, engl. *Inflammatory Bowel Disease*) su skupina kroničnih autoimunih bolesti lokaliziranih u gastrointestinalnom traktu. Ulcerozni kolitis (UC) i Crohnova bolest (CB) su vrste IBD-a, koje se međusobno razlikuju po mjestu na kojem se bolest pojavljuje. CB se može pojaviti u bilo kojem dijelu gastrointestinalnog trakta s upalom koja zahvaća punu debljinu stijenke crijeva, dok UC najčešće zahvaća samo debelo crijevo, a upala ostaje ograničena na unutrašnji sloj stijenke crijeva. TNF- α se izlučuje iz T-limfocita (Th1 stanice) zajedno s drugim citokinima na mjestu upale u crijevima. Citokini uzrokuju nakupljanje stanica imunskog sustava – crijevnih fibroblasta, neutrofila i makrofaga. Nakupljeni crijevni fibroblasti uzrokuju crijevnu fibrozu što dovodi do suženja lumena crijeva. Neutrofili luče elastazu koja uzrokuje degradaciju crijevnog matriksa, dok aktivirani makrofagi izlučuju TNF-alfa, interleukin 1 (IL-1) i interleukin 6 (IL-6) koji posreduju u degradaciji crijevnog matriksa i oštećenju epitela (Jang i sur., 2021) (Slika 1).

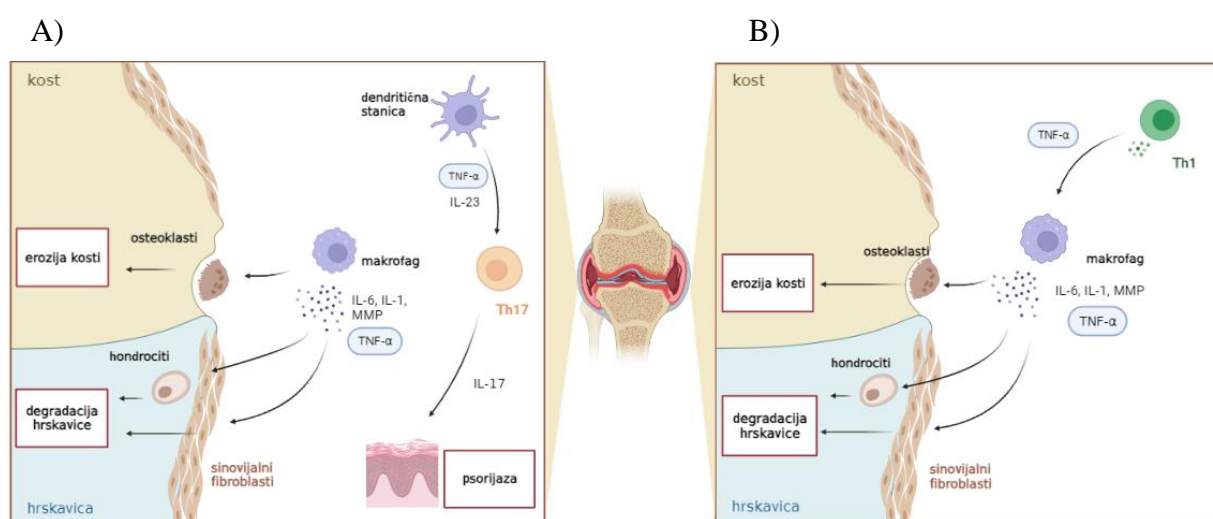


Slika 1. Uloga TNF- α u upalnim bolestima crijeva

1.1.2. ULOGA TNF- α U REUMATOIDNOM I PSORIJATIČNOM ARTRITISU

Reumatoidni artritis (RA) je kronična autoimuna bolest koja zahvaća zglobove, a karakterizira ju crvenilo, oteklina i bol. Upala sinovijalne membrane koja oblaže unutrašnjost zgloba dovodi do progresivnog oštećenja hrskavice i kosti. Upala je povezana s nakupljanjem upalnih stanica, uglavnom pomagačkih T stanica (Th1) i makrofaga, ali i B-stanica, plazma stanica i dendritičnih stanica. TNF- α se smatra glavnim upalnim citokinom, a luče ga Th1 stanice i makrofagi. U reumatoidnom artritisu, TNF- α aktivira sinovijalne fibroblaste što uzrokuje prekomjernu proizvodnju katepsina i matriksne metaloproteinaze (MMP) koji razgrađuju kolagen i proteoglikane, glavne strukturne komponente hrskavice. Aktivira i osteoklaste koji razgrađuju koštano tkivo (Slika 2 B). Posljedica je razgradnja hrskavice i kosti te erozija zgloba.

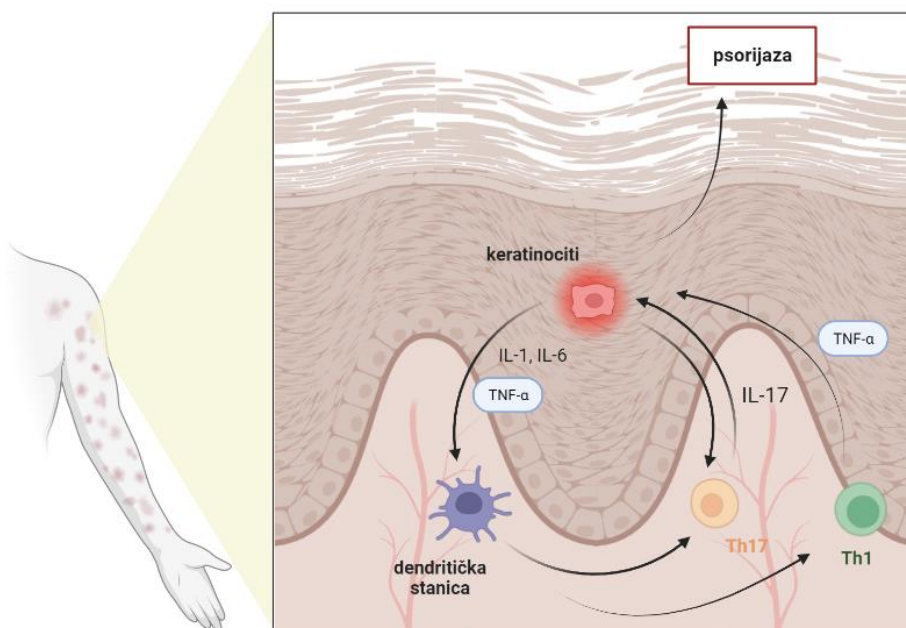
Psorijatični artritis (PA) je autoimuna artropatija koju karakterizira oteklina prstiju na rukama i nogama u osoba s kožnom psorijazom. Dendritične stanice i aktivirani makrofagi prekomjerno proizvode TNF- α i interleukin 23 (IL-23) koji potiče diferencijaciju naivnih CD4⁺ T stanica u Th17 stanice. TNF- α zajedno s IL-17 kojeg luče Th17 stanice aktiviraju keratinocite i potiču regrutaciju upalnih stanica (Slika 2A). TNF- α također inducira proliferaciju i antiapoptozu keratinocita što ima za posljedicu hiperplaziju epiderme i stvaranje mikroapscesa uslijed regrutacije upalnih stanica u psorijazi (Jang i sur., 2021).



Slika 2. Uloga TNF- α u psorijatičnom (A) i reumatoidnom artritisu (B)

1.1.3. ULOGA TNF- α U PSORIJAZI

Psorijaza (PS) je kronična upalna autoimuna bolest koju karakterizira abnormalna regija kože, plakovi s bijelim ljuskicama na vrhu. Upalni proces je posljedica prekomjerne sinteze TNF- α te interleukina 1 i 6 (IL-1 i IL-6) koji aktiviraju dendritične stanice. Posljedično, dolazi do diferencijacije T-stanica u Th1 i Th17, koje ponovno izlučuju TNF- α i IL-17 (Slika 3). Posljedica ove abnormalne imunološke reakcije je hiperprolifercija keratinocita i pojava epidermalnih promjena – akantozе (zadebljanje srednjeg sloja epiderme) i hipogranuloze (Jang i sur., 2021).



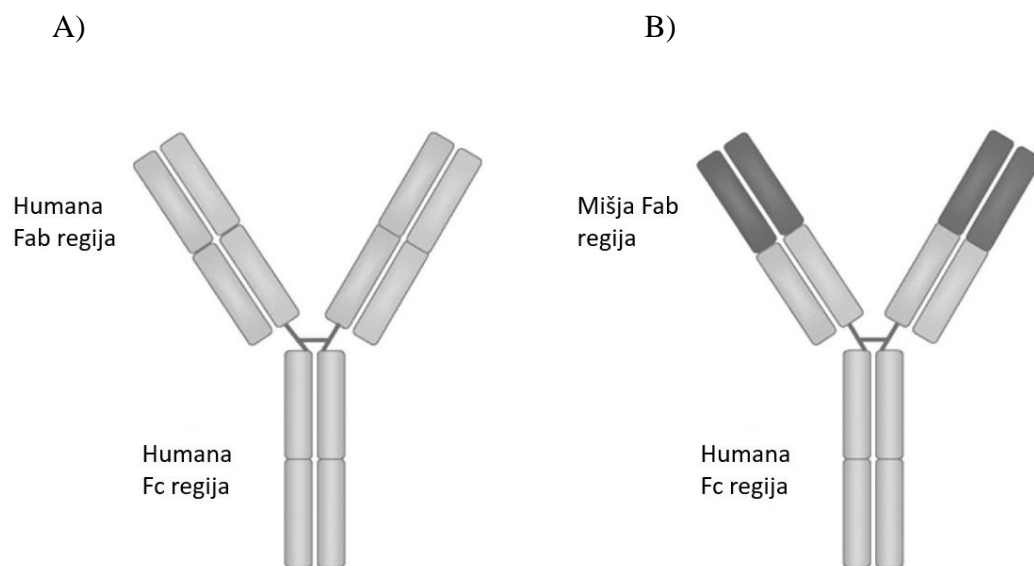
Slika 3. Uloga TNF- α u psorijazi

1.2. ANTI TNF- α LIJEKOVI

Fiziološki, TNF- α je ključan za normalan imunski odgovor, ali njegova prekomjerna sinteza može imati štetne učinke i dovesti do razvoja bolesti. Upalne bolesti crijeva, reumatoidni artritis, psorijatični artritis, psorijaza, kao i neke druge autoimune bolesti, uzrokovane su prekomjernom sintezom TNF- α . Upravo zbog toga, razvijeni su antagonisti tog proteina. Liječenje navedenih autoimunih bolesti se provodi u nekoliko faza kako bi se poboljšalo opće stanje pacijenta, u što većoj mjeri smanjili simptomi te produljilo vrijeme remisije. Liječenje započinje kombiniranom terapijom uz protuupalne lijekove, imunomodulatore te kortikosteroide. Ako se željeni učinak ne postigne unutar tri mjeseca, drugi izbor lijekova su biološki lijekovi, antagonisti TNF- α . Do danas je za kliničku upotrebu odobreno pet antagonista TNF- α : infliksimab, adalimumab, golimumab, certolizumab pegol i etanercept.

1.2.1. STRUKTURA I MEHANIZAM

Većina antagonista TNF- α je sastavljena od dva teška i dva laka lanca IgG1 molekule povezana disulfidnim vezama. Svaki lanac ima varijabilnu regiju koja specifično veže antigen (Fab, engl. *Fragment Antigen-binding*) i konstantu regiju (Fc, engl. *Fragment Constant*). Konstanta regija je humanog podrijetla, dok varijabilna regija može biti mišjeg ili humanog podrijetla. Adalimumab je rekombinantno humano IgG1 monoklonalno protutijelo, dok je infliksimab kimerno IgG1 monoklonalno protutijelo koje ima visok afinitet za TNF- α te sprječava njegovo vezanje za receptor (Slika 4). Ovi lijekovi mogu djelovati kao antagonisti ili kao agonisti. Agonisti stimuliraju apoptozu imunskih stanica koje proizvode TNF- α putem aktivacije citotoksičnosti ovisne o komplementu (CDC, engl. *Complement Dependent Cytotoxicity*) ili citotoksičnosti ovisne o protutijelima (ADCC, engl. *Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity*) (Cessak i sur., 2014). Antagonisti TNF- α imaju više mehanizama: neutralizacija topljivog i transmembranskog TNF- α , aktivacija apoptoze ili aktivacija imunskog sustava uz stvaranje protuupalnih citokina (Billmeier i sur., 2016).



Slika 4. Shematski prikaz strukture ADA (A) i INF (B) (preuzeto i prilagođeno prema <https://www.jrheum.org/content/85/27/F6>)

1.2.2. INDIKACIJE, NAČIN PRIMJENE, DOZIRANJE

Učestalost primjene terapije, doza i način primjene lijeka ovisi o vrsti antagonista TNF- α (Tablica 1). Također, ovisi i o bolesti koja se liječi, težini bolesti te učinkovitosti terapije. Razdoblje između dviju doza lijeka može se povećati ili smanjiti ovisno o postizanju željenog učinka lijeka.

Adalimumab je odobren za liječenje teškog oblika aktivnog reumatoidnog artritisa, aktivnog psorijatičnog artritisa, Crohnove bolesti, ulceroznog kolitisa te teške kronične psorijaze kod odraslih i djece. Primjenjuje se subkutanom injekcijom kao lijek drugog izbora kod osoba koji nisu odgovorili na imunomodulatornu i/ili kortikosteroidnu terapiju. Može djelovati kao monoterapija ili u kombinaciji s metotreksatom. Klinički odgovor se obično postiže unutar 12 tjedana liječenja, ovisno o bolesti koja se liječi (Brunton i sur., 2018; www.halmed.hr).

Infliximab se primjenjuje intravenoznom infuzijom, a indiciran je za liječenje umjerenog do teškog oblika aktivne Crohnove bolesti ili ulceroznog kolitisa kod odraslih i pedijatrijskih bolesnika koji nisu odgovorili na terapiju prvog izbora, za liječenje psorijatičnog artritisa, teškog aktivnog i progresivnog reumatoidnog artritisa te umjerene do teške plak psorijaze.

Liječenje se uvodi pod nadzorom liječnika, a klinički se odgovor uglavnom postiže unutar 12 tjedana liječenja (Brunton i sur., 2018; www.halmed.hr).

Tablica 1. Način primjene, doza i ciljni terapijski interval antagonista TNF- α

	Adalimumab	Infliksimab
Način primjene	subkutano	intravenski
Prosječna doza	Odrasli: 40 mg Djeca (<30 kg): 20 mg	3-10 mg/kg
Učestalost terapije	1-2 tjedna	4-8 tjedana
Ciljni terapijski interval	M: 4-8 mg/L Ž: 4-8 mg/L	M: 3-7 mg/L Ž: 3-7 mg/L

1.2.3. IMUNOGENIČNOST

Iako su se biološki lijekovi pokazali vrlo učinkovitima u liječenju upalnih i autoimunih bolesti, pokazalo se da do 30% pacijenata ne reagira, dok drugih 50% gubi terapijski odgovor tijekom vremena (Cheifetz, 2021). Interindividualni odgovor na terapiju može ovisiti o spolu, tjelesnoj težini, načinu primjene te prisutnosti sistemske upale. Prema Rosenu i sur. (2015) visoke koncentracije TNF- α u serumu dovode do povećanog klirensa lijeka, prema tome i potrebu za povećanom dozom. Također, pokazano je da pacijenti s visokim koncentracijama albumina u serumu pokazuju niži klirens infliksimaba te dulje zadržavaju više koncentracije toga lijeka u krvi. Najčešći uzrok nedostataka odgovora je imunogeničnost. Infliksimab je kimerno protutijelo u čijoj strukturi se nalaze proteini miša koji mogu dovesti do stvaranja protutijela protiv lijeka. Time se smanjuje njegova koncentracija što dovodi do lošijih kliničkih ishoda. Iako je INF imunogeničniji od potpuno humanih protutijela (ADA), dolazi do stvaranja protutijela i ovaj lijek.

Nastala protutijela umanjuju učinkovitost liječenja putem dva moguća mehanizma. Nastala neutralizirajuća i neneutralizirajuća protutijela se vežu na epitop lijeka stvarajući imunološke komplekse čime smanjuju koncentraciju aktivnog lijeka u krvi ili se neutralizirajuća protutijela vežu na lijek blokirajući njegovo vezanje na receptor. Stvaranje protutijela na lijek se može povezati i s povećanom učestalosti kliničkih nuspojava kao što je reakcija na infuziju (van

Schouwenburg i sur., 2013). Ako se primjenom prvog biološkog lijeka ne postigne remisija, preporuka je zamijeniti lijek drugim antagonistom TNF- α do remisije bolesti (Miler, 2022).

1.3. TERAPIJSKO PRAĆENJE KONCENTRACIJE ANTAGONISTA TNF- α

Povećanje doze je prvi izbor u liječenju kada je došlo do gubitka odgovora. Ostale mogućnosti su promjena na drugi antagonist TNF-alfa, dodavanje imunosupresivnih lijekova ili operativni zahvat. Iako Europska organizacija za Crohnovu bolest i kolitis (ECCO, engl. *European Crohn's and Colitis Organization*) ne daje detaljnu preporuku za određivanje ovih lijekova u krvi, postoje dokazi da bi terapijsko praćenje lijeka (TDM, engl. *Therapeutic Drug Monitoring*) moglo biti korisno u ovim slučajevima. TDM predstavlja individualizaciju doziranja s ciljem održavanja koncentracije lijeka u krvi unutar ciljnog raspona. Farmakokinetička varijabilnost, nuspojave vezane uz koncentraciju lijeka i uski terapijski raspon, samo su neke od karakteristika antagonista TNF- α koje čine TDM korisnim (Sanchez – Hernandez i sur., 2019). TDM se može koristiti u svrhu smanjenja doze INF-a kod bolesnika u remisiji ili za optimizaciju monoterapije antagonistima u odabranoj skupini pacijenata kao alternativa kombiniranoj terapiji s imunomodulatorima. Koncentraciju lijeka u krvi preporuča se određivati neposredno prije slijedeće doze lijeka, jer je tada koncentracija lijeka najniža. Osim toga, određivanje koncentracije lijeka preporuča se prije ponovne doze lijeka ADA kako bi se izbjegla akutna reakcija na infuziju (Cheifetz, 2021).

Dakle, TDM se koristi za prilagodbu doze čime se nastoji poboljšati učinkovitost terapije, smanjiti potrebu za kirurškim zahvatima ili hospitalizacijom te smanjiti rizik od nastanka nuspojava ili gubitka odgovora na lijek.

1.3.1. METODE ODREĐIVANJA ANTI-TNF- α U UZORKU SERUMA

Postoji nekoliko tehnika za kvantitativno određivanje koncentracije lijekova adalimumaba i infliksimaba u svrhu terapijskog praćenja doze. Najčešće korištene su enzimski imunokemijska metoda (ELISA, engl. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) kao standardna metoda za kvantitativno određivanje lijekova, radioimunološka metoda (RIA, engl. *Radioimmunoassay*), testovi temeljeni na elektrokemiluminiscenciji (ECLIA, engl. *Electrochemiluminescence Immunoassay*), tandemska masena spektrofotometrija s tekućinskom kromatografijom (LC MS/MS, engl. *Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry*) te novije tehnologije testiranja poput imunonefelometrije. Pojavom novih metoda ističe se problem nedostatka referentnog standarda te potrebu za određivanjem graničnih koncentracija i terapijskih intervala za svaku vrstu testa. Vrijednosti dobivene različitim imunokemijskim metodama nisu međusobno usporedive zbog čega je potrebno longitudinalno praćenje bolesnika uvijek istom imunokemijskom metodom (Cattaneo i Cusato, 2022).

1.4. VALIDACIJA I VERIFIKACIJA KVANTITATIVNIH METODA

Validacija laboratorijskih metoda osigurava izdavanje pouzdanih rezultata koji su uključeni u medicinske odluke kod postavljanja dijagnoze, praćenja učinkovitosti terapije ili praćenja tijeka bolesti. Prije uvođenja nove metode u rutinski rad laboratorija, potrebno je procijeniti jesu li metode usporedive s prethodno korištenim metodama i imaju li zadovoljavajuće analitičke karakteristike. Validacija je opsežan i složen proces kojeg najčešće provodi proizvođač po definiranim uputama. Ukoliko laboratorij mijenja već postojeću metodu, ako se uvodi nova metoda razvijena u laboratoriju (engl. *in-house*-metoda) ili ako koristi već postojeću metodu van njene primarne primjene, potrebno je provesti postupak validacije. Postupak verifikacije potrebno je provesti kada se u laboratorij uvodi nova originalna metoda proizvođača (Bilić-Zulle, 2006).

Verifikacija metode predstavlja objektivnu potvrdu karakteristika metode i/ili analitičkog sustava, koje je dao proizvođač na temelju validacijskog postupka. Provodi se prije uvođenja u rutinski rad. Time se potvrđuje da metoda ima zadovoljavajuću analitičku kvalitetu kako bi se rezultati pretraga koristili u kliničke svrhe. Prije početka verifikacije potrebno je postaviti analitičke ciljeve tj. odrediti kriterije prihvatljivosti. Kriteriji se najčešće preuzimaju od proizvođača ili ih može odrediti sam laboratorij prema njihovim potrebama (Radišić Biljak, 2022). Postupak verifikacije podrazumijeva prikupljanje eksperimentalnih podataka pomoću kojih se procjenjuje pogreška ispitivane metode. Prikupljeni se eksperimentalni podaci statistički obrađuju te se dobivene vrijednosti uspoređuju s unaprijed postavljenim kriterijima prihvatljivosti na temelju čega se donosi odluka (Saračević, 2013).

Postupak inicijalne verifikacije kvantitativnih automatiziranih metoda uključuje ispitivanje:

1. Preciznosti

Preciznost označava slaganje niza nezavisnih mjerenja izvedenih u određenim uvjetima. Ispitivanjem preciznosti zapravo određujemo nepreciznost metode. Procjenjuje se analizom komercijalnih kontrolnih uzoraka i/ili uzoraka pacijenata u najmanje dvije koncentracijske razine koje pokrivaju klinički značajna koncentracijska područja. Svaka se koncentracijska razina određuje pet uzastopnih dana u triplikatu. Ispitivanje nepreciznosti obuhvaća ponovljivost, unutarlaboratorijsku preciznost te povećanu mjernu nesigurnost. Ponovljivost ili preciznost u seriji (engl. *within-run*) je

bliskost slaganja rezultata mjerenih u seriji u istim uvjetima. Ukupna ili unutarlaboratorijska preciznost (engl. *within-laboratory*) predstavlja ukupnu preciznost laboratorija ispitivanu koristeći se istom opremom pri čemu je poželjno obuhvatiti što veći broj izvora raznolikosti (različito doba dana, različito laboratorijsko osoblje i sl.). Rezultat ispitivanja ponovljivosti i unutarlaboratorijske preciznosti je koeficijent varijacije (CV) koji se uspoređuje s unaprijed definiranim kriterijem prihvatljivosti, a predstavlja rasipanje rezultata oko srednje vrijednosti. Pojam mjerna nesigurnost definira raspon vrijednosti unutar kojeg s istom vjerojatnošću možemo očekivati točan rezultat mjerenja. Povećana mjerna nesigurnost predstavlja dvostruku CV (Ćelap i sur., 2018).

2. Istinitosti

Istinitost označava bliskost slaganja srednje vrijednosti više ponovljenih mjerenja sa stvarnom vrijednosti. Istinitost se procjenjuje usporedbom rezultata metode koja se uvodi s rezultatima metode koja se već koristi u rutinskome radu. Provodi se analizom uzoraka (minimalno 20, optimalno 40) istovremeno na oba analitička sustava pri čemu je potrebno pokriti sva klinički značajna koncentracijska područja. Rezultat ispitivanja istinitosti je srednje odstupanje (engl. *bias*) koji se uspoređuje s unaprijed definiranim kriterijem prihvatljivosti.

3. Linearnosti

Linearnost metode označava koncentracijski raspon rezultata unutar kojeg je dokazana linearna ovisnost između stvarne koncentracije analita i izmjerene koncentracije analita. Provjera linearnosti provodi se za metode s linearnim odnosom koncentracije analita i mjerenog signala. Imunokemijske metode koje koriste više kalibratora najčešće imaju nelinearnu kalibracijsku krivulju, pa za takve metode ovaj postupak nije primjenjiv.

4. Referentnih intervala

Referentni interval predstavlja interval koncentracija ili aktivnosti analita omeđen s granicama kliničke odluke. Referentni intervali, ukoliko su prikladni za populaciju za koju će se primjenjivati, mogu se preuzeti iz stručne literature ili iz deklaracije proizvođača.

Kada je to klinički značajno, potrebno je napraviti i ispitivanje:

5. Donje granice detekcije i kvantifikacije

Donja granica detekcije (LOD, engl. *Limit of Detection*) predstavlja najmanju koncentraciju ili aktivnost analita koja se ispitivanom metodom može pouzdano dokazati. Donja granica kvantifikacije (LOQ; engl. *Limit of Quantification*) predstavlja najmanju koncentraciju ili aktivnost analita koja se ispitivanom metodom može pouzdano kvantificirati.

6. Prijenosa analita

Procjena prijenosa prethodnog analita (engl. *Carry over*) predstavlja provjeru hoće li niska koncentracija analita biti lažno povišena ukoliko je neposredno prije analiziran uzorak s visokom koncentracijom istog analita.

Budući da postoji velik broj kvantitativnih metoda koje se temelje na različitim principima, ne postoji jedinstveni verifikacijski protokol. Stoga je preporuka da svaki laboratorij osmisli vlastiti verifikacijski protokol na temelju karakteristika korištene metode i karakteristika analita koji se određuje (Radišić Biljak, 2022).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Određivanje koncentracije bioloških lijekova u svrhu terapijskog praćenja je pokazalo brojne prednosti pri liječenju upalnih autoimunih bolesti. Prije uvođenja nove metode za mjerenje koncentracije lijeka u rutinski rad, potrebno je verifikacijom provjeriti ima li metoda zadovoljavajuće analitičke karakteristike.

U rutinskom radu Kliničkog zavoda za kemiju, Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice, koncentracija lijekova adalimumaba i infliksimaba u uzorku seruma određuje se ručnom metodom, enzimskim imunokemijskim testom RIDASCREEN® ADA/IFX Monitoring (R-Biopharma AG, Germany).

Cilj ovog istraživanja je provesti postupak verifikacije nove kvantitativne i potpuno automatizirane metode N Latex α TNF α (Siemens Healthineers) koja se temelji na principu imunonefelometrije na analizatoru Atellica® NEPH 360 System (Siemens Healthineers) te procijeniti jesu li analitičke karakteristike zadovoljavajuće za uvođenje te metode u rutinski rad. Verifikacija metode obuhvaća ispitivanje preciznosti, usporedbu s rezultatima dosad korištene metode te provjeru granice kvantifikacije.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. UZORCI

Za provjeru preciznosti korišteni su komercijalni kontrolni uzorci koji sadrže adalimumab (ADA) i infliksimab (INF) u dvije koncentracijske razine (Tablica 2). Za usporedbu metoda korišteno je ukupno 66 uzoraka seruma pacijenata (N = 33 za ADA i N = 33 za INF). Uzorci su zaprimljeni u Klinički zavod za kemiju, Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice u Zagrebu sa zahtjevom za određivanje koncentracije ADA i INF. Uzorci pune krvi uzeti su u standardizirane serumske epruvete s aktivatorom zgrušavanja i gelom za odvajanje stanica (Greiner Bio-One VACUETTE®, Austrija). Nakon potpune koagulacije, uzorak je centrifugiran 10 minuta na 4000 okr/min nakon čega je uzet alikvot od 500 µL seruma u sekundarnu epruvetu. Uzorci su do analize ELISA metodom koja se rutinski koristi u Kliničkom zavodu za kemiju, bili pohranjeni na -20 °C. Neposredno prije analize, otopljeni uzorak je centrifugiran 10 minuta na 4000 okr/min. Nakon završene analize serije uzoraka ELISA metodom, isti uzorci analizirani su imunonefelometrijskom metodom na nefelometru Atellica® NEPH 360.

3.2. KALIBRATORI

Pomoću seta kalibratora N ATNFA Standard ADA (Ref. 1087739, LOT 475005) početne koncentracije 30,4 mg/L i N ATNFA Standard INF (Ref. 10873741, LOT 475104) početne koncentracije 28,6 mg/L tvrtke Siemens Healthineers napravljena je kalibracija analitičkog sustava. Kalibracija je potpuno automatizirana, a analizator radi razrjeđenja za pet kalibracijskih točaka (1:10, 1:20, 1:40, 1:80 i 1:160) pomoću otopine za razrjeđivanje N Diluent. Mjerenje svakog razrjeđenja kalibratora izvodi se u duplikatu. Time se dobiva kalibracijska krivulja pomoću koje analizator izmjereni svjetlosni signal pretvara u koncentraciju lijeka. Set kalibratora je skladišten na temperaturi 4-8 °C, a stabilan je do isteka roka naznačenog na kutiji.

3.3. KONTROLNI UZORCI

1. Kontrolni uzorak Adalimumab, niska razina, N ATNFA Control ADA L (Siemens Healthineers) Ref. 10873740, LOT 475404
2. Kontrolni uzorak Adalimumab, visoka razina, N ATNFA Control ADA H (Siemens Healthineers) Ref. 10873740, LOT 475304

3. Kontrolni uzorak Infliksimab, niska razina, N ATNFA Control INF L
(Siemens Healthineers) Ref. 10873742, LOT 475604
4. Kontrolni uzorak Infliksimab, visoka razina, N ATNFA Control INF H
(Siemens Healthineers) Ref. 10873742, LOT 475504

Navedeni komercijalni kontrolni uzorci korišteni su u provjeri preciznosti te svakog radnog dana neposredno prije analize uzoraka. Kontrolni uzorci su spremni za upotrebu, skladišteni su na temperaturi 4-8 °C, a stabilni su do isteka roka naznačenog na kutiji.

Tablica 2. Deklarirano koncentracijsko područje komercijalnih kontrolnih uzoraka ADA i INF u dvije koncentracijske razine

	Srednja vrijednost koncentracije (mg/L)	Koncentracijsko područje (mg/L)
Adalimumab		
L (lot. 475404)	3,08	2,46 – 3,70
H (lot. 475304)	8,55	6,84 – 10,30
Infliksimab		
L (lot. 475604)	2,16	1,73 – 2,59
H (lot. 475504)	4,71	3,77 – 5,65

3.4. OPREMA I REAGENSI

3.4.1. OPREMA I UREĐAJI

- Atellica® NEPH 630 System (Siemens Healthineers), nefelometar
- Reakcijske kivete (Siemens Healthineers)
- Komorice za diluciju (Siemens Healthineers)
- Automatska pipeta i nastavci za pipetu volumena 1 mL
- HydroFlex™ (Tecan), automatski ispirać mikrotitarskih pločica
- VIRCLIA® (Vircell), automatski ELISA analizator
- Staklena graduirana pipeta volumena 20 mL
- Automatska pipeta i nastavci za pipetu volumena 5-50 µL i volumena 20-200 µL

- Rotofix 32 (Hettich), centrifuga
- Miješalica Vortex EV 100 (Tehtnica Železniki)

3.4.2. REAGENSI I OSTALI PRIBOR

Paket reagensa N Latex aTNF α (Siemens Healthineers) uključuje:

- N Latex aTNF α Reagens 1 (Ref. 10873738, LOT 474806). Liofiliziran.
- N Latex aTNF α Reagens 2 (Ref. 10873738, LOT 474906). Liofiliziran.
- Set kontrola N aTNF α Controls ADA/INF. Spreman za upotrebu.
- Kalibracijski set N aTNF α Standard ADA/INF. Spreman za upotrebu.

Paket reagensa RIDASCREEN® ADA/IFX Monitoring (R-Biopharm AG) uključuje:

- Mikrotitarska pločica s 96 jažica obloženih antigenom (humani TNF- α)
- Kalibracijski set RIDASCREEN Standard. Spreman za upotrebu.
- Set kontrola RIDASCREEN Low positive control i RIDASCREEN Positive control. Spreman za upotrebu.
- Konjugat, otopina monoklonskog anti-ADA/IFX antitijela konjugiranog s peroksidazom. Spreman za upotrebu.
- Supstrat, otopina tetrametilbenzidin/H₂O₂. Spreman za upotrebu.
- Otopina za ispiranje jažica
- Folija za pokrivanje jažica
- Otopina sumporne kiseline (0,5 M) za zaustavljanje reakcije

Ostalo:

- Destilirana ili deionizirana voda za otapanje reagensa
- Otopina za automatizirano razrjeđenje kalibratora i uzoraka na analizatoru Atellica® NEPH 630 System (N Diluent, Siemens Healthineers)
- Pufer za analizator Atellica® NEPH 630 System (N Buffer, Siemens Healthineers)
- Otopina za čišćenje igle
- Staklene epruvete od 5 mL za pripremu razrijeđenih uzoraka
- Prazne jažice za nadopunjavanje kolona za automatsko ispiranje
- Odmjerna tikvica od 100 mL i 1000 mL

3.5. METODE

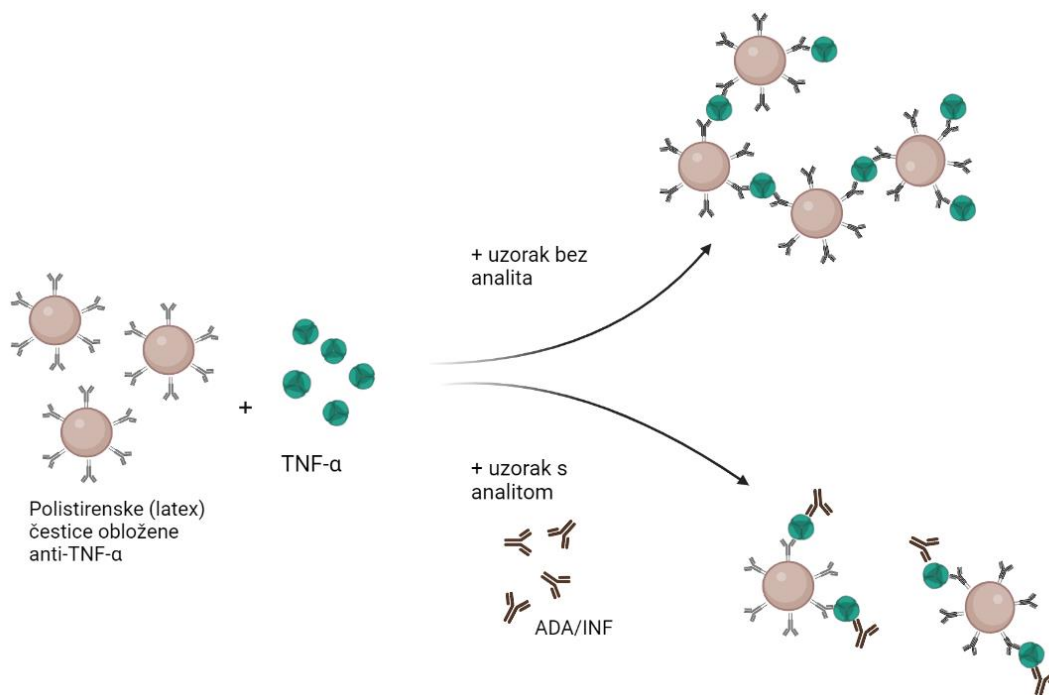
3.5.1. N LATEX aTNF α

N Latex aTNF α reagens (Siemens Healthineers) je dvokomponentni reagens kompatibilan s Atellica® NEPH 630 System (Siemens Healthineers) potpuno automatiziranim imunokemijskim analizatorom, a koristi se za kvantitativno određivanje koncentracije antagonista TNF- α u uzorku seruma lateks imunonefelometrijom.

Lateks kompetitivna indirektna imunonefelometrija je imunokemijska metoda pomoću koje se kvantitativno određuje protutijelo u uzorku seruma. Nastajanjem imunokompleksa između analita i protutijela dolazi do zamućenja otopine. Prolaskom paralelnih zraka svjetlosti kroz zamućenu reakcijsku smjesu, zraka dolazi do nastalog kompleksa te se raspršuje. Imunonefelometrija je metoda u kojoj se mjeri rasap svjetlosti i to najčešće pod kutom od 90°. Lateks kompetitivne metode se temelje na imunokemijskoj reakciji u kojoj je broj veznih mjesta za antigen ograničen. U reakcijskoj kivetu je tako prisutno protutijelo koje kvantificiramo te poznata koncentracija polistirenskih čestica obloženih analogom tog protutijela. Oba protutijela kompetiraju za antigen iz reagensa.

N Latex aTNF α reagens 1 sadrži polistirenske čestice presvučene monoklonalnim protutijelima na TNF- α protein (mišjeg podrijetla), humani albumin te stabilizatore i konzervanse. N Latex aTNF α reagens 2 sadrži humani TNF- α protein, goveđi serumski albumin te konzervanse i stabilizatore. Oba reagensa je potrebno otopiti u 1 mL destilirane vode. Miješanjem reagensa i uzorka seruma, u prisutnosti antagonista TNF- α u uzorku, ne dolazi do stvaranja agregata polistirenskih čestica s TNF- α proteinom (Slika 5). Propuštanjem zrake svjetlosti kroz reakcijsku kivetu, dolazi do raspršenja svijetlosti na agregatima polistirenskih čestica. Intenzitet raspršene svjetlosti mjeri se na fotodiodama detektora pod kutom 13- 24°. Izvor svjetla je infracrvena LED lampa, a mjerenje se izvodi na 840 nm. Intenzitet svjetla je obrnuto proporcionalan koncentraciji TNF- α antagonista u uzorku. Pomoću kalibracijske krivulje, analizator pretvara svjetlosni signal u koncentraciju lijeka (mg/L).

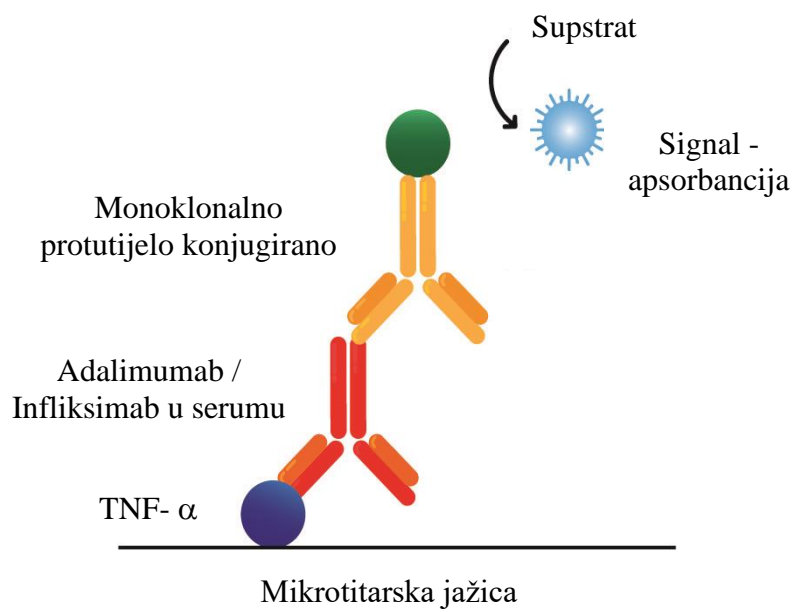
Jednim setom reagensa N Latex aTNF α moguća je detekcija i kvantifikacija oba antagonista TNF- α , adalimumaba i infliksimaba, u kombinaciji sa specifičnim kalibratorima i kontrolama.



Slika 5. Princip kompetitivne indirektne lateks imunokemijske metode.

3.5.2. ELISA

ELISA je enzimaska imunokemijska metoda kojom je moguća kvalitativna i kvantitativna analiza prisutnosti nekog antigena ili protutijela u otopini. Temelji se na imobilizaciji topljivog analita na čvrstu podlogu. Analit se dokazuje i određuje spektrofotometrijskim mjerenjem nastale reakcije u kojoj dolazi do promjene boje. Sendvič ELISA je metoda koja mjeri količinu protutijela između dvaju slojeva (vezujuće i detekcijsko sredstvo) (Slika 6). Pri određivanju antagonista TNF- α , na mikrotitarsku pločicu su imobilizirane molekule proteina TNF- α . Uzorak razrijeđenog seruma se dodaje u jažice i inkubira sat vremena kada dolazi do vezanja adalimumaba ili infliksimaba iz uzorka na imobiliziran TNF- α antigen. Nakon ispiranja puferom slijedi inkubacija s detekcijskim monoklonalnim protutijelom usmjerenim na ADA ili INF, konjugiranim s peroksidazom iz hrena. Nakon faze ispiranja u kojoj se ispiru nevezana monoklonalna detekcijska protutijela, dodaje se supstrat za peroksidazu, tetrametilbenzidin/H₂O₂. Dolazi do promjene boje u plavu, a dodatkom stop otopine se boja mijenja u žutu. Apsorbancija se mjeri pri 450 nm i proporcionalna je koncentraciji lijeka u serumu.



Slika 6. Princip sendvič ELISA metode (preuzeto i prilagođeno prema <https://www.leinco.com>)

3.6. STATISTIČKE METODE

Za prikaz rezultata i statističku obradu korišteni su programi Microsoft Excel® 2016 (Microsoft, SAD) i MedCalc® verzija 22.005 (MedCalc® Software, Belgija). Statističke metode su korištene prilikom ispitivanja preciznosti (ponovljivost i unutarlaboratorijska preciznost) te za usporedbu nove metode s metodom koja se koristi u rutinskom radu. Dobiveni podaci su uspoređeni s unaprijed definiranim kriterijima prihvatljivosti koje je deklarirao proizvođač.

3.6.1. PROVJERA PRECIZNOSTI

Ispitivanje preciznosti provedeno je u skladu s CLSI EP15-A2 protokolom (CLSI, engl. *Clinical and Laboratory Standards Institute*). Preciznost je određena korištenjem komercijalnih kontrolnih uzoraka u dvije koncentracijske razine, s niskom i visokom koncentracijom analita. Svaka se koncentracijska razina analizirala tijekom pet dana u triplikatu.

Mjera nepreciznosti se izražava kao koeficijent varijacije (CV_p) koji označava standardnu devijaciju u odnosu na srednju vrijednost. Preciznost se ispituje određivanjem ponovljivosti i unutarlaboratorijske preciznosti. Dobivena vrijednost uspoređuje se s unaprijed definiranim kriterijem prihvatljivosti za pojedinu koncentracijsku razinu. Kriteriji prihvatljivosti su preuzeti iz deklaracije proizvođača, a prikazani su u Tablici 3.

Tablica 3. Kriteriji prihvatljivosti za ponovljivost i unutarlaboratorijsku preciznost pri određivanju adalimumaba i infliksimaba u dvije koncentracijske razine

	Ponovljivost CV (%)	Unutarlaboratorijska preciznost CV (%)
Adalimumab		
L (lot. 475404)	3,5	4,2
H (lot. 475304)	4,4	5,0
Infliksimab		
L (lot. 475604)	4,0	5,3
H (lot. 475504)	6,5	6,6

Za izračun ponovljivosti prvo je potrebno izračunati aritmetičku sredinu rezultata za svaki od pet dana analize:

$$\text{aritmetička sredina } (\bar{X}) = \frac{X_1 + X_2 + X_3}{3}$$

Dobiveni podaci uvrste se u formulu za izračun standardnog odstupanja (Sd) za svaki od pet dana analize, gdje je n broj mjerenja (triplikat, n = 3):

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

Ponovljivost predstavlja ukupnu standardnu devijaciju (Sr) izračunatu iz standardnih devijacija svakog dana tijekom pet dana određivanja, pomoću slijedeće formule:

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

gdje je N broj dana (N = 5).

Posljednji korak je izračun koeficijenta varijacije (CV_p) pomoću standardnog odstupanja:

$$\text{koeficijent varijacije } (CV_p) = \frac{Sr}{\bar{X}} \times 100 \quad [\%]$$

Dobiveni koeficijent varijacije (CV_p) predstavlja ponovljivost metode i uspoređuje se s unaprijed definiranim kriterijem prihvatljivosti, koji je preuzet iz deklaracije proizvođača. Ako je izmjereni koeficijent varijacije manji ili jednak odabranom kriteriju, zaključuje se da je ponovljivost ispitivane metode zadovoljavajuća. Ako je izmjereni koeficijent varijacije veći od odabranog kriterija prihvatljivosti, zaključuje se da ponovljivost ispitivane metode nije zadovoljavajuća.

Za izračun unutarlaboratorijske preciznosti prvo je potrebno izračunati aritmetičku sredinu svih aritmetičkih sredina vrijednosti izmjerenih u triplikatu za svaki od pet dana, gdje je N = 5:

$$\text{aritmetička sredina } (\bar{X}) = \frac{\bar{x}_1 + \bar{x}_2 + \bar{x}_3 + \bar{x}_4 + \bar{x}_5}{N}$$

Dobivena vrijednost omogućuje izračun validacijske međupreciznosti kod ponovljenih mjerenja (Sb):

$$\text{validacijska međupreciznost kod ponovljenih mjerenja } (Sb) = \sqrt{\frac{\sum_{n=1}^N (\bar{X}_n - \bar{X})^2}{N-1}},$$

gdje je \bar{X}_n aritmetička sredina svakog dana određivanja, a \bar{X} aritmetička sredina svih vrijednosti mjerenja tijekom pet dana. N je broj dana (N = 5).

Unutarlaboratorijsko standardno odstupanje (Sl) izračunava se pomoću standardnog odstupanja za pet dana (Sr) i validacijske međupreciznosti kod ponovljenih mjerenja (Sb), gdje je n = 3:

$$\text{unutarlaboratorijsko standardno odstupanje (Sl)} = \sqrt{\frac{n-1}{n} \times Sr^2 + Sb^2}$$

Posljednji korak je izračun koeficijenta varijacije za unutarlaboratorijsku preciznost (CV_u):

$$\text{koeficijent varijacije (CV}_u\text{)} = \frac{Sl}{\bar{X}} \times 100 \quad [\%]$$

Dobiveni koeficijent varijacije (CV_u) predstavlja unutarlaboratorijsku preciznost metode i uspoređuje se s unaprijed definiranim kriterijem prihvatljivosti, koji je preuzet iz deklaracije proizvođača. Ako je izmjereni koeficijent varijacije manji ili jednak odabranom kriteriju, zaključuje se da je unutarlaboratorijska preciznost ispitivane metode zadovoljavajuća. Ako je izmjereni koeficijent varijacije veći od odabranog kriterija prihvatljivosti, zaključuje se da unutarlaboratorijska preciznost ispitivane metode nije zadovoljavajuća.

3.6.2. USPOREDBA METODE S POSTOJEĆIM SUSTAVOM

Prilikom uvođenja nove metode uvijek je potrebno provjeriti usporedivost nove metode s rutinskom metodom. Usporedivost se provodi analizom uzoraka na oba sustava nakon čega se provodi statistička obrada rezultata. Cilj usporedbe metoda je procjena konstantnog i proporcionalnog odstupanja između uspoređivanih metoda. Dobivena razlika se uspoređuje s unaprijed definiranim kriterijem prihvatljivosti koji se obično uzima od organizatora vanjske kontrole kvalitete. Ako je razlika prihvatljiva, moguće je novom metodom zamijeniti dosad korištenu metodu.

Ispitivana je usporedivost metode N Latex aTNF α (Siemens Healthineers) s rutinskom metodom ELISA. Pri tom je korišteno 66 uzoraka seruma, od kojih se u 33 uzorka određivala koncentracija adalimumaba, dok se u 33 uzorka određivala koncentracija infliksimaba. Koncentracije analiziranih uzoraka pokrivaju čitavo mjerno područje koje prema deklaraciji proizvođača iznosi 1,13 – 14,84 mg/L za ADA te 0,93 – 14,90 mg/L na INF.

Statistička obrada rezultata je provedena koristeći Passing – Bablokovu regresijsku analizu te Bland – Altmanovu analizu. Budući da analitičko mjerno područje ELISA metode (RIDASCREEN® ADA/IFX Monitoring, R-Biopharm AG) obuhvaća koncentracijsko područje 0,5 – 12 mg/L, prilikom statističke obrade Passing - Bablok i Bland - Altman nisu korišteni podaci uzoraka u kojima je koncentracija lijeka veća od 12 mg/L, izuzev za uzorke koji su bili dodatno razrijeđeni.

3.6.2.1. IZRAČUN SREDNJEG ODSUPANJA

Srednje odstupanje se računa kao srednja vrijednost pojedinačnih odstupanja, pri čemu je potrebno odrediti odstupanje za svaki par rezultata pojedinačno.

Srednje odstupanje između metoda (*bias*) računa se prema formuli:

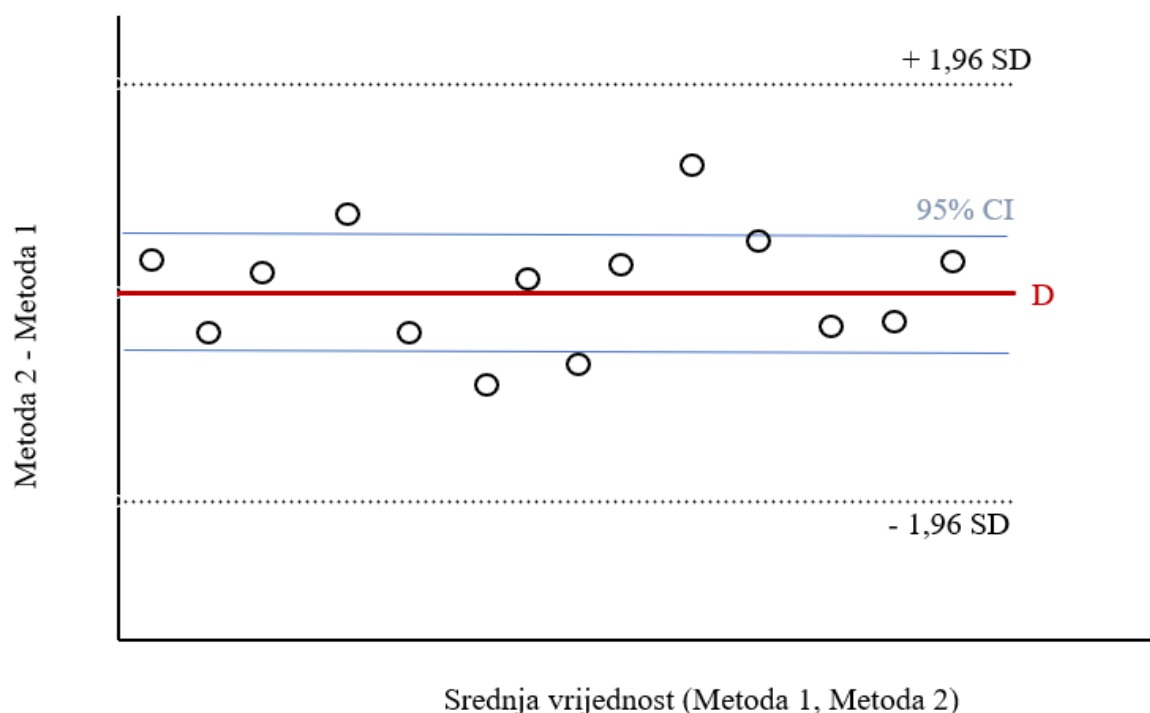
$$bias = \left(\frac{metoda\ 2 - metoda\ 1}{metoda\ 1} \right) \times 100\ %$$

Pri čemu je metoda 1 postojeća metoda (ELISA), dok je metoda 2 nova metoda (N Latex aTNF α). Kao kriterij prihvatljivosti uzet je kriterij od 20% prema smjernicama za validaciju bioanalitičkih metoda (Kadian i sur. 2016)

3.6.2.2. BLAND – ALTMANOVA ANALIZA

Bland – Altmanova analiza je statistička metoda koja se temelji na kvantifikaciji podudarnosti dviju metoda, uključujući srednju vrijednost mjerenja i postavljajući granice podudarnosti. Bland – Altman dijagram se koristi za procjenu odstupanja između srednjih vrijednosti razlika mjerenja i za procjenu intervala pouzdanosti unutar kojeg se nalazi 95 % razlika između mjerenja. Ovom metodom procjenjuje se postojanje konstantnog i proporcionalnog odstupanja te se definira interval pouzdanosti.

Na grafikonu je označena srednja vrijednost razlike (D, engl. *Mean Difference*) dvaju mjerenja uz pripadajući 95% interval pouzdanosti (CI, engl. *Confidence Interval*) (Slika 7). Rezultati mjerenja prikazuju se grafički tako da su na osi y vrijednosti razlike uparenih mjerenja, a na osi x njihova srednja vrijednost. Za procjenu proporcionalnog odstupanja, vrijednosti na osi y su prikazane u postocima. Za procjenu konstantnog odstupanja, vrijednosti na osi y su prikazane kao apsolutne razlike, u mjernim jedinicama. Postojanje konstantnog ili proporcionalnog odstupanja procjenjujemo granicama 95 %-tnog intervala pouzdanosti koji je označen na grafikonu sivim linijama. Osim srednje razlike, izračunava se vrijednost standardne devijacije razlika (s). Na grafu je prikazano područje omeđeno granicama slaganja, unutar kojeg se nalazi 95% razlika mjerenja, a iznose $D \pm 1,96\ SD$. Široki raspon ukazuje na loše podudaranje metoda, dok uzak raspon ukazuje na dobru podudarnost ispitivanih metoda (Giavarina, 2015).



Slika 7. Prikaz rezultata Bland – Altmanove analize

3.6.2.3. PASSING – BABLOKOVA REGRESIJSKA ANALIZA

Passing – Bablokova regresijska analiza je statistička metoda koja omogućuje procjenu podudarnosti analitičkih metoda i postojanje sustavnog odstupanja, konstantnog i proporcionalnog. Neparametrijska je metoda neosjetljiva na distribuciju pogrešaka i ekstremne vrijednosti. Analiza pretpostavlja kontinuirano distribuirane rezultate te linearni odnos između rezultata izmjerenih metodama koje se uspoređuju. Rezultati se prikazuju kao dijagram raspršenja i regresijskim pravcem te regresijskom jednadžbom:

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

Gdje je:

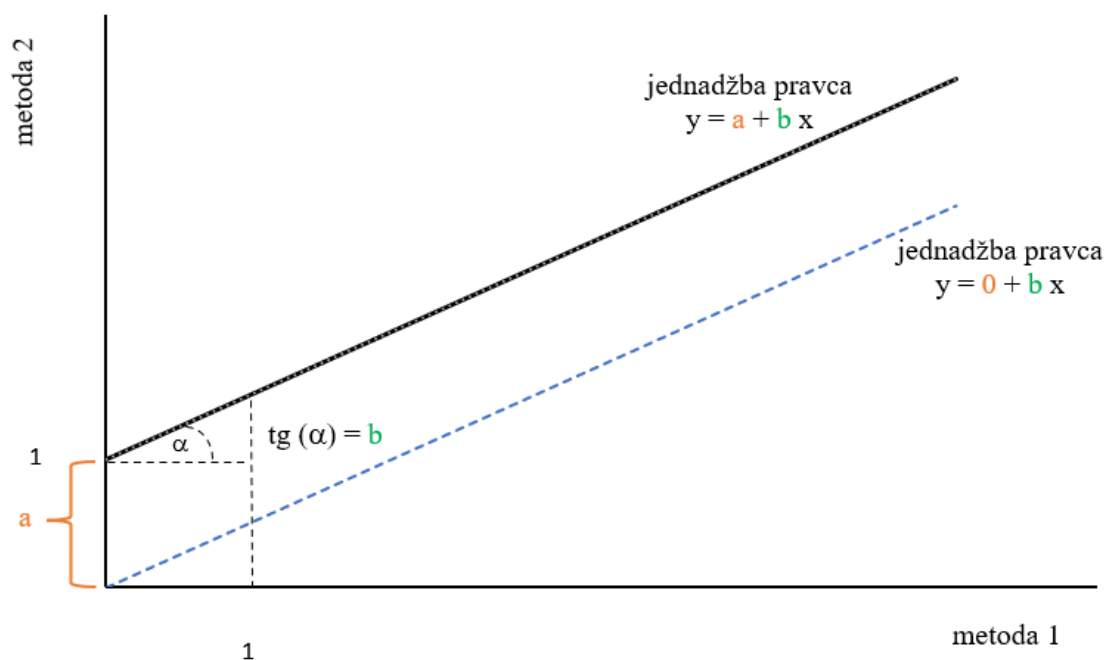
a– odsječak na osi y

b– koeficijent smjera pravca

95 % CI – 95 %-tni interval pouzdanosti

Interval pouzdanosti (CI) označava raspon mogućih vrijednosti unutar kojega se s određenom vjerojatnosti nalazi statistička mjera populacije. CI je objektivna procjena (ne)preciznosti i veličine uzorka nekog istraživanja (Šimundić, 2008). Koristi se za određivanje konstantnog ili proporcionalnog odstupanja između uspoređivanih metoda. Konstantno odstupanje predstavlja matematičko odstupanje između rezultata metoda koji je jednak u svim koncentracijskim područjima i odgovara iznosu odsječka na osi y (a) (Slika 8). Ukoliko 95 %-tni interval pouzdanosti na osi y (a) ne obuhvaća nulu, postoji značajno konstantno odstupanje između ispitivanih metoda.

Proporcionalno odstupanje predstavlja matematičko odstupanje između rezultata metoda koje ovisi o koncentracijskom području i odgovara koeficijentu smjera pravca (b) tj. tangensu kuta kojeg pravac zatvara s osi x. Prisutnost proporcionalnog odstupanja procjenjuje se provjerom intervala pouzdanosti za koeficijent smjera (b) koji mora sadržavati vrijednost 1. Ukoliko 95 %-tni interval pouzdanosti koeficijenta smjera ne obuhvaća vrijednost jedan, postoji statistički značajno proporcionalno odstupanje između ispitivanih metoda.



Slika 8. Primjer Passing – Bablokovog regresijskog pravca.

3.6.2.4. USPOREBA KATEGORIJA REZULTATA

S obzirom da zbog manjeg mjernog raspona ELISA metode nismo bili u mogućnosti usporediti sve kvantitativne rezultate, napravili smo usporedbu podudarnosti u kategorizaciji rezultata dobivenih s obje metode. Rezultati su podijeljeni u kategorije s obzirom na preporučeni terapijski raspon koji za INF iznosi 3 – 7 mg/L, a za ADA 4 – 8 mg/L:

Kategorija 1:

Subterapijska koncentracija lijeka

za IFN < 3 mg/L

za ADA < 4mg/L

Kategorija 2:

Terapijska koncentracija lijeka

za IFN 3 – 7 mg/L

za ADA 4 – 8 mg/L

Kategorija 3:

Visoka koncentracija lijeka

za IFN >7 mg/L

za ADA > 8 mg/L

Za usporedbu podudarnosti u kategorizaciji rezultata korištena je kapa statistika (engl. *Inter-rater agreement (kappa)*). Ako više osoba ili metoda procjenjuje iste podatke vrlo je važno da oni budu pouzdani i usporedivi na što ukazuje kapa (κ) koeficijent čija vrijednost može biti od -1 do +1. U kliničkoj praksi se koristi raspon od 0 do +1 zato što su negativne vrijednosti rijetke. Slaba podudarnost u procjeni podataka od strane više ispitivača ili metoda nije prihvatljiva u medicinskoj praksi niti u kliničkim studijama jer može nepovoljno utjecati na kliničku odluku, a time i na ishod za pacijenta. Kapa-koeficijent obavezno treba interpretirati uz 95-postotni interval pouzdanosti (95 % CI), a prihvatljivom se smatra vrijednost $\geq 0,6$. (McHugh 2012). Interpretacija kapa koeficijenta navedena je u Tablici 4.

Da bi se mogao izračunati kapa-koeficijent, nužno je ispitivanje provesti na minimalno 30 uzoraka, a pritom je potrebno uključiti minimalno 10 uzoraka za svaku očekivanu kategoriju.

Tablica 4. Interpretacija vrijednosti kapa koeficijenta (prilagođeno prema McHugh, 2012).

Vrijednost kapa koeficijenta	Interpretacija podudarnosti	Postotak podudarnih rezultata (%)
0-0,20	Nema podudarnosti	0-4
0,21-0,39	Minimalna podudarnost	4-15
0,40-0,59	Slaba podudarnost	15-35
0,60-0,79	Osrednja podudarnost	35-63
0,80-0,90	Snažna podudarnost	64-81
>0,90	Izvrсна podudarnost	82-100

3.6.3. PROVJERA GRANICE KVANTIFIKACIJE

Granica kvantifikacije (LoQ, engl. *Limit of Quantification*) definirana je kao najniža koncentracija analita koju metoda može pouzdano odrediti sa zadovoljavajućom preciznosti i točnosti. Ispitivanje preciznosti provedeno je u skladu s CLSI EP17-A2 protokolom. Granica kvantifikacije prema deklaraciji proizvođača iznosi 0,3 mg/L za adalimumab te 0,3 mg/L za infliksimab. Provjera deklariranog LoQ provedena je koristeći pool uzoraka niske koncentracijske razine (<0,8 mg/L) koji je razrijeđen otopinom za razrjeđivanje N Diluent (Siemens Healthineers) kako bi se dobila koncentracija što bliža deklariranom LoQ-u. Uzorci su pušteni tri dana u sedam ponavljanja (ukupno 42 mjerenja) koristeći jedan lot reagensa i jedan uređaj.

Deklarirani LoQ se smatra zadovoljavajućim ako je broj rezultata koji ne prelaze unaprijed definirane granice odstupanja manji ili jednak četiri. Kao kriterij granice odstupanja uzet je kriterij od 25% prema smjernicama za validaciju bioanalitičkih metoda (Kadian i sur. 2016)

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. PRECIZNOST

Preciznost metode ispitana je analizom kontrolnih uzoraka s visokom i niskom koncentracijom ADA/INF. Kontrolni su uzorci analizirani u triplikatu kroz pet dana. Rezultati analize su prikazani u Tablicama 5 i 6.

Tablica 5. Prikaz izmjerenih koncentracija (mg/L) i rezultata procjene preciznosti metode korištenjem kontrolnog uzorka s visokom i niskom koncentracijom ADA.

Kontrolni uzorak	ADA L (475404 N)					ADA H (475304 N)				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Dan										
Mjerenje 1	3,38	3,24	2,87	2,99	2,95	8,92	8,87	8,33	9,14	8,29
Mjerenje 2	3,02	3,27	3,19	3,18	2,96	8,70	10,10	9,20	8,97	9,48
Mjerenje 3	3,03	3,04	3,08	3,23	3,00	8,59	9,52	8,63	8,80	8,77
Srednja vrijednost (\bar{x})	3,1	3,2	3,0	3,1	3,0	8,7	9,5	8,7	9,0	8,8
Srednja vrijednost za svih pet dana	3,1					9,0				
Sd	0,21	0,13	0,16	0,13	0,03	0,17	0,62	0,44	0,17	0,60
Sd ²	0,042	0,016	0,026	0,016	0,001	0,028	0,379	0,195	0,029	0,358
Sr	0,14					0,445				
Sb ²	0,007					0,102				
Sl	0,140					0,484				
Ponovljivost (CV)	4,6 %					5,0 %				
Unutar-laboratorijska preciznost (CV)	4,7 %					5,4 %				

Sd – standardno odstupanje, *Sr* – standardno odstupanje za pet dana, *Sb* – validacijska međupreciznost kod ponovljenih mjerenja, *Sl* – unutarlaboratorijsko standardno odstupanje, *CV* – koeficijent varijacije

Izmjerena ponovljivost za nisku koncentracijsku razinu adalimumaba iznosi 4,6% dok za visoku koncentracijsku razinu iznosi 5,0 %. Izračunata unutarlaboratorijska preciznost za nisku koncentracijsku razinu iznosi 4,7 % dok za visoku koncentracijsku razinu iznosi 5,4 %.

Tablica 6. Prikaz izmjerenih koncentracija i rezultata procjene preciznosti metode korištenjem kontrolnog uzorka s visokom i niskom koncentracijom INF

Kontrolni uzorak	INF L (475604 N)					INF H (475504 N)				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Dan										
Mjerenje 1	1,97	2,08	2,01	1,82	1,91	4,39	4,73	4,47	4,16	4,32
Mjerenje 2	2,09	2,02	2,11	2,10	2,11	4,55	4,36	4,90	4,82	4,53
Mjerenje 3	2,10	1,97	2,04	2,02	2,12	5,04	4,75	4,92	4,76	5,18
Srednja vrijednost (\bar{x})	2,1	2,0	2,0	2,0	2,1	4,7	4,6	4,8	4,6	4,7
Srednja vrijednost za svih pet dana	2,0					4,7				
Sd	0,07	0,06	0,05	0,14	0,10	0,34	0,22	0,25	0,36	0,45
Sd ²	0,005	0,003	0,003	0,021	0,010	0,115	0,048	0,065	0,133	0,201
Sr	0,09					0,09				
Sb ²	0,0012					0,0049				
Sl	0,080					0,282				
Ponovljivost (CV)	4,5 %					7,2 %				
Unutar-laboratorijska preciznost (CV)	4,0 %					6,1 %				

Sd – standardno odstupanje, *Sr* – standardno odstupanje za pet dana, *Sb* – validacijska međupreciznost kod ponovljenih mjerenja, *Sl* – unutarlaboratorijsko standardno odstupanje, *CV* – koeficijent varijacije

Izmjerena ponovljivost za nisku koncentracijsku razinu infliksimaba iznosi 4,5 % dok za visoku koncentracijsku razinu iznosi 7,2 %. Izračunata unutarlaboratorijska preciznost za nisku koncentracijsku razinu iznosi 4,0 % dok za visoku koncentracijsku razinu iznosi 6,1 %.

4.2. USPOREDBA METODA

Rezultati dobiveni mjerenjem Metodom 1 (ELISA) i Metodom 2 (N Latex aTNF α nefelometrija) te izračunata odstupanja (*bias*) prikazani su u Tablici 7. Odabrani kriterij prihvatljivosti za usporedbu metoda iznosi 20%.

Tablica 7. Koncentracije ADA (mg/L) u 33 uzorka izmjerene Metodom 1 i Metodom 2 te pripadajući izračunati *bias* (%).

Broj	Metoda 1	Metoda 2	<i>Bias</i> (%)
1	8,40	8,77	4,40
2	14,10	14,70	4,26
3	11,80	11,80	0,00
4	0,90	0,80	-11,11
5	6,93	7,94	14,57
6	0,90	0,80	-11,11
7	0,90	0,80	-11,11
8	>12	17,10	/
9	0,90	0,80	-11,11
10	8,20	8,04	-1,95
11	8,20	7,90	-3,66
12	>12	19,90	/
13	5,90	5,91	0,17
14	9,80	8,48	-13,47
15	0,90	0,80	-11,11
16	>12	11,60	/
17	8,71	8,62	-1,03
18	6,21	6,27	0,97
19	>12	17,80	/
20	0,90	0,80	-11,11
21	1,07	1,76	64,49
22	>12	23,70	/
23	4,09	5,13	25,43
24	6,2	4,98	-19,68
25	5,9	4,99	-15,42
26	4,1	3,31	-19,27
27	0,1	0,19	80,00
28	0,1	0,19	80,00
29	>12	11,7	/
30	>12	8,3	/
31	>12	13,1	/
32	>12	8,89	/
33	1,1	0,9	-27,27
\bar{X}	4,846	4,773	+4,41

Dobiveno srednje odstupanje (*bias*) između metoda pri određivanju ADA u uzorcima seruma iznosi 4,41%. Međutim, više od 5 % vrijednosti (više od 2 para mjerenja) ima veće odstupanje od kriterija prihvatljivosti od 20%.

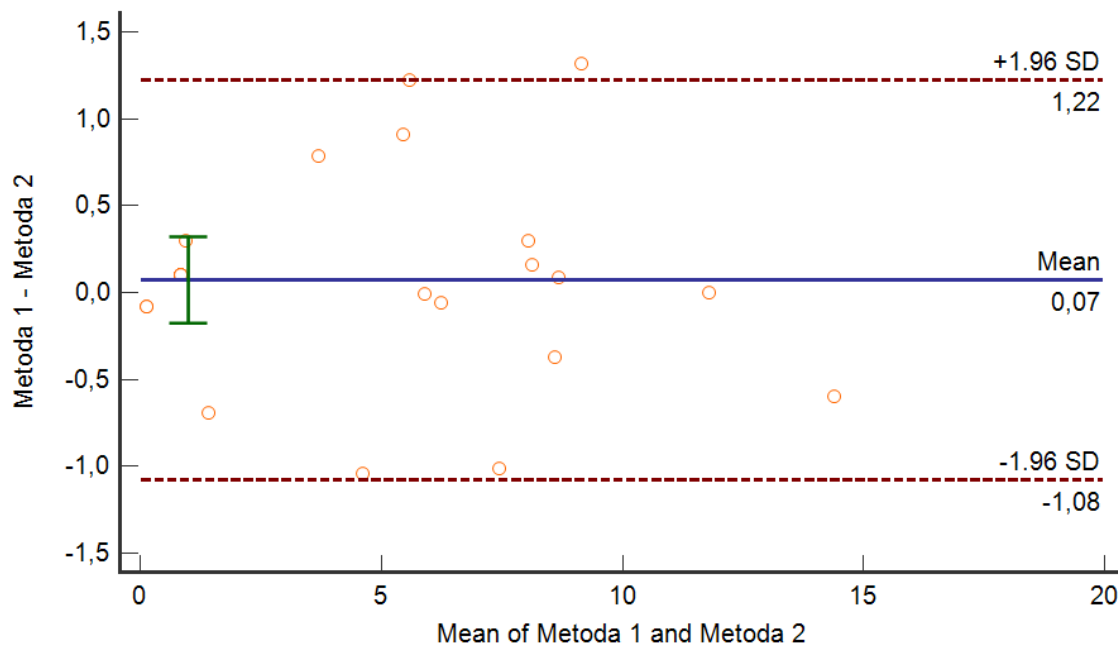
Tablica 8. Koncentracije INF (mg/L) u 33 uzorka izmjerene Metodom 1 i Metodom 2 te pripadajući izračunati *bias* (%).

Broj	Metoda 1	Metoda 2	<i>Bias</i> (%)
1	0,90	0,80	-11,11
2	8,00	8,70	8,75
3	14,20	11,30	-20,42
4	20,60	19,10	-7,28
5	8,20	7,31	-10,85
6	16,60	18,80	13,25
7	21,20	23,60	11,32
8	5,40	4,24	-21,48
9	14,50	12,40	-14,48
10	6,70	8,70	29,85
11	4,80	6,98	45,42
12	1,56	2,65	69,87
13	>12	28,20	/
14	0,90	0,80	-11,11
15	3,51	2,27	-35,33
16	>12	11,40	/
17	11,20	9,81	-12,41
18	3,82	3,26	-14,66
19	8,10	5,95	-26,54
20	0,90	0,80	-11,11
21	>12	12,30	/
22	0,90	1,06	17,78
23	5,40	3,99	-26,11
24	>12	16,10	/
25	7,00	7,03	0,43
26	3,00	2,94	-2,00
27	2,90	4,91	69,31
28	1,41	2,28	61,70
29	15,60	17,40	11,54
30	9,40	7,90	-15,96
31	>12	11,70	/
32	>12	18,80	/
33	11,40	9,24	-18,95
\bar{X}	7,707	7,564	+2,94

Dobiveno srednje odstupanje (*bias*) između metoda pri određivanju INF u uzorcima seruma iznosi 2,94 %. Međutim, više od 5 % vrijednosti (više od 2 para mjerenja) ima veće odstupanje od kriterija prihvatljivosti od 20 %.

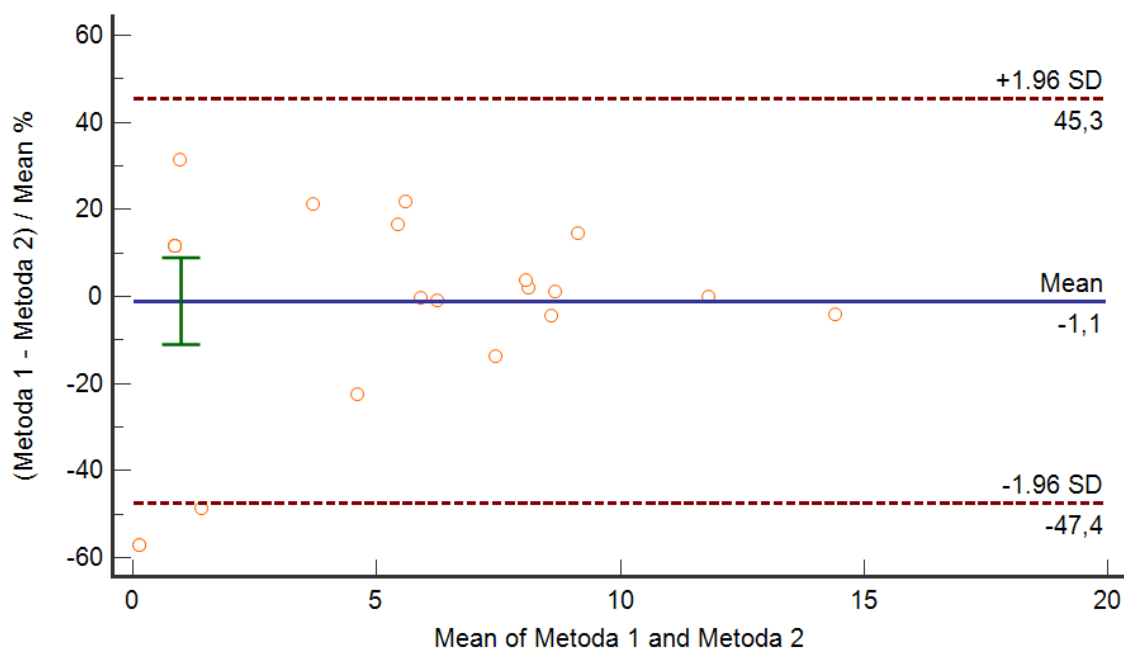
Rezultati statističke analize Bland – Altman, pri određivanju ADA, prikazani su Slici 9 i 10. Na Slici 9 prikazani su rezultati analize konstantnog odstupanja. Na apscisi se nalaze srednje vrijednosti dviju korištenih metoda pri određivanju ADA, a na ordinati razlika u apsolutnoj vrijednosti. Na oba grafikona je označena srednja vrijednost razlika mjerenja (engl. *Mean*) plavom linijom te 95 %-tni interval pouzdanosti za srednju razliku zelenim linijama. Označene su i granice prihvatljivosti $\pm 1,96$ SD crvenim isprekidanim linijama.

Srednja razlika pri određivanju koncentracije ADA iznosi 0,073 mg/L, a 95 %-tni interval pouzdanosti -0,175 – 0,321 mg/L. Interval u kojem se nalazi 95 % razlika uparenih mjerenja iznosi -1,077 – 1,223 mg/L. Budući da 95 %-tni interval pouzdanosti za srednju vrijednost razlika mjerenja sadrži nulu, zaključuje se da nije prisutno statistički značajno konstantno odstupanje.



Slika 9. Grafički prikaz Bland – Altmanove analize konstantnog odstupanja određivanja ADA

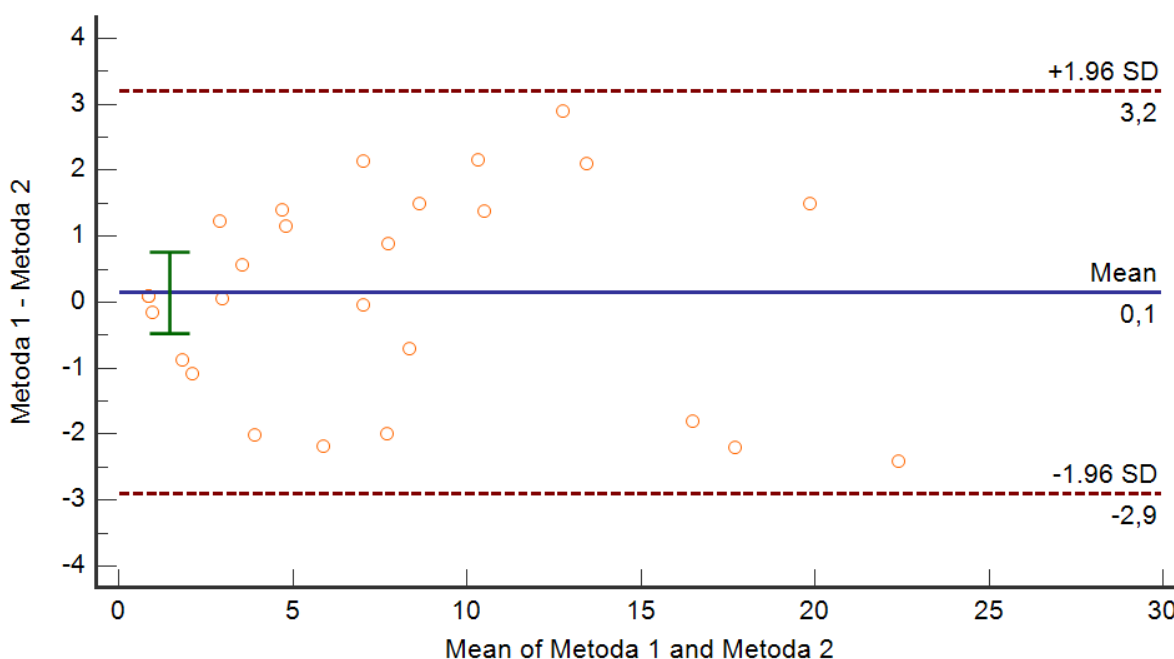
Na Slici 10. prikazani su rezultati analize proporcionalnog odstupanja. Na apscisi se nalaze srednje vrijednosti dviju korištenih metoda pri određivanju ADA, a na ordinati razlika u postotku. Prosječna vrijednost razlike uparenih mjerenja iznosi $-1,067\%$, dok 95% -tni interval pouzdanosti $-11,058 - 8,925\%$. Interval u kojem se nalazi 95% razlika uparenih mjerenja iznosi $-47,443 - 45,310\%$. Budući da 95% -tni interval pouzdanosti za srednju vrijednost razlika mjerenja sadrži nulu, zaključuje se da nije prisutno statistički značajno proporcionalno odstupanje.



Slika 10. Grafički prikaz Bland – Altmanove analize proporcionalnog odstupanja određivanja ADA

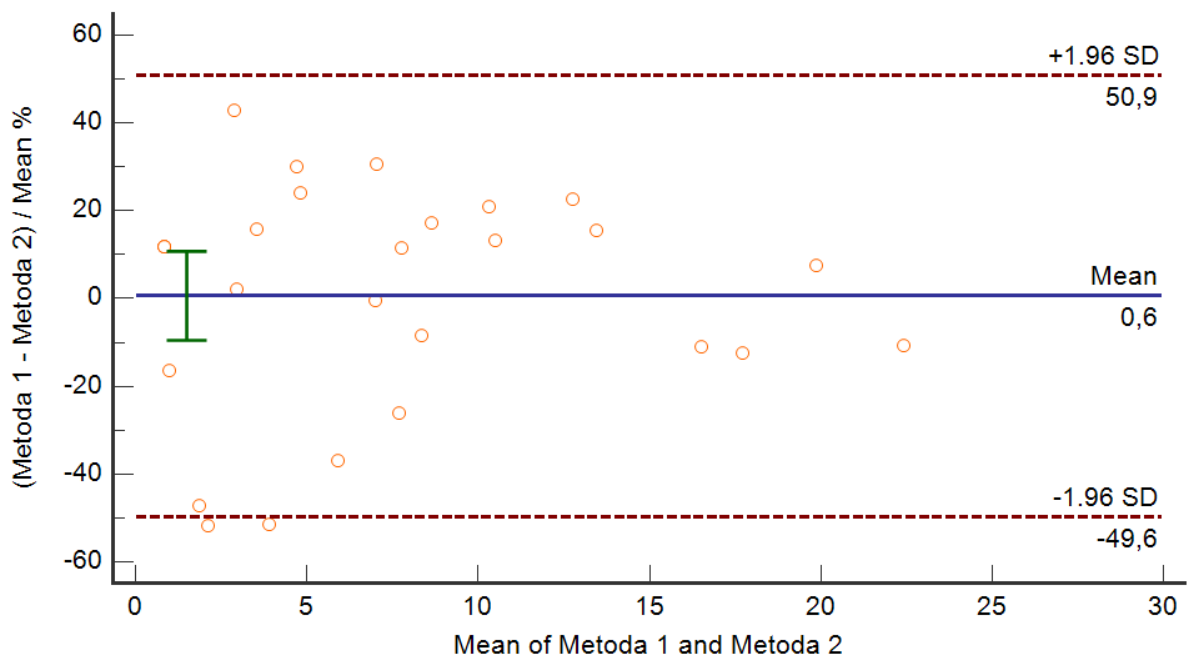
Rezultati statističke analize Bland – Altman, za određivanje INF, prikazani su na Slici 11 i 12. Na Slici 11. prikazani su rezultati analize konstantnog odstupanja. Na apscisi se nalaze srednje vrijednosti dviju korištenih metoda pri određivanju INF, a na ordinati razlika u apsolutnoj vrijednosti. Na oba grafikona je označena srednja vrijednost razlika mjerenja (engl. *Mean*) plavom linijom te 95 %-tni interval pouzdanosti za srednju razliku zelenim linijama. Označene su i granice prihvatljivosti $\pm 1,96$ SD crvenim isprekidanim linijama.

Srednja razlika pri određivanju koncentracije infliksimaba iznosi 0,144 mg/L, a 95 %-tni interval pouzdanosti -0,473 – 0,760 mg/L. Interval u kojem se nalazi 95 % razlika uparenih mjerenja iznosi -2,909 – 3,197 mg/L. Budući da 95 %-tni interval pouzdanosti za srednju vrijednost razlika mjerenja sadrži nulu, zaključuje se da nije prisutno statistički značajno konstantno odstupanje.



Slika 11. Grafički prikaz Bland – Altmanove analize konstantnog odstupanja određivanja INF

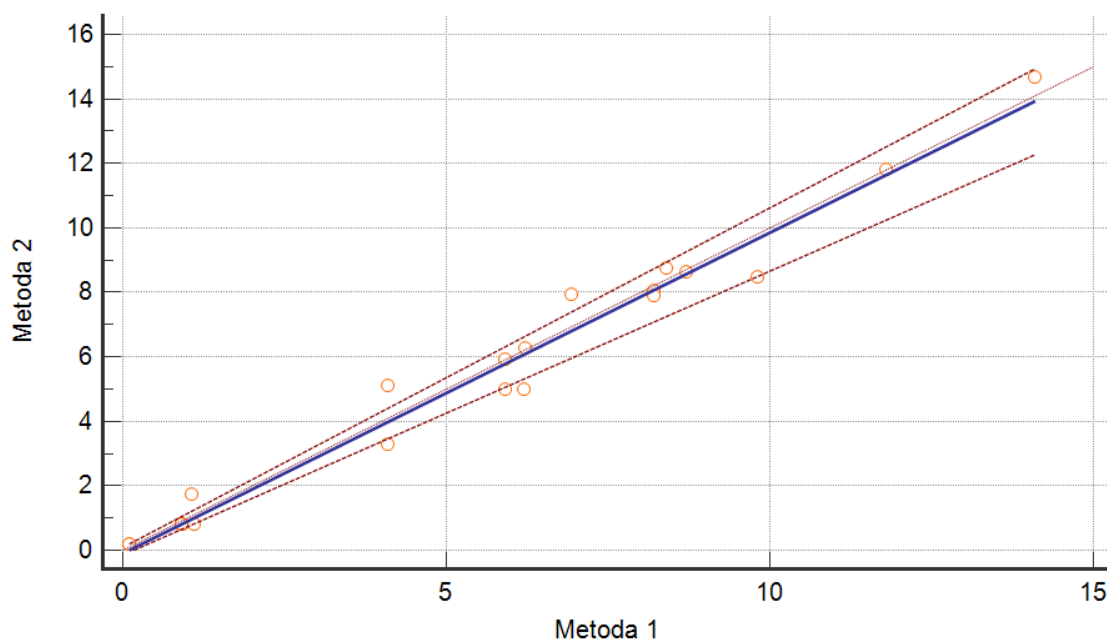
Na Slici 12. prikazani su rezultati analize proporcionalnog odstupanja. Na apscisi se nalaze srednje vrijednosti dviju korištenih metoda pri određivanju INF, a na ordinati razlika u postotku. Prosječna vrijednost razlike uparenih mjerenja iznosi 0,632 %, dok 95 %-tni interval pouzdanosti -9,515 – 10,778%. Interval u kojem se nalazi 95 % razlika uparenih mjerenja iznosi -49,642 – 50,905 %. Budući da 95 %-tni interval pouzdanosti za srednju vrijednost razlika mjerenja sadrži nulu, zaključuje se da nije prisutno statistički značajno proporcionalno odstupanje.



Slika 12. Grafički prikaz Bland – Altmanove analize proporcionalnog odstupanja određivanja INF

Statistički rezultati regresijske analize Passing – Bablok prikazani su na Slici 13 i 14. Na oba grafikona je označen regresijski pravac plavom bojom, 95%-tni interval pouzdanosti isprekidanom crvenom linijom te referenti pravac za lakšu usporedbu rezultata. Referenti pravac prikazuje idealno slaganje metoda.

Statistički rezultati regresijske analize Passing – Bablok, za određivanje ADA, prikazani su na Slici 13. Regresijskom analizom statističkim programom MedCalc® dobivena je jednadžba pravca sa svojim vrijednostima odsječka na ordinati (vrijednosti a) te koeficijenta smjera pravca (vrijednost b) (Tablica 9). Raspon koji obuhvaća interval pouzdanosti odsječka na ordinati iznosi $-0,148 - 0,092$. Budući da interval pouzdanosti za vrijednost a obuhvaća vrijednost nula, može se zaključiti da ne postoji konstantno odstupanje između rezultata korištenih metoda. Interval pouzdanosti koeficijenta smjera iznosi $0,881 - 1,053$. Budući da je tim intervalom obuhvaćena vrijednost 1, može se zaključiti da ne postoji proporcionalno odstupanje između rezultata korištenih metoda.



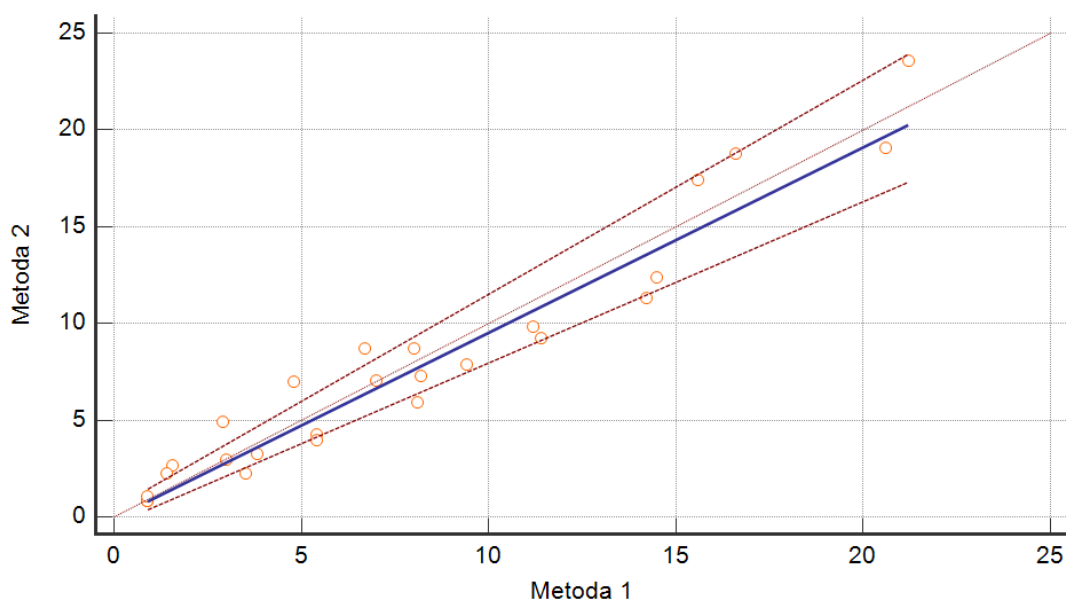
Slika 13. Grafički prikaz Passing – Bablok analize određivanja ADA

Tablica 9. Jednadžba regresijskog pravca određivanja ADA i vrijednosti 95 % CI za odsječak na ordinati i koeficijent smjera

$y = 0,095 + 0,995 x$	
Konstanto odstupanje	
Odsječak na ordinati, a	0,095
95 % CI	-0,148 – 0,092
Proporcionalno odstupanje	
Koeficijent smjera, b	0,995
95 % CI	0,881 – 1,053

CI – interval pouzdanosti (engl. *Confidence Interval*)

Statistički rezultati regresijske analize Passing – Bablok, za određivanje INF, prikazani su na Slici 14. Regresijskom analizom statističkim programom MedCalc dobivena je jednadžba pravca sa svojim vrijednostima odsjeka na ordinati (vrijednosti a) te koeficijenta smjera pravca (vrijednost b) (Tablica 10). Raspon koji obuhvaća interval pouzdanosti odsjeka na ordinati iznosi -0,381 – 0,439. Budući da interval pouzdanosti za vrijednost a obuhvaća vrijednost nula, može se zaključiti da ne postoji konstantno odstupanje između rezultata korištenih metoda. Interval pouzdanosti koeficijenta smjera iznosi 0,834 – 1,107. Budući da je tim intervalom obuhvaćena vrijednost 1, može se zaključiti da ne postoji proporcionalno odstupanje između rezultata korištenih metoda.



Slika 14. Grafički prikaz Passing – Bablok analize određivanja INF

Tablica 10. Jednadžba regresijskog pravca određivanja INF i vrijednosti 95%CI za odsječak na ordinati i koeficijent smjera

y = -0,062 + 0,958 x	
Konstanto odstupanje	
Odsječak na ordinati, a	-0,062
95 % CI	-0,381 – 0,439
Proporcionalno odstupanje	
Koeficijent smjera, b	0,958
95 % CI	0,839 – 1,107

CI – interval pouzdanosti (engl. *Confidence Interval*)

USPOREDBA KATEGORIJA REZULTATA

U Tablicama 11. i 12. prikazani su rezultati kapa statistike za podudarnost kategorizacije rezultata ADA i INF izmjerenih ELISA metodom i metodom imunonefelometrije.

Tablica 11. Rezultati kapa statistike za podudarnost ELISA i imunonefelometrijske metode u mjerenju koncentracije ADA.

Nefelometrija ADA kategorije	ELISA ADA kategorije			
	1	2	3	
1	10	1	0	11 (33,3%)
2	0	6	1	7 (21,2%)
3	0	0	15	15 (45,5%)
	10 (30,3%)	7 (21,2%)	16 (48,5%)	33

Kappa vrijednost	0,935
Standardna pogreška	0,045
95% CI	0,847 - 1,000

Donja granica 95%CI za kapa koeficijent je na razini prihvatljive, snažne podudarnosti.

Tablica 12. Rezultati kapa statistike za podudarnost ELISA i imunonefelometrijske metode u mjerenju koncentracije INF.

Nefelometrija INF kategorija	ELISA INF kategorija			
	1	2	3	
1	6	1	0	7 (21,2%)
2	0	7	1	8 (24,2%)
3	0	1	17	18 (54,5%)
	6 (18,2%)	9 (27,3%)	18 (54,5%)	33
Kappa vrijednost				0,888
Standardna pogreška				0,063
95% CI				0,765 -1,000

Donja granica 95%CI za kapa koeficijent je na razini prihvatljive, osrednje podudarnosti.

4.3. ISPITIVANJE GRANICE KVANTIFIKACIJE

Rezultati ispitivanja granice kvantifikacije prikazani su Tablicama 13 i 14. U tablicama se nalaze izmjerene koncentracije analita (mg/L) te dozvoljeno odstupanje od ciljne vrijednosti. Ciljna vrijednost pri provjeri granice kvantifikacije za ADA iznosi 0,39 mg/L te 0,37 mg/L za INF. Kriterij za dopuštenu ukupnu pogrešku iznosi 25 %. Interval prihvatljivosti obuhvaća vrijednosti 0,30 – 0,49 mg/L za adalimumab te 0,28 – 0,47 mg/L za infliksimab.

Tablica 13. Rezultati ispitivanja granice kvantifikacije određivanja ADA

	1	2	3	4	5	6	7
Dan 1	0,40	0,37	0,40	0,38	0,37	0,36	0,39
Dan 2	0,38	0,29	0,27	0,33	0,34	0,33	0,31
Dan 3	0,38	0,33	0,35	0,37	0,32	0,36	0,34
Ciljna vrijednost	0,39 mg/ L						
Odstupanje	25 %						
	Donja granica		0,30 mg/ L				
	Gornja granica		0,49 mg/ L				
Broj rezultata izvan granice prihvatljivosti: 2							

Tablica 14. Rezultati ispitivanja granice kvantifikacije kod određivanja INF

	1	2	3	4	5	6	7
Dan 1	0,37	0,41	0,39	0,35	0,38	0,37	0,39
Dan 2	0,35	0,36	0,33	0,31	0,33	0,33	0,33
Dan 3	0,35	0,38	0,34	0,35	0,36	0,36	0,36
Ciljna vrijednost	0,37 mg/ L						
Odstupanje	25 %						
	Donja granica			0,28 mg/ L			
	Gornja granica			0,47 mg/ L			
Broj rezultata izvan granice prihvatljivosti: 0							

4.4. RASPRAVA

Prije uvođenja nove metode u rutinski rad laboratorija potrebno je provesti postupak verifikacije. Verifikacija nove metode N Latex aTNF α (Siemens Healthineers) za kvantitativno određivanje ADA i INF uključila je provjeru preciznosti, usporedbu s ručnom metodom koja se trenutno koristi u laboratoriju (ELISA, RIDASCREEN® ADA/IFX Monitoring, R-Biopharm AG) te provjeru deklarirane granice kvantifikacije.

Dobivene vrijednosti uspoređene su s unaprijed definiranim kriterijima preuzetim iz deklaracije proizvođača. Dobivene vrijednosti za visoku i nisku koncentracijsku razinu INF pokazale su zadovoljavajuću unutarlaboratorijsku nepreciznost, ali ne i zadovoljavajuću ponovljivost. Također, vrijednosti CV ponovljivosti i unutarlaboratorijske nepreciznosti za visoku i nisku razinu ADA veće su od deklariranih. Pri tom treba uzeti u obzir da su deklarirana ponovljivost i unutarlaboratorijska nepreciznost vrlo često precijenjeni od strane proizvođača zbog strogo kontroliranih uvjeta u kojima se izvodi validacija. U interpretaciji dobivenih rezultata provjere nepreciznosti metode treba biti kritičan i voditi se kliničkim značajem dobivenog odstupanja u odnosu na deklaraciju proizvođača te se poslužiti i podacima iz dostupne literature. Tako je Lin H. (2021) provodeći evaluaciju nepreciznosti N Latex imunonefelometrijske metode za određivanje slobodnih lakih lanaca imunoglobulina u serumu koristeći kontrolne uzorke proizvođača Siemens Healthineers, dobio vrijednosti ponovljivosti i unutarlaboratorijske preciznosti veće od onih deklariranih od proizvođača. Prema smjernicama za validaciju bioanalitičkih metoda (Kadian i sur, 2016.), kriterij prihvatljivosti za nepreciznost iznosi 20%, što metode ispitivane u ovom radu zadovoljavaju. S obzirom na minimalno odstupanje od deklarirane nepreciznosti koje neće značajno utjecati na interpretaciju rezultata zaključeno je da metoda ima zadovoljavajuću ponovljivost i unutarlaboratorijsku nepreciznost pri određivanju ADA i INF.

Usporedbom koncentracija dobivenih s obje metode dobiven je zadovoljavajući srednji *bias*, međutim, veliki broj parova usporedbi ne zadovoljava definiran kriterij. Statističkom obradom Bland - Altman pokazano je da između Metode 1 i Metode 2 nema statistički značajnog proporcionalnog ni konstantnog odstupanja. Međutim, iz grafičkih prikaza Bland-Altman analize vidljiv je široki raspon unutar kojeg se nalazi 95 % rezultata ($D \pm 1,96 SD$) za ADA i IFN. Razlog tome je što je usporedba rađena na većem udjelu niskih koncentracija jer koncentracije >12 mg/L dobivene ELISA testom nismo mogli uspoređivati. Velika razlika izražena u % za niske koncentracije u konačnici doprinosi srednjoj razlici mjerenja. Treba uzeti u obzir i činjenicu da različite imunokemijske metode u pravilu nisu usporedive na razini

kvantitativnih vrijednosti zbog nestandardiziranosti metoda, odnosno nedostatka referentnog standarda te upotrebi antigena i antitijela iz različitih izvora. Regresijskom analizom Passing – Bablok dobivena je regresijska jednadžba $y = -0,095$ (95 % CI $-0,148 - 0,092$) + $0,995$ (95 % CI $0,881 - 1,053$) za ADA, dok je za INF dobivena jednadžba $y = -0,062$ (95 % CI $-0,381 - 0,439$) + $0,958$ (95 % CI $0,834 - 1,107$). Rezultati su pokazali da ne postoji statistički značajno odstupanje između ispitivanih metoda.

Usporedbom ELISA metode s CMIA metodom, Berger i sur. (2022) također su potvrdili postojanje značajnijeg srednjeg odstupanja (10 % za ADA i 8 % za INF) pri niskim koncentracijama lijeka uz širok raspon unutar kojeg se nalazi 95 % dobivenih rezultata.

Ispitivanjem granice kvantifikacije potvrđen je LoQ od 0,39 mg/L za ADA te 0,37 mg/L za INF, dok je deklarirani LoQ proizvođača 0,3 mg/L za ADA i INF. Broj rezultata izvan granica prihvatljivosti manji je od 4 za oba lijeka. Time je zaključeno da se deklarirane vrijednosti LoQ-a mogu prihvatiti i kao takve koristiti u rutinskome radu laboratorija.

Provjerom podudarnosti u kategorizaciji rezultata izmjerenih koncentracija dokazana je prihvatljiva, snažna podudarnost pri određivanju ADA te prihvatljiva, osrednja podudarnost pri određivanju INF. Međutim, kako bi se mogao izračunati kapa-koeficijent potrebno je provesti ispitivanje na minimalno 30 uzoraka, pri čemu je potrebno minimalno 10 uzoraka u pojedinoj kategoriji. Ovim ispitivanjem taj uvjet nije zadovoljen, stoga rezultate ovog statističkog testa treba interpretirati s oprezom.

Najveća prednost ispitivane N Latex metode u odnosu na ručnu metodu je ta da omogućuje potpuno automatizirani postupak bez prethodne obrade uzorka, dok je ELISA ručna metoda podložna ljudskoj pogrešci, kontaminaciji uzorka te kontaminaciji reagensa. Također, nova metoda kao automatizirana omogućuje brže vrijeme analize, bolju reproducibilnost u odnosu na ručnu metodu te uštedu osoblja i bolju zaštitu od kontakta s biološkim materijalom. Iako se metode nisu pokazale u potpunosti usporedivima u kvantitativnim vrijednostima, usporedivost u smislu kliničke interpretacije je zadovoljavajuća. Važno je napomenuti da je najbolja podudarnost između metoda zabilježena u području subterapijskih koncentracija lijeka koje, očekivano, impliciraju određene kliničke odluke. Općenito pravilo kod imunokemijskih metoda, pa tako i metoda za određivanje koncentracije lijekova je uvijek koristiti istu metodu prilikom longitudinalnog praćenja terapije (Berger i sur., 2022). Međutim, uočene razlike najviše se ističu u subterapijskoj koncentraciji lijeka stoga imaju ograničen potencijal utjecaja na donošenje kliničke odluke o uvođenju metoda u rutinsku upotrebu..

5. ZAKLJUČCI

Prilikom postupka verifikacije metode N Latex aTNF α (Siemens Healthineers) za kvantitativno određivanje bioloških lijekova adalimumaba i infliksimaba, statističkom obradom i pregledom dobivenih rezultata doneseni su slijedeći zaključci.

1. Novi sustav predstavlja automatiziran postupak bez prethodne pripreme uzorka čime osigurava kraće vrijeme analize i bolju zaštitu osoblja od kontakta s biološkim materijalom.
2. Nepreciznost ispitivanog testa zadovoljava i čini test prihvatljivim za kliničku upotrebu.
3. Između koncentracija dobivenih ELISA metodom RIDASCREEN® ADA/INF Monitoring (R-Biopharm AG) i imunonefelometrijskom metodom N Latex aTNF α (Siemens Healthineers) ne postoji statistički značajno proporcionalno niti konstantno odstupanje. Ipak, kvantitativne vrijednosti nisu u potpunosti usporedive.
4. Testovi N Latex aTNF α ADA/INF (Siemens Healthineers) i RIDASCREEN® ADA/IFX Monitoring (R-Biopharma AG) statistički se značajno podudaraju u kategorizaciji rezultata u tri interpretativne kategorije (subterapijska, terapijska i visoka koncentracija).
5. Ispitivanjem granice kvantifikacije dobiveni su rezultati koji zadovoljavaju unaprijed definirane kriterije stoga se prihvaća deklarirana granica kvantifikacije.
6. Na temelju provedene verifikacije zaključuje se da je ispitivana metoda za kvantitativno određivanje adalimumaba i infliksimaba prikladna za uvođenje u rutinski rad laboratorija.

6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

ADA	Adalimumab
CB	Crohnova bolest
CI	interval pouzdanosti; engl. <i>Confidence Interval</i>
CLSI	Institut za kliničke i laboratorijske standarde; engl. <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CV	koeficijent varijacije; engl. <i>Coefficient of Variation</i>
D	srednja vrijednost razlike; engl. <i>Mean Diferrence</i>
ECCO	Europska organitacija za Crohnovu bolest i kolitis; engl. <i>European Crohn's and Colitis Organization</i>
ELISA	enzimska imunokemijska metoda; engl. <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
IBD	upalne bolesti crijeva; engl. <i>Inflammatory bowel disease</i>
IL	Interleukin
INF/IFX	Infliksimumab
LC MS/MS	tandemska masena spektrofotometrija s tekućinskom kromatografijom; engl. <i>Liquid Chromatography tandem mass spectrometry</i>
LED	svjetleća dioda; engl. <i>Light-emitting diode</i>
LOD	granica detekcije; engl. <i>Limit of Detection</i>
LOQ	granica kvantifikacije; engl. <i>Limit of Quantification</i>
PA	psorijatični artritis
PS	psorijatični artritis
RA	reumatoidni artritis
s	standardna devijacija razlika
SAD	Sjedinjene Američke Države
Sb	validacijska međupreciznost kod ponovljenih mjerenja

Sd	standardno odstupanje
Sl	unutarlaboratorijsko standardno odstupanje
sl.	slično
Sr	standardno odstupanje za 5 dana
TDM	terapijsko praćenje koncentracije lijeka; engl. <i>Therapeutic Drug Monitoring</i>
TNF- α	faktor tumorske nekroze alfa; engl. <i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
UC	ulcerozni kolitis
α	grčko slovo alfa
κ	grčko slovo kapa
μ	grčko slovo mi

7. LITERATURA

Baza lijekova, HALMED, <https://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova>, pristupljeno 15.4.2023.

Berger, AE, Gleizes A, Waeckel L, Roblin X, Krzysiek R, Hacein-Bey-Abina S, Soriano A, Paul S. Validation Study of a New Random-Access Chemiluminescence Immunoassay Analyzer i-TRACK10® to Monitor Infliximab and Adalimumab Serum trough Levels and Anti-Drug Antibodies. *Int J Mol Sci.* 2022, 23, 9561.

Bilić-Zulle L. Analitička evaluacija metoda. U: Osnove biostatistike u svakodnevnoj praksi. Priručnik za trajno usavršavanje Šimundić A.M., urednica, Zagreb, Medicinska naklada, 2008, str. 57-65.

Billmeier U, Dieterich W, Neurath MF, Atreya R. Molecular mechanism of action of anti-tumor necrosis factor antibodies in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol.* 2016, 22(42):9300-13.

Brunton LL, Hilal-Dandan R, Knollmann BC. Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics. McGraw-Hill Education, 2018.

Cattaneo D, Cusato J. Therapeutic drug monitoring of TNF α inhibitors: a spotlight on novel techniques and assays. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2022, 18:10, 615-618.

Cessak G, Kuzawińska O, Burda A, Lis K, Wojnar M, Mirowska-Guzel D, Bałkowiec-Iskra E. TNF inhibitors - Mechanisms of action, approved and off-label indications. *Pharmacol Rep*, 2014, 66(5):836-44.

Cheifetz S.A., Abreu T.M. Afif W. i sur. A comprehensive literature review and expert consensus statement on therapeutic drug monitoring of biologics in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*, 2021, 116

Ćelap I, Vukasović I, Juričić G, Šimundić A. Preporuke Radne grupe za mjernu nesigurnost HDMBLM-a i HKMB-a. HDMBLM preporuka, 2018

Giavarina D. Undersatnding Bland Altman analysis. *Biochem Med*, 2015, 25(2):141-51.

Jang, D.-i., Lee, A-H., Shin, H.-Y., Song, H.-R., Park, J.-H., Kang, T.-B., Lee, S.-R., Yang, S.-H. The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) in Autoimmune Disease and Current TNF- α Inhibitors in Therapeutics. *Int J Mol Sci*, 2021, 22, 2719.

Kadian N, Raju KS, Rashid M, Malik MY, Taneja I, Wahajuddin M. Comparative assessment of bioanalytical method validation guidelines for pharmaceutical industry. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 126:83-97.

Leinco Tehnologies Inc., <https://www.leinco.com/types-of-elisa-kits>, pristupljeno 20.4.2023.

McHugh ML. Interrater reliability: the kappa statistic. *Biochem Med*, 2012, 22(3):276-282.

Lin H. Evaluation of the Siemens N Latex free light chain assay and comparison to Binding Site Freelite™ assay. *Am J Clin Pathol*, 2021, 156:21-165

Miler, M. (2022) Povezanost polimorfizama gena za TNF- α s učinkovitošću terapije antagonistima TNF- α infliksimabom i adalimumabom i brzinom razvoja protutijela na lijekove. Doktorski rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko – biokemijski fakultet.

Radišić Biljak V. Verifikacija metoda, Seminar, kolegij: Evaluacija instrumenata, postupaka i reagensa, Merlin 22/23, Zagreb, 2022.

Rosen MJ, Minar P and Vinks AA. Review article: applying pharmacokinetics to optimize dosing of anti-TNF biologics in acute severe ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther*, 2015, 41: 1094–1103.

Sanchez-Hernandez JG, Rebollo N., Munoz F., Martin – Suarez, Calvo MV. Therapeutic drug monitoring of tumor necrosis factor in the management of chronic inflammatory diseases. *Ann. Clin. Biochem*, 2019, 28-41.

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

Šimundić A. Interval pouzdanosti. *Biochem Med*, 2008, 18(2):154-161.

The Journal of Rheumatology, <https://www.jrheum.org/content/85/27/F6>, pristupljeno 8.7.2023.

8. SAŽETAK / SUMMARY

Faktor tumorske nekroze alfa prepoznat je kao glavni regulator upalnog odgovora, ali i kao pro-upalni citokin uključen u patogenezu nekih autoimunih bolesti. Iz tog razloga stvoreni su antagonisti TNF- α . Farmakokinetička varijabilnost, nuspojave vezane uz koncentraciju lijeka i uski terapijski raspon čine terapijsko praćenje koncentracije ovih lijekova korisnim u kliničkoj praksi.

U ovome radu opisan je postupak verifikacije kvantitativne imunonefelometrijske metode N Latex aTNF α (Siemens Healthineers) za određivanje lijekova adalimumaba i infliksimaba na potpuno automatiziranom analizatoru Atellica® NEPH 360 (Siemens Healthineers) u uzorku seruma. Verifikacija je obuhvatila ispitivanje preciznosti koristeći kontrolne uzorke proizvođača, usporedbu s enzimskim imunokemijskim testom RIDASCREEN® ADA/IFX Monitoring (R-Biopharm AG) te provjeru granice kvantifikacije. Verifikacija je provedena u Zavodu za kliničku kemiju, KBC Sestre milosrdnice u Zagrebu.

Postupak je obuhvatio 66 uzorka seruma pacijenata u kojima je zatražena kvantifikacija ADA (N = 33) ili INF (N = 33). Ponovljivost i unutarlaboratorijska nepreciznost za određivanje ADA iznosi 5,0 % i 5,4 % za visoku razinu te 4,6 % i 4,7 % za nisku razinu kontrola, dok za određivanje INF iznosi 7,2 % i 6,1 % za visoku razinu te 4,5 % i 4,0 % na nisku razinu kontrole. Usporedba metoda je potvrdila da ne postoji proporcionalno ni konstanto odstupanje između metoda. Regresijskom analizom dobivena je jednadžba $y = -0,095$ (95%CI -0,148– 0, 092) + 0,995 (95%CI 0,881– 1,053) za ADA, dok za INF $y = -0,062$ (95%CI -0,381 – 0,439) + 0,958 (95%CI 0,834 – 1,107). Bland-Altman analiza potvrdila da je da ne postoji statistički značajno konstantno niti proporcionalno odstupanje. Provjerom LoQ potvrđeni su deklarirane vrijednosti proizvođača pri određivanju ADA (0,37 mg/L) i INF (0,39 mg/L). Rezultati verifikacije su potvrdili prikladnost ispitivane metode pri kvantitativnom određivanju ADA i INF.

Tumor necrosis factor alpha is recognized as the main regulator of the inflammatory response, but also as a pro-inflammatory cytokine involved in the pathogenesis of some autoimmune diseases. For this reason, TNF- α antagonists were designed. Pharmacokinetic variability, drug concentration-related side effects and a narrow therapeutic range make therapeutic concentration monitoring of these drugs useful in clinical practice.

This thesis describes the verification procedure of the quantitative immunonephelometric method N Latex aTNF α (Siemens Healthineers) for the measurement of the drugs adalimumab and infliximab on the automated analyzer Atellica® NEPH 360 (Siemens Healthineers) in a serum sample. The verification included the study of precision using quality control samples, comparison with the enzyme immunochemical test RIDASCREEN® ADA/IFX Monitoring (R-Biopharm AG) and a study of the limit of quantification. The verification was carried out at the Department of Clinical Chemistry, Sestre milosrdnice University Hospital Center, Zagreb.

The procedure included 66 serum samples from patients in whom ADA (N = 33) or INF (N = 33) quantification was requested. Repeatability and within-laboratory imprecision for the determination of ADA was 5.0% and 5.4% for the high level QC and 4.6% and 4.7% for the low level QC, while for the determination of INF was 7.2% and 6.1% for the high level QC and 4.5% and 4.0% to a low level QC. The comparison of the methods confirmed that there is no proportional or constant deviation between the methods. Regression analysis yielded the equation $y = -0.095$ (95%CI -0.148– 0.092) + 0.995 (95%CI 0.881– 1.053) for ADA, while for INF $y = -0.062$ (95%CI -0.381 – 0.439) + 0.958 (95%CI 0.834 – 1.107). Bland-Altman analysis confirmed there is no statistically significant constant nor proportional deviation. The LoQ study confirmed the manufacturer declared values for ADA (0.37 mg/L) and INF (0.39 mg/L). The verification results confirmed the suitability of the tested method for the quantitative determination of ADA and INF.

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

VERIFIKACIJA NEFELOMETRIJSKE METODE KOD ODREĐIVANJA ANTI-TNF-ALFA

Iva Otmačić

SAŽETAK

Faktor tumorske nekroze alfa prepoznat je kao glavni regulator upalnog odgovora, ali i kao pro-upalni citokin uključen u patogenezu nekih autoimunih bolesti. Iz tog razloga stvoreni su antagonisti TNF- α . Farmakokinetička varijabilnost, nuspojave vezane uz koncentraciju lijeka i uski terapijski raspon čine terapijsko praćenje koncentracije ovih lijekova korisnim u kliničkoj praksi.

U ovome radu opisan je postupak verifikacije kvantitativne imunonefelometrijske metode N Latex aTNF α (Siemens Healthineers) za određivanje lijekova adalimumaba i infliksimaba na potpuno automatiziranom analizatoru Atellica® NEPH 360 (Siemens Healthineers) u uzorku seruma. Verifikacija je obuhvatila ispitivanje preciznosti koristeći kontrolne uzorke proizvođača, usporedbu s enzimskim imunokemijskim testom RIDASCREEN® ADA/IFX Monitoring (R-Biopharm AG) te provjeru granice kvantifikacije. Verifikacija je provedena u Zavodu za kliničku kemiju, KBC Sestre milosrdnice u Zagrebu.

Postupak je obuhvatio 66 uzorka seruma pacijenata u kojima je zatražena kvantifikacija ADA (N = 33) ili INF (N = 33). Ponovljivost i unutarlaboratorijska nepreciznost za određivanje ADA iznosi 5,0 % i 5,4 % za visoku razinu te 4,6 % i 4,7 % za nisku razinu kontrola, dok za određivanje INF iznosi 7,2 % i 6,1 % za visoku razinu te 4,5 % i 4,0 % na nisku razinu kontrole. Usporedba metoda je potvrdila da ne postoji proporcionalno ni konstantno odstupanje između metoda. Regresijskom analizom dobivena je jednadžba $y = -0,095$ (95%CI -0,148– 0, 092) + 0,995 (95%CI 0,881– 1,053) za ADA, dok za INF $y = -0,062$ (95%CI -0,381 – 0,439) + 0,958 (95%CI 0,834 – 1,107). Bland-Altman analiza potvrdila da je da ne postoji statistički značajno konstantno niti proporcionalno odstupanje. Provjerom LoQ potvrđeni su deklarirane vrijednosti proizvođača pri određivanju ADA (0,37 mg/L) i INF (0,39 mg/L). Rezultati verifikacije su potvrdili prikladnost ispitivane metode pri kvantitativnom određivanju ADA i INF.

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

Rad sadrži: 52 stranica, 14 grafičkih prikaza, 14 tablica i 22 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Faktor tumorske nekroze alfa, anti-TNF alfa, adalimumab, infliksimab, verifikacija metode, usporedba metoda, N Latex aTNF α

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

Komentor: **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. Roberta Petlevski, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Doc. dr. sc. Andrea Tešija Kuna, *spec. med. biochem.* Klinički bolnički centar Sestre milosrdnice, Zagreb

Rad prihvaćen: srpanj 2023.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

VERIFICATION OF LATEX ANTI-TNF-ALPHA NEPHELOMETRIC ASSAY

Iva Otmačić

SUMMARY

Tumor necrosis factor alpha is recognized as the main regulator of the inflammatory response, but also as a pro-inflammatory cytokine involved in the pathogenesis of some autoimmune diseases. For this reason, TNF- α antagonists were designed. Pharmacokinetic variability, drug concentration-related side effects and a narrow therapeutic range make therapeutic concentration monitoring of these drugs useful in clinical practice.

This thesis describes the verification procedure of the quantitative immunonephelometric method N Latex aTNF α (Siemens Healthineers) for the measurement of the drugs adalimumab and infliximab on the automated analyzer Atellica® NEPH 360 (Siemens Healthineers) in a serum sample. The verification included the study of precision using quality control samples, comparison with the enzyme immunochemical test RIDASCREEN® ADA/IFX Monitoring (R-Biopharm AG) and a study of the limit of quantification. The verification was carried out at the Department of Clinical Chemistry, Sestre milosrdnice University Hospital Center, Zagreb.

The procedure included 66 serum samples from patients in whom ADA (N = 33) or INF (N = 33) quantification was requested. Repeatability and within-laboratory imprecision for the determination of ADA was 5.0% and 5.4% for the high level QC and 4.6% and 4.7% for the low level QC, while for the determination of INF was 7.2% and 6.1% for the high level QC and 4.5% and 4.0% to a low level QC. The comparison of the methods confirmed that there is no proportional or constant deviation between the methods. Regression analysis yielded the equation $y = -0.095$ (95%CI -0.148– 0.092) + 0.995 (95%CI 0.881– 1.053) for ADA, while for INF $y = -0.062$ (95%CI -0.381 – 0.439) + 0.958 (95%CI 0.834 – 1.107). Bland-Altman analysis confirmed there is no statistically significant constant nor proportional deviation. The LoQ study confirmed the manufacturer declared values for ADA (0.37 mg/L) and INF (0.39 mg/L). The verification results confirmed the suitability of the tested method for the quantitative determination of ADA and INF.

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

Thesis includes: 52 pages, 14 figures, 14 tables and 22 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Tumor necrosis factor alpha, anti-TNF-alpha, adalimumab, infliximab, method verification, method comparison, N Latex aTNF α

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

Co-mentor: **Andrea Tešija Kuna, Ph.D.**, Assistant Professor, spec. med. biochem., Sestre milosrdnice University Hospital Center, Zagreb

Reviewers: **Donatella Verbanac, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Roberta Petlevski, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Andrea Tešija Kuna, Ph.D., Assistant Professor, spec. med. biochem., Sestre milosrdnice University Hospital Center, Zagreb

The thesis was accepted: July 2023.