

Ispitivanje stabilnosti ekstrakta fekalnog kalprotektina upotrebom komercijalnog sustava za ekstrakciju QUANTA Flash Calprotectin

Veltruski, Sanja

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:163:145645>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-23**



Repository / Repozitorij:

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



Sanja Veltruski

**Ispitivanje stabilnosti ekstrakta fekalnog
kalprotektina upotrebom komercijalnog sustava
za ekstrakciju QUANTA Flash[®] Calprotectin**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021. godina

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 dr. sc. Andree Tešija Kuna, spec. med. biokemije.

Zahvaljujem se svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Donatelli Verbanac, dipl. ing. med. biokemije kao i sumentorici dr. sc. Andrei Tešija Kuna, spec. med. biokemije na svim savjetima i uloženom trudu pri izradi ovog diplomskog rada.

Veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima, a posebno roditeljima i sestri te dečku Arminu i najboljoj prijateljici Valeriji što su uvijek vjerovali u mene i što su mi bili neizmjerena podrška tijekom školovanja.

Hvala kolegici Anamariji na uspješnoj suradnji i ugodnom društvu tijekom izrade eksperimentalnog dijela diplomskog rada.

Sadržaj

1.	UVOD	1
1.1.	Fekalni kalprotektin	1
1.2.	Probavni sustav	2
1.3.	Predanalitika	3
1.4.	Poslijeanalitika	4
1.5.	Stabilnost.....	4
1.6.	Klinička primjena.....	5
1.6.1.	Ulcerozni kolitis	5
1.6.2.	Crohnova bolest.....	5
1.6.3.	Sindrom iritabilnog crijeva.....	6
1.7.	Ograničenja metode	7
2.	OBRAZLOŽENJE TEME	8
3.	MATERIJALI I METODE	9
4.	REZULTATI.....	12
4.1.	Prikaz bias-a.....	12
4.2.	Prikaz promjena koncentracija fekalnog kalprotektina tijekom 120 sati.....	24
4.3.	Prikaz odstupanja vrijednosti fekalnog kalprotektina <i>ekstrakta 1 i 3</i> od <i>ekstrakta 2</i> istog uzorka	35
5.	RASPRAVA.....	37
6.	ZAKLJUČCI.....	40
7.	LITERATURA.....	41
8.	SAŽETAK/SUMMARY	43

1. UVOD

1.1. Fekalni kalprotektin

Fekalni kalprotektin je kalcij- i cink-vezujući protein iz S100 proteinske obitelji koji se uglavnom nalazi u neutrofilima, ali i u ostalim tjelesnim tekućinama (Pathirana i sur., 2018). Građen je od jednog lakog i dva teška polipeptidna lanca, ukupne molekularne mase od 36.5 kDa (<https://www.calprotectina.com/en/calprotectina>).

U neutrofilima čini 5% od ukupnih proteina, a 60% od citoplazmatskih proteina. U manjim količinama se nalazi u monocitima i makrofagima. Pripada skupini proteina akutne faze upale i potiče ispoljavanje staničnih receptora koji su uključeni u migraciju, adheziju i fagocitozu neutrofila, te pokreće kemotaksiju neutrofila prema mjestu infekcije/djelovanja. Posjeduje važnu ulogu u urođenom imunom odgovoru jer ima bakteriostatsko i mikostatsko djelovanje. U fecesu se nalazi zbog migracije neutrofila u gastrointestinalno tkivo uslijed prisustva upale, odnosno oštećenja mukoze crijeva. Stoga je fekalni kalprotektin dobar pokazatelj intestinalne upale i koristi se kao biomarker kod gastrointestinalnih poremećaja, posebice prilikom razlikovanja upalnih crijevnih bolesti (IBD, engl. *inflammatory bowel disease*) od sindroma iritabilnog crijeva (IBS, engl. *irritable bowel syndrome*). Njegova koncentracija u fecesu je šest puta veća nego u plazmi te se određuje za dijagnostiku, praćenje aktivnosti bolesti te za praćenje ponovnog relapsa bolesti. Također, određivanje koncentracije fekalnog kalprotektina može imati ulogu u liječenju infektivnog gastroenteritisa, akutnog apendicitisa, peptičke ulkusne bolesti, cistične fibroze, celijakije, odbacivanja transplantata i tijekom „graft versus host bolesti“ (Pathirana i sur., 2018). Međutim, u svezi ovih bolesti su potrebna daljnja istraživanja.

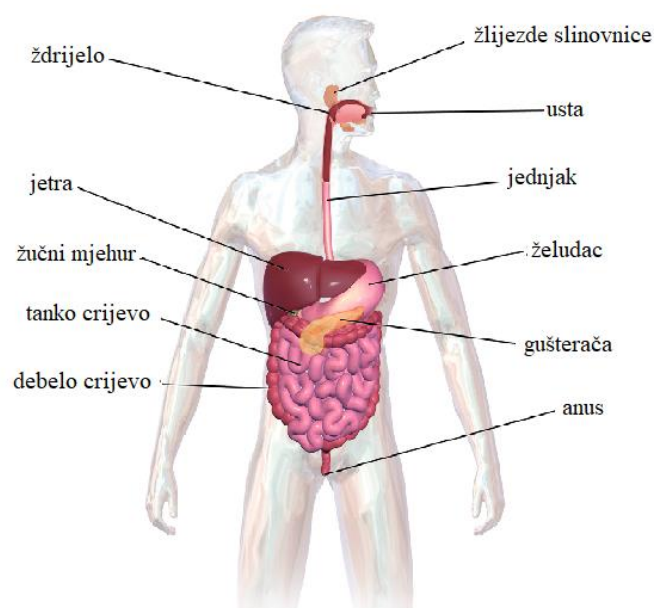
Određivanjem kalprotektina u serumu ili plazmi se ne može odrediti točno mjesto upale, a čimbenici kao što su dob, neki lijekovi i dnevne varijacije utječu na rezultate pretrage. Kalprotektin je otporan na razgradnju uslijed djelovanja proteolitičkih enzima izlučenih iz pankreasa u lumen crijeva te je otporan i na bakterijsku degradaciju. Osim u fecesu, serumu i/ili plazmi, kalprotektin se nalazi u slini, cerebrospinalnoj tekućini te urinu.



Slika 1-1. Prikaz strukture fekalnog kalprotektina (prema: <https://www.rcsb.org/3d-view/1XK4/1>)

1.2. Probavni sustav

Probavni sustav se sastoji od usne šupljine, ždrijela, jednjaka, želuca, tankog i debelog crijeva, jetre, gušterače i crijevnog otvora (anusa). Ti organi sudjeluju u razgradnji hrane i apsorpciji korisnih sastojaka, dok se ostatak izlučuje stolicom. Stolica (lat. *faeces*) je produkt metabolizma i probavnog sustava. Stolica se normalno sastoji od 75% vode i 25% krute tvari. Krute tvari se sastoje od 30% mrtvih bakterija, 10-20% anorganskih tvari, 2-3% proteina i 30% neprobavljenih krupnih ostataka hrane. Svaka promjena u boji, količini i/ili konzistenciji stolice može biti znak nekih patoloških promjena unutar probavnog sustava. Boja stolice potječe od urobilina i sterkobilina, a miris stolice potječe od razgradnih produkata bjelančevina (indola i skatola) te intestinalnih plinova i plinova nastalih bakterijskim metabolizmom (Nikolac Gabaj i sur., 2019). Kod zdravih osoba, količina stolice dnevno iznosi <200 g, a kod dojenčadi 10 g/kg/dan.










Slika 1-2. Probavni sustav (modificirano prema https://en.wikipedia.org/wiki/Digestion#/media/File:Blausen_0316_DigestiveSystem.png)

1.3. Predanalitika

Iako je homogeno distribuiran u stolici, uzorak stolice se uvijek uzima s više mjesta (tri do pet). Uzorak izbora je prva dnevna stolica, ali se ne smije uzimati u žena reproduktivne dobi za vrijeme menstruacije. Ako pacijent nije u mogućnosti dostaviti uzorak isti dan u laboratorij, potrebno ga je pohraniti u hladnjak u specijalnim kontejnerima na temperaturu od 2 do 8°C. Ne preporuča se provođenje pretrage ako pacijent koristi nesteroidne protuupalne lijekove ili inhibitore protonске pumpe.

Prema ljestvici po Bristolu postoji sedam tipova stolice koji su prikazani na *Slici 1-3*.

Tip 1.		Tvrde kuglice kao lješnjaci
Tip 2.		Oblik „kobasice“, nekompaktna
Tip 3.		Oblik „kobasice“, hrapava
Tip 4.		Oblik „kobasice/zmije“, glatka
Tip 5.		Mekane kuglice
Tip 6.		Neformirana stolica
Tip 7.		Vodenasta stolica

Slika 1-3. Tipovi stolice po Bristolu (modificirano prema: <https://www.abc.net.au/news/2019-04-22/the-bristol-stool-chart---full-image/11035710?nw=0>)

Defekacijski problemi se očituju u promjeni boje i oblika stolice, a često su povezani s patološkim stanjima. Za organsku konstipaciju su karakteristični tipovi 1 i 2, a za latentnu konstipaciju je karakterističan tip 3. Tipovi 4 i 5 su normalna stolica, tip 6 se pojavljuje kod stanja hiperaktivnog kolona, dok se tip 7 pojavljuje kod stanja koji uzrokuju vodenastu stolicu.

1.4. Poslijeanalitika

Koncentracija fekalnog kalprotektina manja od 43,5 ng/mL (<50 mg/kg) definira se kao negativan rezultat, koncentracija $\geq 43,5$ - < 104,3 ng/mL (≥ 50 - < 120 mg/kg) kao neodređen rezultat, a $\geq 104,3$ ng/mL (≥ 120 mg/kg) kao pozitivan rezultat. Analitički mjerni raspon metode Quanta Flash® Calprotectin je od 14 ng/mL (16,1 mg/kg) do 3043,5 ng/mL (3500 mg/kg) (mjereno na BIO-FLASH analizatoru). Ukoliko je vrijednost fekalnog kalprotektina u uzorku stolice manja od 14,0 ng/mL, BIO-FLASH će izdati rezultat kao „<14 ng/mL“. Ukoliko je vrijednost fekalnog kalprotektina u uzorku stolice veća od 3043,5 ng/mL, BIO-FLASH će izdati rezultat kao „>3043,5 ng/mL“.

1.5. Stabilnost

Stabilnost se definira kao sposobnost uzorka da, pohranjen pod određenim uvjetima, zadrži vrijednost mjerenog parametra unutar granica tijekom definiranog vremenskog razdoblja

(Šimundić, 2012). Za određivanje kalprotektina, uzorak stolice za analizu ne bi trebao biti stariji od 3 dana (Nikolac Gabaj i sur., 2019).

1.6. Klinička primjena

Fekalni kalprotektin se koristi kao biomarker kod gastrointestinalnih poremećaja jer je dobar pokazatelj intestinalne upale. U dijagnostici služi kao pomoć u razlikovanju upalnih crijevnih bolesti (IBD, engl. *inflammatory bowel disease*) od sindroma iritabilnog crijeva (IBS, engl. *irritable bowel syndrome*) i ostalih neupalnih crijevnih bolesti. Ukoliko je koncentracija fekalnog kalprotektina visoka, vjerojatno se radi o IBD-u (ulcerozni kolitis i Crohnova bolest), ali je pacijenta potrebno uputiti gastroenterologu i obaviti kolonoskopiju za potvrdu dijagnoze. Kolonoskopija je zlatni standard za dijagnozu IBD-a. Međutim, postupak je neugodan i ponekad bolan za pacijenta te dugotrajan i skup. Zbog tih nedostataka potrebno je pronaći osjetljiv, brz, pouzdan, jeftin i neinvazivan biomarker za mukoznu upalu kako bi se moglo razlučiti kod kojih pacijenata je potrebno napraviti kolonoskopiju. Kod IBS-a je koncentracija fekalnog kalprotektina niža od one kod IBD-a, ponekad je iznad referentnog intervala, ali je uvijek viša od koncentracije koja se nalazi u zdravih pojedinaca.

1.6.1. Ulcerozni kolitis

Ulcerozni kolitis je kronična upalna bolest za koju su karakteristične ulceracije sluznice debelog crijeva, a najčešće se manifestira krvavim proljevima (<http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/bolesti-probave/upalne-bolesti-crijeva/ulcerozni-kolitis>).

Može ostati lokaliziran u rektumu ili se širi proksimalno, a u nekim slučajevima zahvaća cijeli kolon. Upala zahvaća sluznicu i podsluznicu, a jasno se može razlikovati zdrava od sluznice koja je zahvaćena upalom.

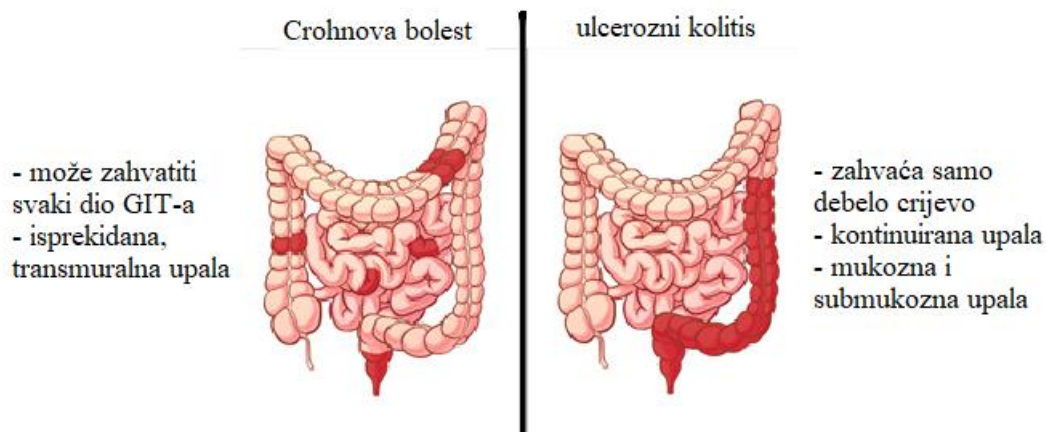
Simptomi su krvavi proljevi različitog trajanja i intenziteta, a izmjenjuju se s asimptomatskim intervalima. Oboljeli imaju nagon za brzu defekaciju, blage grčeve u donjem abdomenu, te primjećuju sluz i krv u stolici. Ako se upala širi u područje proksimalnog dijela crijeva, oboljeli mogu imati više od deset stolica dnevno uz jake grčeve.

1.6.2. Crohnova bolest

Crohnova bolest predstavlja kroničnu transmuralnu upalu koja obično zahvaća distalni ileum i kolon, ali također može nastati u bilo kojem dijelu GI trakta (<http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/bolesti-probave/upalne-bolesti-crijeva/crohnova-bolest>).

Transmuralna upala znači da je zahvaćena cijela debljina stijenke crijeva, ali je upala

asimetrična i segmentalno zahvaća crijevo. Simptomi Crohnove bolesti su abdominalni bolovi, proljev, opstrukcija crijeva, nastanak unutarnjih i vanjskih fistula, te apscesa. Bolest može zahvatiti samo ileum, samo kolon ili i ileum i kolon (u najviše slučajeva). Ne zahvaća rektum kao što je to slučaj kod ulceroznog kolitisa. Za potvrdu dijagnoze, potrebna je kolonoskopija. Bolest se rijetko izliječi, a karakteristične su faze remisije i relapsa. Uz adekvatnu terapiju, većina oboljelih funkcionira prihvatljivo, uglavnom se uklapaju u svakodnevne aktivnosti bez uočljivih smetnji za okolinu.



Slika 1-4. Usporedba Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa (modificirano prema https://assets.aboutkidshealth.ca/akhassets/Crohns_vs_ulcerative_colitis_MED_ILL_EN.png?RenditionID=10)

1.6.3. Sindrom iritabilnog crijeva

Sindrom iritabilnog crijeva je motorni poremećaj čitavog želučanocrijevnog sustava koji uzrokuje bol u trbuhu, zatvor stolice ili proljev (<http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-zapacijente/probavne-bolesti/poremecaji-praznjenja-crijeva/sindrom-iritabilnog-crijeva>). Postoje dva glavna tipa sindroma iritabilnog crijeva. Prvi tip je tip spastičkog debelog crijeva, a okidač je hrana. Dolazi do periodičkog zatvora ili proljeva s boli. Bol je tupa ili su prisutni grčevi, a još neki od simptoma su nadutost, plinovi, tjeskoba, mučnina, umor. Drugi tip karakteriziraju uglavnom proljevi bez bolova. Nagon za defekacijom je tako velik da ponekad osoba izgubi kontrolu.

Većina ljudi koji imaju sindrom iritabilnog crijeva izgledaju zdravo, a pretrage se rade kako bi se razlikovao ovaj sindrom od upalnih bolesti crijeva.

Liječenje je individualno, a uglavnom se sastoji od toga da osoba prepozna koji joj vanjski čimbenici ne odgovaraju, posebice koja hrana smeta, te da takve situacije izbjegava.

1.7. Ograničenja metode

Ograničenja metode su ta što samo visoke koncentracije fekalnog kalprotektina nisu dovoljne za postavljanje dijagnoze IBD-a. Fekalni kalprotektin je indikator prisutnosti neutrofila u stolici, a to nije specifično za IBD, stoga se rezultati trebaju tumačiti zajedno s drugim dijagnostičkim testovima. Pomaže u razlikovanju IBD-a od IBS-a, ali ne može razlikovati Crohnovu bolest od ulceroznog kolitisa.

Lažno negativni rezultati mogu biti prisutni kod pacijenata koji imaju granulocitopeniju zbog depresije koštane srži.

Neki pacijenti koji uzimaju nesteroidne protuupalne lijekove (NSAID, *engl. non-steroidal anti-inflammatory drugs*) ili inhibitore protonskih pumpi imaju povišene vrijednosti fekalnog kalprotektina.

Koncentracije variraju s godinama. Djeca 1-4 godine imaju snižene koncentracije fekalnog kalprotektina u usporedbi sa zdravom djecom mlađom od 1 godine, a više u usporedbi s djecom starijom od 4 godine i odraslim osobama (Pathirana i sur., 2018).

Pacijenti s neprepoznom/neliječenom celijakijom ponekad imaju povišene vrijednosti fekalnog kalprotektina, isto kao i pacijenti s nekim drugim crijevnim bolestima, uključujući gastrointestinalne infekcije i kolorektalni karcinom.

Pacijenti s dijagnosticiranim IBD-om imaju razdoblja aktivne upale koje se izmjenjuju sa stadijima remisije, stoga to treba uzeti u obzir prilikom komentiranja nalaza.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Cilj ovog rada je ispitati stabilnost ekstrakta fekalnog kalprotektina kemiluminiscentnom imunoanalizom (CLIA) upotrebom komercijalnog sustava za ekstrakciju QUANTA Flash[®] Calprotectin (INOVA Diagnostics, San Diego, CA, USA) tijekom 120 sati i dobivene vrijednosti usporediti s navodima proizvođača.

3. MATERIJALI I METODE

QUANTA Flash[®] Calprotectin (INOVA Diagnostics, San Diego, CA, USA) je kemiluminiscentna imunoanaliza (CLIA) za kvantitativno određivanje fekalnog kalprotektina u ekstrahiranim uzorcima stolice koja se izvodi na analizatoru BIO-FLASH (INOVA Diagnostics, San Diego, CA, USA).



Slika 3-1. BIO-FLASH analizator

Uzorci koji su bili ispitivani su ostaci uzoraka od pacijenata koji su donijeli uzorak stolice za rutinsko ispitivanje na fekalni kalprotektin u KBC Sestre milosrdnice u Zagrebu. Uzorci koje smo koristili u našem istraživanju nisu bili stariji od 3 dana, te su bili pohranjeni na temperaturi od 2 do 8°C.

Referentna metoda uzorkovanja je metoda vaganja, međutim takav način uzorkovanja je dugotrajan i kompliciran. Stoga se ekstrakcija izvodila pomoću epruvete za ekstrakciju stolice. Epruveta za ekstrakciju stolice sadrži ekstrakcijski pufer i štapić s utorima. Štapić je potrebno uroniti u uzorak stolice i okretati ga dokle god svi utori ne budu ispunjeni stolicom. Prije stavljanja štapića u epruvetu s puferom, potrebno je ukloniti višak uzorka okretanjem štapića o unutrašnju stijenku spremnika uzorka stolice. Ukoliko je stolica tekuća, potrebno je pipetom uzorkovati 56 µL takve stolice i pomiješati ju s ekstrakcijskim puferom.



Slika 3-2. Epruveta za ekstrakciju stolice

Princip analize je „sendvič“ tehnika. Paramagnetske kuglice su obložene kalprotektin-specifičnim veznim protutijelima, a nalaze se u spremniku s reagensom pod uvjetima koji čuva protutijelo u reaktivnom stanju. QANTA Flash Calprotectin reagens osim kuglica obloženih kalprotektin-specifičnim veznim protutijelom sadrži i pufer (ružičaste boje, sadržava stabilizatore proteina i konzervanse) i kalprotektin „tracer“ (izoluminolom obilježeno anti-kalprotektin protutijelo; sadržava pufer, stabilizatore proteina i konzervanse). QANTA Flash Special Wash je otopina za ispiranje.

Ekstrakt stolice je u analizatoru razrijeđen 1:23 u jednokratnim plastičnim kivetama. Alikvot takvog razrijeđenog ekstrakta, protutijelom-obložene kuglice i pufer se miješaju u drugoj kiveti i inkubiraju na 37°C. Kuglice se tada magnetiziraju i ispiru nekoliko puta. Izoluminolom konjugirano anti-kalprotektin protutijelo se dodaje u kivetu i opet inkubira na 37°C, te se ispiru. Izoluminolov konjugat proizvodi luminiscentnu reakciju kada se u kivetu doda „trigger“ reagens. Svjetlo koje nastaje se mjeri u BIO-FLASH-ovom optičkom sustavu kao relativna svjetlosna jedinica (RLU, *engl. Relative light units*). RLU vrijednosti su proporcionalne količini vezanih konjugata izoluminola, a oni su proporcionalni količini kalprotektina vezanog na površinu kuglica.

Tijekom ovog rada, ukupno je analizirano 20 uzoraka. Svi su uzorci obrađeni u duplikatu i na tri načina.

Prvi način je bio po uputama proizvođača. Nakon uzorkovanja, epruveta za ekstrakciju je vorteksirana minimalno 30 sekundi, a maksimalno 4 minute kako bi se sadržaj homogenizirao. Neovisno o zaostalom uzorku u utorima, nastavlja se s postupkom. U nastavku rada se ekstrakti dobiveni na ovaj način označavaju sa *ekstrakt 1*.

Drugi način jest da je epruveta za ekstrakciju nakon uzorkovanja vorteksirana koliko je god bilo potrebno da sav sadržaj iz utora izađe u ekstrakcijski pufer. U nastavku rada se ekstrakti dobiveni na ovaj način označavaju sa *ekstrakt 2*.

Treći način jest da je epruveta za ekstrakciju nakon uzorkovanja pohranjena na temperaturi od 2 do 8°C, te je nakon 24 sata vorteksirana po uputama proizvođača, odnosno minimalno 30 sekundi, a maksimalno 4 minute. Neovisno o zaostalom uzorku u utorima, nastavlja se s postupkom. U nastavku rada se ekstrakti dobiveni na ovaj način označavaju sa *ekstrakt 3*.

Nakon vorteksiranja, štapić se ukloni, a epruveta se zatvori čepom. Ekstrakt se centrifugira 10 minuta na 1000-3000g kako bi se uklonili mogući ostaci stolice. Tako pripremljen ekstrakt je spreman za analizu na BIO-FLASH kemiluminiscentnom analizatoru.

Rezultati su prikazani u ng/mL. Za preračunavanje iz ng/mL u mg/kg, rezultat je potrebno pomnožiti s faktorom 1,15.

Proizvođač navodi da je fekalni ekstrakt stabilan pod ovim uvjetima:

- do 72 sata na sobnoj temperaturi,
- do 14 dana na 2-8°C,
- do 90 dana na -20°C (zamrznuti uzorci mogu proći 4 ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja, a zamrznuti uzorci moraju biti homogenizirani prije korištenja).

U eksperimentalnom dijelu ovog rada je ispitana stabilnost fekalnog ekstrakta ekstrahiranog na tri načina koji su ranije objašnjeni.

Koncentracija fekalnog kalprotektina iz *ekstrakata 1 i 2* mjerena je odmah nakon ekstrakcije, nakon 48 sati, 72 sata i 120 sati. *Ekstrakti 1 i 2* su bili pohranjeni na sobnoj temperaturi.

Ekstrakt 3 je bio pohranjen na temperaturi od 2 do 8°C, te je koncentracija fekalnog kalprotektina mjerena nakon 24 sata, 72 sata, 96 sati i 144 sata od uzorkovanja (odnosno odmah nakon ekstrakcije, te 48 sati, 72 sata i 120 sati nakon ekstrakcije).

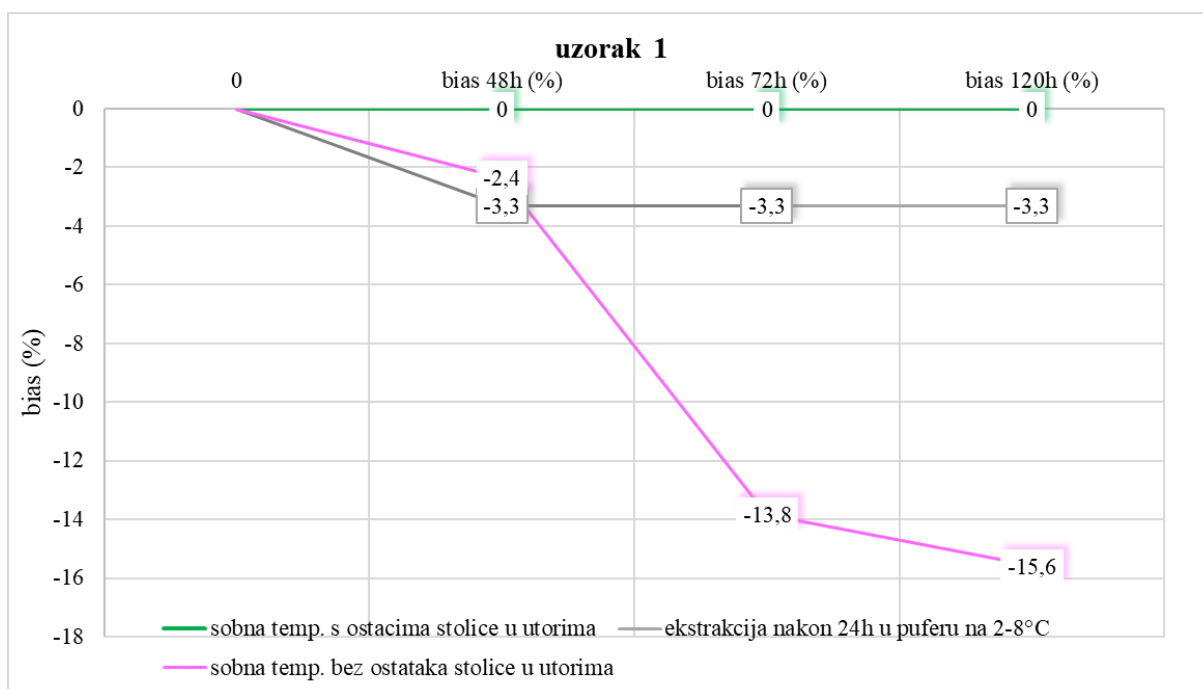
4. REZULTATI

4.1. Prikaz bias-a

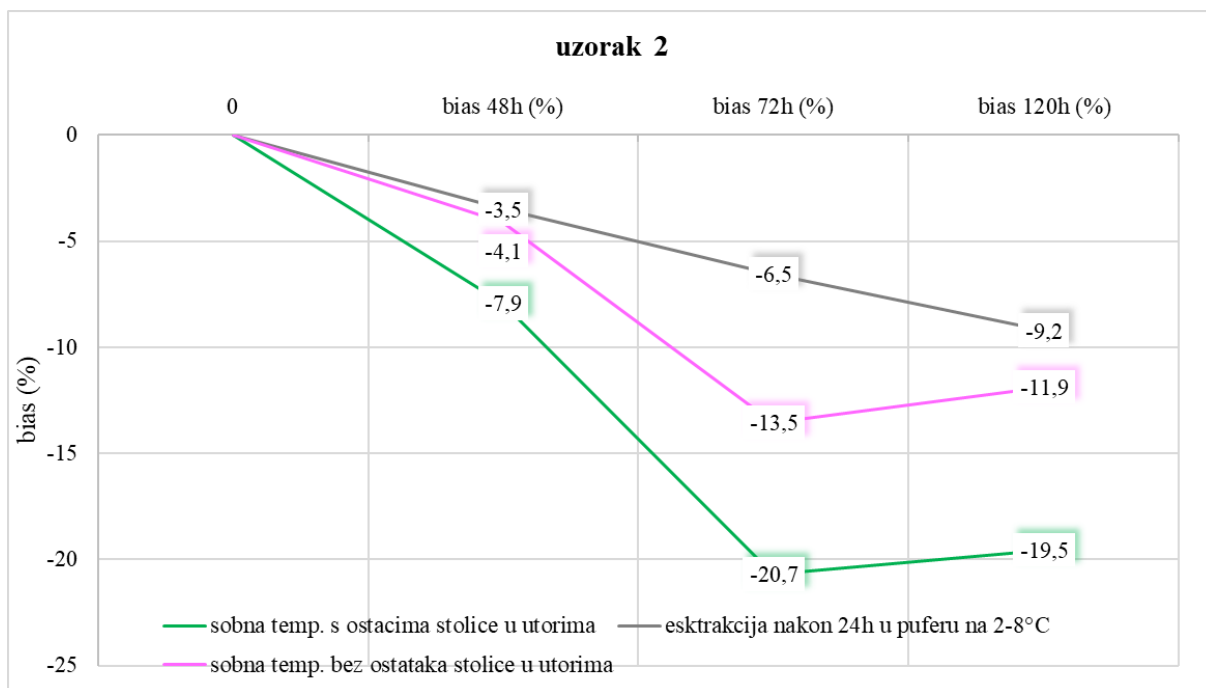
Bias označava odstupanje od istinite vrijednosti. Relativni bias se računa po formuli:

$$\text{bias (\%)} = \frac{\text{izmjerena vrijednost} - \text{ciljna vrijednost}}{\text{ciljna vrijednost}} \times 100$$

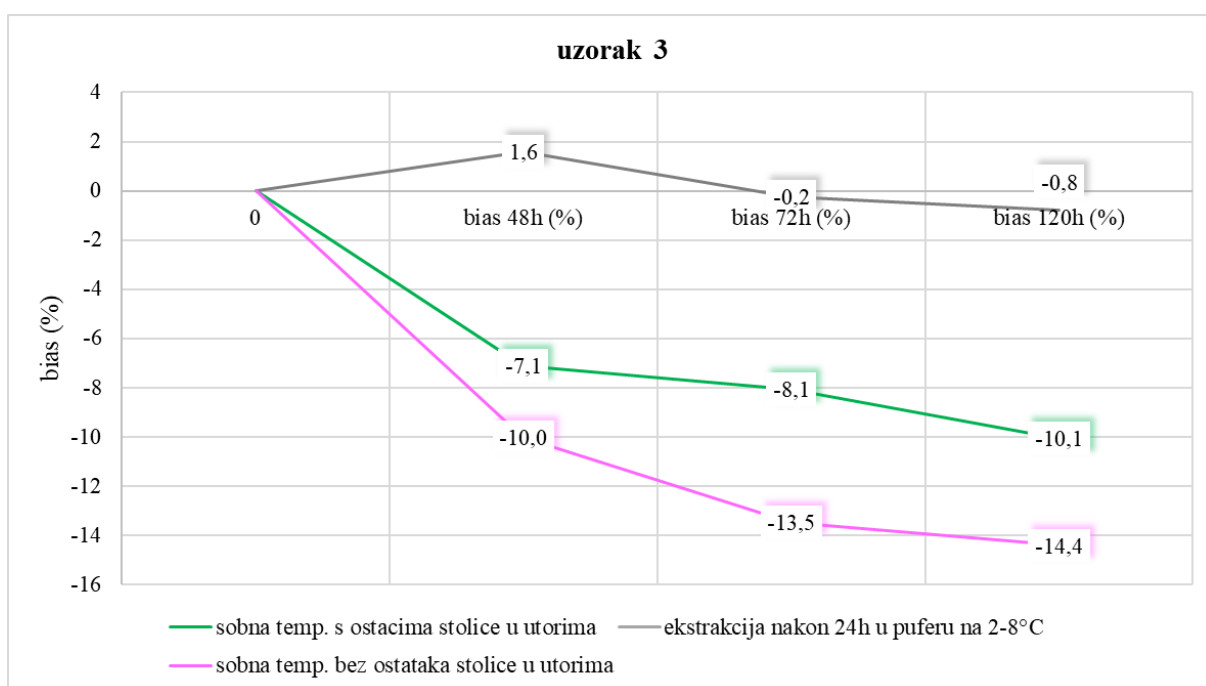
U narednim grafovima prikazani su bias-i izračunati na temelju koncentracija fekalnog ekstrakta mjerenih tijekom 120h. Pošto je svaki ekstrakt rađen u duplikatu, kao izmjerena vrijednost računao se prosjek dvaju mjerenja (za 1.dan, nakon 48h, 72h i 120h). Ciljna vrijednost je koncentracija fekalnog kalprotektina dobivena prvim mjerenjem.



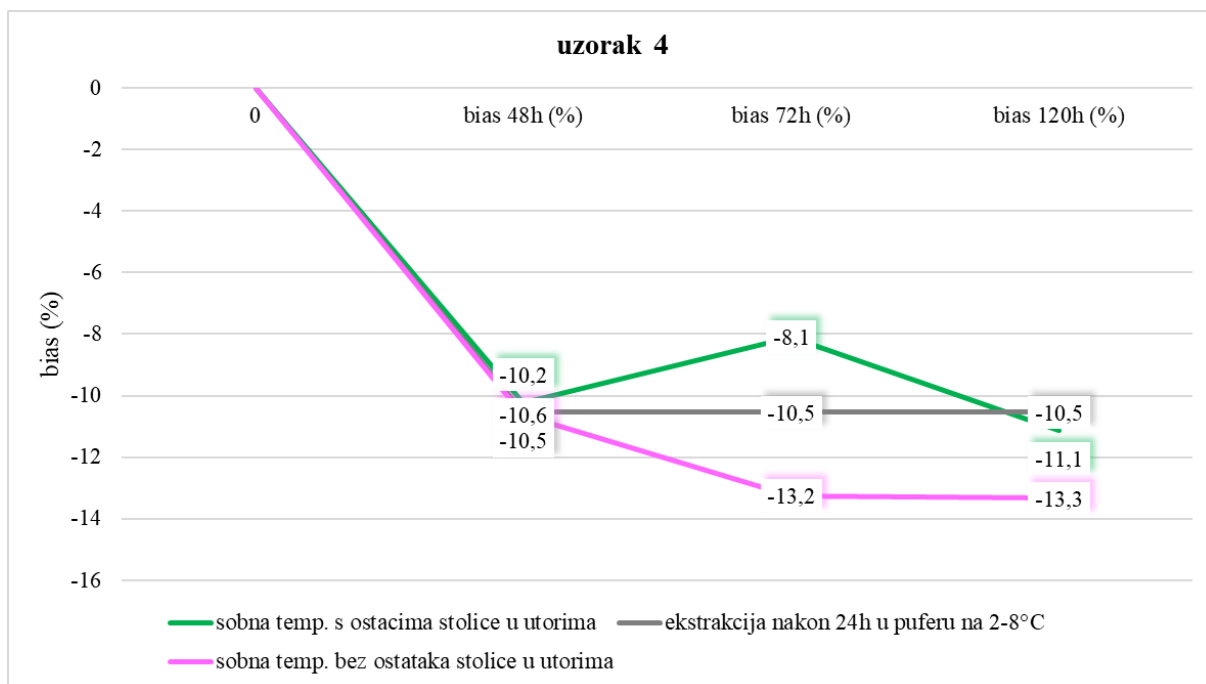
Slika 4-1. Prikaz bias-a za sva tri ekstrakta uzorka 1



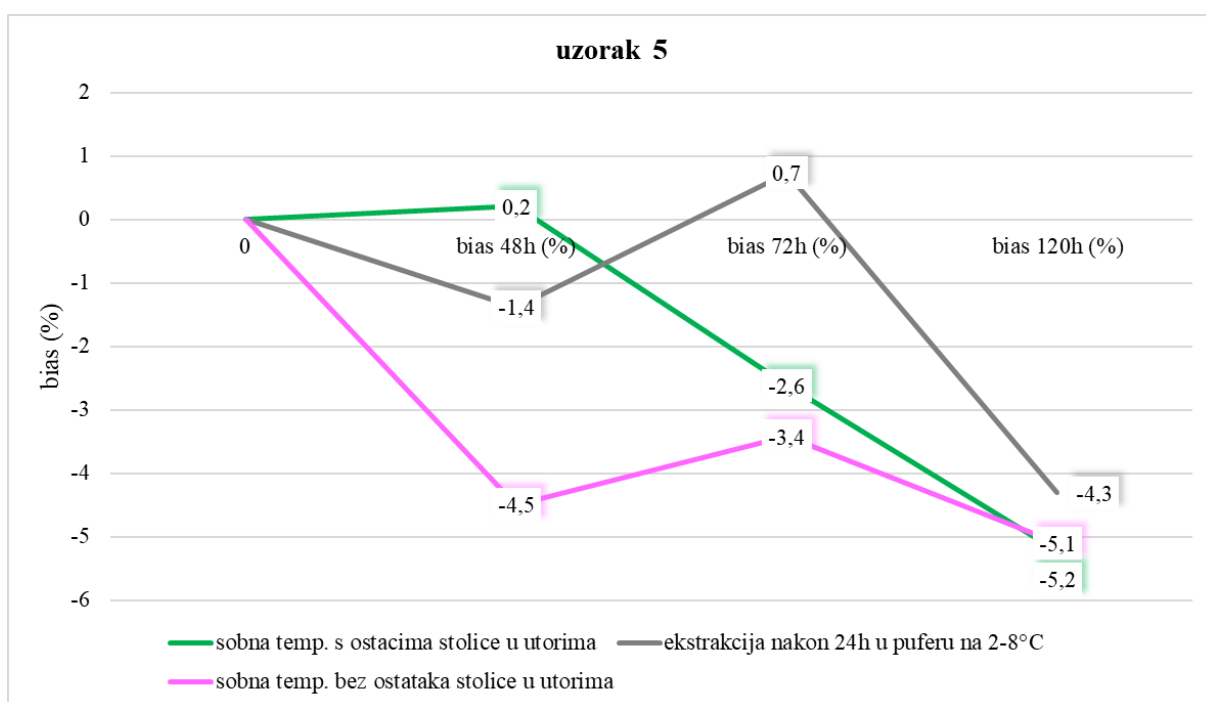
Slika 4-2. Prikaz bias-a za sva tri ekstrakta uzorka 2



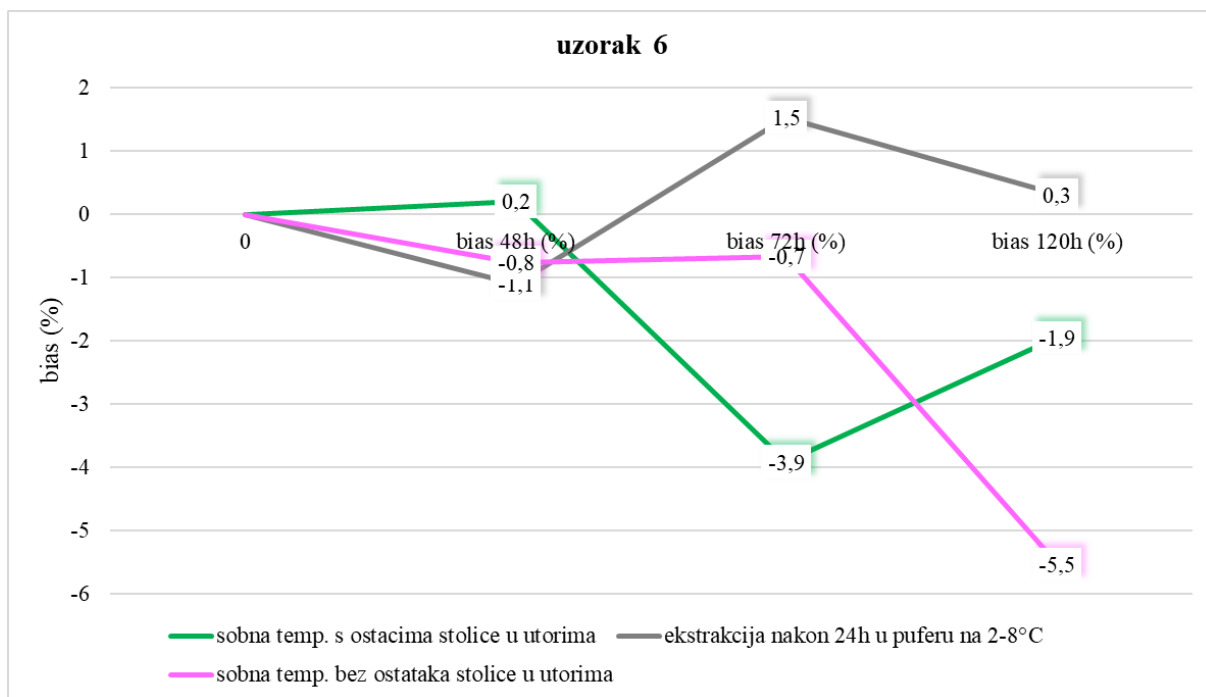
Slika 4-3. Prikaz bias-a za sva tri ekstrakta uzorka 3



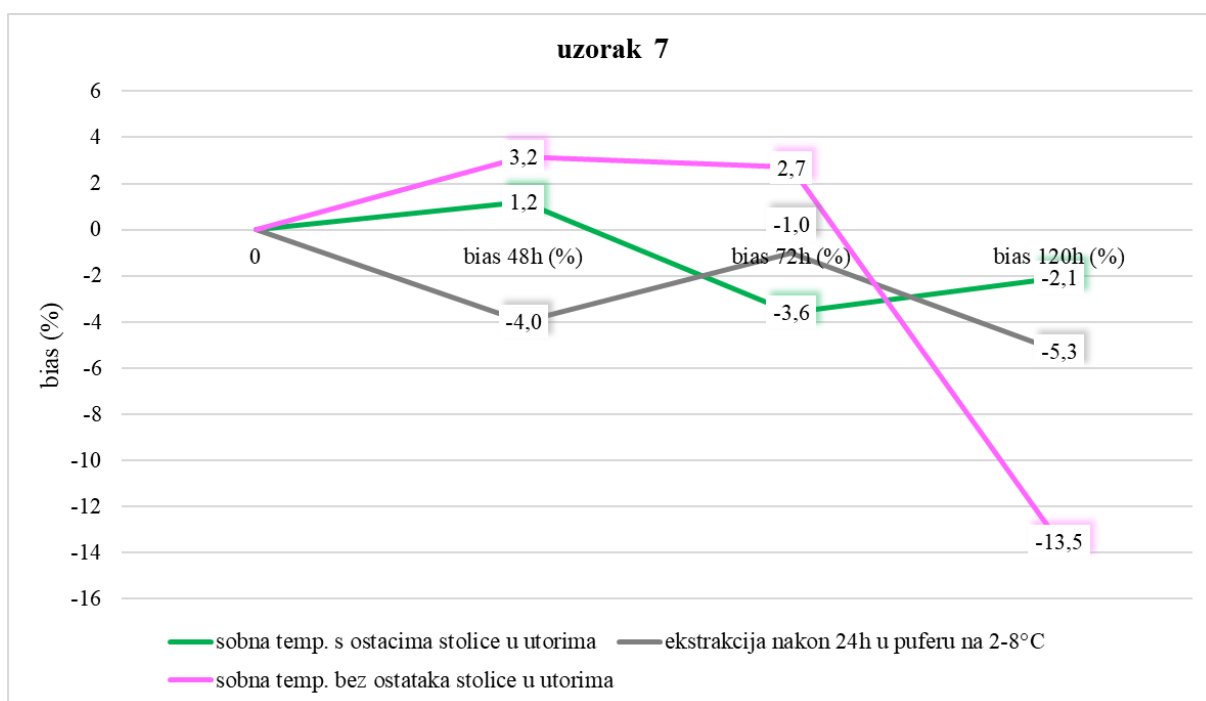
Slika 4-4. Prikaz bias-a za sva tri ekstrakta uzorka 4



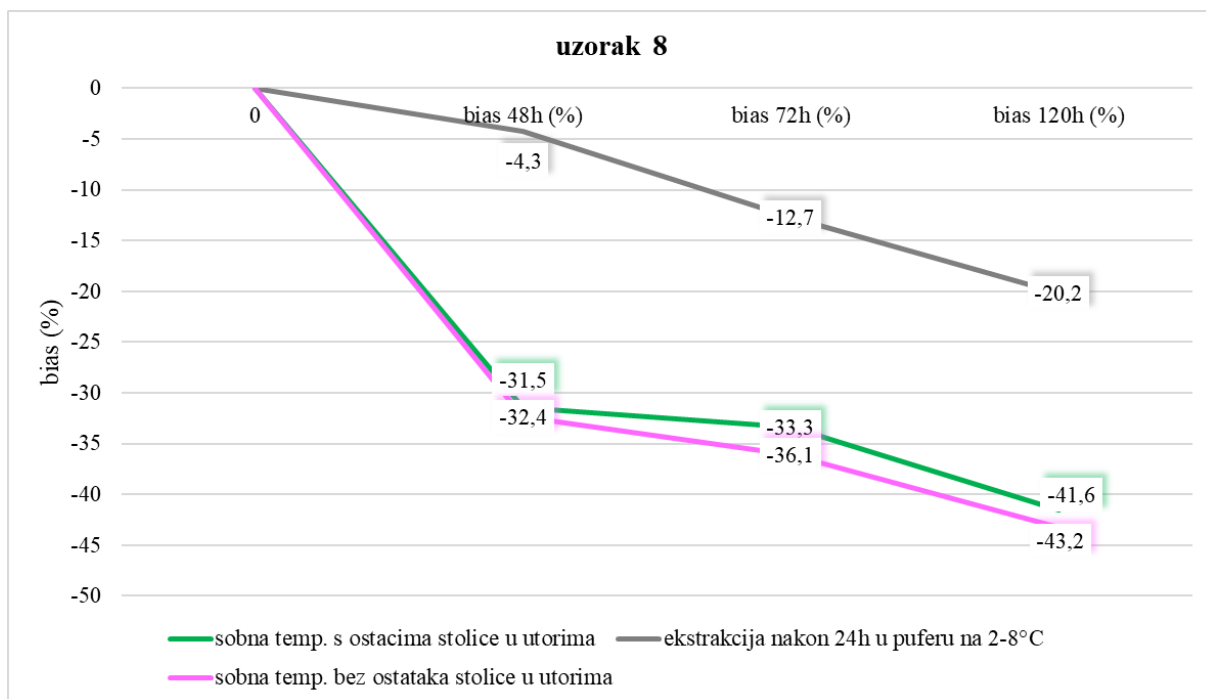
Slika 4-5. Prikaz bias-a za sva tri ekstrakta uzorka 5



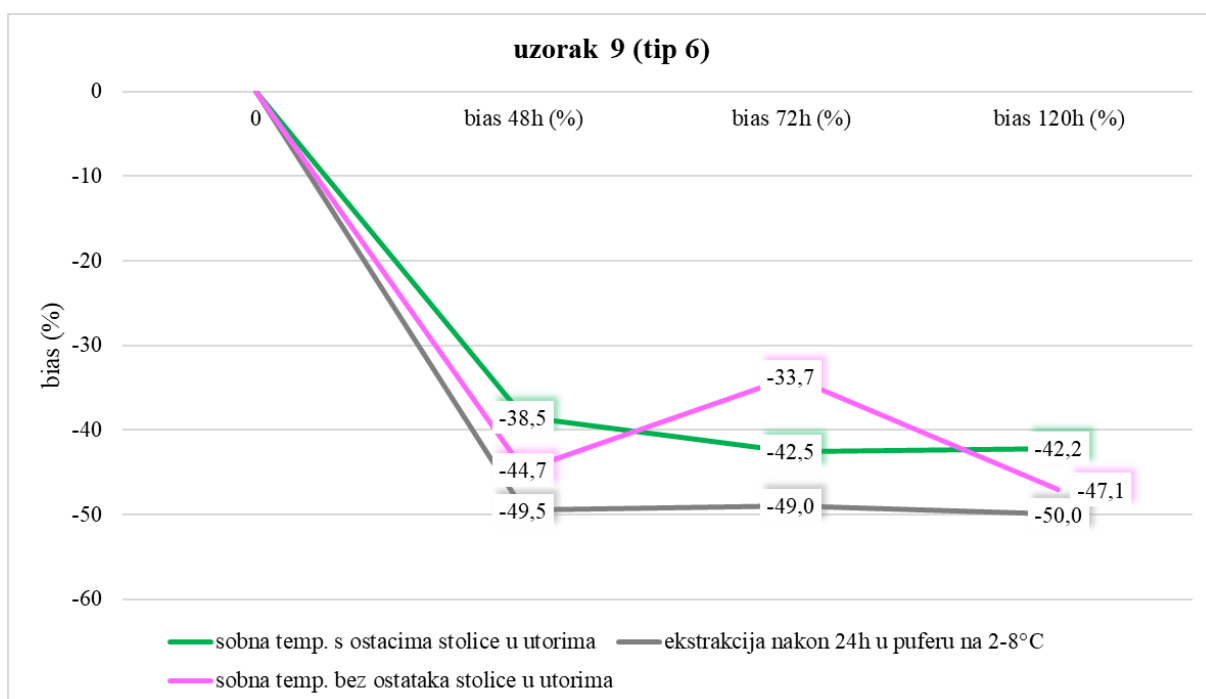
Slika 4-6. Prikaz bias-a za sva tri ekstrakta uzorka 6



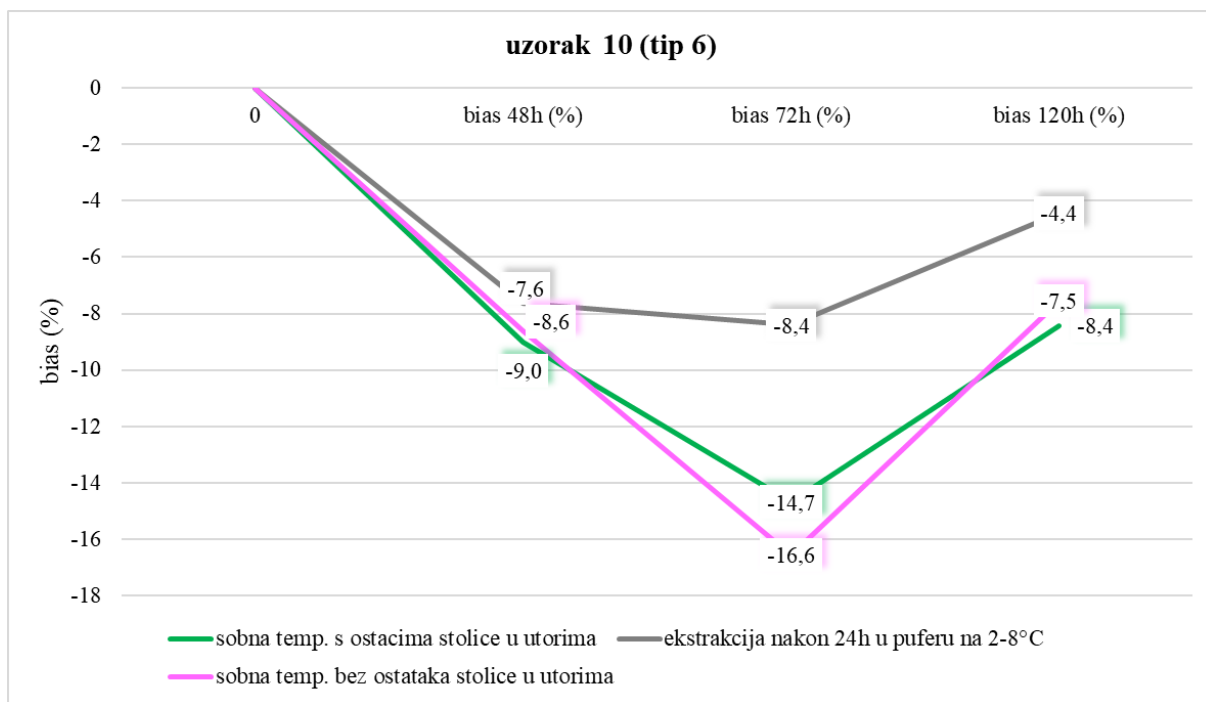
Slika 4-7. Prikaz bias-a za sva tri ekstrakta uzorka 7



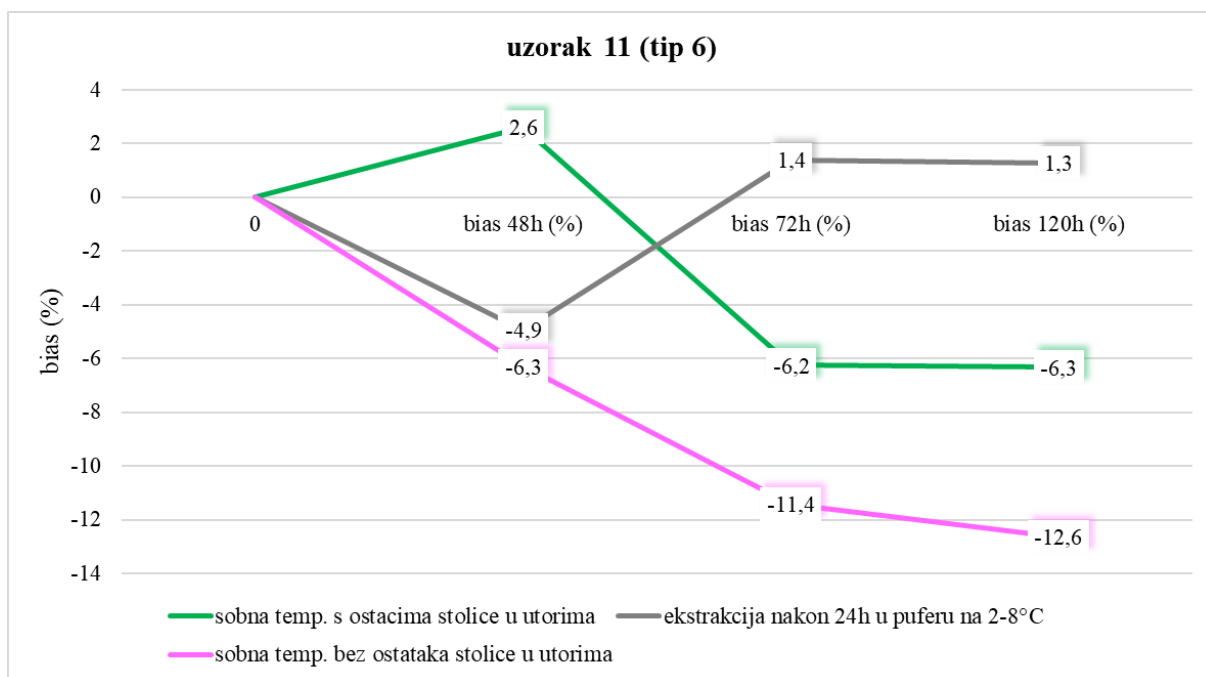
Slika 4-8. Prikaz bias-a za sva tri ekstrakta uzorka 8



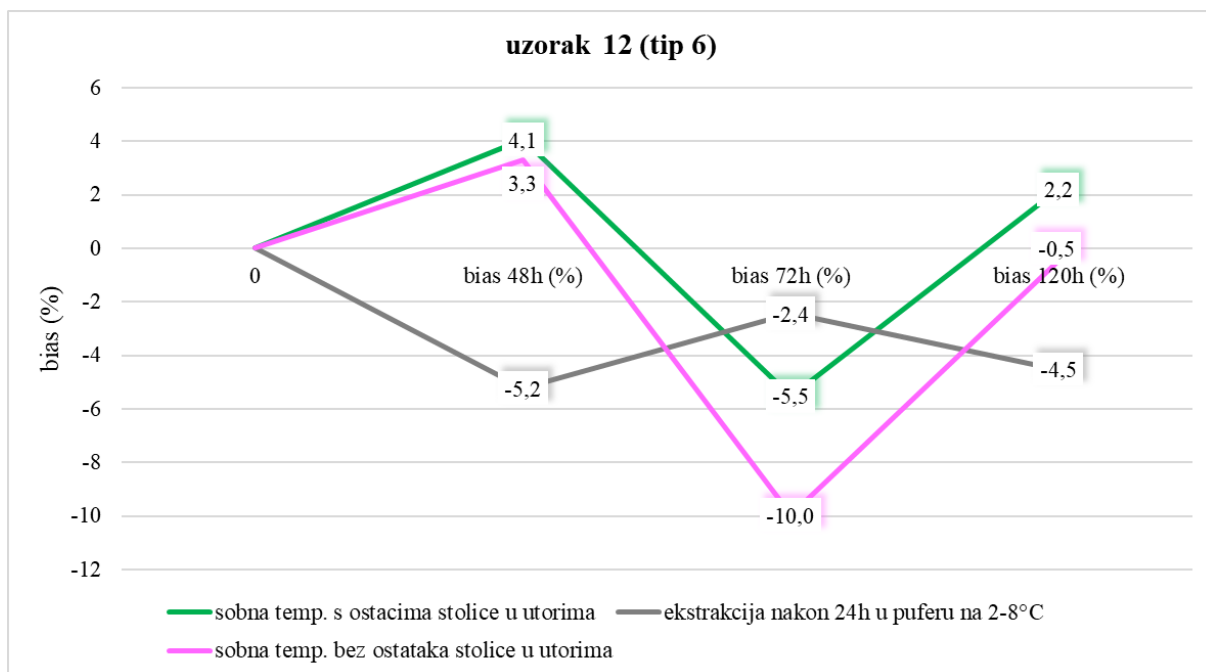
Slika 4-9. Prikaz bias-a za sva tri ekstrakta uzorka 9



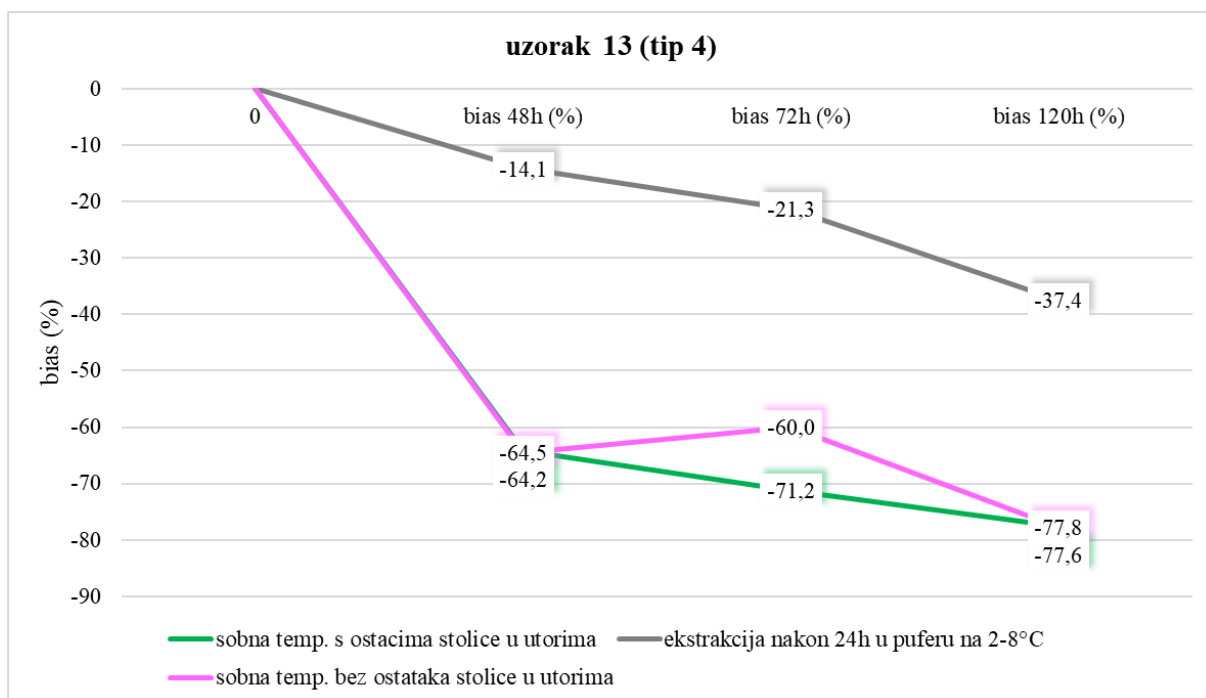
Slika 4-10. Prikaz bias-a za sva tri ekstrakta uzorka 10



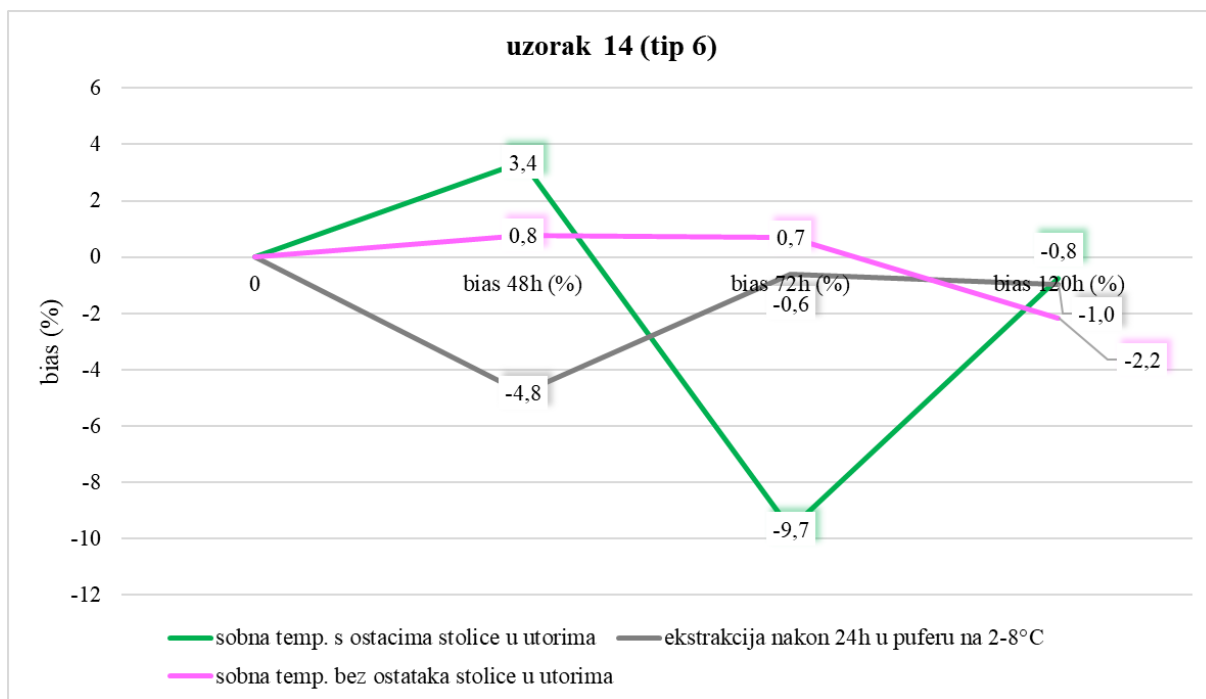
Slika 4-11. Prikaz bias-a za sva tri ekstrakta uzorka 11



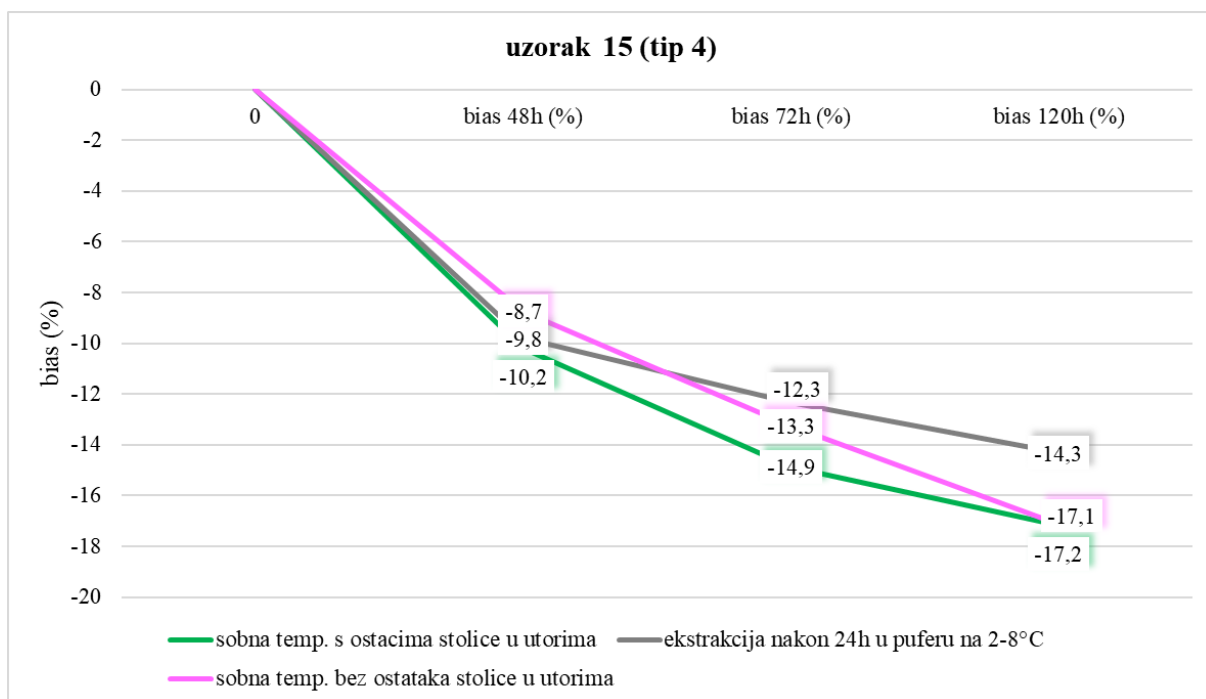
Slika 4-12. Prikaz bias-a za sva tri ekstrakta uzorka 12



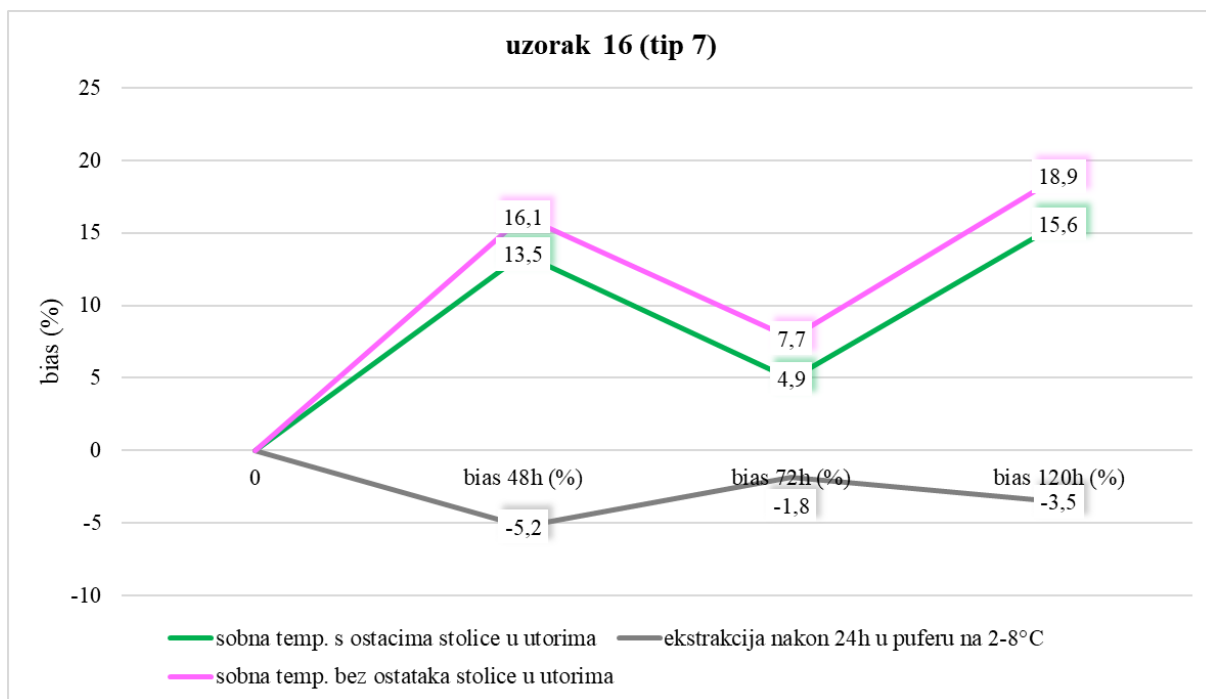
Slika 4-13. Prikaz bias-a za sva tri ekstrakta uzorka 13



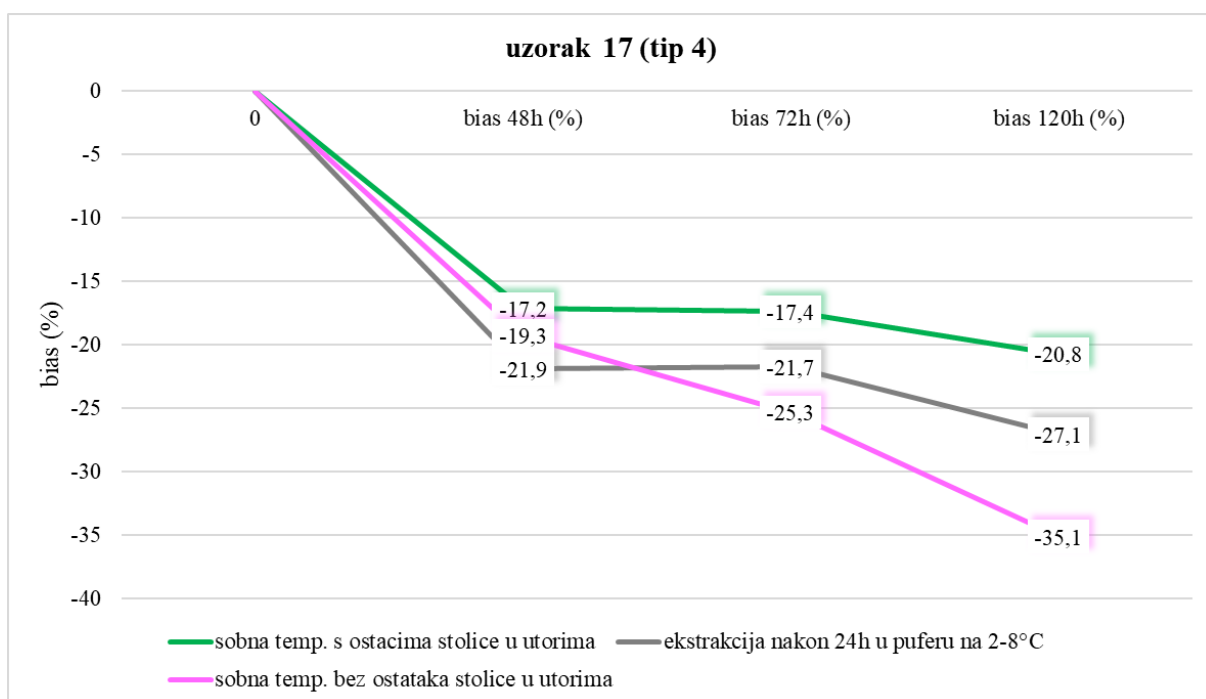
Slika 4-14. Prikaz bias-a za sva tri ekstrakta uzorka 14



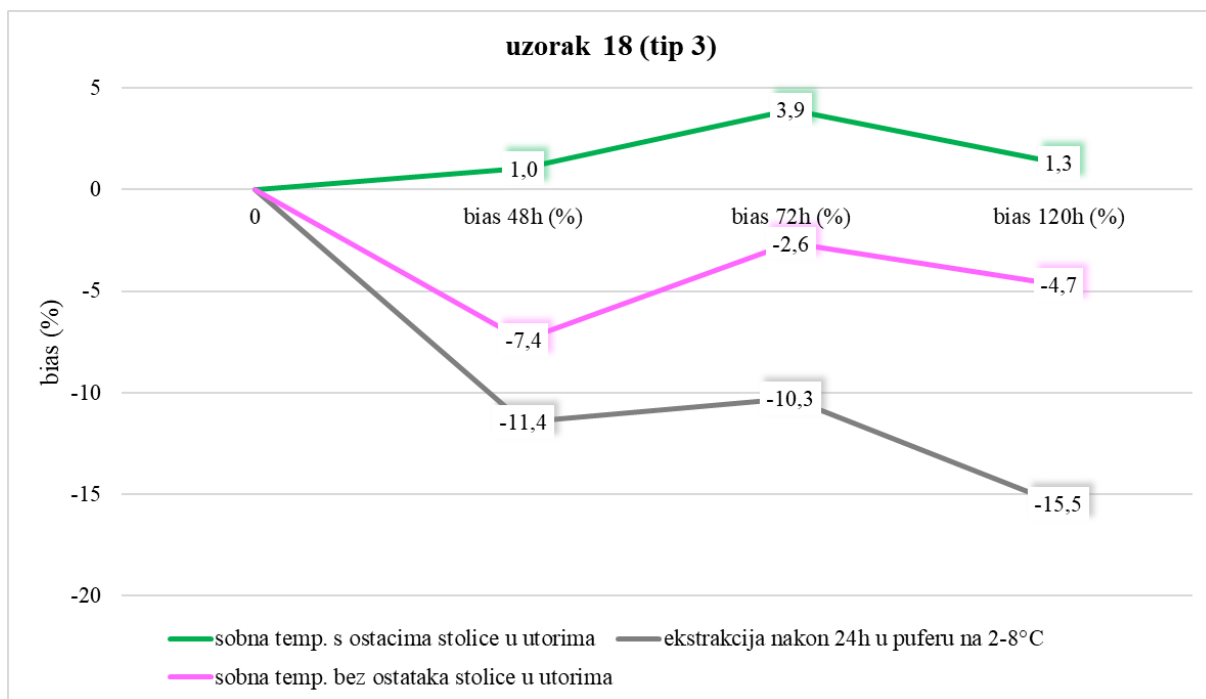
Slika 4-15. Prikaz bias-a za sva tri ekstrakta uzorka 15



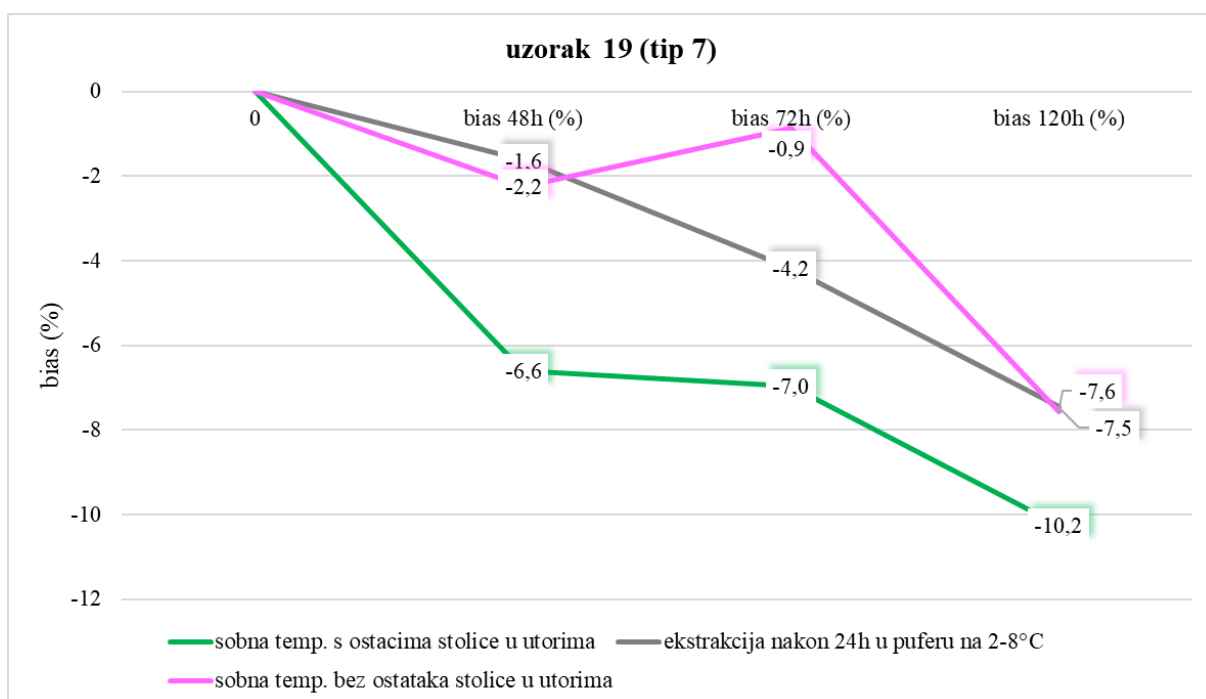
Slika 4-16. Prikaz bias-a za sva tri ekstrakta uzorka 16



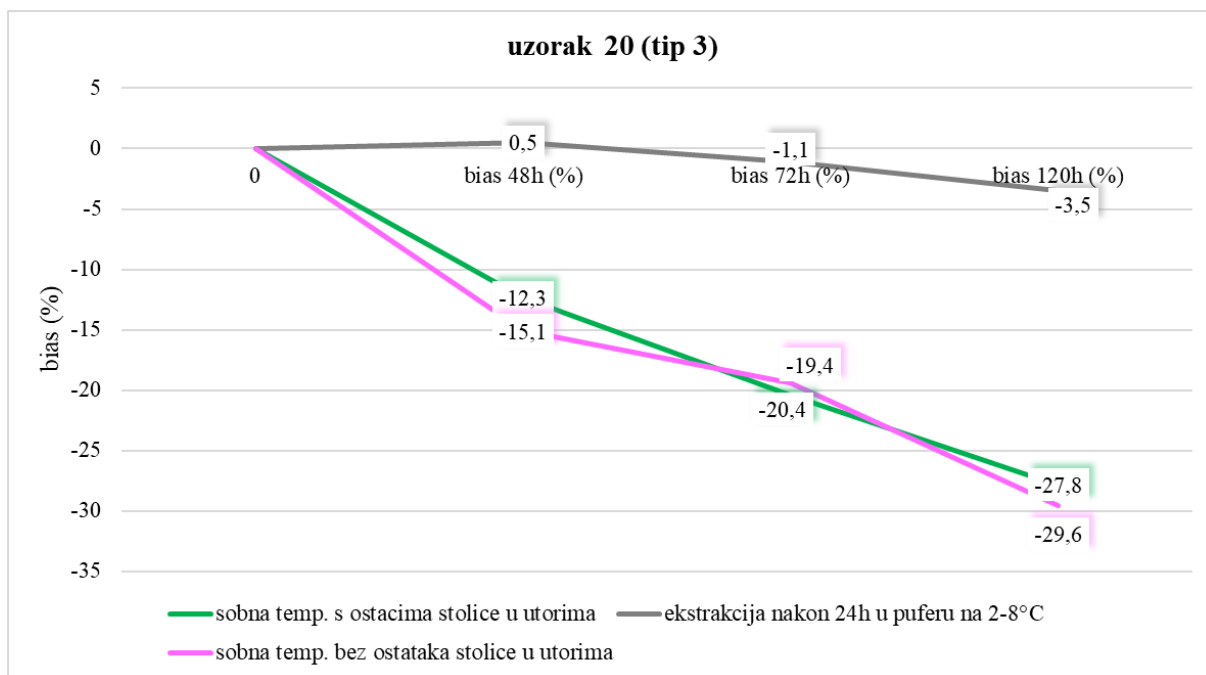
Slika 4-17. Prikaz bias-a za sva tri ekstrakta uzorka 17



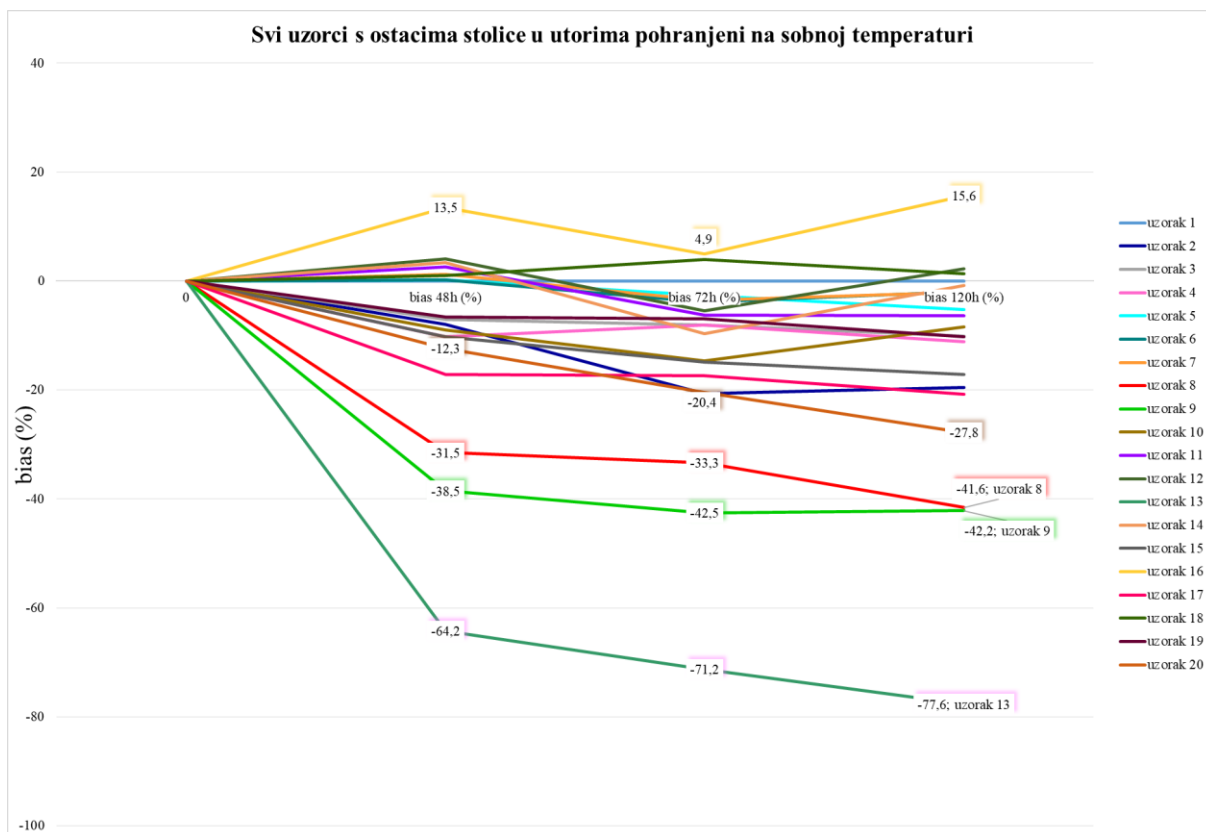
Slika 4-18. Prikaz bias-a za sva tri ekstrakta uzorka 18



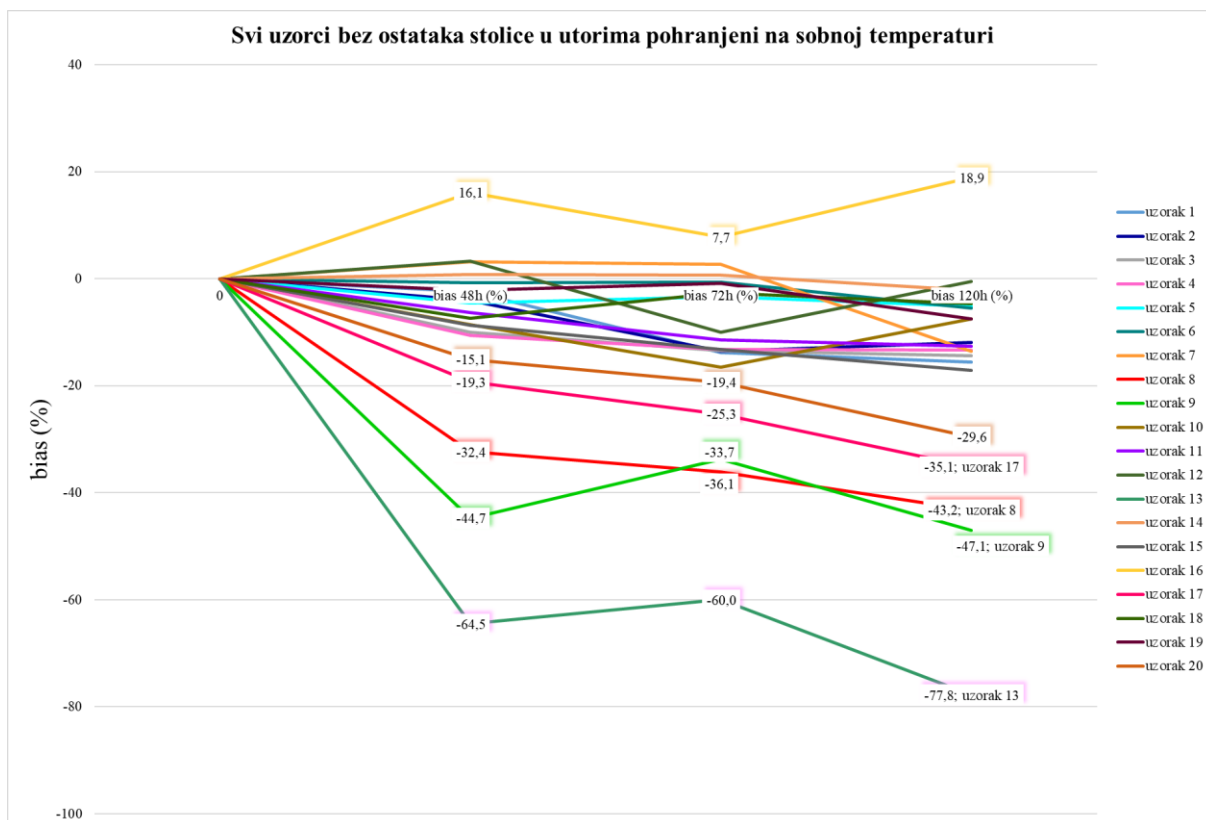
Slika 4-19. Prikaz bias-a za sva tri ekstrakta uzorka 19



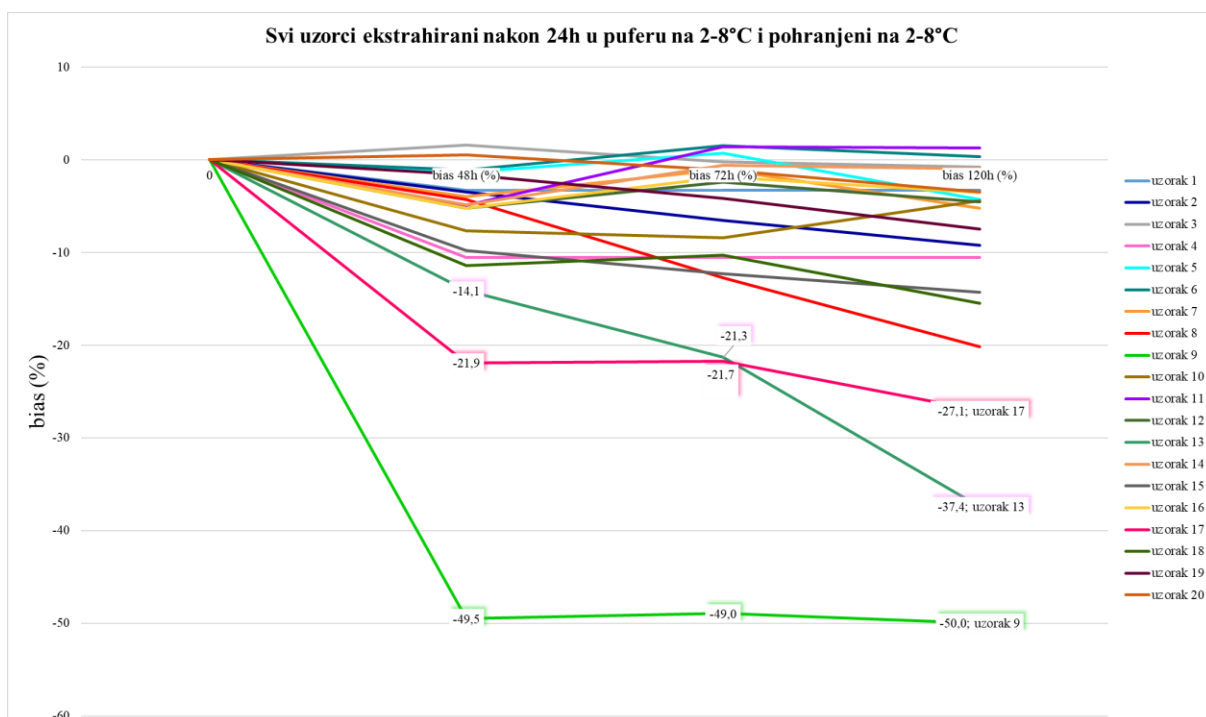
Slika 4-20. Prikaz bias-a za sva tri ekstrakta uzorka 20



Slika 4-21. Prikaz bias-a svih uzoraka s ostacima stolice u utorima koji su bili pohranjeni na sobnoj temperaturi tijekom 120h (ekstrakti 1)

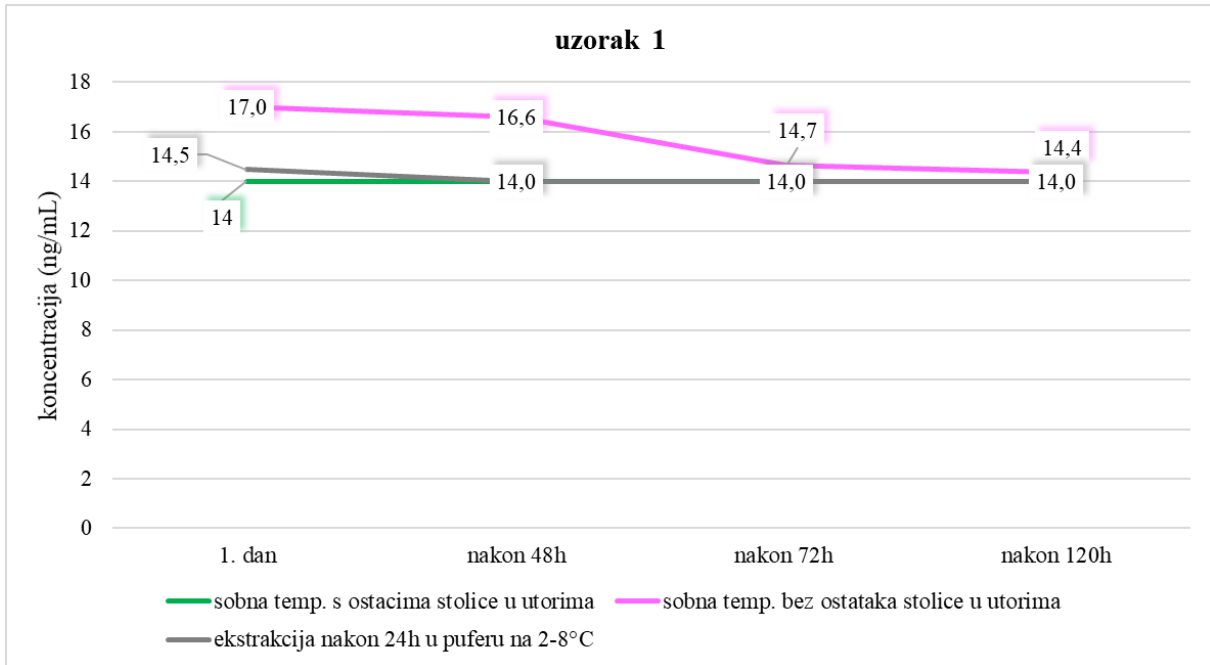


Slika 4-22. Prikaz bias-a svih uzoraka bez ostataka stolice u utorima koji su bili pohranjeni na sobnoj temperaturi tijekom 120h (ekstrakti 2)

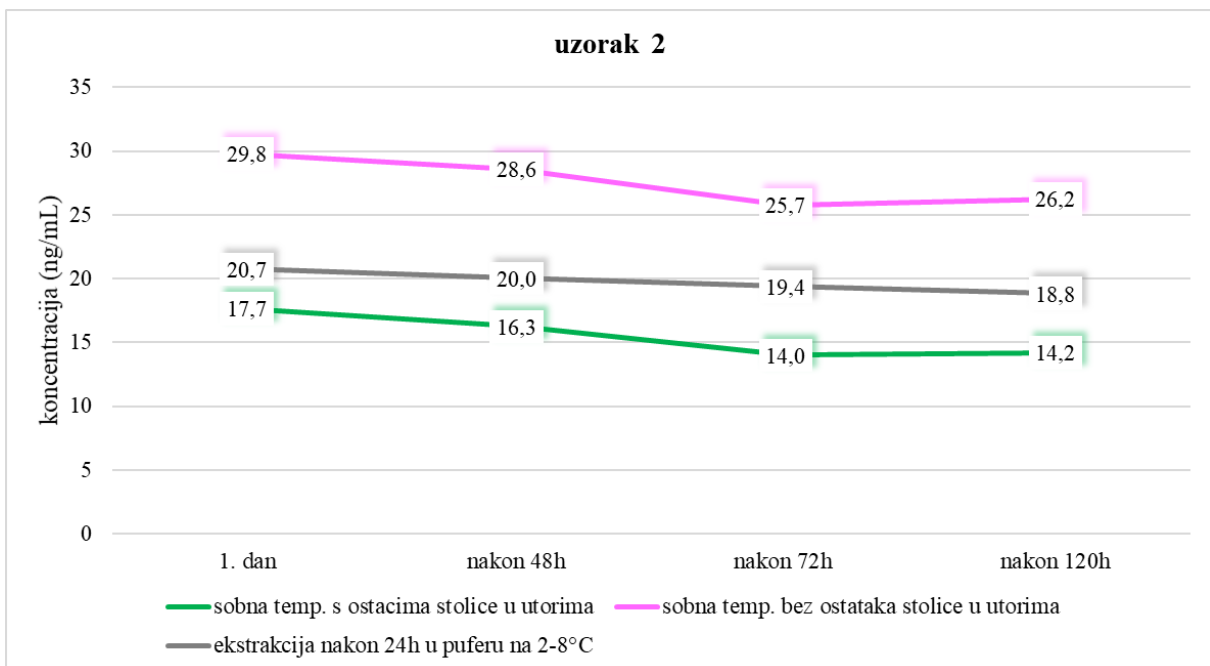


Slika 4-23. Prikaz bias-a svih uzoraka koji su bili ekstrahirani nakon 24h u puferu na 2-8°C i pohranjeni na 2-8°C tijekom 120h (ekstrakti 3)

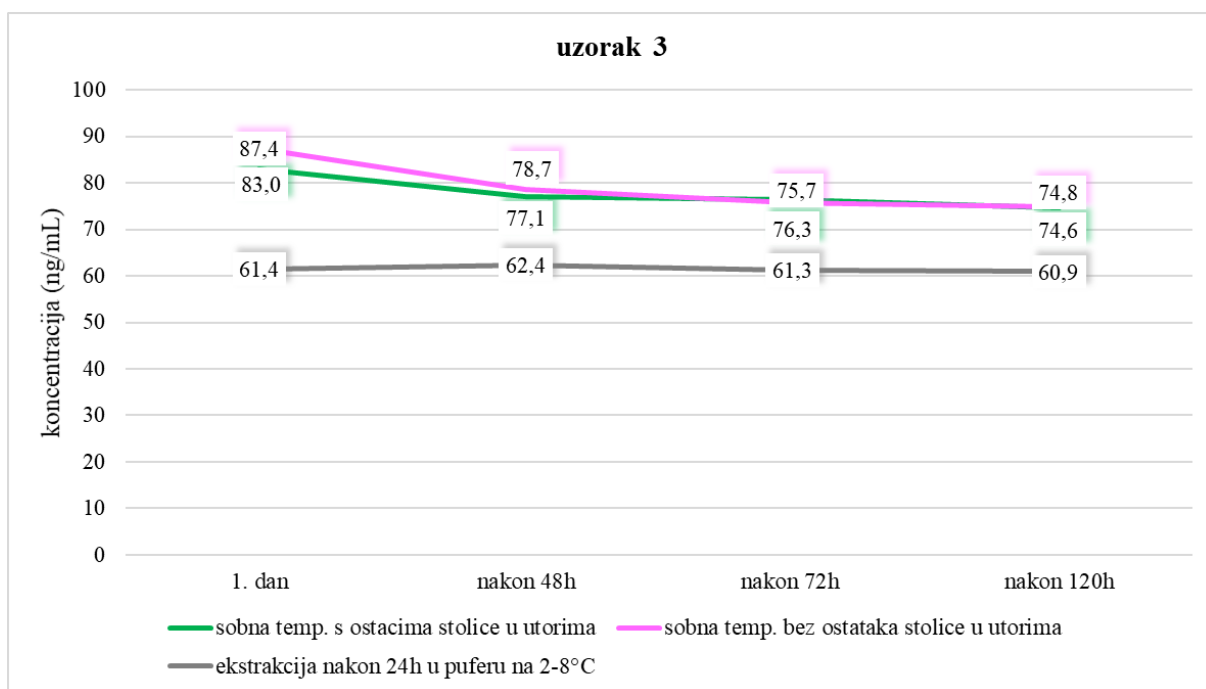
4.2. Prikaz promjena koncentracija fekalnog kalprotektina tijekom 120 sati



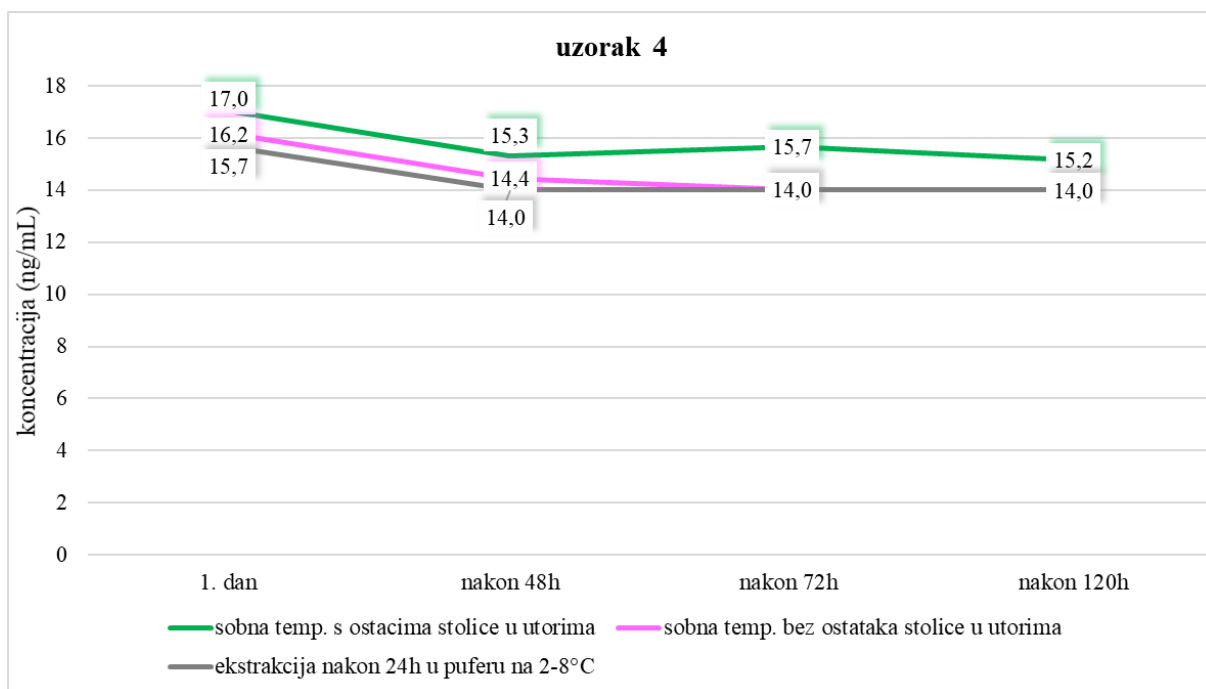
Slika 4-24. Prikaz promjena konc. fekalnog kalprotektina u sva tri ekstrakta uzorka 1 tijekom 120 sati



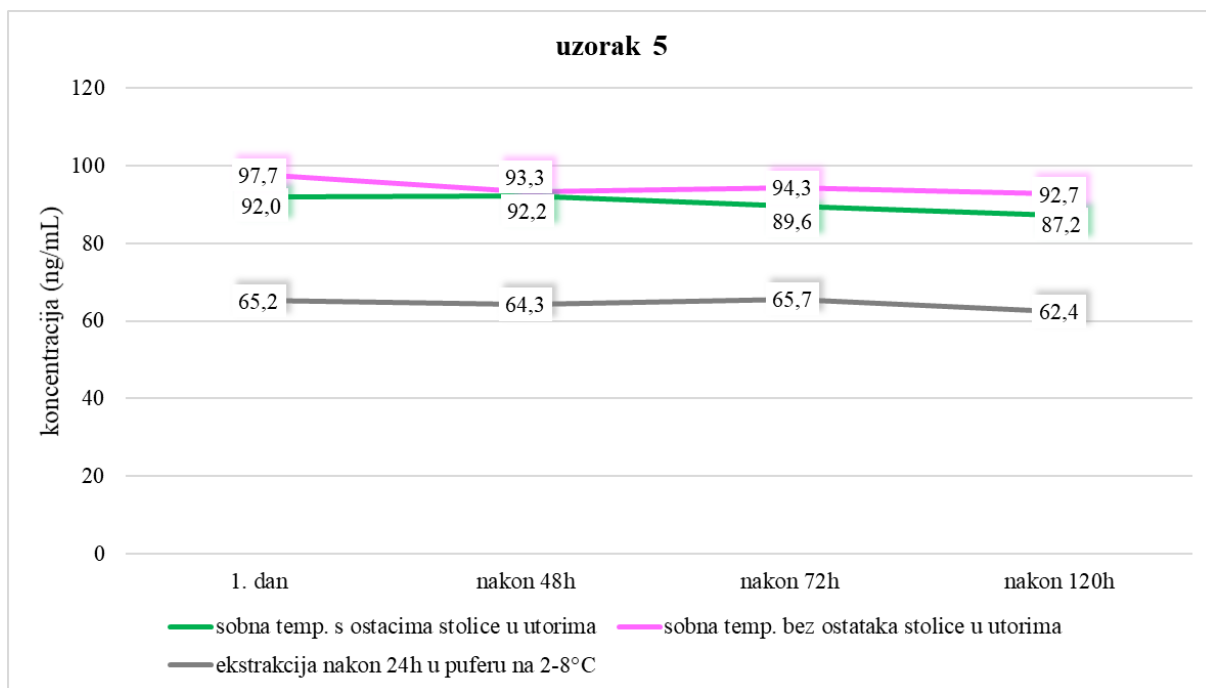
Slika 4-25. Prikaz promjena konc. fekalnog kalprotektina u sva tri ekstrakta uzorka 2 tijekom 120 sati



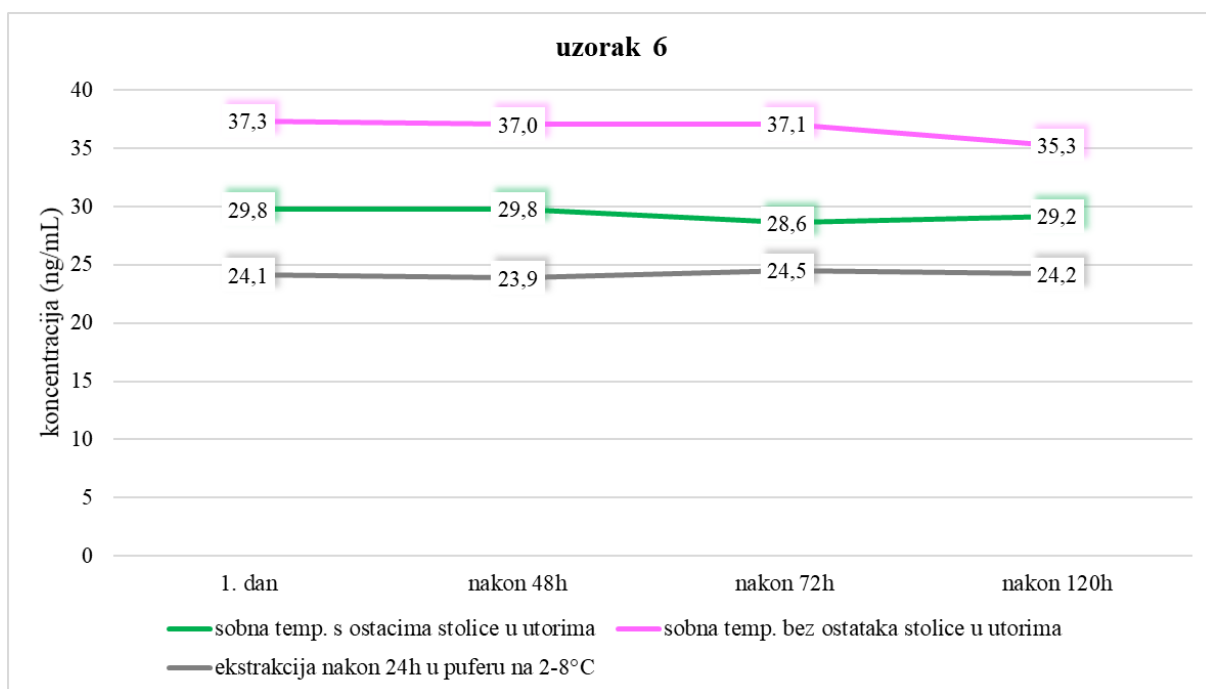
Slika 4-26. Prikaz promjena konc. fekalnog kalprotektina u sva tri ekstrakta uzorka 3 tijekom 120 sati



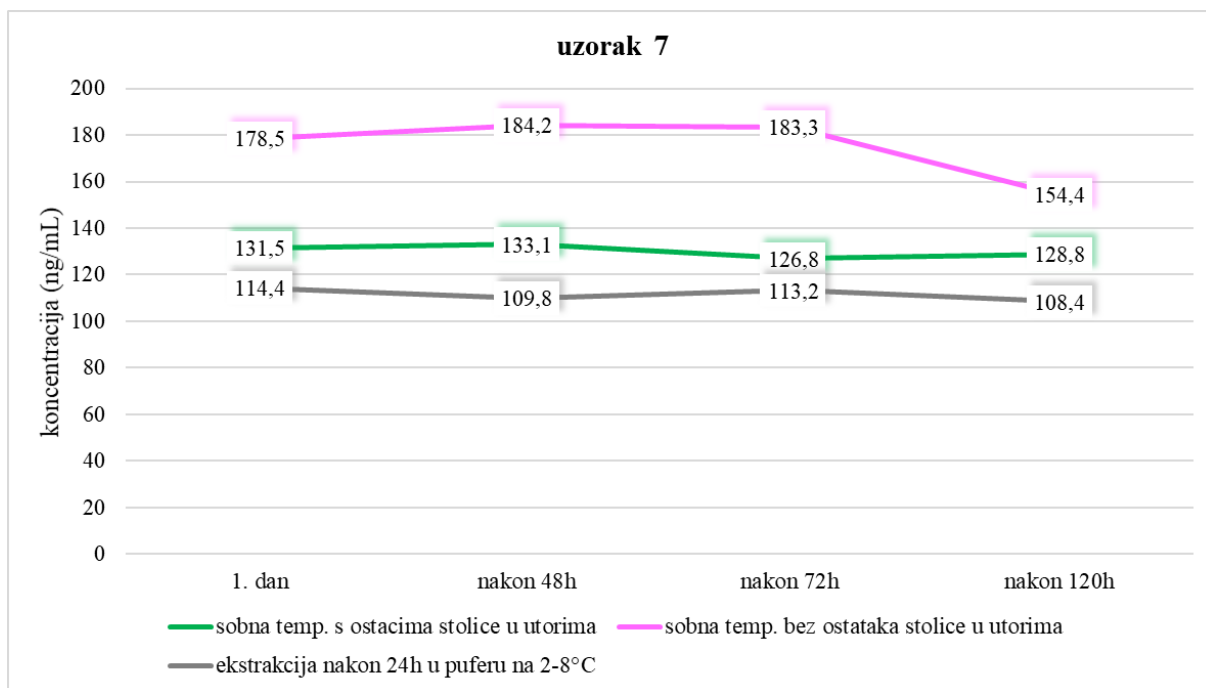
Slika 4-27. Prikaz promjena konc. fekalnog kalprotektina u sva tri ekstrakta uzorka 4 tijekom 120 sati



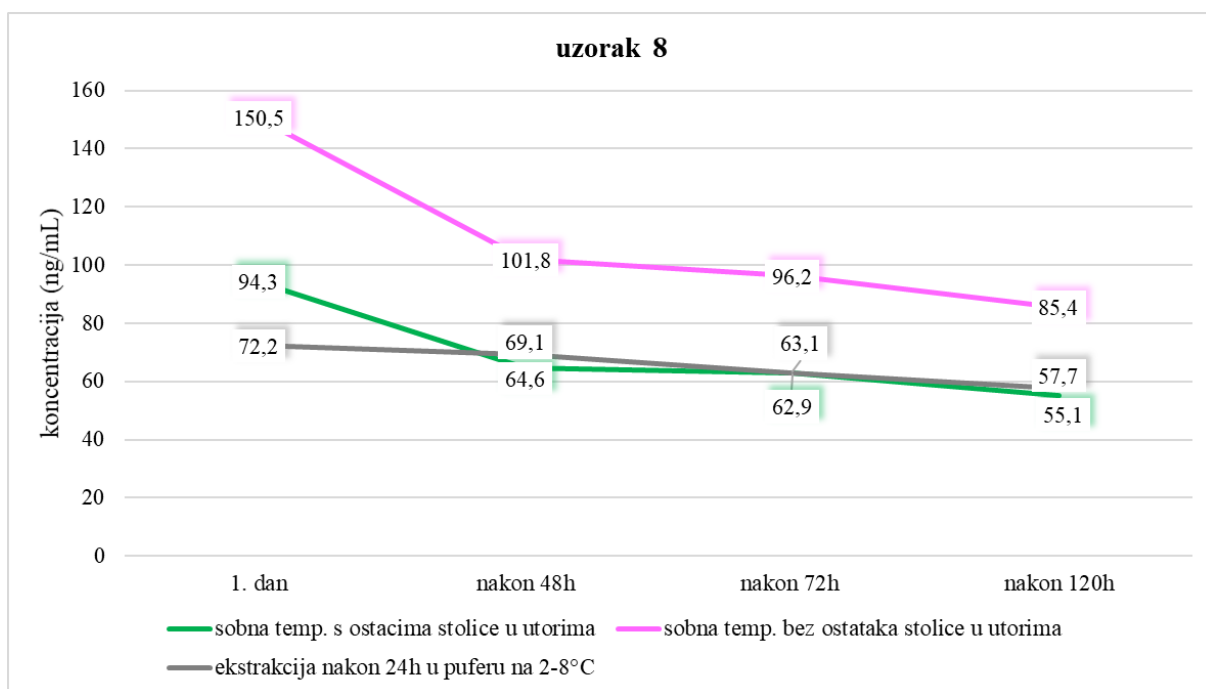
Slika 4-28. Prikaz promjena konc. fekalnog kalprotektina u sva tri ekstrakta uzorka 5 tijekom 120 sati



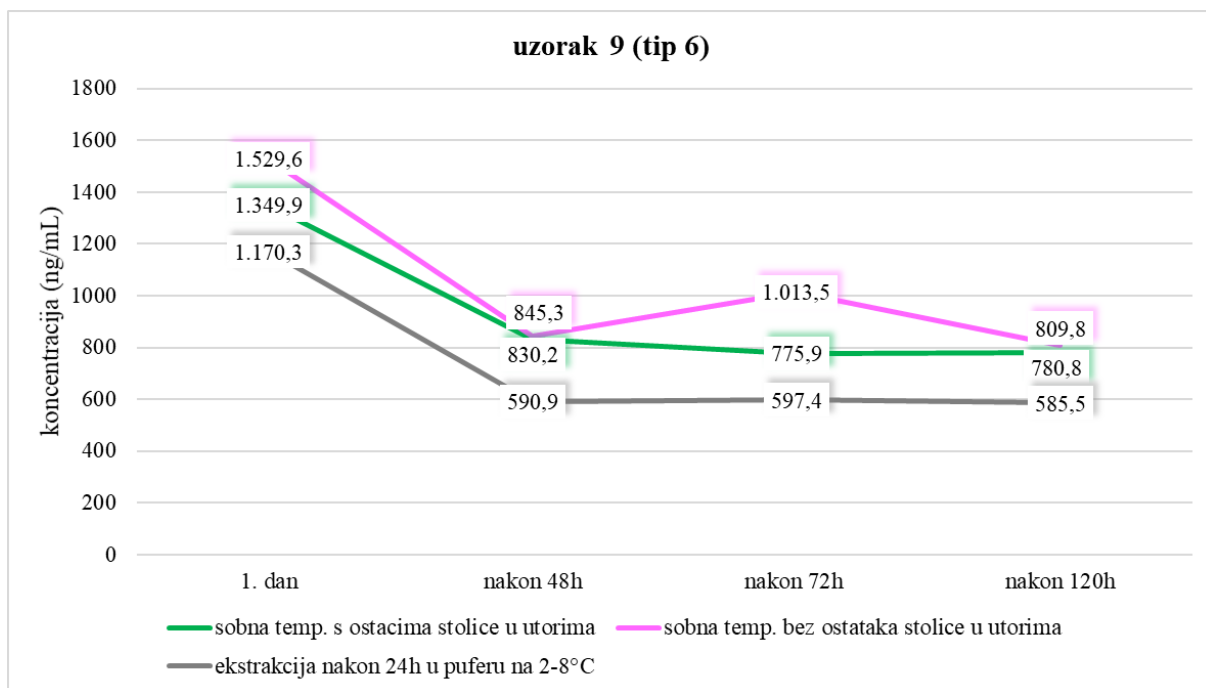
Slika 4-29. Prikaz promjena konc. fekalnog kalprotektina u sva tri ekstrakta uzorka 6 tijekom 120 sati



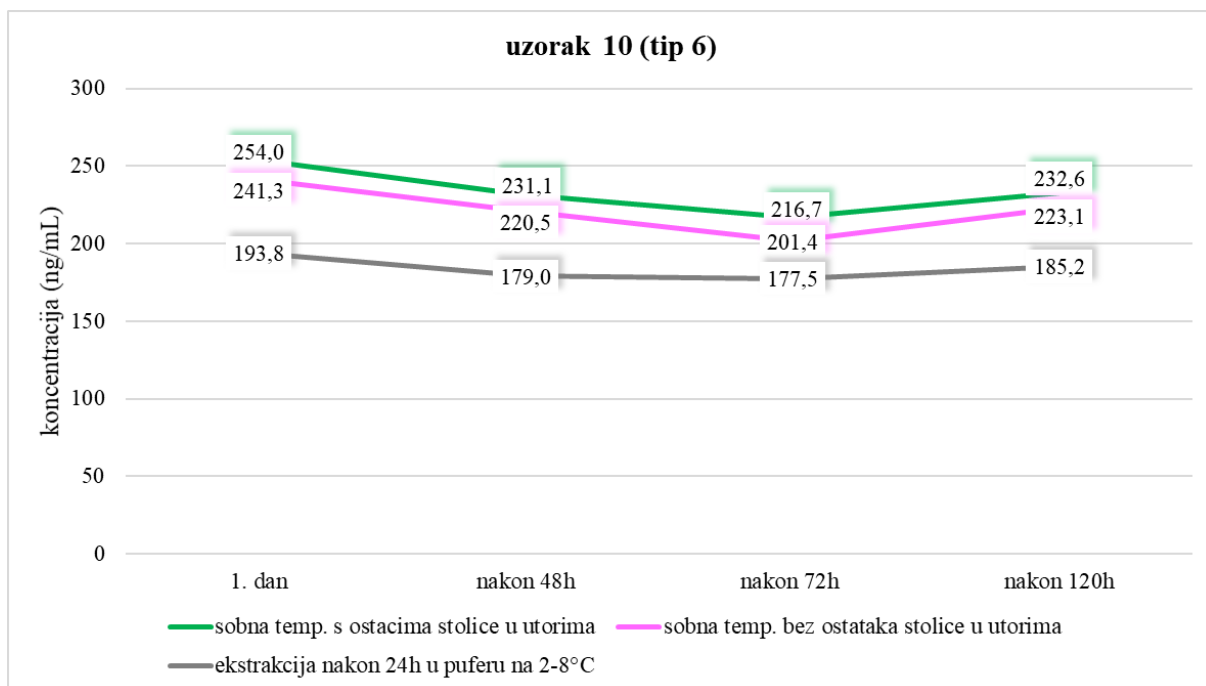
Slika 4-30. Prikaz promjena konc. fekalnog kalprotektina u sva tri ekstrakta uzorka 7 tijekom 120 sati



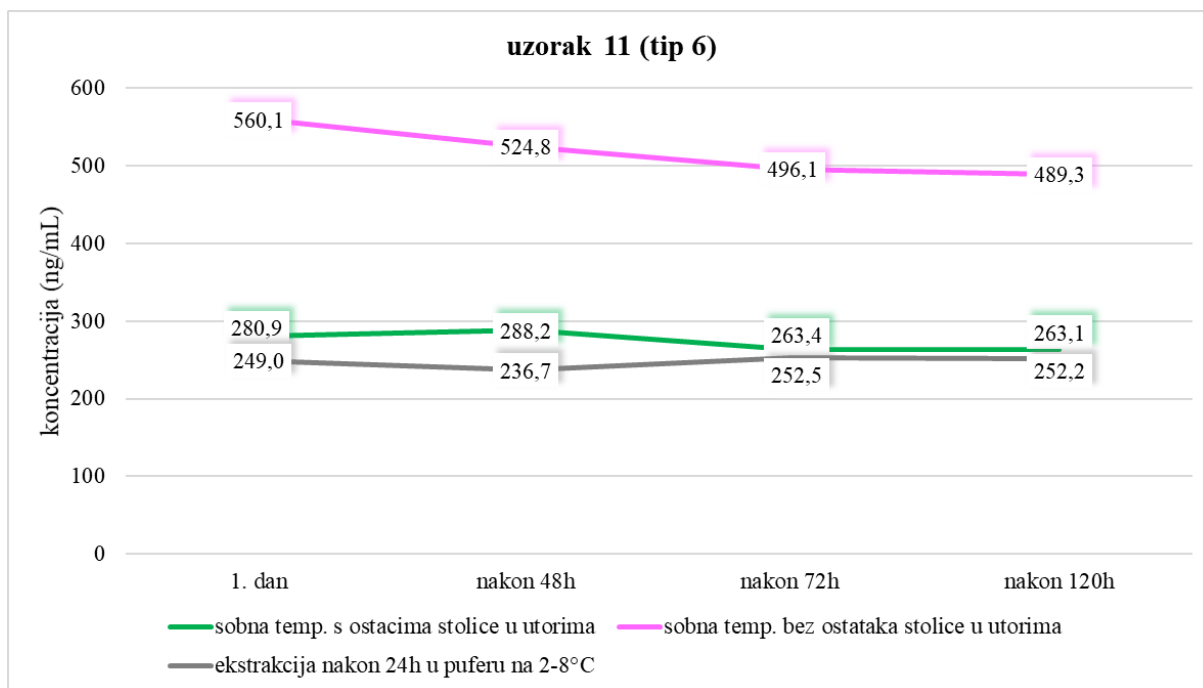
Slika 4-31. Prikaz promjena konc. fekalnog kalprotektina u sva tri ekstrakta uzorka 8 tijekom 120 sati



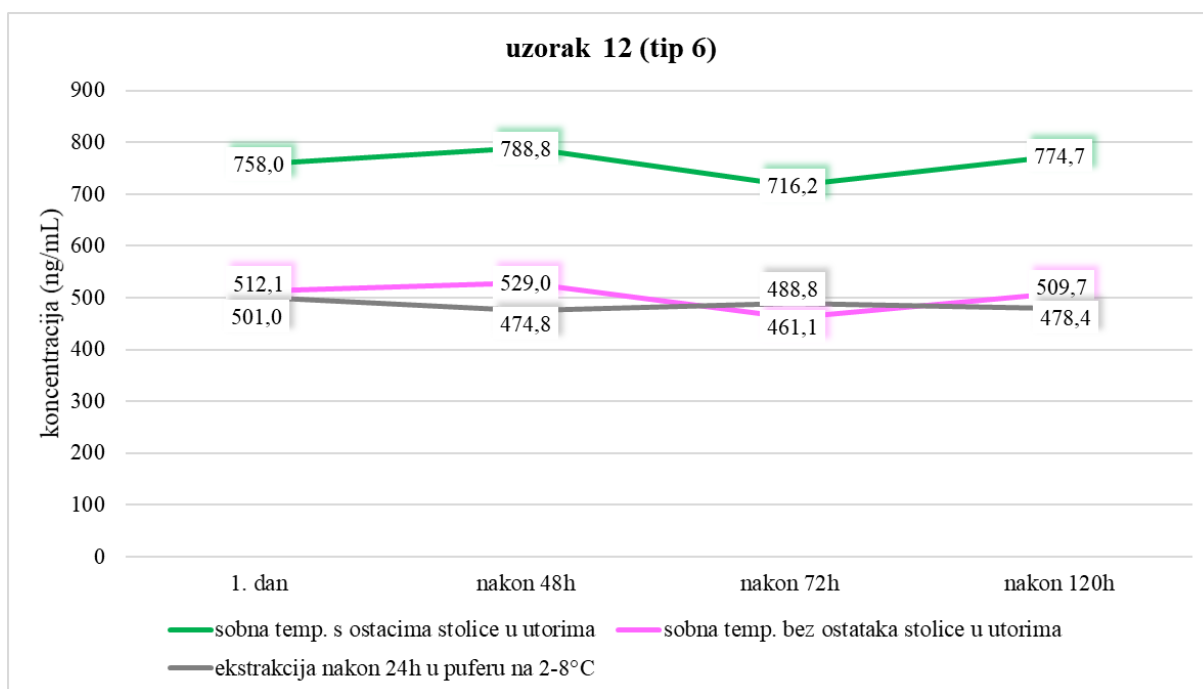
Slika 4-32. Prikaz promjena konc. fekalnog kalprotektina u sva tri ekstrakta uzorka 9 tijekom 120 sati



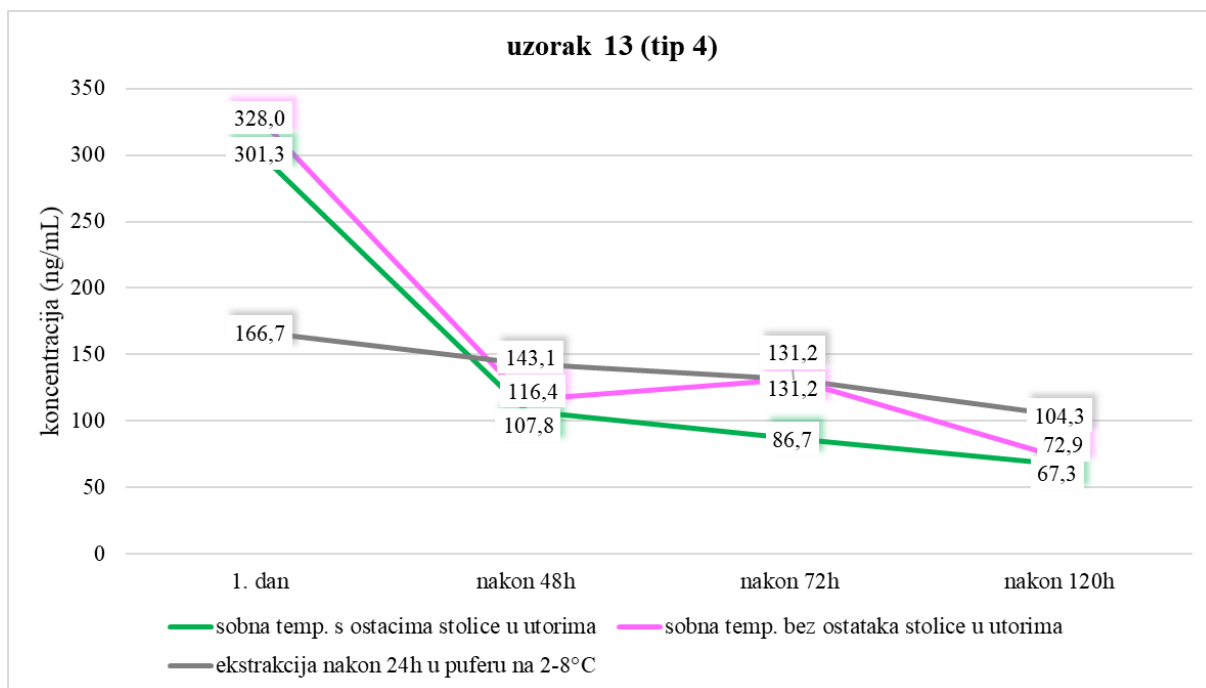
Slika 4-33. Prikaz promjena konc. fekalnog kalprotektina u sva tri ekstrakta uzorka 10 tijekom 120 sati



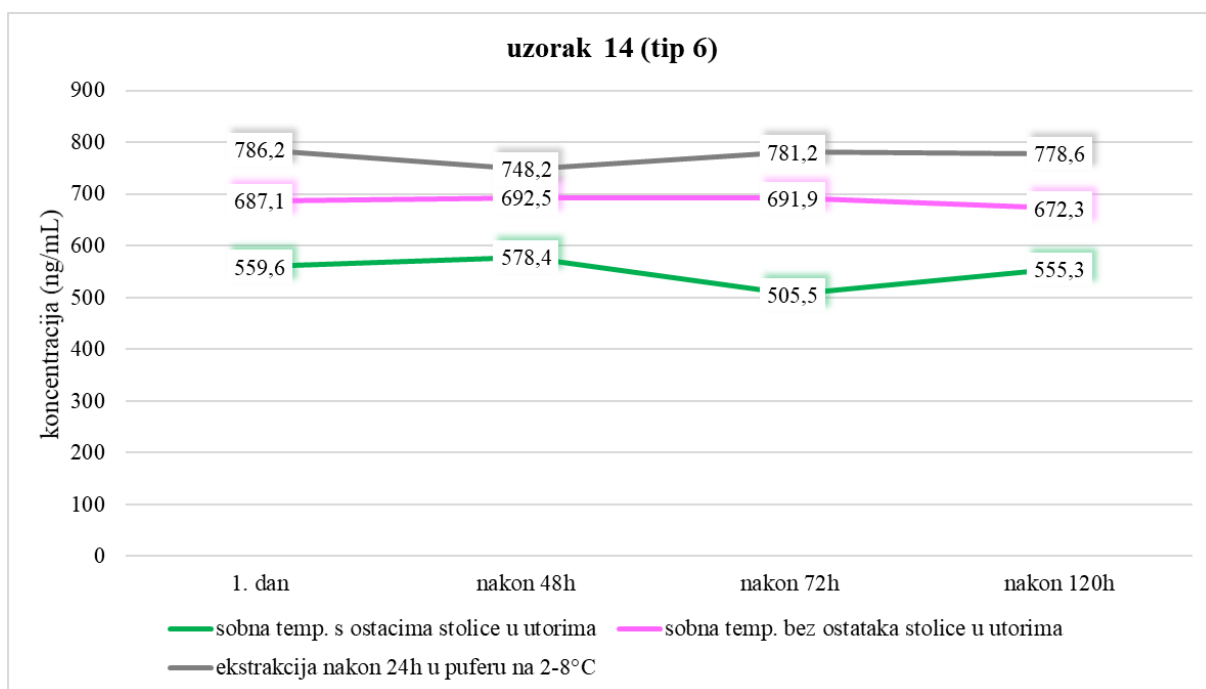
Slika 4-34. Prikaz promjena konc. fekalnog kalprotektina u sva tri ekstrakta uzorka 11 tijekom 120 sati



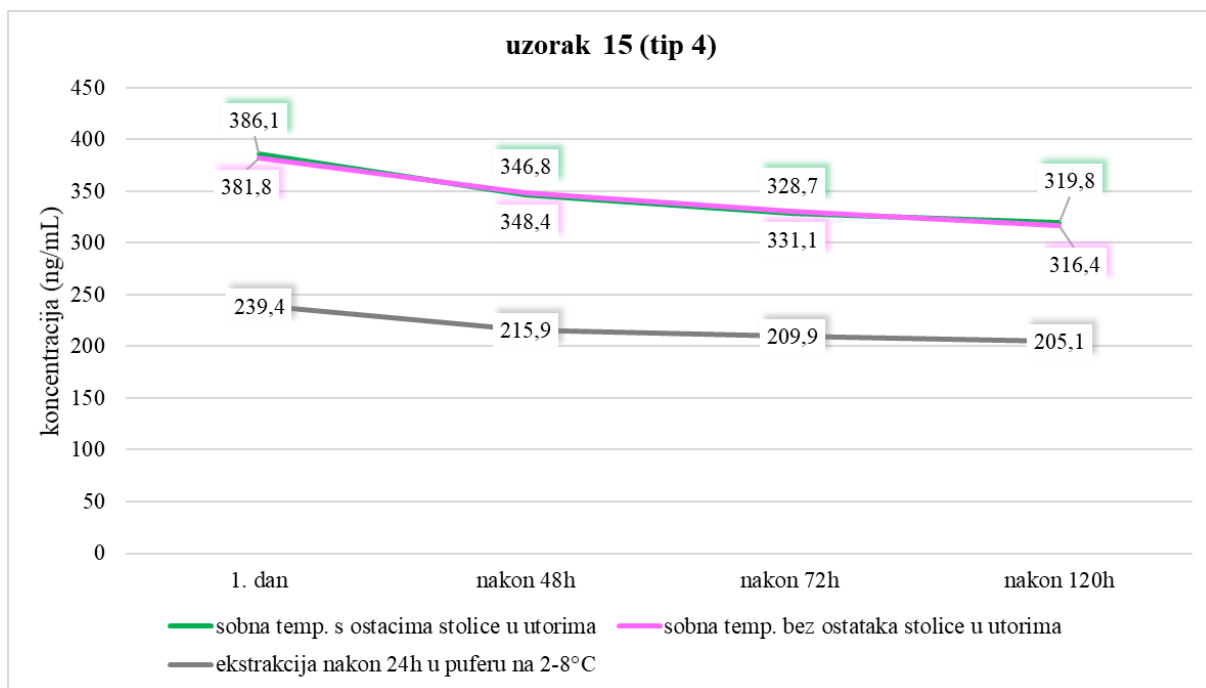
Slika 4-35. Prikaz promjena konc. fekalnog kalprotektina u sva tri ekstrakta uzorka 12 tijekom 120 sati



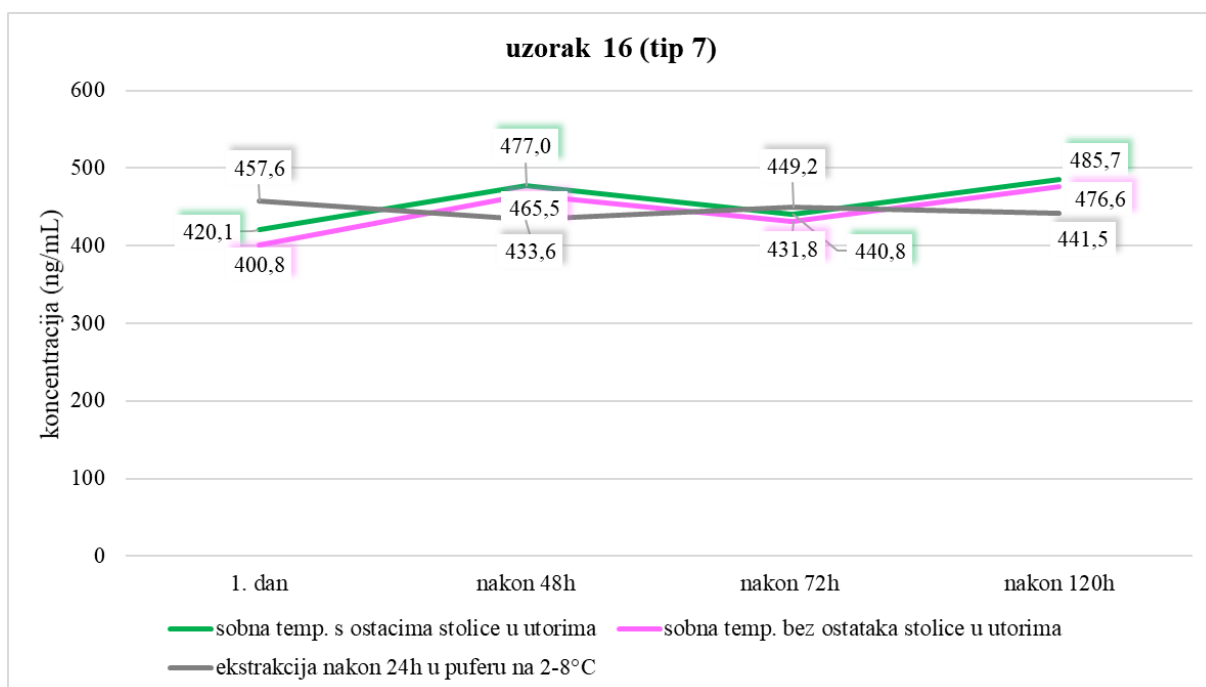
Slika 4-36. Prikaz promjena konc. fekalnog kalprotektina u sva tri ekstrakta uzorka 13 tijekom 120 sati



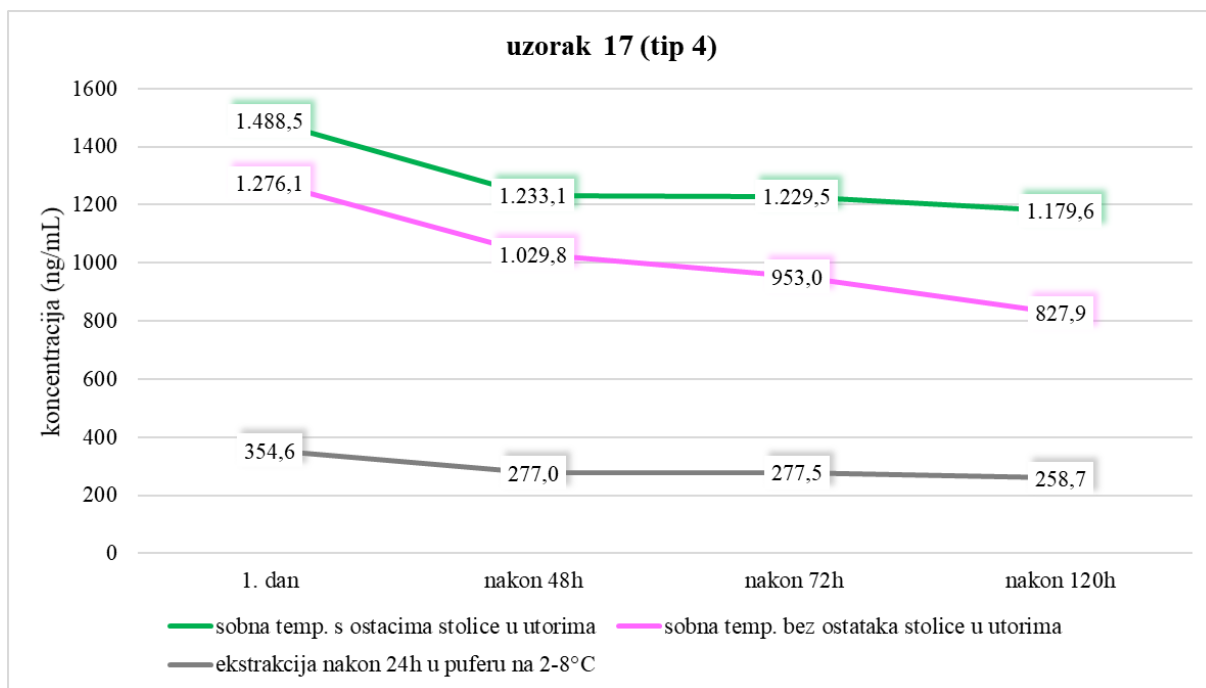
Slika 4-37. Prikaz promjena konc. fekalnog kalprotektina u sva tri ekstrakta uzorka 14 tijekom 120 sati



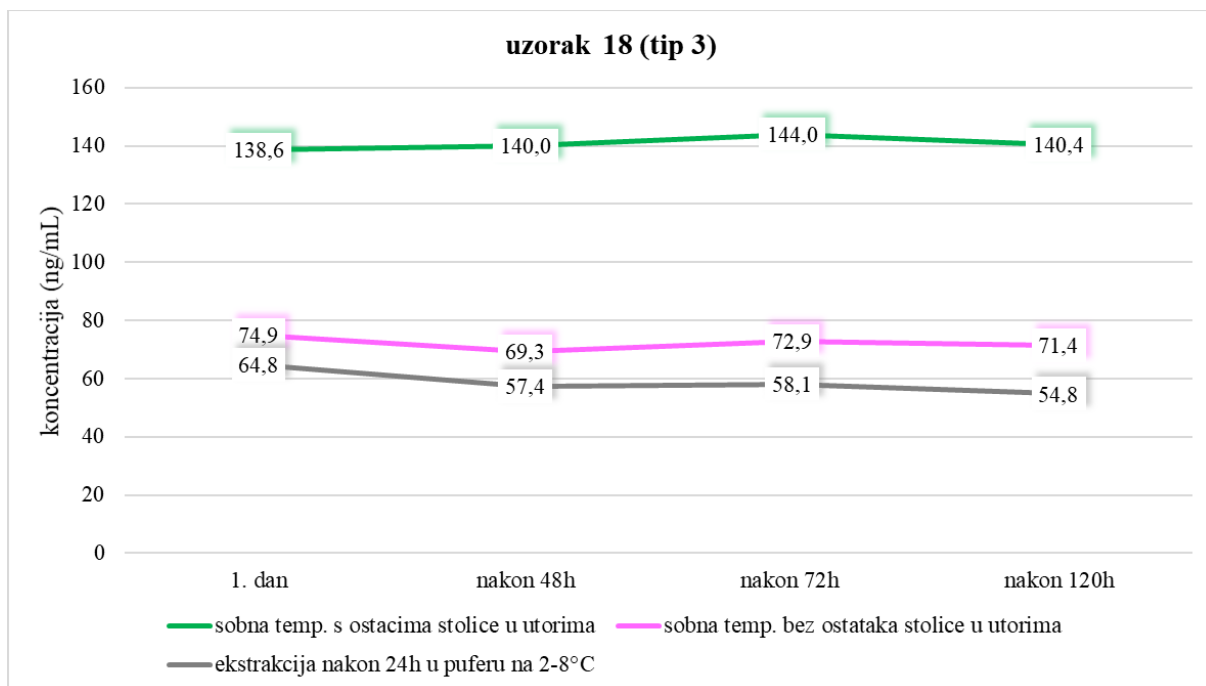
Slika 4-38. Prikaz promjena konc. fekalnog kalprotektina u sva tri ekstrakta uzorka 15 tijekom 120 sati



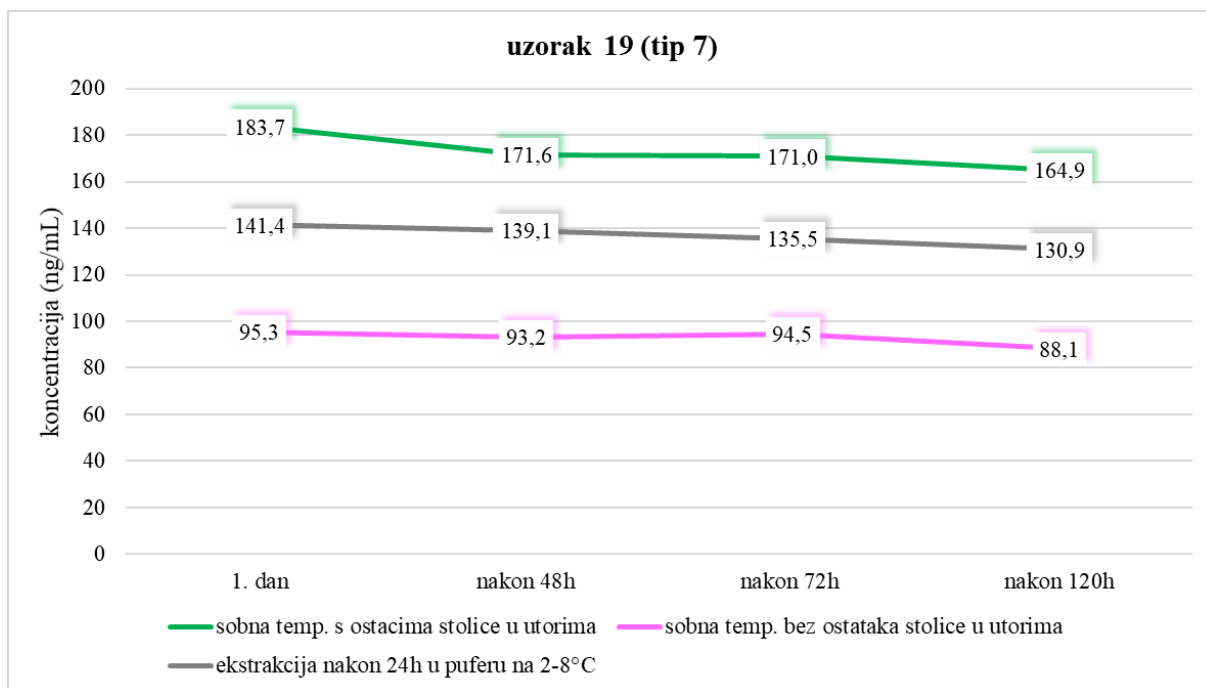
Slika 4-39. Prikaz promjena konc. fekalnog kalprotektina u sva tri ekstrakta uzorka 16 tijekom 120 sati



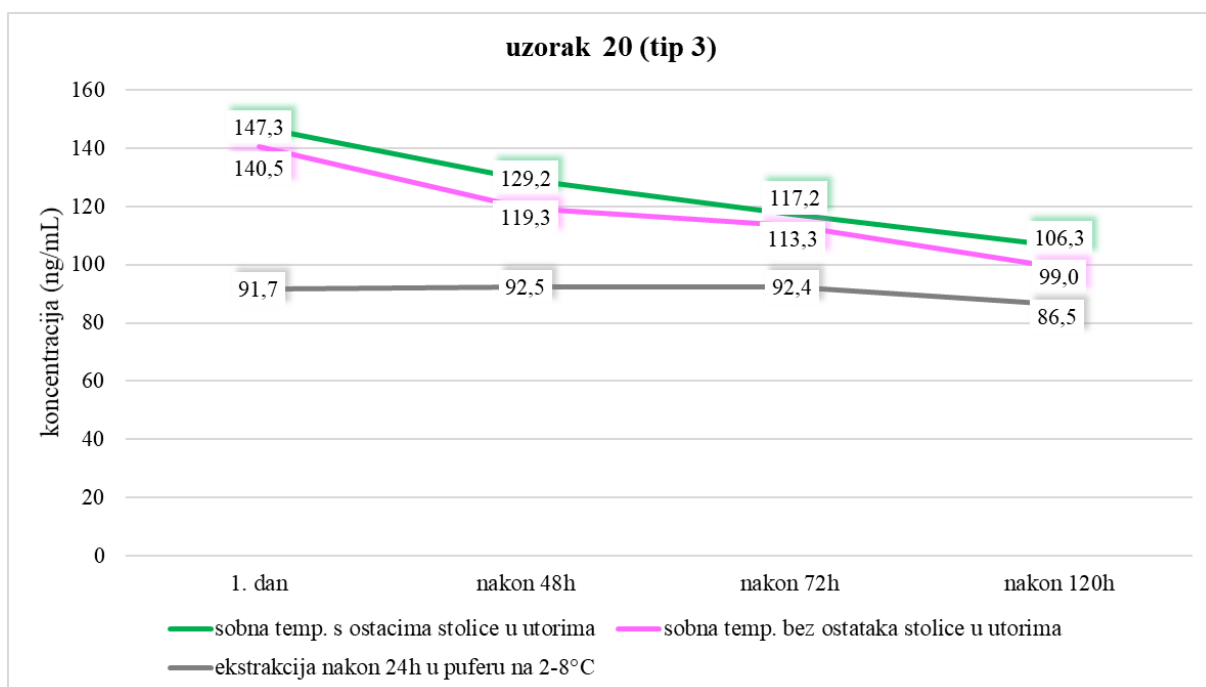
Slika 4-40. Prikaz promjena konc. fekalnog kalprotektina u sva tri ekstrakta uzorka 17 tijekom 120 sati



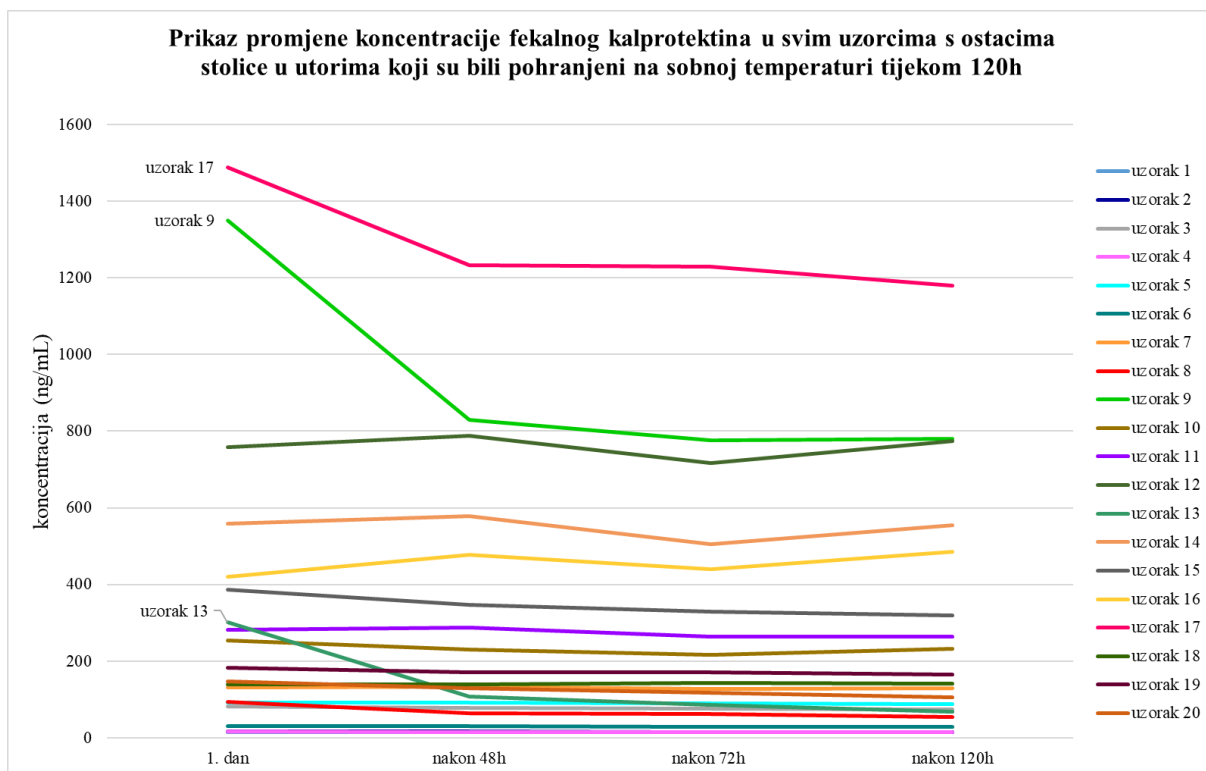
Slika 4-41. Prikaz promjena konc. fekalnog kalprotektina u sva tri ekstrakta uzorka 18 tijekom 120 sati



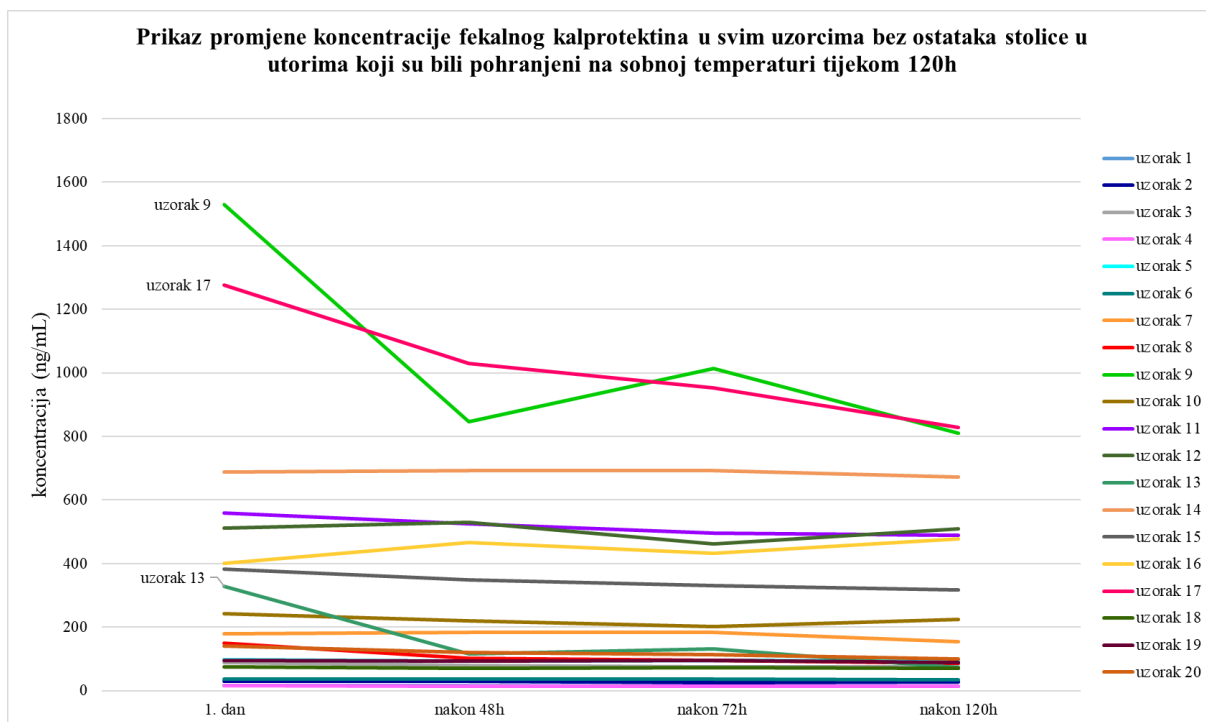
Slika 4-42. Prikaz promjena konc. fekalnog kalprotektina u sva tri ekstrakta uzorka 19 tijekom 120 sati



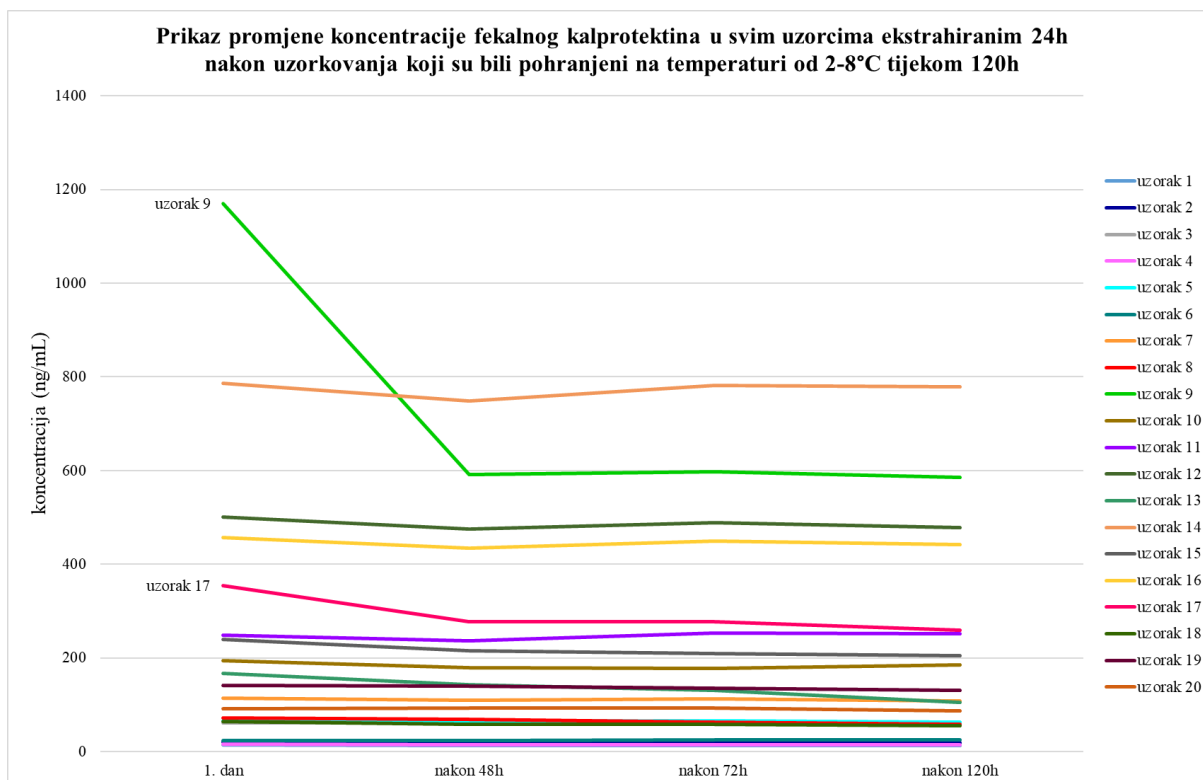
Slika 4-43. Prikaz promjena konc. fekalnog kalprotektina u sva tri ekstrakta uzorka 20 tijekom 120 sati



Slika 4-44. Prikaz promjene konc. fekalnog kalprotektina u svim uzorcima s ostacima stolice u utorima koji su bili pohranjeni na sobnoj temperaturi tijekom 120 sati (ekstrakti 1)



Slika 4-45. Prikaz promjene konc. fekalnog kalprotektina u svim uzorcima bez ostataka stolice u utorima koji su bili pohranjeni na sobnoj temperaturi tijekom 120 sati (ekstrakti 2)

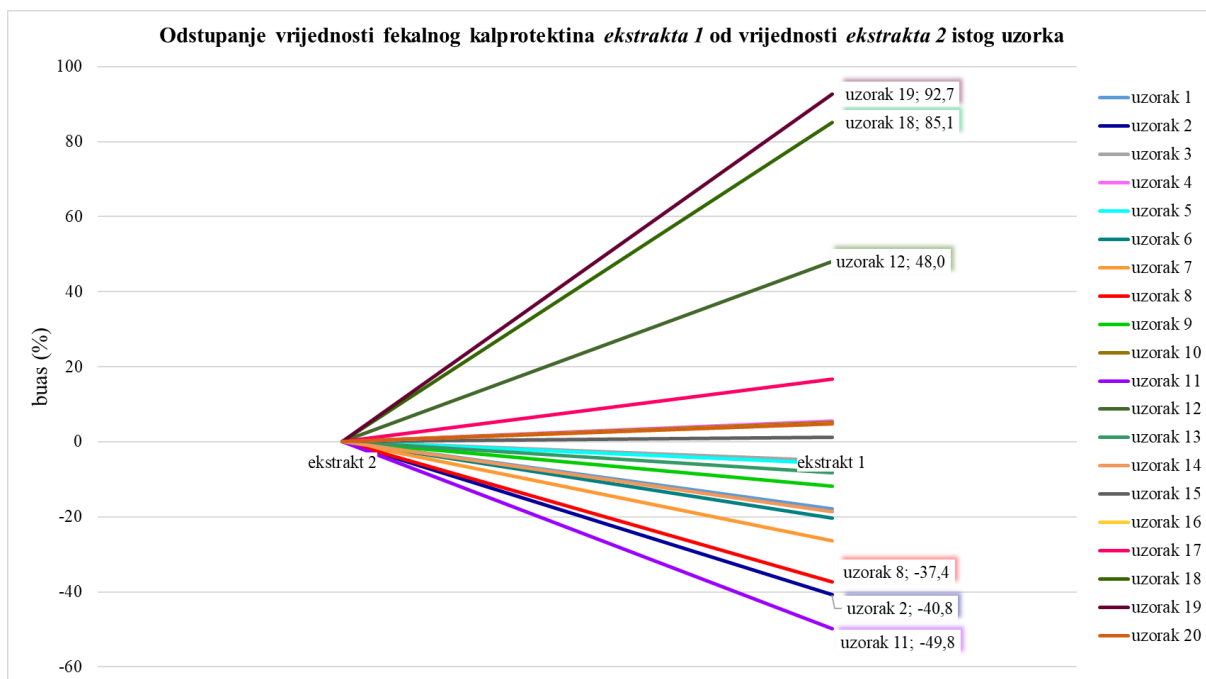


Slika 4-46. Prikaz promjene konc. fekalnog kalprotektina u svim uzorcima ekstrahiranim 24 sata nakon uzorkovanja koji su bili pohranjeni na temperaturi od 2-8°C tijekom 120 sati (ekstrakti 3)

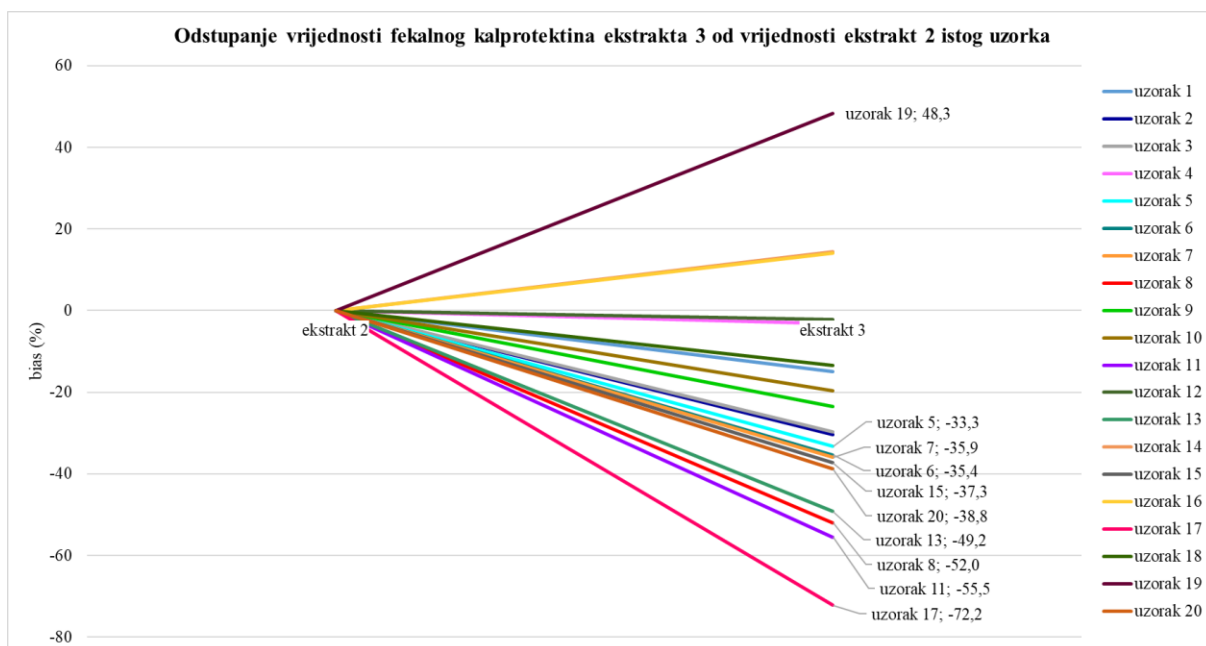
4.3. Prikaz odstupanja vrijednosti fekalnog kalprotektina ekstrakta 1 i 3 od ekstrakta 2 istog uzorka

Ekstrakt 2 smatramo referentnim zato što je sva stolica izašla iz utora u pufer i zapravo predstavlja najtočniju količinu stolice. Zato smo izračunali odstupanja vrijednosti fekalnog kalprotektina ekstrakta 1 i ekstrakta 3 od ekstrakta 2 za svaki pojedini uzorak prilikom prvog mjerenja, tj. mjerenja odmah nakon ekstrakcije. Na taj način ćemo vidjeti kolika su odstupanja u koncentracijama za pojedini uzorak ekstrahiran na tri načina.

Npr. za uzorak 1 je ciljna vrijednost bila prosječna koncentracija ekstrakta 2, dok je kao izmjerena vrijednost uvrštena prosječna koncentracija ekstrakta 1 u prvom slučaju, a u drugom je prosječna koncentracija ekstrakta 3.



Slika 4-47. Prikaz odstupanja vrijednosti fekalnog kalprotektina ekstrakta 1 od vrijednosti ekstrakta 2 istog uzorka



Slika 4-48. Prikaz odstupanja vrijednosti fekalnog kalprotektina ekstrakta 3 od vrijednosti ekstrakta 2 istog uzorka

5. RASPRAVA

Kako je određivanje fekalnog kalprotektina nestandardizirana metoda, prema literaturnim podacima (Padoan i sur., 2018) je zaključeno da je dopušteno intraindividualno odstupanje (CVi) za CLIA metodu 31,4%.

Odstupanja (bias, %) izmjerenih koncentracija od očekivanih koncentracija u sve četiri točke mjerenja su bila unutar kriterija prihvatljivosti za stabilnost svih ekstrakta osim *ekstrakta 1 i 2* uzorka 8, *ekstrakta 1, 2 i 3* uzorka 9 i uzorka 13, te *ekstrakta 2* uzorka 17.

Ekstrakti 1 i 2 uzorka 8, *ekstrakti 1, 2 i 3* uzorka 9 i *ekstrakti 1 i 2* uzorka 13 pokazuju odstupanja izvan kriterija prihvatljivosti već pri drugom mjerenju, tj. pri mjerenju koncentracije fekalnog kalprotektina nakon 48 sati.

Ekstrakt 3 uzorka 13 i *ekstrakt 2* uzorka 17 pokazuju odstupanja izvan kriterija prihvatljivosti pri četvrtom mjerenju, tj. pri mjerenju koncentracije fekalnog kalprotektina nakon 120 sati.

Možemo zaključiti da *ekstrakti 1 i 2* uzorka 8, *ekstrakti 1, 2 i 3* uzorka 9 i *ekstrakti 1, 2 i 3* uzorka 13 ne zadovoljavaju uvjetima stabilnosti koje je naveo proizvođač, dok *ekstrakt 2* uzorka 17 zadovoljava uvjete (stabilan je 72 sata).

Uzorak 9 je tip 6 stolice prema ljestvici po Bristolu. Pet uzoraka je kategorizirano u tip 6 stolice, što znači da 20% stolica tipa 6 nije zadovoljilo uvjete za stabilnost.

Uzorci 13 i 17 su tip 4 stolice prema ljestvici po Bristolu. Tri uzorka su kategorizirana u tip 4 stolice, što znači da 66,7% stolica tipa 4 nije zadovoljilo uvjete za stabilnost.

Ako se svi ekstrakti podijele u kategorije prema početnim koncentracijama fekalnog kalprotektina, svi ekstrakti čija je koncentracija bila <43,5 ng/mL su zadovoljili uvjetima stabilnosti. 1/12 ekstrakata početne koncentracije 43,5-104,3 ng/mL, 4/31 ekstrakata početne koncentracije 104,3-1000 ng/mL i 4/5 ekstrakata početne koncentracije >1000 ng/mL nije zadovoljilo uvjetima stabilnosti. Stoga se može zaključiti da čim je veća početna koncentracija fekalnog kalprotektina, tim je veća mogućnost da ekstrakt neće zadovoljiti uvjetima stabilnosti.

Tablica 1. Prikaz broja ekstrakata kategoriziranih prema početnim koncentracijama fekalnog kalprotektina koji nisu zadovoljili uvjetima stabilnosti

	< 43,5 ng/mL	43,5-104,3 ng/mL	104,3-1000 ng/mL	> 1000 ng/mL
ukupan broj ekstrakata	12	12	31	5
broj ekstrakata koji nisu zadovoljili uvjetima stabilnosti	0	1	4	4
udio	0	1/12	4/31	4/5

Kod analiziranja odstupanja vrijednosti fekalnog kalprotektina *ekstrakta 1* od vrijednosti *ekstrakta 2* istog uzorka (koncentracije izmjerene odmah nakon ekstrakcije), možemo zaključiti da uzorci 2, 8, 11, 12, 18 i 19 nisu zadovoljili uvjete (dozvoljeno je CVi = 31,4%).

Kod analiziranja odstupanja vrijednosti fekalnog kalprotektina *ekstrakta 3* od vrijednosti *ekstrakta 2* istog uzorka (koncentracije izmjerene odmah nakon ekstrakcije), možemo zaključiti da uzorci 5, 6, 7, 8, 11, 13, 15, 17, 19 i 20 nisu zadovoljili uvjete (dozvoljeno je CVi = 31,4%).

Tijekom eksperimentalnog rada analizirano je 20 uzoraka. U 15 od 20 uzoraka (75%) je *ekstrakt 3* imao najmanju početnu koncentraciju. U 8 od 20 uzoraka (40%) je *ekstrakt 1* imao najveću koncentraciju, dok je u 9 od 20 uzoraka (45%) *ekstrakt 2* imao najveću koncentraciju. U 55% slučajeva *ekstrakt 2* ima veću početnu koncentraciju fekalnog kalprotektina od *ekstrakta 1*, što znači da je vorteksiranje epruvete za ekstrakciju sve dok sva stolica ne izađe iz utora u pufer imalo utjecaj na koncentraciju fekalnog kalprotektina u 55% slučajeva u usporedbi s vorteksiranjem prema uputama proizvođača.

Iako postoje razlike u koncentracijama između tri ekstrakta istog uzorka (dobiveno mjerenjem odmah nakon ekstrakcije), u 15 od 20 uzoraka ekstrakti pripadaju u istu kategoriju rezultata (negativno, neodređeno ili pozitivno). Iznimke su uzorci 8, 13, 18, 19 i 20.

Rezultat *ekstrakta 2* uzorka 8 je pozitivan prilikom prvog mjerenja, a sljedeća 3 rezultata su neodređena kao i kod ostala dva ekstrakta.

Rezultat *ekstrakta 1* uzorka 13 je neodređen prilikom mjerenja nakon 72 sata, dok su rezultati *ekstrakta 2 i 3* pozitivni. U ostalim mjerenjima se slažu.

Rezultat *ekstrakta 1* uzorka 18 je pozitivan za sva mjerenja, dok su rezultati ostala dva ekstrakta neodređeni.

Rezultati *ekstrakta 2* uzorka 19 su neodređeni za sva mjerenja, dok su rezultati ostala dva ekstrakta pozitivni.

Rezultati *ekstrakta 3* uzorka 20 su neodređeni za sva mjerenja, dok su rezultati ostala dva ekstrakta pozitivni.

Ekstrakti koji imaju u najviše uzoraka (60%) najveća odstupanja nakon 120 sati jesu *ekstrakti 2* (koji sadrže najveću količinu stolice), dok ekstrakti koji imaju u najviše uzoraka (70%) najmanja odstupanja nakon 120 sati jesu *ekstrakti 3* koji su bili pohranjeni na temperaturi od 2°C do 8°C.

6. ZAKLJUČCI

1. Fekalni kalprotektin je protein akutne faze upale i ima važnu ulogu u urođenom imunosnom odgovoru. Koristi se kao biomarker za razlikovanje upalnih crijevnih bolesti (IBD) od sindroma iritabilnog crijeva (IBS). Kod IBS-a je koncentracija fekalnog kalprotektina niža od one kod IBD-a, ali je uvijek viša od koncentracije kod zdravih pojedinaca.

2. Koncentracija fekalnog kalprotektina manja od 43,5 ng/mL (<50 mg/kg) definira se kao negativan rezultat, koncentracija $\geq 43,5$ - < 104,3 ng/mL (≥ 50 - < 120 mg/kg) kao neodređen rezultat, a $\geq 104,3$ ng/mL (≥ 120 mg/kg) kao pozitivan rezultat.

3. Na osnovu dobivenih rezultata nakon provedene analize, može se zaključiti da:

- 15% *ekstrakata 1*, 15% *ekstrakata 2* te 10% *ekstrakata 3* nije zadovoljilo uvjetima stabilnosti koje je naveo proizvođač,
- petina (20%) stolica tipa 6 i dvije trećine (66,7%) stolica tipa 4 nije zadovoljila uvjete za potrebnu stabilnost,
- su svi ekstrakti čija je koncentracija bila <43,5 ng/mL zadovoljili uvjetima stabilnosti, a čim je veća početna koncentracija fekalnog kalprotektina, tim je veća mogućnost da ekstrakt neće zadovoljiti uvjetima stabilnosti,
- najveća odstupanja nakon 120 sati imaju *ekstrakti 2* koji sadrže najveću količinu stolice, dok najmanja odstupanja imaju *ekstrakti 3* koji su pohranjeni na temperaturi od 2°C do 8°C.

7. LITERATURA

Calprotectin, <https://www.calprotectina.com/en/calprotectina>, pristupljeno 10.8.2021.

Calprotectin, fecal, <https://www.labcorp.com/tests/123255/calprotectin-fecal>, pristupljeno 24.9.2021.

Crohnova bolest, <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/bolesti-probave/upalne-bolesti-crijeva/crohnova-bolest>, pristupljeno 23.9.2021.

Crystal structure of human calprotectin (S100A8/S100A9), <https://www.rcsb.org/3d-view/1XK4/1>, pristupljeno 8.8.2021.

Guyton A., Hall J. Medicinska fiziologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2006, str. 817

Juricic G, Brencic T, Tesija-Kuna A, Njegovan M, Honovic L. Faecal calprotectin determination: impact of preanalytical sample treatment and stool consistency on within- and between-method variability. *Biochem Med (Zagreb)*. 2019;29:010707

Nikolac Gabaj N. i sur. Ekstravaskularni uzorci u laboratorijskoj medicini. Zagreb, Medicinska naklada, 2019, str. 122-124.

Padoan, A., D'Inca, R., Scapellato, M., De Bastiani, R., Caccaro, R., Mescoli, C., Moz, S., Bozzato, D., Zambon, C., Lorenzon, G., Rugge, M., Plebani, M. and Basso, D. (2018) Improving IBD diagnosis and monitoring by understanding preanalytical, analytical and biological fecal calprotectin variability. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, Vol. 56 (Issue 11), pp. 1926-1935. <https://doi.org/10.1515/cclm-2018-0134>

Pathirana WGW, Chubb SP, Gillett MJ, Vasikaran SD. Faecal Calprotectin. *Clin Biochem Rev*. 2018;39(3):77-90

Sindrom iritabilnog crijeva, <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-za-pacijente/probavne-bolesti/poremecaji-praznjenja-crijeva/sindrom-iritabilnog-crijeva>, pristupljeno 23.9.2021.

Šimundić Ana-Maria. Predanalitička faza laboratorijskog rada. Zagreb, Medicinska naklada, 2012, str. 21

The bristol stool chart, <https://www.abc.net.au/news/2019-04-22/the-bristol-stool-chart---full-image/11035710?nw=0>, pristupljeno 11.10.2021.

Ulcerozni kolitis, <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/bolesti-probave/upalne-bolesti-crijeva/ulcerozni-kolitis>, pristupljeno 20.9.2021.

Upute za pripremu pacijenta za laboratorijske pretrage, <https://www.bolnica-du.hr/files/Upute-za-pripremu-pacijenta-za-laboratorijske-pretrage.pdf>, pristupljeno 10.9.2021.

8. SAŽETAK/SUMMARY

Fekalni kalprotektin je važan biomarker za razlikovanje upalnih crijevnih bolesti (IBD, engl. *inflammatory bowel disease*) od sindroma iritabilnog crijeva (IBS, engl. *irritable bowel syndrome*), kao i za praćenje tijeka bolesti i recidiva. Metoda je neinvazivna, a pacijent se upućuje na kolonoskopiju u slučaju povišene koncentracije fekalnog kalprotektina odnosno, ukoliko se sumnja na IBD.

U ovom radu ispitana je stabilnost 20 uzoraka tijekom 120 sati. Koncentracija fekalnog kalprotektina se mjerila kemiluminiscentnom imunoanalizom (CLIA) upotrebom komercijalnog sustava za ekstrakciju QUANTA Flash[®] Calprotectin (INOVA Diagnostics, San Diego, CA, USA) na analizatoru BIO-FLASH (INOVA Diagnostics, San Diego, CA, USA). Zaključno, 85% ekstrakata koji su priređeni i obrađeni po uputama proizvođača zadovoljili su traženim uvjetima stabilnosti.

Fecal calprotectin is an essential biomarker for distinguishing inflammatory bowel disease (IBD) from irritable bowel syndrome (IBS) and monitoring the course of disease and relapse. The method is non-invasive, and the patient is referred for colonoscopy in case of elevated fecal calprotectin concentration, particularly if IBD is suspected.

In this experiment, the stability of 20 samples over 120 hours was examined.

Fecal calprotectin concentration was determined by chemiluminescent immunoassay (CLIA) method using a commercial QUANTA Flash® Calprotectin extraction system (INOVA Diagnostics, San Diego, CA, USA) on a BIO-FLASH analyzer (INOVA Diagnostics, San Diego, CA, USA).

Finally, 85% of the extracts prepared and processed according to the manufacturer's instructions meet the required stability requirements.

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

ISPITIVANJE STABILNOSTI EKSTRAKTA FEKALNOG KALPROTEKTINA UPOTREBOM KOMERCIJALNOG SUSTAVA ZA EKSTRAKCIJU QUANTA Flash® Calprotectin

Sanja Veltruski

SAŽETAK

Fekalni kalprotektin je važan biomarker za razlikovanje upalnih crijevnih bolesti (IBD, engl. *inflammatory bowel disease*) od sindroma iritabilnog crijeva (IBS, engl. *irritable bowel syndrome*), kao i za praćenje tijeka bolesti i recidiva. Metoda je neinvazivna, a pacijent se upućuje na kolonoskopiju u slučaju povišene koncentracije fekalnog kalprotektina odnosno, ukoliko se sumnja na IBD.

U ovom radu ispitana je stabilnost 20 uzoraka tijekom 120 sati. Koncentracija fekalnog kalprotektina se mjerila kemiluminiscentnom imunoanalizom (CLIA) upotrebom komercijalnog sustava za ekstrakciju QUANTA Flash® Calprotectin (INOVA Diagnostics, San Diego, CA, USA) na analizatoru BIO-FLASH (INOVA Diagnostics, San Diego, CA, USA). Zaključno, 85% ekstrakata koji su priređeni i obrađeni po uputama proizvođača zadovoljili su traženim uvjetima stabilnosti.

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

Rad sadrži: 44 stranice, 48 grafičkih prikaza, 1 tablicu i 14 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: fekalni kalprotektin, QUANTA Flash Calprotectin, stabilnost, upalne bolesti crijeva, sindrom iritabilnog crijeva

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

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

Dr. sc. Roberta Petlevski, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Rad prihvaćen: studeni 2021.

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

STABILITY TESTING OF FECAL CALPROTECTIN EXTRACT USING QUANTA Flash® Calprotectin COMMERCIAL EXTRACTION SYSTEM

Sanja Veltruski

SUMMARY

Fecal calprotectin is an essential biomarker for distinguishing inflammatory bowel disease (IBD) from irritable bowel syndrome (IBS) and monitoring the course of disease and relapse. The method is non-invasive, and the patient is referred for colonoscopy in case of elevated fecal calprotectin concentration, particularly if IBD is suspected.

In this experiment, the stability of 20 samples over 120 hours was examined.

Fecal calprotectin concentration was determined by chemiluminescent immunoassay (CLIA) method using a commercial QUANTA Flash® Calprotectin extraction system (INOVA Diagnostics, San Diego, CA, USA) on a BIO-FLASH analyzer (INOVA Diagnostics, San Diego, CA, USA).

Finally, 85% of the extracts prepared and processed according to the manufacturer's instructions meet the required stability requirements.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry. Thesis includes: 44 pages, 48 figures, 1 table and 14 references. Original is in Croatian language.

Keywords: fecal calprotectin, QUANTA Flash Calprotectin, stability, inflammatory bowel disease, irritable bowel syndrome

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

Robert Petlevski, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: November 2021