

Verifikacija reagensa za određivanje koncentracije estradiola kemiluminiscentnom imunoanalizom na analizatoru Unicel Dxl 600

Živković, Valentina

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:879094>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-04**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Valentina Živković

**VERIFIKACIJA REAGENSA ZA
ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE
ESTRADIOLA
KEMILUMINISCENTNOM
IMUNOANALIZOM NA ANALIZATORU
UNICEL DXI 600**

Završni rad

Osijek, 2023.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Valentina Živković

**VERIFIKACIJA REAGENSA ZA
ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE
ESTRADIOLA
KEMILUMINISCENTNOM
IMUNOANALIZOM NA ANALIZATORU
UNICEL DXI 600**

Završni rad

Osijek, 2023.

Rad je ostvaren na Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Osijek

Mentor rada: doc. dr. sc. Sanja Mandić, mag. med. biochem, specijalist medicinske biokemije

Neposredni voditelj: Maja Grabić, mag. med. biochem.

Rad ima 25 listova, 2 tablice i 4 slike.

ZAHVALA

Srdačno zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Sanji Mandić, spec. med. biochem, na prihvaćanju mentorstva, pruženoj pomoći i uloženom vremenu prilikom pisanja završnog rada.

Zahvaljujem Maji Grabić, mag. med. biochem, na svim savjetima i pomoći prilikom izvođenja praktičnog dijela završnog rada.

Hvala obitelji, prijateljima i kolegama koji su podrškom i razumijevanjem pridonijeli ovom mom postignuću.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Verifikacija metode	1
1.1.1. Preciznost	2
1.1.2. Istinitost	2
1.1.3. Linearnost	3
1.1.4. Referentni intervali	3
1.2. Estradiol	4
1.2.1. Određivanje estradiola	4
2. CILJ	5
3. MATERIJAL I METODE	6
3.1. Ustroj studije	6
3.2. Ispitanici	6
3.3. Metode	6
3.3.1. Imunoanaliza na Alinity i analizatoru	7
3.3.2. Imunoanaliza na Unicel DxI 600 analizatoru	7
3.4. Statističke metode	7
4. REZULTATI	9
4.1. Preciznost	9
4.2. Istinitost	9
4.3. Linearnost	10
4.4. Usporedba metoda	11
4.5. Verifikacija referentnih intervala	13
5. RASPRAVA	15
6. ZAKLJUČAK	18
7. SAŽETAK	19
8. SUMMARY	21
9. LITERATURA	23
10. ŽIVOTOPIS	25

1. UVOD

Laboratoriji u svakoj grani djelatnosti, osobito medicinski, dužni su osigurati kvalitetnu uslugu svojim korisnicima i raditi na unaprjeđenju. Uvođenje novih metoda u rutinski laboratorijski rad omogućava podizanje kvalitete usluga. Svakako je važno obratiti pozornost na praktične zahtjeve nove metode koja se uvodi u laboratorij, njezinu kliničku primjenjivost i financijske mogućnosti. Kako bi metoda ili analitički sustav bili objektivno procijenjeni moraju se utvrditi njihove karakteristike postupkom evaluacije. Evaluacija zahtjeva provođenje validacije i verifikacije (1). Verifikacija znači pružanje objektivnih dokaza da određena stavka ispunjava potrebne uvjete. To je potvrda da su svojstva mjernog sustava zadovoljavajuća (2). Verifikacija metode je postupak koji se provodi prilikom implementacije nove metode u kliničkim laboratorijima prilikom kojeg se ispituju značajke kao što su: preciznost, istinitost, linearnost i provjera referentnih intervala (1). Ovim značajkama se provjerava koliko je nova metoda prikladna za rutinsku primjenu i je li usporediva s drugom metodom (referentnom ili rutinski primjenjivanom).

Estradiol je biološki najaktivniji estrogen. Glavni je ženski spolni hormon koji ima važnu ulogu u seksualnom razvoju žena. Estradiol utječe na brojne fiziološke procese te na razvoj i progresiju brojnih bolesti pa je važan dijagnostički biljeg različitih kliničkih stanja, osobito kod žena (3,4).

1.1. Verifikacija metode

Prije uvođenja nove metode u rutinsku upotrebu treba napraviti analitičku procjenu analizatora i metode kako bi se potvrdile deklarirane specifikacije koje je odredio proizvođač. Evaluacija analitičke metode je proces kojeg čine validacija i verifikacija. Evaluacija je postupak kojim se ispituju karakteristike analitičke metode da bi se osigurali pouzdani rezultati. Samo metode koje su validirane mogu se koristiti u kliničkom laboratoriju. Validacijom se dokazuje da su značajke metode prikladne za određenu namjenu, a verifikacija je provjera točnosti specifikacija koje je postavio proizvođač (5). Verifikacija je definirana kao proces koji se provodi samo jednom kako bi se provjerila istinitost tehničkih specifikacija proizvođača (6). Novi mjeriteljski rječnik VIM4 (engl. *International Vocabulary of Metrology*) definira verifikaciju kao proces koji osigurava pružanje objektivnih dokaza da određena stavka ispunjava određene uvjete. To je potvrda da su svojstva izvedbe mjernog sustava postignuta (2).

Prilikom provedbe verifikacije u laboratorijskim uvjetima provjeravaju se: preciznost, istinitost, linearnost, referentni intervali i, ukoliko je primjenjivo, usporedba s referentnom ili rutinski korištenom metodom. Kako bi se osigurali standardni uvjeti, Institut za kliničke i laboratorijske standarde (engl. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, CLSI) objavljuje smjernice u kojima se opisuju procesi validacije i verifikacije (1).

1.1.1. Preciznost

Preciznost se definira kao slaganje između rezultata ponovljenih mjerenja dobivenih pod određenim uvjetima i može se odrediti mjerenjem stupnja slaganja između rezultata ponovljenih mjerenja (7). Prema CLSI protokolu ponovljeno mjerenje najmanje dva uzorka s različitim koncentracijama provodi se u razdoblju od 5, 6 ili 7 uzastopnih dana, i to svaki dan po jedna serija uzoraka analiziranih u triplicatu. Ako se koriste uzorci s poznatim koncentracijama, kao što su kontrolni uzorci, kalibratori ili drugi materijali s poznatom koncentracijom analita, rezultati iz jednog eksperimenta mogu se procijeniti i za točnost i za preciznost (8).

Verifikacijom se izražava nepreciznost metode pomoću standardne devijacije (SD) ili koeficijenta varijacije (KV) uz određenu srednju vrijednost analita. Pomoću dobivenih vrijednosti računa se ponovljivost iz standardne devijacije svakog pojedinog dana tijekom 5 uzastopnih dana i međupreciznost koja se računa za svaki pojedini dan preko promjene srednjih vrijednosti mjerenja (1). Ponovljivost je pokazatelj neslaganja u ponovljenim mjerenjima kada su sva mjerenja izvedena pod jednakim uvjetima. Uobičajeno se koristi naziv nepreciznost u seriji. Međupreciznost predstavlja neslaganje između ponovljenih mjerenja unutar istog laboratorija u duljem vremenskom razdoblju, što omogućuje obuhvaćanje svih poznatih, glavnih izvora mjerne pogreške. U laboratorijskoj praksi uobičajeno se koristi naziv nepreciznost iz dana u dan (2,9).

1.1.2. Istinitost

Istinitost je definirana kao bliskost slaganja između srednje vrijednosti dobivene ponavljanjem mjerenja i stvarne vrijednosti. Istinitost se povezuje sa sustavnom pogreškom te se smatra da mjerenje ima bolju istinitost kada ima manju sustavnu pogrešku (2). Mjera istinitosti je odstupanje (bias). Bias se procjenjuje analizom materijala s poznatim

koncentracijama, kao što su uzorci za kontrolu kvalitete ili referentni standardi s poznatom koncentracijom analita (7).

Istinitost metode, prema CLSI smjernicama, može se ispitati na dva načina. Jedan je određivanje odstupanja izmjerene vrijednosti od očekivane vrijednosti. Preporuka je korištenje certificiranog referentnog materijala ili onog za provjeru kontrole kvalitete. Postupak se provodi mjerenjem uzoraka u dvije koncentracijske razine, svaki uzorak mjerenjem u triplikatu, u 3 do 5 serija, nakon čega se računa odstupanje. Ukoliko su vrijednosti unutar intervala koji je deklariran od strane proizvođača, smatra se da je ispitivana metoda pouzdana za primjenu (1,8).

1.1.3. Linearnost

Linearni raspon metode definiran je kao raspon koncentracije u kojem postoji izravan proporcionalni odnos između mjernog signala i koncentracije analita. Verifikacija linearnosti sastoji se od dva koraka: procjena linearnosti i, u slučaju nelinearnosti, izračun stupnja nelinearnosti i usporedba s dopuštenim kriterijima. Najčešće se analiza radi polinomnom metodom (7).

Procjena linearnosti se radi s pet do devet uzoraka s različitim poznatim koncentracijama ili omjerima razrjeđenja koji se analiziraju u duplikatu. Preporučuje se korištenje smjese (engl. *pool*) uzoraka bolesnika pomiješanih u različitim koncentracijama. Odabiru se dva uzorka bolesnika, jedan s visokom koncentracijom, a drugi s niskom koncentracijom analita i pripremaju se u različitim razrjeđenjima (1). Metoda je linearna ako je linearan odnos između srednje vrijednosti mjerenih koncentracija i stvarnih koncentracija (8).

1.1.4. Referentni intervali

Referentni intervali su važan alat za tumačenje laboratorijskih nalaza. Referentni interval je interval koji uključuje određeni postotak referentne populacije, obično 95 %. Postupak izrade referentnog intervala za neki analit je vrlo kompleksan i skup. Zbog toga se u praksi uglavnom provodi verifikacija i prijenos referentnih intervala koje je naveo proizvođač reagensa. Takav pristup je moguć samo ako je osiguran usporediv analitički sustav i referentni uzorak. Za verifikaciju referentnih intervala dovoljno je 20 uzoraka referentnih osoba koje zadovoljavaju sve potrebne kriterije za referentnu populaciju. Referentni interval možemo prihvatiti ako se najviše dvije izmjerene vrijednosti nalaze izvan referentnih granica (7).

1.2. Estradiol

Estradiol je najpoznatiji predstavnik steroidnih hormona poznatih kao estrogeni. Izlučuje se iz jajnika i žutog tijela tijekom reproduktivnog razdoblja žene, dok se u trudnoći izlučuje primarno iz posteljice. Estradiol djeluje kao hormon rasta za ženske reproduktivne organe i ima ulogu u razvoju i održavanju spolnih karakteristika žena. Kontrolira reproduktivne funkcije žene te zajedno s progesteronom priprema endometrij za implantaciju oplođenog jajašca i održava trudnoću (3,4).

Koncentracija estradiola najniža je za vrijeme menstruacije i rane folikularne faze menstracijskog ciklusa, a najviša je u kasnoj folikularnoj fazi, neposredno prije ovulacije. Ukoliko dođe do oplodnje jajne stanice, koncentracija estradiola kontinuirano raste tijekom trudnoće. Trajno niske koncentracije estradiola su kod žena u menopauzi. Također, estradiol je prisutan i kod muškaraca gdje se izlučuje iz testisa, ali u malim količinama. Utječe na masno tkivo, metabolizam i kosti kod muškaraca slično kao i kod žena (10,11).

Određivanje estradiola je važno za procjenu funkcije jajnika, sindroma policističnih jajnika, neplodnosti muškarca i žene, amenoreje, anovulacije ili početka menopauze. Abnormalno visoka razina estradiola u muškaraca indikacija je feminizirajućeg sindroma kao što je ginekomastija. Estradiol utječe i na krvožilni, imunološki i živčani sustav pa se određuje kod sumnje na patogenezu krvožilnih bolesti i tumora koji ovise o hormonima. Također se koristi u hormonskoj kontracepciji i hormonskoj nadomjesnoj terapiji (12).

1.2.1. Određivanje estradiola

Koncentracija estradiola najčešće se rutinski mjeri različitim imunokemijskim metodama. Te su metode relativno jednostavne, brze i dostupne. Nedostatak im je nedovoljna specifičnost i, u određenoj populaciji pacijenata, nedovoljna osjetljivost. Stoga se zadnjih godina u visoko specijaliziranim laboratorijima mjerenje koncentracije estradiola provodi tehnikom LC-MS/MS (engl. *Liquid Chromatography with tandem mass spectrometry*). Ta je metoda visoko specifična i osjetljiva, ali zahtjeva pripremu uzorka pri čemu je onemogućeno pojedinačno testiranje pacijenata. Također, ova metoda zahtjeva skupu opremu i dobro educirano osoblje kako za analitičku provedbu tako i za kvantifikaciju (13,14).

2. CILJ

Ciljevi ovog rada su:

1. Ispitati preciznost, istinitost i linearnost metode za određivanje koncentracije estradiola na analizatoru Unicel DxI 600
2. Usporediti rezultate izmjerene kemiluminiscentnom metodom (CLIA) na analizatoru Unicel DxI 600 s rezultatima izmjerenim rutinski korištenom mikročestičnom imunoanalizom (CMIA) na Alinity i analizatoru (Abbott)
3. Verificirati referentne intervale

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Ustroj studije

Ustroj studije čini presječno istraživanje.

3.2. Ispitanici

Istraživanje je provedeno na Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Osijek pri čemu su analizirani uzorci seruma 123 pacijenta, različite životne dobi i spola, koji su imali zatraženu pretragu određivanja koncentracije estradiola. Podaci i uzorci pacijenata prikupljeni su i analizirani tijekom studenog 2022. godine.

3.3. Metode

Verifikacija metode je provedena prema CLSI smjernicama. Za provjeru preciznosti i istinitosti korišteni su komercijalni kontrolni uzorci: Seronorm Immunoassay Lyo L-1, REF 206005, LOT 2010908 (Sero1) i Seronorm Immunoassay Lyo L-2, REF 206105, LOT 2011909 (Sero2). Postupak mjerenja preciznosti proveden je tijekom 5 uzastopnih dana. Svaki dan su puštane kontrole u dvije koncentracijske razine. Mjerenja su rađena za svaki dan u triplicatu. Iz dobivenih podataka računala se preciznost i izrazila pomoću standardne devijacije i koeficijenta varijacije.

Za određivanje istinitosti metode napravljena su mjerenja u duplikatu, također u dvije koncentracijske razine. Postupak je proveden tijekom 5 uzastopnih dana. Iz dobivenih podataka izračunato je odstupanje (bias).

Linearnost metode odredila se u 5 točaka mjerenja, u duplikatu, pomoću komercijalnih kalibratora za estradiol (Access sensitive estradiol calibrators, LOT 288908). Za svaku od točaka mjerenja napravljen je određeni omjer između kalibratora visoke i kalibratora niske koncentracije. U prvoj točki izmjeren je uzorak s najvišom koncentracijom, dok je u petoj točki mjerenja izmjeren uzorak s najnižom koncentracijom. U ostalim točkama mjerenja, napravljeni su omjeri 3 : 1, 1 : 1 i 1 : 3. Konačno, dobiveni podaci uspoređivani su s očekivanim vrijednostima.

Za procjenu usporedivosti metoda korišteno je 123 uzorka pacijenta koji su bili prethodno pohranjeni na - 20°C. Uzorci koji su bili hemolitični, lipemični ili ikterični su

isključeni iz istraživanja. Uzorci su najprije analizirani CMIA metodom na Alinity i, a zatim CLIA metodom na UniceL DxI 600.

3.3.1. Imunoanaliza na Alinity i analizatoru

Alinity i (Abbott) estradiol je jednostupanjski kemiluminiscentni imunokemijski test (engl. *chemiluminescent microparticle immunoassay*, CMIA) za kvantitativno određivanje estradiola u humanom serumu i plazmi. Primjena se temelji na miješanju uzorka s tekućinom za razrjeđivanje uzorka, tekućinom za razrjeđivanje reagensa i paramagnetskim mikročesticama koje su obložene antitijelom na estradiol (kuneća, monoklonska antitijela). Zatim se smjesa inkubira i dodaje se konjugat estradiola koji je obilježen akridinom. Nakon još jedne inkubacije dodaju se predaktivacijska i aktivacijska otopina pri čemu nastaje kemiluminiscentna reakcija. Rezultat se izražava u relativnim svjetlosnim jedinicama koji je obrnuto proporcionalan količini estradiola u uzorku (12,15).

3.3.2. Imunoanaliza na UniceL DxI 600 analizatoru

Access sensitive estradiol na UniceL DxI (Beckman Coulter) je kemiluminiscentni imunokemijski test s paramagnetskim česticama (engl. *chemiluminescent immunoassay*, CLIA) za kvantitativno određivanje razine estradiola u humanom serumu i plazmi. Temelji se na imunoenzimskom mjerenju kompetitivnog vezanja. Uzorak se miješa s analogom estradiola i konjugatom antiestradiola (ovčja, monoklonska antitijela na estradiol konjugirana s alkalnom fosfatazom). Nakon inkubacije dodaju se paramagnetske čestice obložene analogom estradiola koje konkuriraju s estradiolom u uzorku za vezno mjesto na konjugatu antiestradiola. Kompleksi koji se stvore vežu se u čvrstoj fazi te se nakon inkubacije drže u magnetskom polju. Zatim se dodaje kemiluminiscentni supstrat. Svjetlo koje se stvori reakcijom mjeri se luminometrom i obrnuto je proporcionalno količini estradiola u uzorku (16,17).

3.4. Statističke metode

Rezultati su obrađeni statističkim programom MedCalc, verzija 12.4.0.0. (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium). Pomoću Microsoft Office Excel 2010 programa obrađeni su podaci za određivanje preciznosti i istinitosti metode uspoređeni s kriterijima prihvatljivosti. Postupak ispitivanja linearnosti ispitivan je pomoću Wilcoxon testa. Za usporedbu metoda

korištene su Bland-Altman analiza i Passing-Bablok regresijska analiza. Vrijednost $P < 0,05$ predstavlja razinu značajnosti koja se koristila za ocjenu značajnosti dobivenih rezultata.

4. REZULTATI

Ovim istraživanjem ispitana je preciznost, istinitost i linearnost metode na Unicel DxI 600 analizatoru te je napravljena usporedba s rutinski korištenom metodom na Alinity i analizatoru.

4.1. Preciznost

Rezultati ispitivanja preciznosti metode na Unicel DxI 600 izraženi kao standardna devijacija i koeficijent varijacije prikazani su u Tablici 1. Preciznost je izmjerena pomoću komercijalnih kontrolnih uzoraka niske koncentracijske razine i visoke koncentracijske razine. Preciznost je izražena kao ponovljivost (nepreciznost u seriji) i međupreciznost (nepreciznost iz dana u dan). Za nisku koncentracijsku razinu ponovljivost iznosi 3,56 %, a za visoku 1,87 %. Izmjerena međupreciznost za nisku koncentracijsku razinu iznosi 3,30 %, a za visoku koncentracijsku razinu iznosi 1,85 %.

Tablica 1. Prikaz preciznosti pomoću SD i KV gdje Sero1 predstavlja nisku koncentracijsku razinu, a Sero2 visoku koncentracijsku razinu

	Ponovljivost		Međupreciznost	
	SD (pmol/L)	KV (%)	SD (pmol/L)	KV (%)
Sero1	10,042	3,563	9,302	3,300
Sero2	30,075	1,869	29,833	1,854

4.2. Istinitost

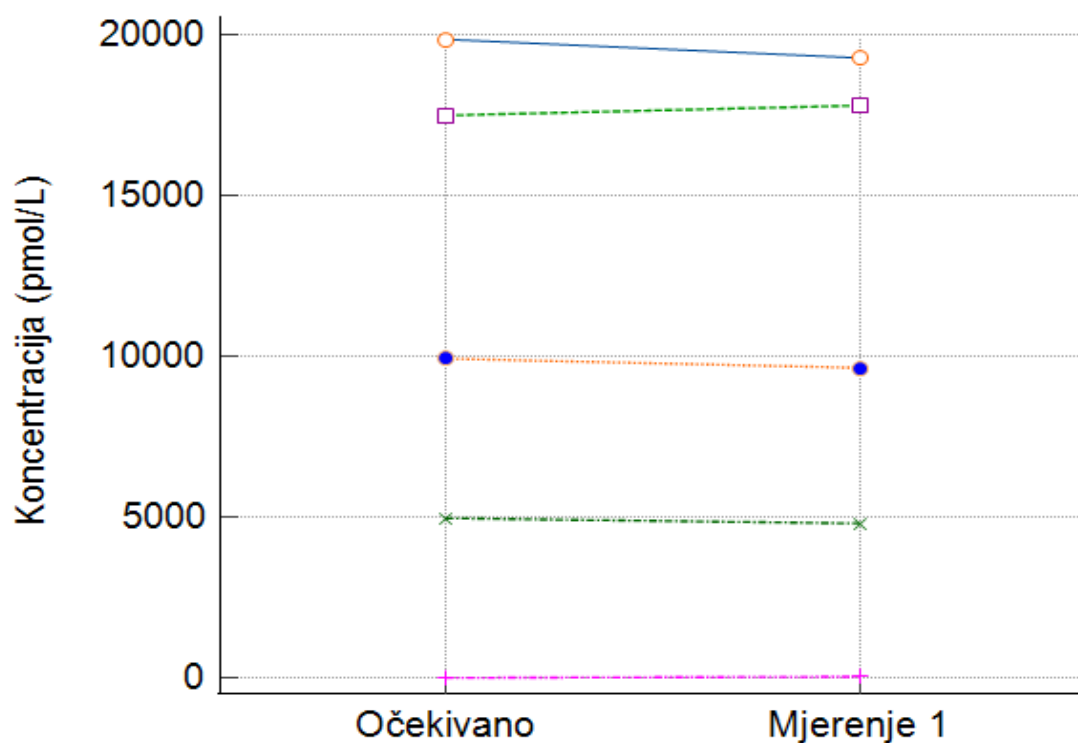
Rezultati ispitivanja istinitosti metode na Unicel DxI 600 prikazani su kao odstupanje od ciljne vrijednosti (bias) koja je određena od strane proizvođača komercijalnih kontrolnih uzoraka za estradiol. Za Sero1 propisana je ciljna vrijednost od 300 pmol/L, dok je za Sero2 ciljna vrijednost 1740 pmol/L. Za izračun istinitosti uzeta je srednja vrijednost dva mjerenja tijekom 5 uzastopnih dana te ciljna vrijednost koju je propisao proizvođač. Na osnovu razlike izračunato je odstupanje pomoću apsolutnog i relativnog biasa. Rezultati ispitivanja istinitosti prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. Prikaz istinitosti kao odstupanje (bias)

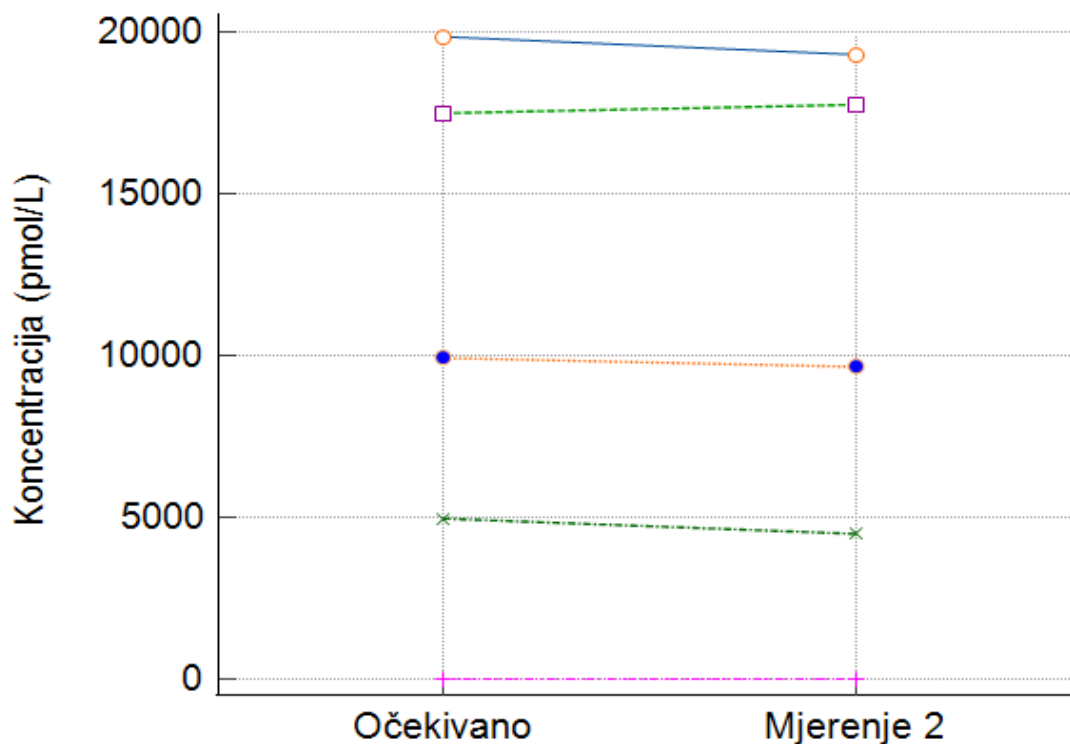
	Ciljna vrijednost (pmol/L)	Izmjerena srednja vrijednost (pmol/L)	Bias apsolutni	Bias relativni
Sero1	300	283,90	-16,10	-5,37
Sero2	1740	1605,37	-134,63	-7,74

4.3. Linearnost

Za izračun linearnosti provedena su dva mjerenja u 5 točaka različitih omjera koncentracije pomoću komercijalnih kalibratora za estradiol. Usporedba izmjerenih vrijednosti s očekivanim vrijednostima prikazana je pomoću Wilcoxon testa. Značajnost linearnosti metode za prvo mjerenje određuje vrijednost $P = 0,625$, a za drugo $P = 0,144$.



Slika 1. Razlike između očekivanih vrijednosti koncentracije i vrijednosti koncentracije dobivenih u prvom mjerenju

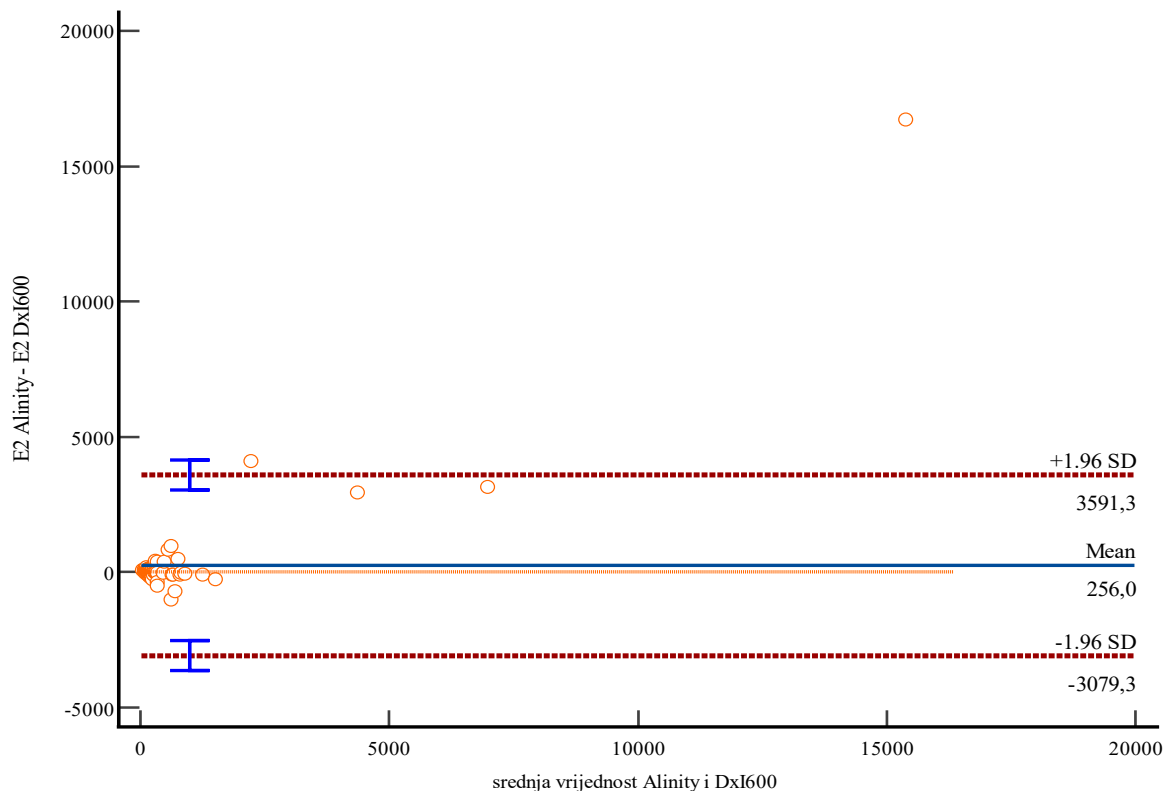


Slika 2. Razlike između očekivanih vrijednosti koncentracije i vrijednosti koncentracije dobivenih u drugom mjerenju

4.4. Usporedba metoda

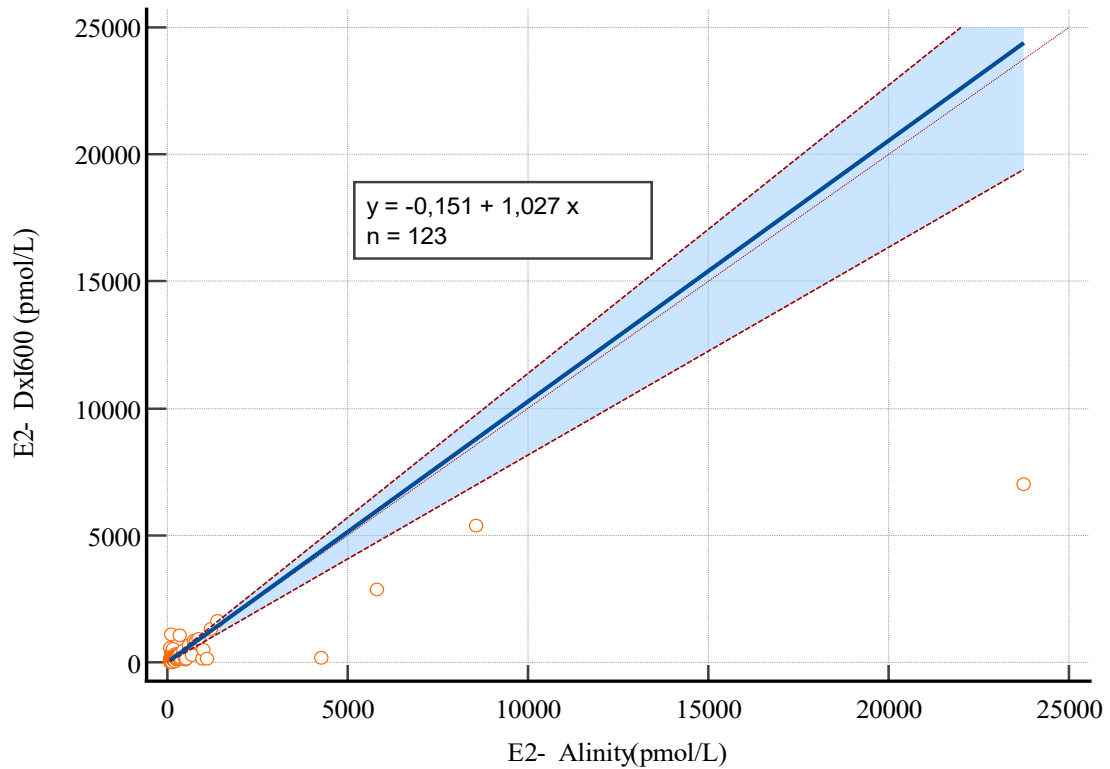
Ovim istraživanjem analizirano je 123 uzorka seruma pacijenata različite životne dobi i spola. Usporedba metode na Alinity i analizatoru s metodom na DxI 600 analizatoru prikazana je pomoću Bland-Altman analize i Passing-Bablok regresijske analize.

Na Bland-Altman prikazu (Slika 3.) rezultati su grupirani unutar granica dvije standardne devijacije $\pm 1,96$ SD. Označena je srednja vrijednost razlike u mjerenjima (256,006) i standardna devijacija razlike u mjerenjima (- 3079,3122 – 3591,3232). Dva rezultata se nalaze iznad dozvoljene gornje granice, dok se ostali rezultati nalaze unutar granica standardnih devijacija.



Slika 3. Grafikon Bland-Altman analize, središnja puna linija predstavlja srednju vrijednost razlike u mjerenjima, a gornja i donja isprekidana crta standardnu devijaciju razlike u mjerenjima

Rezultati Passing-Bablok regresijske analize (Slika 4.) prikazani su pomoću jednadžbe pravca $y = -0,151$ (95 % CI - 20,7528 – 30,1040) + $1,027x$ (95 % CI 0,8181 – 1,1348). Pearsonov koeficijent varijacije iznosi 0,970. Mjerenja izrazito visoke koncentracije nalaze se izvan dopuštenog regresijskog pravca.



Slika 4. Prikaz Passing-Bablok regresijske analize, točke predstavljaju mjerenja, puna crta regresijski pravac, isprekidane crte granice pouzdanosti, a sitno isprekidana crta idealan pravac

4.5. Verifikacija referentnih intervala

U uputama uz reagens za određivanje koncentracije estradiola CLIA metodom na Unicel DxI analizatoru navedeni su referentni intervali za žene od 19 godina ovisno o fazi ciklusa (rana folikularna, srednja folikularna, sredina ciklusa, srednja lutealna faza), za muškarce od 19 godina te dodatno za pedijatrijsku populaciju oba spola.

Verifikacija referentnih intervala napravljena je za ranu lutealnu fazu žena reproduktivne dobi, od 19 godina, korištenjem 20 uzoraka naizgled zdravih žena. Nakon mjerenja koncentracije estradiola CMIA metodom na Alinity i instrumentu, kojom je potvrđeno da su sve žene imale vrijednosti koncentracija unutar referentnog intervala (77 – 921 pmol/L) za lutealnu fazu, izmjerene su koncentracije estradiola CLIA metodom na Unicel DxI instrumentu. Medijan vrijednost koncentracija estradiola CMIA metodom na Alinity i analizatoru bila je 156 (95 % CI 125 – 196), a CLIA metodom na Unicel DxI analizatoru 149

(95 % CI 127 – 189). Od 20 rezultata izmjerenih CLIA metodom samo dva nisu bila unutar deklariranog raspona referentnih intervala za ranu folikularnu fazu žena (82 – 422 pmol/L), dok su preostali zadovoljavali kriterije referentnih intervala (18/20).

5. RASPRAVA

Ovim istraživanjem verificirani su reagensi za određivanje koncentracije estradiola kemiluminiscentnom imunoanalizom na analizatoru Unicel DxI 600 tvrtke Beckman Coulter. Svaku novu metodu koja se uvodi u primjenu u klinički laboratorij potrebno je verificirati kako bi se provjerile značajke metode koju je deklarirao proizvođač. Prilikom postupka verifikacije potrebno je metodu usporediti s onom koja se koristi u rutini te provjeriti preciznost, istinitost i linearnost same metode. Također je potrebno verificirati deklarirane referentne intervale ukoliko su napravljeni na populaciji sličnoj onoj populaciji na kojoj će se provoditi mjerenja. Smjernice za provođenje procesa verifikacije propisane su od strane Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (engl. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, CLSI) kako bi se osigurali standardni uvjeti (5).

U ovom radu prikazani su rezultati verifikacije analitičkih performansi analizatora Unicel DxI. Preciznost je izražena kao ponovljivost (nepreciznost u seriji) i međupreciznost (nepreciznost iz dana u dan) pomoću standardne devijacije i koeficijenta varijacije. Najviši koeficijent varijacije primijećen je na nižim koncentracijskim razinama. Proizvođač deklarira ponovljivost $\leq 5\%$ za nisku koncentracijsku razinu i $\leq 2\%$ za visoku koncentracijsku razinu. Dakle, izmjerena ponovljivost za obje koncentracijske razine zadovoljava kriterij naveden od strane proizvođača. Deklarirana međupreciznost od proizvođača iznosi $\leq 3\%$ za nisku koncentracijsku razinu i $\leq 2\%$ za visoku koncentracijsku razinu. Prema tome, visoka koncentracijska razina zadovoljava navedeni kriterij, dok niska koncentracijska razina prelazi kriterij koji deklarira proizvođač, ali ne značajno. Metoda, dakle, zadovoljava kriterije za ponovljivost za obje koncentracijske razine te kriterije za međupreciznost za visoku koncentracijsku razinu. Niska koncentracijska razina ima nešto veći koeficijent varijacije za međupreciznost od onoga koji je propisan od strane proizvođača.

Europska federacija za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu (engl. *European federation of clinical chemistry and laboratory medicine*, EFLM) propisuje kriterije biološke varijacije za preciznost. Propisana optimalna preciznost iznosi 3,8%. U usporedbi s navedenim, izmjerena preciznost zadovoljava EFLM kriterij (18). Također, istraživanje provedeno korištenjem Access Estradiol testa i Access Sensitive Estradiol testa na automatiziranim platformama Beckman Coulter Unicel DxI 600 analizatora u Laboratoriju za kemiju i endokrinologiju u Italiji, pokazalo je dobru ukupnu ponovljivost što je prikazano niskim

vrijednostima koeficijenta varijacije za različite koncentracijske razine i dobar linearni odnos metoda (13).

Prilikom mjerenja istinitosti korišteni su komercijalni kontrolni uzorci čija je koncentracija mjerena tijekom 5 uzastopnih dana i računala se pomoću ciljne vrijednosti i srednje vrijednosti koja je dobivena mjerenjem. Izmjerene vrijednosti bile su niže i za područje niske i za područje visoke koncentracijske razine. Deklarirani kriterij za vrijednost biasa nije naveden od strane proizvođača. Prema EFLM kriterijima biološke varijacije optimalni bias iznosi 2,5 što znači da kontrolni uzorci niske i visoke koncentracijske razine ne zadovoljavaju EFLM kriterije za istinitost (18).

U procjeni linearnosti metode, Wilcoxonov test je pokazao prihvatljive kriterije linearnosti. U vrijednostima oba mjerenja nije uočeno veće odstupanje od očekivane vrijednosti. Proizvođač navodi prihvatljivu linearnost u cijelom rasponu analitičkog mjerenja od niske do visoke koncentracijske razine. Izmjerene vrijednosti potvrđuju navedene specifikacije navedene od proizvođača, s obzirom da nema većih razlika između mjerene i očekivane vrijednosti.

Za ispitivanje usporedivosti metoda na Alinity i analizatoru i Unicel DxI 600 analizatoru korištene su Bland-Altman i Passing-Bablok regresijska analiza. Na Bland-Altman prikazu većina se vrijednosti obiju metoda nalazila unutar granica standardnih devijacija što se smatra pouzdanim rezultatima mjerenja. Dva rezultata izrazito visoke koncentracije nalaze se izvan dozvoljene granice, dok se ostale vrijednosti nalaze unutar granica standardnih devijacija što pokazuje normalnu distribuciju rezultata mjerenja.

Rezultat Passing-Bablok regresijske analize izražen je jednadžbom pravca $y = -0,151$ (95 % CI - 20,7528 – 30,1040) + 1,027x (95 % CI 0,8181 – 1,1348). Vrijednost intervala pouzdanosti odsječka sadrži vrijednost nula, a vrijednost intervala pouzdanosti nagiba pravca sadrži vrijednost jedan, što upućuje da između metoda ne postoji statistički značajno odstupanje između rezultata mjerenja. Ne postoji klinički značajna razlika između dvije metode pa to omogućuje istovremenu uporabu obje. Svakako je nužno pacijenta pratiti uvijek istom metodom, u istom laboratoriju.

Estradiol se najčešće određuje u svrhu ispitivanja reproduktivnog statusa žena, a uzorkovanje se u tu svrhu provodi između trećeg i petog dana ciklusa, što predstavlja razdoblje rane folikularne faze. Verifikacijom referentnih intervala, za ranu folikularnu fazu žena reproduktivne dobi, od 20 rezultata izmjerenih CLIA metodom samo dva nisu bila unutar

deklariranog raspona referentnih intervala, dok su preostali zadovoljavali kriterije referentnih intervala. Prema rezultatima, deklarirani referentni intervali za ranu folikularnu fazu žena u reproduktivnoj dobi zadovoljavaju verifikacijske kriterije te se mogu preuzeti i koristiti u rutinskom radu.

Temeljem navedenoga može se zaključiti da performanse kemiluminiscentne metode na Unicel DxI 600 instrumentu zadovoljavaju potrebe svakodnevnog određivanja koncentracije estradiola u kliničkom laboratoriju.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju ovog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Kemiluminiscentna metoda na Unicel DxI 600 analizatoru pokazuje prihvatljive performanse za preciznost, istinitost i linearnost.
2. Usporedbom kemiluminiscentne metode (CLIA) na Unicel DxI 600 analizatoru i mikročestične imunoanalize (CMIA) na Alinity i analizatoru nije utvrđena statistički značajna razlika između izmjerenih rezultata.
3. Deklarirani referentni intervali za ranu folikularnu fazu žena u reproduktivnoj dobi zadovoljavaju verifikacijske kriterije te se mogu preuzeti i koristiti u rutinskom radu.

7. SAŽETAK

Uvod

Svaku novu metodu koja se uvodi u laboratorij treba prethodno verificirati, odnosno potvrditi odgovaraju li značajke metode specifikacijama proizvođača.

Cilj istraživanja

Cilj istraživanja je verificirati reagens za određivanje koncentracije estradiola kemiluminiscentnom imunoanalizom na Unicel DxI 600 analizatoru ispitivanjem preciznosti, istinitosti i linearnosti metode, napraviti usporedbu s rutinski korištenom metodom na Alinity i analizatoru i verificirati referentne intervale.

Materijal i metode

Za provjeru preciznosti i istinitosti korišteni su komercijalni kontrolni uzorci u dvije koncentracijske razine analizirani tijekom 5 uzastopnih dana. Za procjenu linearnosti metode korišteni su komercijalni kalibratori za estradiol mjereni u 5 točaka u duplikatu. Usporedivost metoda ispitana je pomoću Bland-Altman i Passing-Bablok regresijske analize. Za ispitivanje usporedivosti korišteni su uzorci seruma 123 pacijenta. Verifikacija referentnih intervala napravljena je korištenjem 20 uzoraka.

Rezultati

Preciznost je izražena pomoću koeficijenta varijacije. Za nisku koncentracijsku razinu izmjereni KV je iznosio 3,56 % (ponovljivost) i 3,30 % (međupreciznost), a za visoku 1,87 % (ponovljivost) i 1,85 % (međupreciznost). Istinitost je izražena pomoću biasa, - 5,37 za nisku i - 7,74 za visoku koncentracijsku razinu. Za linearnost je korišten Wilcoxon test s razinom značajnosti $P = 0,625$ za prvo i $P = 0,144$ za drugo mjerenje. Na Bland-Altman prikazu dva rezultata rasipaju se izvan granica standardnih devijacija. Kod Passing-Bablok regresijske analize interval pouzdanosti za odsječak iznosi 0,151 i za nagib pravca 1,027.

Zaključak

Sve ispitivane značajke pokazale su prihvatljive rezultati istraživanja. Nema statistički značajne razlike u usporedivosti metoda što omogućava korištenje obje metode u rutinskom radu.

Ključne riječi: estradiol, imunoanaliza, luminiscentna mjerenja, referentne vrijednosti

8. SUMMARY

VERIFICATION OF REAGENT FOR DETERMINING THE CONCENTRATION OF ESTRADIOL BY CHEMILUMINESCENT IMMUNOASSAY ON THE UNICEL DXI 600 ANALYZER

Introduction

Every new method that is introduced into the laboratory should be previously verified, that is, it should be confirmed whether the features of the method correspond to the manufacturer's specifications.

Objective

The aim of the research is to verify the reagent for determining the concentration of estradiol by chemiluminescent immunoassay on the Unicel DxI 600 analyzer by testing the precision, truthfulness, and linearity of the method, to make a comparison with the routinely used method on Alinity i analyzer, and to verify the reference intervals.

Materials and Methods

To check the precision and truthfulness, commercial control samples were used in two concentration levels and were analyzed for 5 consecutive days. To assess the linearity of the method, commercial estradiol calibrators measured at 5 points in duplicate were used. The comparability of the two methods was tested using Bland-Altman and Passing-Bablok regression analysis. Serum samples from 123 patients were used to test the comparability of the methods. Verification of reference intervals was made using 20 samples.

Results

Precision is expressed using the coefficient of variation. For the low concentration level, the measured KV was 3.56 % (repeatability) and 3.30 % (interprecision), and for the high one 1.87

% (reproducibility) and 1.85 % (interprecision). The trueness is expressed by bias, - 5.37 for low and - 7.74 for high concentration level. The Wilcoxon test was used for linearity with a significance level of $P = 0.625$ for the first and $P = 0.144$ for the second measurement. On the Bland-Altman plot, the two results are scattered beyond the limits of the standard deviations. In Passing-Bablok regression analysis, the confidence interval for the intercept is 0.151 and for the slope of the line is 1.027.

Conclusion

Acceptable research results were obtained for all examined features. There is no statistically significant difference in the comparison of methods that allow the use of both methods in routine work.

Key words: estradiol, immunoassay, luminescent measurements, reference values

9. LITERATURA

1. Saračević Andrea, Upravljanje kvalitetom laboratorijskog rada, Validacija i verifikacija metoda, str. 7-20, Medicinska naklada, Zagreb, 2013
2. Joint Committee for Guides in Metrology, International Vocabulary of Metrology, 4th edition – Committee Draft (VIM4), 2021
3. William Stillwell, An Introduction to Biological Membranes, Second Edition, Chapter 20 - Bioactive Lipids, str. 453-478, 2016, Elsevier
4. Katherine F. Roby, 17-Beta Estradiol, Reference Module in Biomedical Sciences, Elsevier, 2019
5. Šimundić Ana-Maria, Upravljanje kvalitetom laboratorijskog rada, Medicinska naklada, Zagreb, 2013
6. James H. Nichols, Verification of method performance for clinical laboratories, Advances in Clinical Chemistry, vol. 47, 2022, Elsevier
7. Joachim Pum, Advances in Clinical Chemistry, A practical guide to validation and verification of analytical methods in the clinical laboratory, vol. 90, str. 215-281, 2019, Elsevier
8. CLSI, User Verification of Precision and Estimation of Bias, 2nd Edition, CLSI Document EP15-A2, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006
9. Gašljević Višnja, Validacija i mjerna nesigurnost, Croatian Metrology Society, Zagreb, 2009
10. National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, The Clinical Utility of Compounded Bioidentical Hormone Therapy, Reproductive Steroid Hormones: Synthesis, Structure, and Biochemistry, 2020, National Academies Press
11. So-Youn Kim, Yi Luan, Teresa K. Woodruff, Encyclopedia of Reproduction – Second Edition, Hormone Effects on Follicular Growth and Differentiation, 2018, Elsevier
12. Architect Estradiol, Abbott Laboratories, 2016
13. Chiara Nencetti, Maria Rita Sessa, Paolo Vitti, Maria Chiara Anelli, Massimo Tonacchera and Patrizia Agretti, Estradiol Serum Levels are Crucial to Understand Physiological/Clinical Setting in Both Sexes: Limits of Measurement of Low Estradiol and Evaluation of a Sensitive Immunoassay, Research Article, vol. 5, Issue 2, 2019, Prime Scholars
14. Enrico Carmina, Frank Z. Stanczyk, Rogerio A. Lobo, Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology – Eighth Edition, Evaluation of Hormonal Status, 2019, Elsevier

15. Jong Do Seo, Da Young Song, Youngwon Nam, Chihchiao Li, Seunghwan Kim, Joon Hee Lee, Kyunghoon Lee, Junghan Song, Sang Hoon Son, Evaluation of analytical performance of Alinity i system on 31 measurands, Practical laboratory medicine, 2020
16. Access Immunoassay System, Upute za upotrebu, Beckman Coulter, 2021
17. Luigi Cinquanta, Desre' Ethel Fontana, Nicola Bizzaro, Chemiluminescent immunoassay technology: what does it change in autoantibody detection?, 2017, Autoimmune Highlights
18. Aarsand A. K., Fernandez-Calle P., Webster C., Coskun A., Gonzales-Lao E., Diaz-Garzon J., Jonker N., Simon M., Braga F., Perich C., Boned B, Marques-Garcia F., Carobene A., Aslan B., Sezer E., Bartlett W. A. , Sandberg S., The EFLM Biological Variation Database. Dostupno na: <https://biologicalvariation.eu/>. Datum pristupa: 05.08.2023.

10. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

Ime i prezime: Valentina Živković

Datum i mjesto rođenja: 03. ožujka 2001., Vinkovci, Republika Hrvatska

Adresa stanovanja: Kostrč 211, 76 276 Kostrč, Bosna i Hercegovina

Telefon: +385 95 867 0980

E-mail adresa: valentina.zivkovic01@gmail.com

Obrazovanje:

- 2020. – 2023. Medicinski fakultet Osijek, Sveučilišni prijediplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika
- 2016. – 2020. Školski centar fra Martina Nedića Orašje, smjer opća gimnazija