

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

Stefanović, Claudia

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:152:708674>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-19**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

Claudia Stefanović

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

Diplomski rad

Osijek, 2023.

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

Claudia Stefanović

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

Diplomski rad

Osijek, 2023.

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

Mentor rada: doc. dr. sc. Sanja Mandić, spec. med. biochem.

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

Rad ima 32 lista, dvije tablice i 4 slike.

Mentorici, doc. dr. sc. Sanji Mandić,

veliko hvala na nesebično udijeljenoj pomoći, trudu i uloženom vremenu tijekom izrade ovoga rada. Pisati rad pod Vašim mentorstvom bila mi je jedna velika čast i zadovoljstvo.

Magistri Maji Grabić,

veliko hvala na pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela istraživanja. Hvala na svakom odgovorenom pitanju, svakoj razriješenoj nedoumici i svakom savjetu.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. VERIFIKACIJA METODE.....	1
1.1.1. Preciznost	2
1.1.2. Točnost.....	2
1.1.3. Linearnost.....	2
1.1.4. Provjera referentnih intervala	3
1.2. TESTOSTERON	3
1.2.1. Metode određivanja testosterona	4
2. CILJEVI RADA	5
3. ISPITANICI I METODE.....	6
3.1. USTROJ STUDIJE.....	6
3.2. ISPITANICI/UZORCI.....	6
3.3. METODE.....	6
3.3.1. Kemiluminiscentna imunoanaliza	6
3.3.2. LCMS/MS	7
3.4. POSTUPAK ISTRAŽIVANJA.....	7
3.4.1. Provjera preciznosti	7
3.4.1.1. <i>Provjera ponovljivosti</i>	7
3.4.1.2. <i>Provjera međupreciznosti</i>	8
3.4.2. Provjera točnosti.....	8
3.4.3. Provjera linearnosti.....	9
3.4.4. Provjera referentnih intervala	9
3.4.5. Provjera usporedivosti metoda	10
3.5. STATISTIČKE METODE.....	10
4. REZULTATI.....	11

4.1. Preciznost.....	11
4.2. Točnost.....	11
4.3. Linearnost.....	11
4.4. Referentni intervali.....	12
4.5. Usporedba metoda.....	12
5. RASPRAVA.....	17
6. ZAKLJUČAK.....	19
7. SAŽETAK.....	19
8. SUMMARY.....	21
9. POPIS LITERATURE.....	23
10. ŽIVOTOPIS.....	25

POPIS KRATICA

CLIA engl. *Chemiluminescent immunoassay*

Kemiluminiscentna imunoanaliza

LC-MS/MS engl. *Liquid chromatography - tandem mass spectrometry*

Tekućinska kromatografija spregnuta s tandemskom masenom spektrometrijom

SD engl. *Standard deviation*

Standardna devijacija

SHBG engl. *Sex hormone binding globulin*

Globulin koji veže spolne hormone

1. UVOD

Laboratorijski nalazi u velikoj mjeri predstavljaju temelj u postavljanju dijagnoze i liječenju, stoga je suvremena medicina nezamisliva bez medicinsko laboratorijske dijagnostike. Pogreške u laboratorijskom radu mogu ugroziti sigurnost pacijenata i imati ozbiljne posljedice na njihovo zdravlje. Kako bi laboratorijski nalaz doista bio odraz zdravlja pacijenata, nužno je osigurati njegovu pouzdanost i točnost primjenjujući sustav kvalitete. Uvođenje sustava upravljanja kvalitetom sukladno međunarodnoj normi HRN EN ISO 15189 uvelike doprinosi smanjenju i pravovremenom uklanjanju svih mogućih pogrešaka koje mogu ugroziti sigurnost pacijenata (1).

Evaluacija metode jedna je od važnih komponenti sustava kvalitete koja osigurava stalnu kvalitetu kliničkog laboratorija te je neophodna pri implementaciji nove metode. Evaluacija metode je sustavno izvođenje laboratorijskih postupaka u svrhu prikupljanja i analize podataka za prosudbu analitičke izvedbe laboratorijske metode, kako bi se ispitala prikladnost za predviđenu kliničku svrhu. Evaluacija metode se može podijeliti u dva segmenta, validaciju metode u kojoj se prvenstveno utvrđuje izvedba laboratorijske metode i verifikaciju metode u kojoj se karakteristike izvedbe metode verificiraju prema postavljenim kriterijima uglavnom osiguranim od proizvođača reagensa. Verifikacija metode može se smatrati skraćenom verzijom validacije koju provodi neposredni korisnik. Sukladno direktivi IVD 98/79/EC (engl. *Directive on in vitro diagnostic medical devices, IVD 98/79/EC*) proizvođači su dužni provesti validaciju svih metoda namijenjenih u dijagnostičke svrhe, dok se od korisnika očekuje verifikacija metode kojom se potvrđuje kako su karakteristike metode primjenjive u rutinskom radu laboratorija (2).

1.1. VERIFIKACIJA METODE

Verifikaciju metode je nužno provesti prije rutinske primjene, prilikom prijenosa metode u drugi laboratorij ili ukoliko dođe do promjene uvjeta (2). Postupkom verifikacije se provjerava zadovoljava li metoda potrebe pojedinog laboratorija u vlastitom okruženju, s vlastitim osobljem i uzorcima (3). Tijekom postupka verifikacije provjeravaju se sljedeće značajke metode: preciznost, točnost, linearnost i referentni intervali. Ukoliko nova metoda zamjenjuje prethodno korištenu, potrebno je ispitati postoji li razlika u rezultatima mjerenja koja može utjecati na donošenje kliničke odluke.

1.1.1. Preciznost

Preciznost se definira kao bliskost slaganja rezultata ispitivanja istog uzorka dobivenih višestrukim ponavljanjima i predstavlja raspršenost oko srednje vrijednosti mjerenja. Manja raspršenost predstavlja manju nepreciznost (4). Preciznost se može promatrati kroz dvije razine: ponovljivost i međupreciznost. Ponovljivost označava preciznost u seriji pri čemu se isti uzorak analizira više puta u jednoj analitičkoj seriji. Međupreciznost označava preciznost iz dana u dan te se provodi kroz više dana. Ponovljivost i međupreciznost se analiziraju kroz pet dana te se izražavaju kao standardna devijacija (SD) ili koeficijent varijacije. Prema smjernici EP15-A2 *User verification of performance for precision and trueness*, uzorci koji se koriste u ispitivanju preciznosti moraju biti što sličnijega matriksa uzorcima bolesnika koji se koriste rutinski. Verifikacija preciznosti metode provodi se kroz pet uzastopnih dana pri čemu se svaki dan pušta po jedna serija uzoraka u triplikatu, u dvije koncentracijske razine analita (5).

1.1.2. Točnost

Točnost se definira kao bliskost slaganja izmjerene vrijednosti i prave vrijednosti mjerene veličine (5). Postupak ispitivanja točnosti se provodi kroz pet dana. Potrebno je koristiti materijal s definiranim vrijednostima u dvije koncentracijske razine. Osim referentnog certificiranog materijala, za provjeru točnosti mogu biti korišteni uzorci za ispitivanje kontrole kvalitete. Oba materijala imaju točno poznatu koncentraciju analita što omogućuje dobru procjenu točnosti metode. Točnost metode se izražava kroz mjerno odstupanje (engl. *bias*). (5).

1.1.3. Linearnost

Sukladno smjernici EP06-A *Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach*, linearni raspon deklariran od strane proizvođača dovoljno je ispitati na pet do sedam uzoraka. Preporučeni materijal je smjesa uzoraka jer tako ne dolazi do promjene matriksa. Osim smjese (engl. *pool*) uzoraka, za provjeru linearnosti mogu se koristiti uzorci pacijenata razrijeđeni dodatkom otapalu koji preporučuje proizvođač ili fiziološkom otopinom te kalibratorom (komercijalni kontrolni materijal). Pri korištenju smjese uzoraka, nužno je odabrati dvije smjese, jednu s koncentracijom analita blizu gornje granice, a drugu smjesu s koncentracijom blizu donje granice deklariranog raspona linearnosti. Sva se mjerenja izvode u duplikatu pri čemu redosljed mjerenja mora biti nasumičan. Rezultati

mjerenja analiziraju se polinomijalnom regresijskom analizom (6,7).

1.1.4. Provjera referentnih intervala

Referentni intervali obično predstavljaju središnji interval od 95 % promatranih vrijednosti analita među zdravim subjektima te služi za usporedbu s laboratorijskim nalazima i za njihovu interpretaciju. U idealnim uvjetima, svaki laboratorij bi trebao izraditi svoje referentne intervale specifične za metode koje posjeduje i specifične za lokalno stanovništvo. Međutim, njihova izrada je previše kompleksna, zahtijeva puno vremena i financijskih sredstava, stoga laboratoriji mogu verificirati referentne intervale utvrđene drugim izvorima poput velikih multicentričnih studija. Verifikacijom se provjerava jesu li referentni intervali primjenjivi za namijenjenu populaciju bolesnika. Dovoljno je provjeriti referentne intervale na 20 uzoraka zdravih ispitanika (8).

Ukoliko su više od dvije vrijednosti izvan granica, deklarirani intervali se ne mogu koristiti.

1.2. TESTOSTERON

Testosteron je primarno muški spolni hormon odgovoran za brojne spolne funkcije poput spolne diferencijacije, spermatogeneze i plodnosti u muškaraca. Uz to, testosteron je odgovoran za razvoj primarnih spolnih karakteristika, a to uključuje spuštanje testisa, povećanje penisa i testisa te povećanje libida.

Testosteron je također odgovoran u razvoju sekundarnih spolnih karakteristika. One uključuju dlakavost, promjenu i produblјivanje glasa, ubrzani rast u pubertetu, kao i rast skeletnih mišića zbog stimulacije sinteze proteina (9,10).

Testosteron se u muškaraca primarno sintetizira u Leydigovim stanicama koje se nalaze u intersticiju testisa (9). Luteinizirajući hormon (LH) jedan je od glavnih hormona odgovornih za izlučivanje testosterona. Većina testosterona vezana je za proteine plazme, i to ponajviše za globulin koji veže spolne hormone (engl. *Sex hormone binding globulin*, SHBG), ali postoji i slabo vezan za albumin. Manja koncentracija slobodnog testosterona u krvi djeluje na razini tkiva, ponajprije sjemenih mjehurića, kostiju, mišića i prostate (9,10).

Razni defekti u funkciji testosterona imaju za posljedicu karakteristične kliničke pokazatelje. Iznimno niska razina testosterona u muškaraca može upućivati na hipogonadizam, hipopituitarizam, hiperprolaktinemiju, zatajenje bubrega, cirozu jetre ili Kleinfelterov sindrom. Visoke vrijednosti testosterona mogu biti posljedica adrenalnih tumora i tumora testisa,

kongenitalne adrenalne hiperplazije (KAH-e) ili abnormalnosti u osi hipotalamus-hipofiza-testisi.

U žena se testosteron proizvodi u jajnicima, nadbubrežnoj žlijezdi i perifernim masnim tkivima, no u znatno manjoj koncentraciji. Većina testosterona u serumu žena veže se uz SHBG i albumin, uz malu količinu u slobodnom stanju. Povišene vrijednosti testosterona u žena mogu upućivati na sindrom policističnih jajnika (PCOS), stromalnu hipertekozu, tumore jajnika i nadbubrežne žlijezde, KAH-u te druge poremećaje osi hipotalamus-hipofiza-jajnici (9,10).

1.2.1. Metode određivanja testosterona

U medicinskim laboratorijima za određivanje koncentracije testosterona rutinski se koriste imunokemijske metode. Prednosti imunokemijskih metoda su njihova brzina, jednostavnost, robusnost i osjetljivost. Osim toga, za provedbu analize potrebna je vrlo mala količina uzorka i nije potrebna posebna priprema uzorka. Unatoč podjeli imunokemijskih metoda prema brojnim kriterijima, sve imaju zajednički princip, a to je vezanje specifičnog protutijela na antigen pri čemu se detektira stvoreni kompleks uporabom različitih obilježivača. Unatoč svojim prednostima, glavni nedostatak imunokemijskih metoda je njihova podložnost interferencijama, tj. mogućnost promjene izmjerene vrijednosti u odnosu na pravu vrijednost zbog prisustva interferirajućih tvari u biološkom uzorku. Interferencije se mogu podijeliti u tri osnovne skupine: križna reaktivnost, prozonski učinak i učinak matriksa (11).

Nadalje, referentna metoda za određivanje koncentracije testosterona je metoda tekućinske kromatografije spregnute sa masenom spektrometrijom (engl. *Liquid chromatography - tandem mass spectrometry*, LCMS/MS). LCMS/MS je sofisticirana tehnika koja omogućuje rezultate visoke osjetljivosti i specifičnosti. Osim navedenih, prednost ove tehnike je mogućnost istovremene analize više srodnih analita, kao i velika baza podataka pomoću koje se dobiveni analiti mogu identificirati. Nedostatci LCMS/MS tehnike su sklonost interferenciji u vidu ionske supresije, složena i dugotrajna priprema uzorka, potreba visoko educiranog kadra i visoka cijena. Također, jedan od nedostataka ključan za kliničku primjenu je neprikladnost metode za hitnu dijagnostiku (11,12).

2. CILJEVI RADA

Cilj rada je ispitati izvedbene značajke metode za određivanje koncentracije testosterona na analizatoru Unicel DxI 600 tvrtke Beckman Coulter.

Specifični ciljevi ovoga rada su :

1. Ispitati preciznost, istinitost i linearnost CLIA (engl. *chemiluminescent immunoassay*, CLIA) metode za određivanje koncentracije testosterona na analizatoru Unicel DxI 600.
2. Usporediti rezultate izmjerene CLIA metodom s rezultatima izmjerenima LCMS/MS metodom.
3. Napraviti provjeru referentnih intervala.

3. ISPITANICI I METODE

3.1. USTROJ STUDIJE

Istraživanje je presječnog tipa.

3.2. ISPITANICI/UZORCI

Istraživanje je provedeno na Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Osijek, uz suglasnost predstojnika Zavoda i odobrenje Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Za usporedbu metoda korištena su 123 ostatna uzorka seruma pacijenata koji su imali zatraženu pretragu određivanja koncentracije testosterona, prikupljenih tijekom studenog 2022. godine. Pri analizi se u obzir nisu uzimali lipemični, hemolitični ili ikterični serumi.

3.3. METODE

U ovome radu koncentracija testosterona mjerena je CLIA metodom na analizatoru Unicel DxI 600 tvrtke Beckman Coulter i uspoređena s koncentracijom izmjerenom LCMS/MS metodom.

3.3.1. Kemiluminiscentna imunoanaliza

Koncentracija testosterona izmjerena je imunoenzimskim kompetitivnim testom. Uzorak se dodaje u reakcijsku posudu zajedno s otopinom za obradu uzorka koja otpušta testosteron u uzorku. Reakcijskoj posudi dodaju se paramagnetske čestice obložene antimišjim poliklonskim antitijelima, mišja monoklonska antitestosteronska antitijela te konjugat testosterona i alkalne fosfataze. Nakon što se otpusti s nosivih proteina, testosteron se natječe za vezna mjesta na specifičnim antitestosteronskim monoklonskim antitijelima sa konjugatom testosterona i alkalne fosfataze. Antitijelo veže komplekse antigena i antitijela na krutu fazu koji se nakon inkubacije u reakcijskoj posudi drži u magnetskom polju, dok se nevezani materijal ispire. U posudu se potom dodaje kemiluminiscentni supstrat te se svjetlost mjeri luminometrom. Količina svjetla je obrnuto proporcionalna koncentraciji testosterona u uzorku (13).

3.3.2. Tekućinska kromatografija spregnuta sa masenom spektrometrijom

LCMS/MS je analitička metoda koja se smatra zlatnim standardom za razdvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju komponenti uzorka. Metoda ima visoku osjetljivost i specifičnost. Za analizu je potrebno pripremiti uzorak seruma postupkom deproteinizacije, ekstrakcije tekuće-tekuće, ekstrakcije na čvrstoj fazi, uparavanjem i rekonstitucijom u manjem volumenu mobilne faze. Princip rada LCMS/MS tehnike temelji se na razdvajanju komponenti uzorka prema fizikalnim (veličina molekula) ili kemijskim svojstvima (afinitet i naboj molekula), koje se zbog navedenih razlika zadržavaju različitim vremenom na kromatografskoj koloni. Nakon razdvajanja molekula analita, slijedi njihova detekcija masenim spektrometrom. Analiti se identificiraju preko omjera mase i naboja i prikazuju pikovima. Nužno je da se cijeli proces odvija u kontroliranim uvjetima definiranim pri postavljanju same metode. Snagu ovoj metodi pridaje i velika baza podataka koja omogućuje identifikaciju dobivenih analita (12,13).

3.4. POSTUPAK ISTRAŽIVANJA

3.4.1. Provjera preciznosti

Provjera preciznosti metode provedena je prema CLSI (engl. *Clinical & Laboratory standard institute*, CLSI) smjernici EP05-A2 *Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods*. Korišteni su komercijalno dostupni kontrolni uzorci proizvođača Sero (*Seronorm: Immunoassay Lyo L-1* LOT 2010908, *Immunoassay Lyo L-2* LOT 2011909). Svi kontrolni uzorci mjereni su u triplikatu tijekom 5 uzastopnih dana u dvije koncentracijske razine. Iz dobivenih vrijednosti određivala se preciznost u seriji, tj. ponovljivost i preciznost iz dana u dan, tj. međupreciznost.

3.4.1.1. Provjera ponovljivosti

Ponovljivost (Sp) predstavlja ukupnu SD-u izračunatu iz SD-e svakog pojedinog dana tijekom 5 uzastopnih dana mjerenja prema formuli:

$$Sp = \sqrt{\frac{\sum_{d=1}^D \sum_{i=1}^n (x_{d1} - \bar{x}_d)^2}{D(n-1)}}$$

3. ISPITANICI I METODE

pri čemu „D“ predstavlja ukupni broj dana (5); n – ukupni broj uzoraka po seriji po danu (3); x_{di} – rezultat mjerenja „i“ unutar serije na dan „d“; \bar{x}_d - srednju vrijednost svih mjerenja za dan „d“. Srednje vrijednosti svih mjerenja za svaki pojedini dan prikazane su u Tablici 1.

Tablica 1. Srednje vrijednosti mjerenja po danima

Dan mjerenja	Srednja vrijednost svih mjerenja za kontrolu Sero 1 (nmol/L)	Srednja vrijednost svih mjerenja za kontrolu Sero 2 (nmol/L)
1	21,41	2,00
2	21,85	2,06
3	21,42	2,25
4	20,69	2,29
5	21,86	2,29

3.4.1.2. Provjera međupreciznosti

Međupreciznost (S_m) računa se preko varijance srednjih vrijednosti mjerenja (S_b^2) izračunatih za svaki dan istraživanja prema formuli:

$$s_b^2 = \frac{\sum_{d=1}^B (\bar{x}_d - \bar{x})^2}{D - 1}$$

pri čemu \bar{x}_d označava srednju vrijednost mjerenja za dan „d“ (Tablica 1); \bar{x} srednju vrijednost svih mjerenja. Iz dobivene vrijednosti računa se međupreciznost prema sljedećoj formuli:

$$s_m = \sqrt{\frac{n-1}{n} x Sp^2 + S_b^2}$$

pri čemu „n“ predstavlja broj uzoraka po seriji (n = 3).

Dobivene se vrijednosti uspoređuju s vrijednostima deklariranima od strane proizvođača, nakon čega se donosi zaključak o prihvatljivosti preciznosti.

3.4.2. Provjera točnosti

3. ISPITANICI I METODE

Provjera točnosti metode provedena je prema smjernici EP15-A2 *User verification of performance for precision and trueness*. Za provjeru točnosti korišteni su komercijalno dostupni kontrolni uzorci proizvođača Sero (*Seronorm: Imunoassay Lyo L-1* LOT 2010908, *Imunoassay Lyo L-2* LOT 2011909). Svaki kontrolni uzorak mjereno je u tri serije tijekom pet uzastopnih dana u dvije koncentracijske razine. Iz izmjerenih vrijednosti izračunate su srednja vrijednost i SD koji su uspoređeni sa deklariranim srednjim vrijednostima pomoću kojih su izračunate granice prihvatljivosti za odstupanje (engl. *bias*). Ako je deklarirana vrijednost analita unutar verifikacijskog intervala, prihvaća se istinitost koju je deklarirao proizvođač.

3.4.3. Provjera linearnosti

Linearnost se ispitala korištenjem kalibratora kroz pet mjerenja u duplikatu. Korišteni su kalibratori Access Testosterone vrijednosti 0 nmol/L i maksimalne vrijednosti 55,5 nmol/L. Kalibratori su prije mjerenja stavljeni u unaprijed određeni omjer. Raspored mjerenja prikazan je u Tablici 2, pri čemu je kalibrator vrijednosti 0 nmol/L prikazan oznakom „0 cal“, dok je kalibrator vrijednosti 55,5 nmol/L prikazan oznakom „high cal“.

Tablica 2: Udio 0 i high kalibratora pri provjeri linearnosti

Uzorak/kalibrator	0 cal	high cal
1	4 nmol/L	0 nmol/L
2	3 nmol/L	1 nmol/L
3	1 nmol/L	1 nmol/L
4	1 nmol/L	3 nmol/L
5	0 nmol/L	4 nmol/L

Potom su Wilcoxonovim testom sume rangova uspoređeni rezultati dobivenih mjerenja i očekivanih mjerenja te prikazani grafički uz pripadajuće P vrijednosti.

3.4.4. Provjera referentnih intervala

U uputama uz reagens za određivanje testosterona CLIA metodom na Unicel DxI 600 analizatoru, navedeni su referentni intervali za odraslu populaciju (od 18 godina) razvrstani prema spolu, a muškarci dodatno u tri kategorije prema dobi. Verifikacija referentnih intervala napravljena je za ženski spol korištenjem 20 uzoraka naizgled zdravih žena.

3.4.5. Provjera usporedivosti metoda

Za provjeru usporedivosti CLIA i LC-MS/MS metode analizirana su 123 ostatna uzorka seruma. Uzorci su najprije analizirani LC-MS/MS metodom, a zatim CLIA metodom na analizatoru Unicel Dx1 600.

3.5. STATISTIČKE METODE

Za izračun rezultata mjerenja preciznosti, istinitosti i linearnosti korišten je program Microsoft Excel. Za usporedbu i prikaz podataka dobivenih dvjema analitičkim metodama korišten je statistički program MedCalc (Medcalc Software, Mariakerke, Belgium), tj. Passing-Bablok regresijska analiza i Bland-Altmanova analiza. Korelacija mjerenja ispitana je Pearsonovim koeficijentom korelacije. Vrijednost $P < 0,05$ predstavlja razinu značajnosti koja se koristi za ocjenu statističke značajnosti dobivenih rezultata.

4. REZULTATI

4.1. Preciznost

Ispitivanje preciznosti uključivalo je mjerenje ponovljivosti i međupreciznosti.

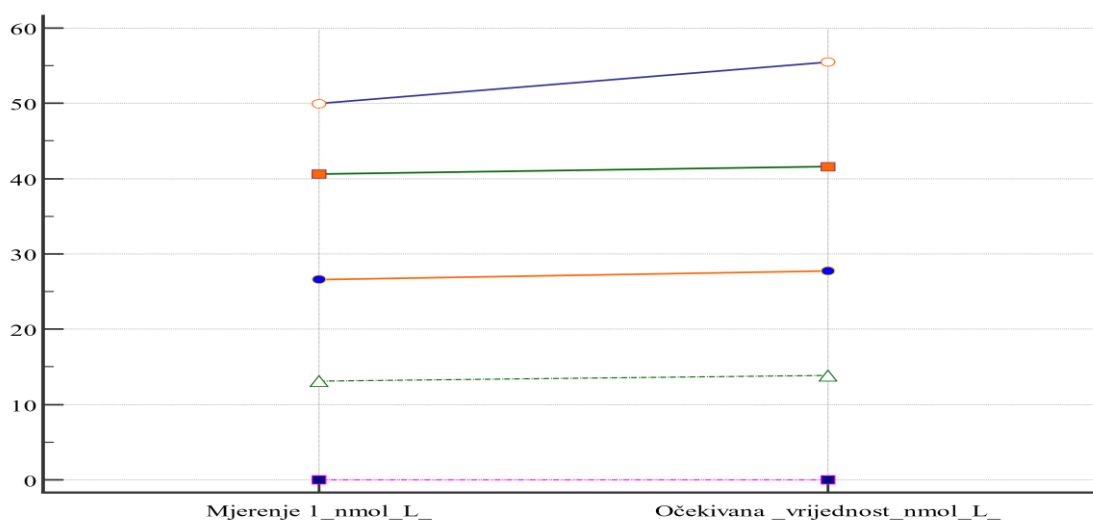
Izmjerena ponovljivost za nisku koncentracijsku razinu iznosi 6,3 %, dok za visoku koncentracijsku razinu iznosi 4,2 %. Ponovljivost niske koncentracijske razine deklarirana od strane proizvođača iznosi 4 %, dok visoke koncentracijske razine 3 %.

Izmjerena međupreciznost za nisku koncentracijsku razinu iznosi 6,1 %, dok za visoku koncentracijsku razinu iznosi 3,6 %. Kriterij proizvođača za međupreciznost za nisku koncentracijsku razinu iznosi 6,2 %, dok za visoku iznosi 7,1 %.

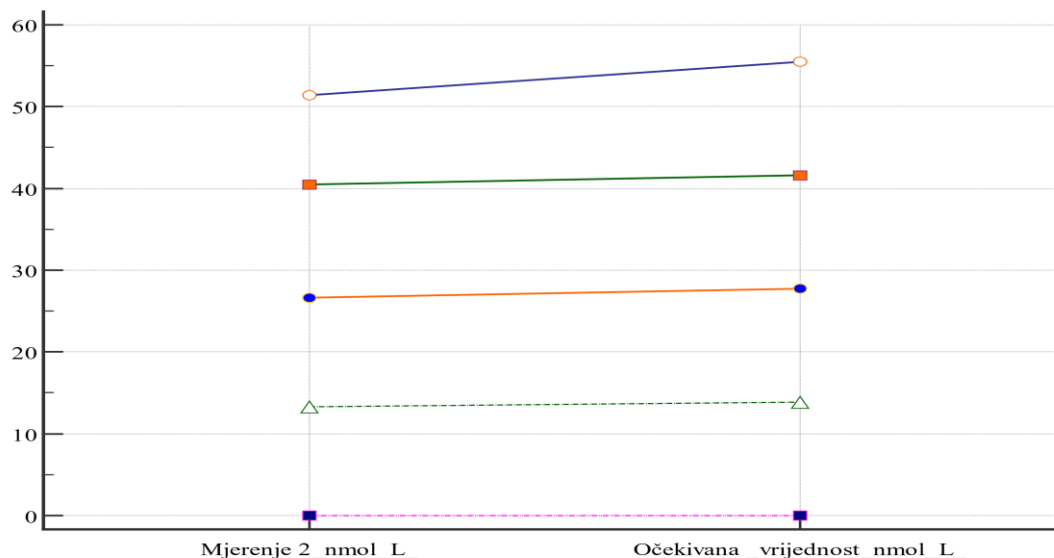
4.2. Točnost

Ispitivanje točnosti uključivalo je mjerenje granica prihvatljivosti za odstupanje (engl. *bias*). Izmjereni relativni bias iznosi 2,4 za visoko koncentracijsko područje, dok za nisko koncentracijsko područje iznosi -15,2. Deklarirani bias nije naveden od strane proizvođača. Prema EFLM kriterijima, poželjni bias iznosi 6,2.

4.3. Linearnost



Slika 1. Razlike između vrijednosti prvog mjerenja i očekivane vrijednosti



Slika 2. Razlike između vrijednosti drugog mjerenja i očekivane vrijednosti

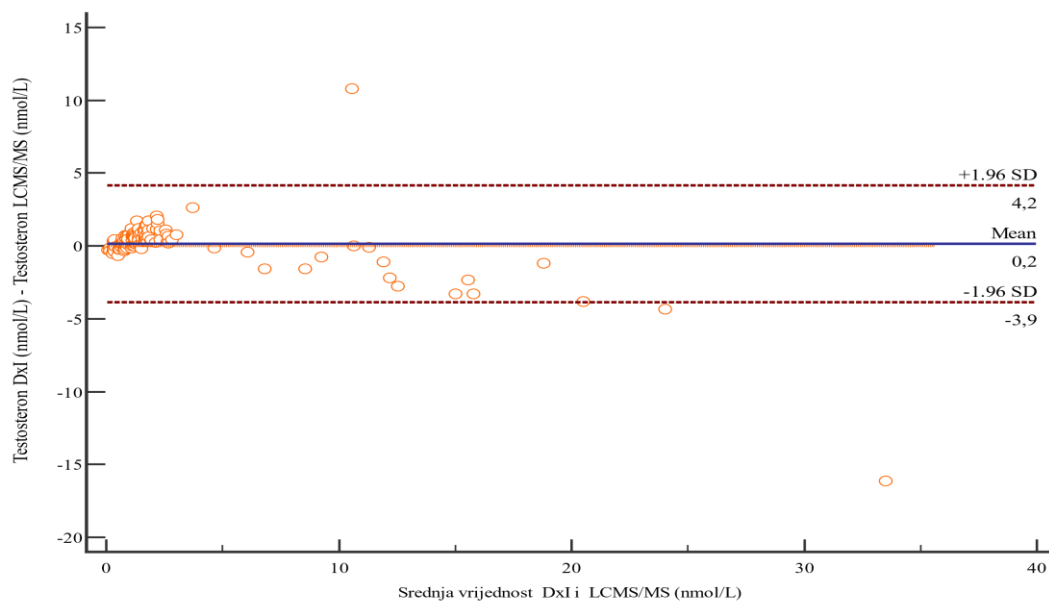
Linearnost je ispitivana koristeći kalibratore nakon čega su se izmjerene vrijednosti uspoređivale sa očekivanim vrijednostima Wilcoxonovim testom sume rangova. Razlika između prvog mjerenja i očekivanih vrijednosti prikazana je na Slici 1. Pripadajuća P vrijednost iznosi 0,00679. Razlika između drugog mjerenja i očekivane vrijednosti prikazana je na Slici 2 s pripadajućom P vrijednosti 0,0679.

4.4. Referentni intervali

Koncentracije testosterona CLIA metodom na Unicel DxI instrumentu izmjerene su na uzorku od 20 naizgled zdravih žena starijih od 18 godina koje su imale koncentracije testosterona LCMS/MS metodom unutar referentnog intervala (0,07 – 1,56 nmol/L).

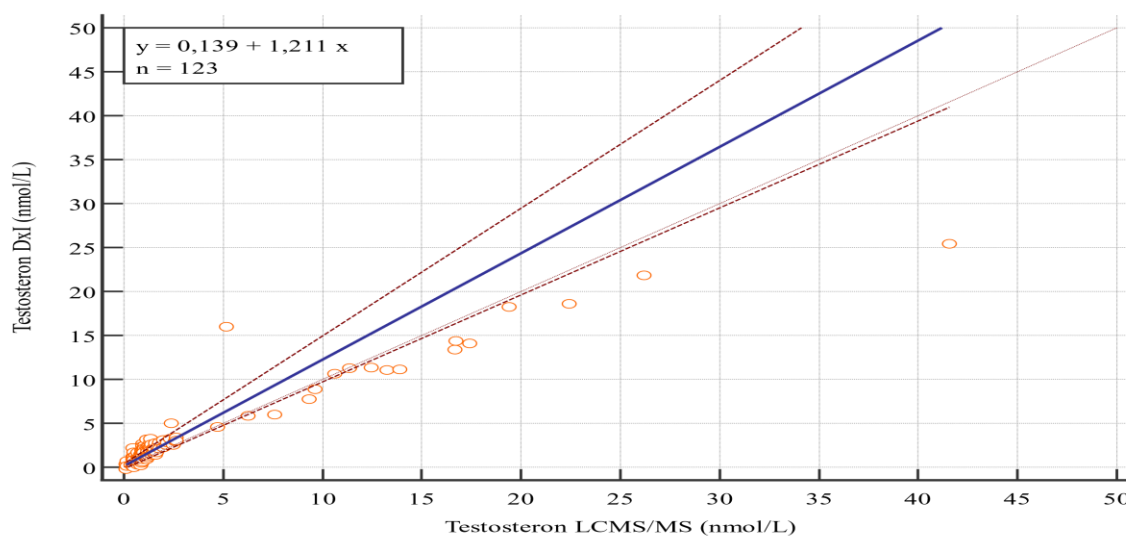
Srednja vrijednost koncentracija testosterona LCMS/MS metodom bila je 0,97 (95 % CI 0,85 – 1,20), a CLIA metodom 1,71 (95 % CI 1,43 – 1,99). Od 20 rezultata izmjerenih CLIA metodom samo jedan nije bio unutar deklariranog raspona referentnog intervala za žene (< 0,35 – 2,56 ng/mL), dok su preostali bili unutar raspona (19/20).

4.5. Usporedba metoda



Slika 3. Bland-Altman prikaz usporedbe metoda. Središnja puna linija označava srednju vrijednost razlike u mjerenjima, dok isprekidane linije označavaju standardnu devijaciju razlike u mjerenjima.

Na Bland-Altmanovu prikazu podataka označena je srednja vrijednost razlike u mjerenjima (0,1502) te SD razlike u mjerenjima (-3,8777 – 4,1780).



Slika 4. Passing-Bablok analiza usporedbe LCMS/MS i CLIA metode. Puna crta predstavlja regresijski pravac, isprekidane crte intervale pouzdanosti, sitno isprekidana crta idealni pravac.

4. REZULTATI

Rezultati Passing – Bablok regresijske analize rezultata mjerenja LCMS/MS i CLIA metodom rezultiraju jednadžbom pravca $y = 0,139474$ (95 % CI $-1,906 - 0,4019$) + $1,210526$ (95 % CI $0,9900 - 1,4537$) x koja opisuje matematički odnos između dviju metoda. Odsječak na osi x pomoću kojega se procjenjuje konstantno odstupanje između metoda iznosi $0,1395$ ($-1,906 - 0,4019$) nmol/L. Rezultati regresijske analize za koeficijent smjera pravca iznosi $1,211$ ($0,9900 - 1,4537$) nmol/L.

Korelacija mjerenja ispitana je Pearsonovim koeficijentom korelacije pri čemu je dobivena izvrsna međusobna povezanost dvaju mjerenja ($r = 0,9538$; $P < 0,0001$; 95 % CI $0,9346 - 0,9675$).

5. RASPRAVA

Pouzdani i točni nalazi ključni su u postavljanju dijagnoze i liječenju. Kako bi to bilo moguće, u laboratorijski rad nužno je uvesti sustav kvalitete. Svaki medicinski laboratorij dužan je pratiti smjernice međunarodne norme HR EN ISO 15189 kako bi se mogućnost pogreške, samim time i ugrožavanje sigurnosti pacijenta, svelo na minimum. Pri uvođenju novih metoda u rad laboratorija, nužno je provesti postupak evaluacije prema direktivi IVD 98/79/EC. Evaluacija metode uključuje postupke validacije i verifikacije. Validacijom se smatra utvrđivanje izvedbenih značajki metode koju je dužan provesti proizvođač, dok se verifikacijom potvrđuju radne značajke metode i provodi ju sam korisnik. Verifikacijom metode provjeravaju se sljedeće značajke: preciznost, točnost, linearnost i referentni intervali.

Istraživanje je uključivalo mjerenje koncentracije testosterona dvjema metodama, imunokemijskom CLIA i kromatografskom LCMS/MS. Imunokemijske metode često su korištene u kliničkim laboratorijima. Odlikuju se osjetljivošću, jednostavnošću i brzinom. Također, za analizu nije potrebna posebna priprema uzorka te je dovoljna relativno mala količina uzorka. Princip imunokemijskih metoda se temelji na vezivanju antitijela na antigen nakon čega se korištenjem obilježivača detektira stvoreni kompleks antigen-antitijelo. Glavni nedostatak imunokemijskih metoda je njihova podložnost interferencijama. LCMS/MS je referentna metoda za određivanje koncentracije testosterona i karakterizira ju visoka osjetljivost i specifičnost. Uz brojne prednosti, LC-MS/MS ima i negativnih strana. Prva od njih je sklonost interferencijama koja utječe na rezultat mjerenja i rezoluciju dobivenih pikova. Druga od njih je dugotrajna priprema uzorka za ovakvu dijagnostiku, što ju čini neprikladnom za dijagnostiku hitnih stanja. Također, važan nedostatak je i visoka cijena, ali i visoko educirani kadar potreban za rukovanje ovom analizom.

Mjerenje preciznosti uključivalo je mjerenje ponovljivosti i međupreciznosti u visokoj i niskoj koncentracijskoj razini. Izmjerena ponovljivost za nisku koncentracijsku razinu viša je od ponovljivosti deklarirane od strane proizvođača koja iznosi 4 %. Zaključeno je da ponovljivost niske koncentracijske razine ne zadovoljava kriterije postavljene od strane proizvođača. Deklarirana ponovljivost visoke koncentracijske viša je od izmjerene ponovljivosti koja iznosi 4,2 %, što također znači da izmjerena ponovljivost ne zadovoljava kriterije proizvođača.

Izmjerena međupreciznost za nisku koncentracijsku razinu iznosi 6,1 %, a međupreciznost deklarirana od strane proizvođača iznosi 6,2 % čime je zadovoljena deklarirana međupreciznost u području niskih koncentracija. Međupreciznost visoke koncentracijske razine iznosi 3,6 %, dok deklarirana 7,1 % čime je također zadovoljena deklarirana međupreciznost.

Ispitivanjem ponovljivosti i međupreciznosti u komercijalnim kontrolama niske i visoke koncentracijske razine zaključeno je da metoda ne zadovoljava kriterije proizvođača za ponovljivost, ali zadovoljava kriterije proizvođača za međupreciznost. Prema kriterijima Europske federacije za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu (engl. *European federation of clinical chemistry and laboratory medicine*, EFLM) poželjna preciznost iznosi 6,3 % (14). Prema EFLM kriterijima za biološku varijaciju, izmjerena preciznost zadovoljava kriterij.

Prema EFLM kriterijima, kod ispitivanja točnosti, poželjni bias iznosi 6,2. Ispitivanjem točnosti u komercijalnim kontrolama niske i visoke koncentracijske razine zaključeno je da metoda zadovoljava EFLM kriterije za visoku koncentracijsku razinu, dok za nisku ne zadovoljava.

U istraživanju Ruggera Dittadija i suradnika iz 2017. godine u kojemu se uspoređivalo mjerenje testosterona CLIA metodom i LCMS/MS metodom, izmjereni raspon biasa iznosio je 2,7 % - 34,7 % pri čemu je veći bias mjeren za nisko koncentracijsko područje (15).

U grafičkim prikazima vrijednosti prvog mjerenja i očekivanih vrijednosti mjerenja nema većih odstupanja isto kao i u slučaju usporedbe vrijednosti drugog mjerenja i očekivanih vrijednosti mjerenja.

Od 20 rezultata izmjerenih CLIA metodom samo jedan nije bio unutar deklariranog raspona referentnih intervala za žene, dok su preostali bili unutar raspona. Prema tome, deklarirani referentni intervali za žene od 18 godina zadovoljavaju verifikacijske kriterije te se mogu preuzeti i koristiti u rutinskom radu.

Na Bland-Altman prikazu podataka, dva rezultata izlaze van raspona $\pm 1,96$ SD. Rasipanje podataka znatno je veće u nižem koncentracijskom području. Rezultati koncentracija testosterona mjereni CLIA metodom prosječno su viši od rezultata mjenjenih LCMS/MS metodom.

Passing-Bablok regresijskom analizom rezultata mjerenja dobivenih ovim istraživanjem CLIA i LCMS/MS metodama pokazano je kako između metoda ne postoji statistički značajno konstantno odstupanje budući da vrijednost intervala pouzdanosti odsječka obuhvaća vrijednost nula. Također, između metoda ne postoji ni proporcionalno odstupanje između mjenjenih vrijednosti budući da rezultat regresijske analize za koeficijent smjera pravca obuhvaća vrijednost jedan. Zaključuje se kako su metode usporedive, a tome u prilog ide i izmjereni Pearsonov koeficijent korelacije koji pokazuje izvrsnu međusobnu povezanost dvaju mjerenja. Slično istraživanje proveli su Martinez-Escribano i sur. 2020. godine u kojemu su mjerili testosteron u mlađih pretilih muškaraca pritom uspoređujući rezultate imunokemijske metode i LCMS/MS metode. Preciznost u seriji, tj. ponovljivost navedenog istraživanja iznosila je 4,7

5. RASPRAVA

% za nisku koncentracijsku razinu, dok je za visoku koncentracijsku razinu iznosila 3,4 %. Međupreciznost u niskoj koncentracijskoj razini je iznosila 6,7 %, dok u visokoj 7,6 %. Rezultati Passing-Bablok regresijske analize dali su vrijednost koeficijenta smjera 1,1603 (95% CI 1,0735 – 1,2529) i odsječka 0,0533 (95 % CI -0,2109 – 0,2876). Budući da vrijednost odsječka uključuje nulu, ne postoji statistički značajno konstantno odstupanje između dviju metoda. Vrijednost koeficijenta smjera ne uključuje vrijednost jedan, zaključuje se kako između metoda postoji statistički značajno konstantno odstupanje (16).

Konačno, temeljem provedenog istraživanja može se zaključiti da se CLIA metoda na instrumentu Unicel Dxl 600 pokazala prikladnom za određivanje koncentracije testosterona. Budući da je CLIA metoda brža i jednostavnija, njezina klinička primjena ima brojne prednosti.

6. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Ispitivanjem izvedbenih značajki zaključujemo sljedeće:

- a) Metoda ne zadovoljava kriterije proizvođača za ponovljivost, ali zadovoljava kriterije proizvođača za međupreciznost. Izmjerena preciznost zadovoljava EFLM kriterije za biološku varijaciju.
- b) Metoda zadovoljava EFLM kriterije točnosti za visoku koncentracijsku razinu, dok za nisku ne zadovoljava.
- c) Linearnost metode je zadovoljavajuća.

2. Usporedbom metoda zaključuje se kako su metode međusobno usporedive te dobro koreliraju.

3. Provjerom referentnih intervala, deklarirani intervali zadovoljavaju verifikacijske kriterije te se mogu koristiti u rutinskom radu.

7. SAŽETAK

Uvod:

Verifikacija metode ključan je segment implementacije nove metode u rutinski rad laboratorija. Testosteron, kao primarno muški spolni hormon, odgovoran je za brojne funkcije u muškaraca, ali može biti okidač raznih stanja i u žena. Za mjerenje testosterona rutinski se koriste imunokemijske metode, dok je referentna metoda LCMS/MS.

Cilj istraživanja:

Cilj istraživanja bio je ispitati verifikacijske značajke CLIA metode na analizatoru Unicel DxI 600 (preciznost, točnost, linearnost, referentni intervali) te usporediti CLIA metodu sa LCMS/MS metodom.

Ispitanici i metode:

Za provjeru preciznosti i točnosti korišteni su kontrolni uzorci mjereni u triplikatu u dvije razine. Za provjeru linearnosti korišteni su kalibratori mjereni kroz pet mjerenja u duplikatu. Provjera referentnih intervala napravljena je na uzorcima 20 naizgled zdravih žena. Za provjeru usporedivosti metode korištena su 123 ostatna uzorka seruma pacijenata. Uzorci su mjereni LCMS/MS, zatim CLIA metodom.

Rezultati:

Ponovljivost niske koncentracijske razine iznosi 6,3 %, visoke 4,2 %. Međupreciznost niske koncentracijske razine iznosi 6,1 %, visoke 3,6 %. Izmjereni bias iznosi 2,4 za visoko i -15,2 za nisko koncentracijsko područje. Srednja vrijednost koncentracija testosterona LCMS/MS metodom je 0,97 (95 % CI 0,85 – 1,20), CLIA metodom 1,71 (95 % CI 1,43 – 1,99). Bland-Altman prikazuje srednju vrijednost razlike u mjerenjima (0,1502) te SD razlike u mjerenjima (-3,8777 – 4,1780). Passing-Bablok regresijska analiza rezultira jednadžbom pravca $y = 0,139474 (95 \% \text{ CI } -1,906 - 0,4019) + 1,210526 (95 \% \text{ CI } 0,9900 - 1,4537)x$.

Zaključak:

Istraživanjem je potvrđeno da je imunokemijska metoda tvrtke Beckman Coulter za analizator

Unicel DxI 600 prikladna za određivanje koncentracije testosterona.

Ključne riječi: imunoanaliza, luminiscentna mjerenja, testosteron, referentni interval

8. SUMMARY

Verification of reagents for determination of testosterone concentration by chemiluminescence immunoassay on Unicel DxI 600 analyzer

Introduction:

Verification of the method is a key segment of the implementation of the new method in the routine work of the laboratory. Testosterone, as a primarily male sex hormone, is responsible for numerous functions in men, but it can trigger various conditions in women as well. Immunochemical methods are routinely used to measure testosterone, while the reference method is LCMS/MS.

Objectives:

The aim of the research was to examine the verification features of the CLIA method on the Unicel DxI 600 analyzer (precision, accuracy, linearity, reference intervals) and to compare the CLIA method with the LCMS/MS method.

Participants and methods:

To check the precision and accuracy of the method, control samples measured in triplicate at two levels were used, while to check the linearity, calibrators were used, measured through five measurements in duplicate. The verification of the reference intervals was made on the samples of 20 apparently healthy women. To check the comparability of the method, 123 patient serum samples were used. The samples were first measured by the LCMS/MS method and then by the CLIA method on a Unicel DxI 600 analyzer.

Results:

Reproducibility of low concentration level is 6,3 %, reproducibility of high concentration level is 4,2 %. Intermediate precision of low concentration level is 6,1 %, of high concentration level is 3,6 %. The measured bias is 2,4 for the high and -15,2 for the low concentration area. The mean value of testosterone concentrations by the LCMS/MS method was 0.97 (95% CI 0,85 – 1,20), and by the CLIA method 1,71 (95 % CI 1,43 – 1,99). Bland-Altman shows the mean value of the difference in measurements (0,1502) and the SD of the difference in measurements

8. SUMMARY

(-3,8777 – 4,1780). Passing-Bablok regression analysis results in the line equation $y = 0,139474$ (95 % CI -1,906 – 0,4019) + 1,210526 (95 % CI 0,9900 – 1,4537)x. The correlation coefficient is $P < 0,0001$

Conclusion:

This research confirmed that the Beckman Coulter immunochemical method for the Unicel DxI 600 analyzer is suitable for determining testosterone concentration.

Keywords: immunoassay, luminescent measurements, testosterone, reference interval

9. POPIS LITERATURE

1. Topić E, Primorac D, Janković S, Štefanović M i sur. Medicinska biokemija i laboratorijska medicina u kliničkoj praksi. Zagreb: Medicinska naklada; 2018.
2. Šimundić AM, ur. Upravljanje kvalitetom laboratorijskog rada. Priručnik za trajno usavršavanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2013.
3. European Committee for Clinical and Laboratory Standards. Guidelines for the evaluation of analyzer in clinical chemistry, ECCLS Document, Vol. 3, No. 2, 1986.
4. CLSI. User Verification of Precision and Estimation of Bias Approved Guideline. 2. izdanje. CLSI Document EP05-A2. Wayne, PA, SAD: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005. In.
5. Abdel GMT, El-Masry MI. Verification of quantitative analytical methods in medical laboratories. J Med Biochem, 2021. (pristupljeno 4. 4. 2023.) Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34177366/>.
6. CLSI. Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline. 2. izdanje. CLSI Document EP06-A. Wayne, PA, SAD: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2003.
7. Buljubašić L, Verifikacija metode za određivanje hemoglobina A1c kapilarnom elektroforezom na uređaju Sebia Minicap Flex-Piercing u postupku uvođenja u rutinski rad (Diplomski rad). Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek; 2018. (pristupljeno 8. 4. 2023.) Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:883503>.
8. Ozarda Y, Higgins V, Adeli K. Verification of reference intervals in routine clinical laboratories: practical challenges and recommendations. Clinical Chemistry and Laboratory

9. POPIS LITERATURE

Medicine (CCLM). 2019.

9. Handelsman DJ. Androgen Physiology, Pharmacology, Use and Misuse. In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, et al., eds. Endotext. South Dartmouth (MA): MDText.com, 2020. (pristupljeno 18. 5. 2023.) Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25905231/>.

10. Nassar GN, Leslie SW. Physiology, Testosterone. StatPearls, 2023. (pristupljeno 12. 4. 2023.) Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526128/>.

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

12. . Pulok K, Mukherjee. A Rapid Technique for Understanding the Plant Metabolite Analysis. Quality Control and Evaluation of Herbal Drugs, Elsevier, 2019. (pristupljeno 6. 5. 2023.) Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128133743000119>.

13. Beckman Coulter. Instruction Manual for Access Immunoassay Systems A33261 U. Beckman Coulter Inc., CA, SAD, 2020.

14. EFLM: Testosterone. Analytical Performance Specification Calculation. (pristupljeno 12. 8. 2023.) Dostupno na: <https://biologicalvariation.eu/search?query=Testosterone>.

16. Dittadi, R, Matteucci, M, Meneghetti, E, Ndreu, R. Reassessment of the Access Testosterone chemiluminescence assay and comparison with LC-MS method. J Clin Lab Anal. 2018. (pristupljeno 7. 8. 2023.) Dostupno na: <https://onlinelibrary.wiley.com/action/showCitFormats?doi=10.1002%2Fjcla.22286&mobileUi=0>

15. Martínez-Escribano A, Maroto-García J, Ruiz-Galdón M, Barrios-Rodríguez R, Álvarez-Millán JJ, Cabezas-Sánchez P, et al. Measurement of Serum Testosterone in Nondiabetic Young Obese Men: Comparison of Direct Immunoassay to Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. Biomolecules, 2020. (pristupljeno 7. 8. 2023.) Dostupno na: <https://www.mdpi.com/2218-273X/10/12/1697>

10. ŽIVOTOPIS

OPĆI PODACI:

IME I PREZIME: Claudia Stefanović

DATUM I MJESTO ROĐENJA: 10. svibnja 1999., Slavonski Brod

ADRESA STANOVANJA: Matije Gupca 6, 35220 Slavonski Šamac

BROJ MOBITELA: 092 335 6672

E-MAIL: stefanovicclaudia0611@gmail.com

OBRAZOVANJE:

2006. – 2014. Osnovna škola „Josip Kozarac“ Slavonski Šamac

2014. – 2018. Klasična gimnazija fra Marijana Lanosovića s pravom javnosti, Slavonski Brod

2018. – 2021. Sveučilišni odjel zdravstvenih studija Split – sveučilišni preddiplomski studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

2021. – 2023. Medicinski fakultet Osijek – sveučilišni diplomski studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

2022. – 2023. Filozofski fakultet Osijek - program cjeloživotnog obrazovanja Psihološko – pedagoško – didaktičko – metodička izobrazba

AKADEMSKI NASLOVI:

univ. bacc. med. lab. diag. (2021.)