

Usporedba metoda za određivanje kalprotektina u stolici

Malecki, Lara

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

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:152:717310>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-24**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Lara Malecki

**USPOREDBA METODA ZA
ODREĐIVANJE KALPROTEKTINA U
STOLICI**

Završni rad

Osijek, 2024.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Lara Malecki

**USPOREDBA METODA ZA
ODREĐIVANJE KALPROTEKTINA U
STOLICI**

Završni rad

Osijek, 2024.

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

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Vatroslav Šerić, spec. med. biochem.

Rad ima 22 lista, 1 tablicu i 2 slike.

ZAHVALA

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Vatroslavu Šeriću na prihvaćanju uloge mentora te na njegovoj neizmjernoj pomoći tijekom izrade mog završnog rada.

Hvala dr. sc. Ines Šahinović na njevoj nesebičnoj pomoći i stručnim savjetima koji su mi bili od velike vrijednosti tijekom izrade praktičnog dijela završnog rada.

Najveće hvala mojoj obitelji, posebno mami, baki i djedu, na strpljenju i ogromnoj podršci. Vaša vjera u mene i vaša stalna potpora učinili su sve ovo mogućim i bez vas ovaj uspjeh ne bi bio ostvaren.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Kalprotektin	1
1.1.1. Upotreba fekalnog kalprotektina u kliničkoj praksi.....	1
1.1.2. Referentne vrijednosti fekalnog kalprotektina.....	2
1.2. Upalne bolesti crijeva	3
1.2.1. Crohnova bolest	3
1.2.2. Ulcerozni kolitis.....	4
2. CILJ RADA.....	5
3. MATERIJAL I METODE	6
3.1. Ustroj studije.....	6
3.2. Ispitanici (materijal)	6
3.3. Metode	6
3.3.1. BIO-FLASH®.....	6
3.3.2. OC-SENSOR™ Ceres	8
3.4. Statističke metode.....	9
4. REZULTATI	10
5. RASPRAVA.....	13
6. ZAKLJUČAK	17
7. SAŽETAK.....	18
8. SUMMARY	19
9. LITERATURA	20
10. ŽIVOTOPIS	22

POPIS KRATICA

CLIA - kemiluminiscentna imunoanaliza (prema engl. *Chemiluminescent immunoassay*)

CRP - C-reaktivni protein

EMMPRIN - induktor metaloproteaze izvanstaničnog matriksa (prema engl. *Extracellular matrix metalloprotease inducer*)

ELISA - enzimski povezani imunosorbentni test (prema engl. *Enzyme-linked immunosorbent assay*)

FC - fekalni kalprotektin (prema engl. *Faecal calprotectin*)

IBS - sindrom iritabilnog crijeva (prema engl. *Irritable bowel syndrome*)

KBC - Klinički Bolnički Centar

KZLD - Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku

MAPK - put protein kinaze aktivirane mitogenom (prema engl. *Mitogen-activated protein kinase*)

OD - apsorbancija (prema engl. *Optical density*)

pANCA - perinuklearna antineutrofilna citoplazmatska antitijela (prema engl. *Perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies*)

PI3K - put fosfoinozimid 3-kinaze (prema engl. *Phosphoinositide 3-kinase*)

PMN - E - polimorfonuklearna elastaza (prema engl. *Polymorphonuclear elastase*)

RAGE - receptor za napredne krajnje proizvode glikacije (prema engl. *Receptor for advanced glycation end products*)

Rho-GTPaze - put Ras homologne GTP-aze (prema engl. *Ras homologous-GTPases*)

RLU - relativna svjetlosna jedinica (prema engl. *Relative light units*)

SE - sedimentacija eritrocita

TLR4 - receptor sličan Tollu 4 (prema engl. *Toll like receptor 4*)

UBC - upalne bolesti crijeva

1. UVOD

1.1. Kalprotektin

Kalprotektin je protein koji se nalazi u citoplazmi neutrofilnih granulocita. Čini 60 % svih proteina citosola, a može se pronaći i na membrani monocita, aktiviranih makrofaga, endotelnih i epitelnih stanica. Iz granulocita je izoliran 1980. godine pod nazivom L1 protein. Pripada porodici S-100 proteina koji vežu kalcij. Uz kalcij, kalprotektin može vezati i cink (1). Zbog same mogućnosti da veže kalcij, kalprotektin je iznimno otporan na razgradnju probavnim enzimima.

Fekalni kalprotektin sadrži S100A8 (α podjedinica) i S100A9 (β podjedinica) monomere. Geni S100A8 i S100A9 nalaze se na kromosomu 1 (q21) kod ljudi (2). Svaki protein S100 sadržava dva motiva EF-ruke, što su N-terminalni kraj koji sadrži uzvojnica I i uzvojnica II te, odvojenog fleksibilnim veznikom, C-terminalni motiv sa uzvojnicom III i uzvojnicom IV, čime se osiguravaju dva vezna mjesta za kalcij. Zajedno sa S100A12, tvore potporodicu kalgranulina, skupinu proteina s proupalnim funkcijama koje otpuštaju fagociti (3).

Kalprotektin se iz stanica oslobađa nakon vezanja na stanične površinske receptore, kao što su receptor za napredne krajnje proizvode glikacije (RAGE, engl. *Receptor for advanced glycation end products*), receptor sličan Tollu 4 (TLR4, engl. *Toll like receptor 4*) i induktor metaloproteaze izvanstaničnog matriksa (EMMPRIN, engl. *Extracellular matrix metalloprotease inducer*). Nakon oslobađanja, u upalnim procesima sudjeluje kroz brojne signalne puteve, kao što je put protein kinaze aktivirane mitogenom (MAPK, engl. *Mitogen-activated protein kinase*), put fosfoinozimid 3 - kinaze (PI3K, engl. *Phosphoinositide 3-kinase*) i put Ras homologne GTP-aze (Rho-GTPaze, engl. *Ras homologous-GTPases*) (4). Ovi signalni putevi omogućuju kalprotektinu da oblikuje upalni odgovor i doprinese patofiziološkim procesima u raznim upalnim stanjima.

1.1.1. Upotreba fekalnog kalprotektina u kliničkoj praksi

Fekalni kalprotektin, koji se često označava kraticom FC (engl. *Faecal calprotectin*), ključni je biomarker koji se široko koristi u kliničkoj praksi za dijagnozu i praćenje upalnih bolesti crijeva, često označenih kraticom UBC, kao što su Crohnova bolest i ulcerozni kolitis. Njegova upotreba

je izuzetno korisna jer omogućava neinvazivnu procjenu upalnog procesa u crijevima. Mjerenjem koncentracije kalprotektina u stolici dobiva se indirektna mjera prisutnosti neutrofilnih granulocita u crijevnoj sluznici, što ukazuje na aktivnu upalu. Visoke razine FC-a obično su povezane s povećanom inflamacijom, dok niže vrijednosti sugeriraju smanjenje upale ili remisiju bolesti kod pacijenata (2).

Zahvaljujući svojoj pouzdanosti i specifičnosti, fekalni kalprotektin je postao standardni alat u dijagnostičkim i praćenim protokolima za pacijente s UBC-om, omogućavajući preciznije upravljanje bolešću i prilagodbu terapije prema individualnim potrebama pacijenata. Osim toga, fekalni kalprotektin je koristan i u diferencijaciji između UBC-a i sindroma iritabilnog kolona (IBS, engl. *Irritable bowel syndrome*) jer se značajno povišene razine kalprotektina obično ne nalaze kod pacijenata s IBS-om. Ova diferencijacija je važna za pravilno usmjeravanje liječenja i izbjegavanje nepotrebnih terapija (2).

Sukladno tome, redovno praćenje razina FC-a može pomoći u ranom otkrivanju recidiva bolesti, omogućavajući pravovremenu intervenciju i prilagodbu terapije, što može poboljšati ishode liječenja i kvalitetu života pacijenata. Zbog navedenih prednosti, fekalni kalprotektin predstavlja neizostavan alat u modernoj gastroenterološkoj praksi (2).

1.1.2. Referentne vrijednosti fekalnog kalprotektina

Vrijednosti fekalnog kalprotektina ispod 50 $\mu\text{g/g}$ pouzdano isključuju dijagnozu upalne bolesti crijeva, budući da se takvi rezultati smatraju normalnima. Vrijednosti fekalnog kalprotektina između 50 $\mu\text{g/g}$ i 120 $\mu\text{g/g}$ klasificiraju se kao granične, što može zahtijevati dodatne pretrage ili praćenje kliničkog stanja pacijenta. Prema različitim istraživanjima, vrijednosti iznad 120 $\mu\text{g/g}$ smatraju se povišenima i upućuju na moguću prisutnost upalne bolesti crijeva ili drugog patološkog stanja koje zahtijeva daljnju medicinsku evaluaciju i intervenciju (5).

Prednost primjene fekalnog kalprotektina u dijagnostici i praćenju upalnih bolesti crijeva je neinvazivna priroda, koja u određenim slučajevima može eliminirati potrebu za invazivnim endoskopskim pretragama kod pacijenata. Zbog varijacija u metodama mjerenja fekalnog kalprotektina među različitim laboratorijima, ključno je uspoređivati rezultate iz istog laboratorija prilikom praćenja aktivnosti bolesti (5).

1.2. Upalne bolesti crijeva

Upalne bolesti crijeva predstavljaju kronične upalne poremećaje gastrointestinalnog trakta nepoznate etiologije (6). Upala se javlja kao posljedica staničnog imunološkog odgovora. UBC se najčešće dijagnosticiraju u dvjema dobno specifičnim skupinama: od 15 do 30 godina te od 60 do 80 godina, iako mogu zahvatiti osobe u bilo kojoj životnoj dobi (6). Crohnova bolest i ulcerozni kolitis bolesti su koje zahvaćaju probavni sustav, a pripadaju upalnim bolestima crijeva. Unatoč mnogim sličnostima između Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa, ove se bolesti u većini slučajeva mogu jasno diferencirati. Specifične kliničke manifestacije, lokalizacija upale u gastrointestinalnom traktu te dijagnostički nalazi omogućuju precizno razlikovanje između ova dva poremećaja (6).

1.2.1. Crohnova bolest

Crohnova bolest je kronična upalna bolest crijeva koja zahvaća sve slojeve crijevne stijenke i najčešće pogađa distalni ileum i kolon, iako se može pojaviti u bilo kojem dijelu gastrointestinalnog trakta. Glavni simptomi uključuju proljev i bolove u trbuhu, ali pacijenti mogu također iskusiti umor, gubitak težine i anemiju (7).

Crohnova bolest ima najveću incidenciju u razvijenim zemljama, gdje se godišnje bilježi oko 7 novih slučajeva na 100000 stanovnika. Bolest je češća među bijelcima nego kod drugih rasa, a omjer između spolova varira od 1,1 do 1,8:1 u korist žena. Iako još nije identificiran točan uzrok, smatra se da kombinacija čimbenika okoline, genetike i imunološkog odgovora doprinosi razvoju bolesti. Pušenje je glavni okolišni čimbenik, gotovo udvostručujući rizik od obolijevanja (8).

Laboratorijski nalazi kod Crohnove bolesti obično su nespecifični. Upala se može detektirati kroz leukocitozu i trombocitozu, zajedno s ubrzanom sedimentacijom eritrocita, koja se označuje kraticom SE, i povišenim vrijednostima C-reaktivnog proteina, označen kraticom CRP, te fibrinogena. Dodatno, mogu se pojaviti anemija, sideropenija, smanjenje serumskih vrijednosti vitamina B12, hipoalbuminemija, hipokalijemija, hipokalcemija i hipomagneziemija. U stolici se može naći povećan broj leukocita i povišene razine fekalnog kalprotektina. Unatoč tome, endoskopski pregledi ostaju ključna metoda za dijagnozu Crohnove bolesti (8).

Crohnova bolest može se podijeliti u tri glavna oblika: primarno upalni oblik, primarno stenozirajući ili opstruktivni oblik te primarno penetrirajući ili fistulirajući oblik. Primarno upalni oblik nakon nekoliko godina često prelazi u druge oblike bolesti (7). Svaki oblik Crohnove bolesti, sa svojim specifičnim kliničkim obilježjima, zahtijeva poseban terapijski pristup za optimalno upravljanje stanjem i njegovim komplikacijama (7).

1.2.2. Ulcerozni kolitis

Ulcerozni kolitis je kronična upalna bolest koja uzrokuje stvaranje ulceracija na sluznici debelog crijeva, što često dovodi do krvavih proljeva. Osim gastrointestinalnih simptoma, mogu se javiti i ekstraintestinalni znakovi, kao što je artritis (7). Bolest prvo počinje u rektumu te može ostati ograničena na rektum što se naziva ulceroznim proktitisom. Bolest se širi kontinuirano, retrogradno i može zahvatiti cijelo debelo crijevo. Osobe s ulceroznim kolitisom imaju veći dugoročni rizik od raka debelog crijeva u odnosu na one bez ove bolesti. (7).

Incidencija ulceroznog kolitisa je najviša u razvijenim zemljama, a bilježi oko 11 novih slučajeva na 100000 stanovnika godišnje. Nema razlike u učestalosti između spolova (8). Ulcerozni kolitis može se pojaviti u bilo kojoj životnoj dobi, ali najčešće počinje prije 30. godine. Također postoji manji broj slučajeva gdje se bolest prvi put javlja između 50. i 70. godine života (7).

Kao i kod Crohnove bolesti, teorije o etiologiji ulceroznog kolitisa uključuju kombinaciju okolišnih čimbenika, genetike i imunološkog odgovora. Mogući okolišni faktori uključuju pušenje i korištenje oralnih kontraceptiva (8).

Kod većine bolesnika s ulceroznim kolitisom dijagnoza se postavlja na temelju kliničke slike, laboratorijskih nalaza i endoskopskog pregleda s histološkom potvrdom. U laboratorijskim nalazima tijekom akutne faze često se javlja leukocitoza i trombocitoza, uz ubrzanu SE i povišene vrijednosti CRP-a, što ukazuje na upalnu aktivnost. Česte su i sideropenična anemija, hypoalbuminemija i hipokalijemija. Perinuklearna antineutrofilna citoplazmatska antitijela (pANCA, engl. *Perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies*) su pozitivna kod 80 % oboljelih. U stolici se mogu naći leukociti i povišene razine fekalnog kalprotektina. Kao i kod Crohnove bolesti, endoskopski postupci ostaju ključni za dijagnozu ulceroznog kolitisa (8).

2. CILJ RADA

Cilj ovog istraživanja je kvantificirati koncentraciju kalprotektina koristeći dvije različite imunokemijske metode te provesti detaljnu usporedbu i analizu rezultata dobivenih nakon izvršenih mjerenja.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Ustroj studije

Istraživanje je ustrojeno kao presječna studija. Presječne studije su opservacijske studije koje analiziraju podatke iz populacije u jednom trenutku (9). Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva za istraživanje Medicinskog fakulteta Osijek, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku dana 24. svibnja 2024. godine.

3.2. Ispitanici (materijal)

Istraživanje je obavljeno na uzorcima stolice kliničkih i ambulantnih pacijenata koji su bili upućeni na Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku KBC Osijek radi mjerenja koncentracije fekalnog kalprotektina. Istraživanje je provedeno tijekom srpnja 2024. godine i obuhvatilo je 30 sudionika. Studija je uključivala pacijente različitih dobnih skupina i oba spola. Pacijenti nisu aktivno sudjelovali u istraživanju, već su njihovi uzorci korišteni anonimno. Kako bi se zaštitila privatnost sudionika, korišten je sustav šifriranja koji onemogućava identifikaciju pojedinaca čiji su podaci analizirani. Svakom pacijentu dodijeljen je jedinstveni identifikacijski broj sastavljen od 10 znamenki. Podaci su obrađeni na način koji osigurava povjerljivost i sigurnost informacija, čime je osigurana etičnost istraživanja.

3.3. Metode

3.3.1. BIO-FLASH®

BIO-FLASH® (Biokit, S.A.) napredni je imunokemijski analizator dizajniran za automatizaciju cjelokupnog analitičkog procesa u laboratorijskim uvjetima. Ovaj uređaj omogućava automatiziranu identifikaciju uzoraka korištenjem integriranog sustava za očitavanje crtičnih kodova. Nadalje, uređaj precizno pipetira uzorke i reagense, osiguravajući dosljednost u pripremi uzoraka. Inkubacija se odvija pod kontroliranim uvjetima koji su optimizirani za svaki specifični test. Nakon inkubacije, uređaj mjeri signal kemiluminiscencije, što omogućava visoko

osjetljive i specifične analitičke rezultate. BIO-FLASH® automatski evaluira izvedbu analize, pružajući brze i pouzdane rezultate koji su odmah spremni za interpretaciju (10).

QUANTA Flash® Calprotectin (Inova Diagnostics, Inc., San Diego, CA, SAD) je reagens koji je kompatibilan s BIO-FLASH® kemiluminiscentnim analizatorom. Ovaj reagens je specifično dizajniran za precizno i kvantitativno mjerenje koncentracije kalprotektina u uzorcima stolice nakon što su oni podvrgnuti ekstrakciji. Komplet reagensa uključuje QUANTA Flash® Calprotectin reagens, QUANTA Flash® Calprotectin kalibratore te QUANTA Flash® Calprotectin kontrole (10).

Princip mjerenja temelji se na načelu kemiluminiscentne imunoanalize (CLIA, engl. *Chemiluminescent immunoassay*). Kemiluminiscencija se javlja u reakcijama gdje se dio oslobođene energije emitira kao elektromagnetsko zračenje. Za kemiluminiscenciju je potrebno prisustvo molekule koja može biti ekscitirana elektronom te da ta molekula bude reakcijski produkt ili važna komponenta reakcije u kojoj se analit određuje. Također, potrebna je odgovarajuća količina emitiranih fotona u odnosu na broj molekula koje sudjeluju u reakciji i dovoljna brzina reakcije kako bi se kemiluminiscencija mogla precizno mjeriti (11).

Paramagnetske kuglice obložene su antitijelima specifičnim za kalprotektin, koja djeluju kao hvatači. Ove kuglice su pohranjene u ulošku reagensa, gdje su uvjeti optimizirani kako bi se očuvala reaktivnost antitijela. Na taj način, antitijela zadržavaju svoju sposobnost prepoznavanja i vezanja za kalprotektin, omogućavajući precizno i pouzdano mjerenje koncentracije kalprotektina u uzorku (10).

Za analizu je potrebno prikupiti 1-5 grama stolice u bočicu koja ne sadrži konzervanse. Uzorci mogu biti mekane ili tekuće konzistencije jer se rezultati proračunavaju uzimajući u obzir težinu uzorka stolice. Uzorak treba biti dostavljen u laboratorij unutar deset dana od prikupljanja. Tijekom transporta, temperatura ne smije prelaziti 30 °C kako bi se očuvala kvaliteta uzorka. Uzorak mora biti analiziran unutar 10 dana od prikupljanja. Ako se testiranje neće obaviti odmah, uzorci se mogu čuvati na temperaturi od 2 – 8 °C do 4 dana. Ako se testiranje ne može obaviti unutar perioda od 10 dana, uzorci se pohranjuju zamrzavanjem na -20 °C kako bi se sačuvala njihova stabilnost za kasniju analizu. Uzorci moraju biti pažljivo označeni i praćeni kako bi se izbjeglo miješanje ili gubitak informacija (10).

Ekstrakt stolice se razrjeđuje u omjeru 1:23 unutar instrumenta koristeći tekućinu za ispiranje, a postupak se provodi u jednokratnoj plastičnoj kivetu. Zatim se u drugu kivetu dodaje alikvot razrijeđenog uzorka pacijenta, paramagnetske kuglice obložene antitijelima i reagensni pufer te se smjesa temeljito homogenizira. Kiveta se zatim inkubira na temperaturi od 37 °C. Nakon provedenog postupka, kuglice se magnetiziraju i višestruko ispiru. U kivetu se potom dodaje anti-kalprotektin protutijelo konjugirano s ABEI luminiscentnim obilježivačem (ONS-HS-N-(4-aminobutil)-N-etil-izoluminol) te se smjesa ponovno inkubira na 37°C, nakon čega slijedi drugi ciklus ispiranja. Izoluminol konjugat inducira luminiscentnu reakciju kada se „Trigger 1“ (Fe (III) koproporfirin u otopini natrijevog hidroksida) i „Trigger 2“ (urea-vodikov peroksid u otopini natrijevog klorida) reagensi dodaju u kivetu. Svjetlosna emisija iz ove reakcije mjeri se kao relativna svjetlosna jedinica (RLU, engl. *Relative Light Units*) s pomoću BIO-FLASH® optičkog sustava. Vrijednosti RLU su proporcionalne količini vezanog izoluminol konjugata, što samim time odražava količinu kalprotektina vezanog na površini kuglica. Za kvantifikaciju, QUANTA Flash® Calprotectin koristi unaprijed definiranu lot specifičnu glavnu krivulju koja se učitava na instrument putem barkoda na spremniku reagensa (10).

3.3.2. OC-SENSOR™ Ceres

OC-SENSOR™ Ceres (EIKEN CHEMICAL Co., LTD., Tokyo, Japan) analizator je jednostavan za upotrebu i kompaktno dizajniran za izvođenje imunokemijskog testa za određivanje koncentracija fekalnog kalprotektina i hemoglobina u stolici. Test se temelji na reakciji poznatoj kao lateks aglutinacijska imuniturbidimetrija. Ova tehnika mjeri koncentraciju antigena na osnovu promjena u apsorpciji zračenja, koje su uzrokovane formiranjem kompleksa između antigena i antitijela. U postupku se koriste čestice lateksa koje su obložene antitijelima, a kada se antigeni prisutni u uzorku vežu na ta antitijela, dolazi do aglutinacije. Ovaj proces aglutinacije mijenja optička svojstva otopine, što se može kvantitativno mjeriti s pomoću turbidimetrije. Na taj način, promjene u mutnoći otopine pružaju informacije o koncentraciji specifičnih antigena u uzorku (12).

Lateks reagens priprema se premazivanjem polistirenskih lateksnih čestica anti-humanim kalprotektinskim antitijelima. Kada se reagens pomiješa s uzorkom, antitijela na lateksnim česticama reagiraju s kalprotektinom u uzorku, formirajući lateksni agregat kroz reakciju aglutinacije. Promjena apsorpcije po jedinici vremena, koja nastaje zbog aglutinacije,

proporcionalna je koncentraciji kalprotektina u uzorku. Krivulja odgovora, koja prikazuje apsorbanciju (OD, *engl. Optical Density*) u odnosu na koncentraciju, generira se iz rezultata kalibratora te se s pomoću nje određuje koncentracija kalprotektina u uzorku pacijenta (12).

Reagensni paket za analizu fekalnog kalprotektina uključuje OC-FCa™ reagense, OC-FCa™ kalibrator te OC-FCa™ kontrole LV1, LV2 i LV3. Svi ovi elementi su važni za standardizaciju i kvantifikaciju rezultata testiranja, osiguravajući preciznost i pouzdanost u interpretaciji nalaza (13). Uzorak stolice se prvo prikuplja u posudici za uzorke. Za pripremu uzoraka za analizu koristi se posebna epruveta OC-Auto Sampling Bottle 3™. Štapić s utorima se umoči u uzorak stolice i okreće, dok se svi utori ne napune uzorkom. Nakon toga, štapić se vraća u epruvetu s puferom i epruveta se zatvori. Prije analize, važno je provjeriti je li uzorak potpuno suspendiran u otopini pufera. Preporučuje se da se uzorak analizira najmanje sat vremena nakon sakupljanja u epruveti. Kalprotektin u OC-Auto Sampling Bottle 3™ stabilan je na sobnoj temperaturi do 3 dana, dok može biti stabilan i do 14 dana na temperaturi od 2-10 °C (12).

Mlaznica za reagens primjenjuje R1 reagens (N-2-hidroksietilpiperazin-N'-2-etansulfonska kiselina) u testne kivete. Nakon toga, mlaznica za uzorak dodaje uzorak u kivete, dok mikser miješa reagens R1 i uzorak kako bi ih homogenizirao. Zatim mlaznica za reagens dodaje R2 reagens (suspenzija čestica lateksa obloženih anti-humanim kalprotektin mišjim antitijelima) u već homogenizirani uzorak. Mikser ponovno homogenizira tekućinu u kivetama gdje se provodi analiza. Propusnost svjetlosti mjeri se u svakom ciklusu nakon dodavanja R1 reagensa. Jedan ciklus traje 40 sekundi. Rezultati analize ispisuju se iz uređaja, a analiza je gotova za 7 minuta (12).

3.4. Statističke metode

Kontinuirani podatci opisani su medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Slaganje u metodama ispitalo se Passing - Bablok regresijskom analizom i Bland – Altman analizom (13,14). Sve P vrijednosti su dvostrane. Razina značajnosti je postavljena na $\alpha = 0,05$. Za statističku analizu korišten je statistički program MedCalc® Statistical Software version 22.023 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2024).

4. REZULTATI

Izvršena su mjerenja koncentracije fekalnog kalprotektina u 30 uzoraka stolice na dva imunokemijska analizatora.

Koncentracije fekalnog kalprotektina izmjerene kemiluminiscentnim analizatorom BIO – FLASH prikazane su u Tablici 1., a koncentracije fekalnog kalprotektina analizatorom OC – SENSOR CERES prikazane su u Tablici 2.

Rezultati dobiveni analizom obrađeni su s pomoću statističkog programa MedCalc® Statistical Software verzija 22.023 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgija; <https://www.medcalc.org>; 2024).

Mjere sredine i raspršenja fekalnog kalprotektina s obzirom na primijenjene imunokemijske metode prikazane su u Tablici 1.

Tablica 1. Mjere sredine i raspršenja fekalnog kalprotektina s obzirom na primijenjene imunokemijske metode.

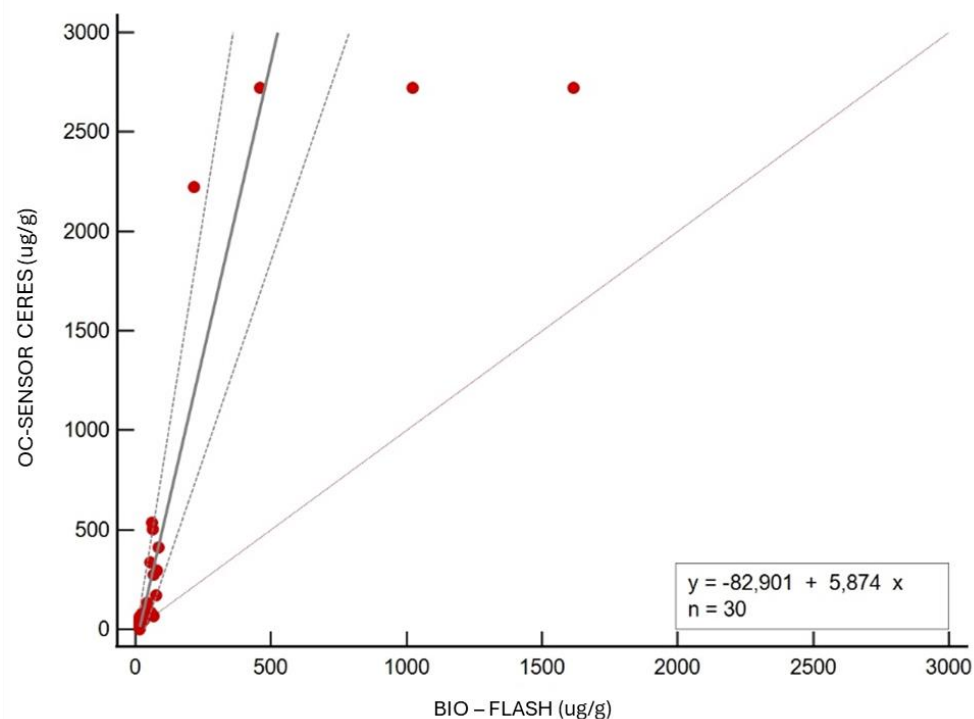
Fekalni kalprotektin (µg/g)	Medijan	Raspon
	(interkvartilni raspon)	(minimum – maksimum)
BIO - FLASH®	40,43 (16,10 – 67,74)	16,1 – 1616,47
OC-SENSOR™	78,50 (37,0 – 338,0)	0 – 2720,0

Istraživanjem su uspoređeni rezultati koncentracije fekalnog kalprotektina s obzirom na dvije različite imunokemijske metode.

Spearmanovim koeficijentom korelacije ocijenjena je povezanost te dvije skale, koja je pozitivna i vrlo dobra (Rho = 0,917; 95% interval pouzdanosti od 0,831 do 0,960; P < 0,001).

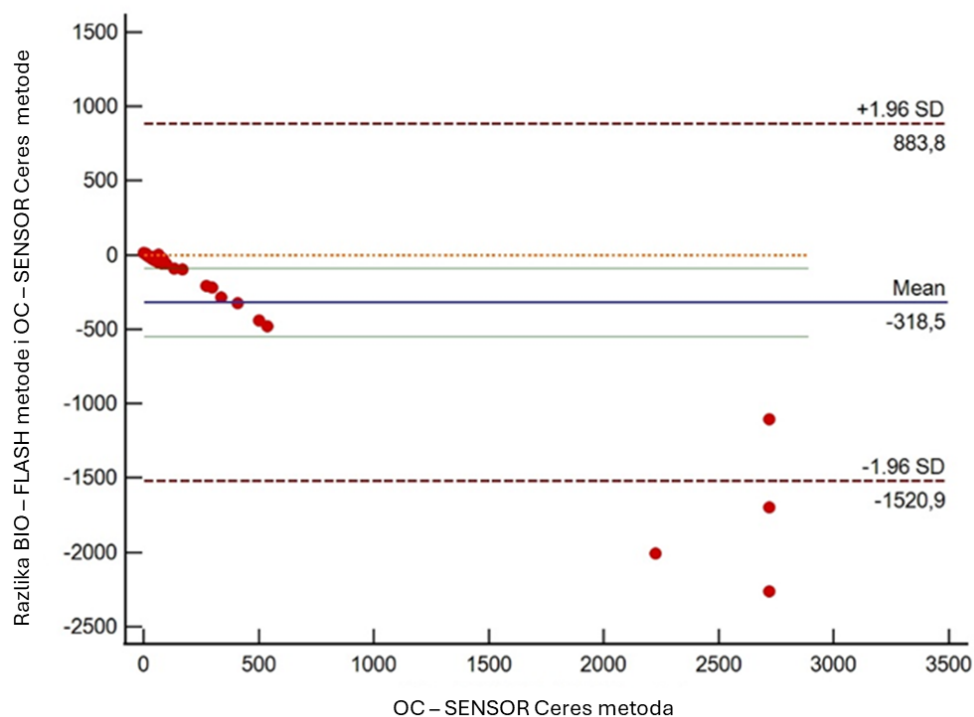
Uz zadovoljen uvjet nepostojanja značajnog odstupanja od linearnosti (Cusum test, $P = 0,34$), rezultati Passing - Bablok regresije prikazuje odnos dvije metode u obliku pravca s pripadnom jednadžbom, kojoj su definirane vrijednosti nagiba pravca i odsječka na osi y, a koje govore o prisutnosti konstantne i proporcionalne razlike dviju metoda.

U slučaju odnosa BIO - FLASH® i OC-SENSOR™ metode Passing Bablok regresijska analiza rezultirala je jednadžbom pravca: $y = -82,90 + 5,87 x$ (koeficijent a = -82,9; 95% interval pouzdanosti -135,8 do -33,7; koeficijent b = 5,87; 95% interval pouzdanosti 3,97 do 8,43), što je prikazano na Slici 1. Ovo ukazuje na postojanje i konstantne i proporcionalne razlike.



Slika 1. Prikaz Passing – Bablok regresijske analize (točke predstavljaju mjerenja; puna crta – regresijski pravac; isprekidana crta – granice 95 % intervala pouzdanosti regresijskog pravca; sitno isprekidana crta - pravac $y = x$) ($n = 30$).

Da se ispita je li postojeća razlika između dviju metoda statistički značajna, koristi se Bland-Altmanova analiza. Svi rezultati mjerenja, osim tri, nalaze se unutar raspona $\pm 1,96$ standardne devijacije (SD). Srednja vrijednost razlike je -318,5 (uz 95% interval pouzdanosti -547,6 do -89,48; $P = 0,008$), stoga možemo zaključiti da postoji značajna razlika u koncentraciji fekalnog kalprotektina s obzirom na ove dvije metode, što je prikazano na Slici 2.



Slika 2. Bland-Altmanova usporedba BIO - FLASH® i OC-SENSOR™ metode (n = 30)

5. RASPRAVA

Kalprotektin je ključni protein koji se koristi kao biomarker za dijagnostiku UBC, poput Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa. Njegova prisutnost u stolici omogućava razlikovanje između upalnih i neupalnih stanja crijeva, olakšavajući rano otkrivanje i precizno praćenje bolesti. Oslobađa se specifično iz neutrofila tijekom upalnog procesa, što znači da visoka razina kalprotektina u stolici pouzdano ukazuje na prisutnost upale. Osim kalprotektina, drugi upalni biljezi za bolesti crijeva uključuju CRP, SE, laktoferin i polimorfonuklearnu elastazu (PMN - E, engl. Polymorphonuclear elastase) (8,15). Međutim, kalprotektin je specifičniji za gastrointestinalnu upalu, dok CRP i SE mogu biti povišeni zbog upale bilo gdje u tijelu. Laktoferin i PMN-E također se mogu koristiti kao pokazatelji UBC, ali nemaju toliku kliničku validaciju i široku primjenu kao kalprotektin. Istraživanje koje su proveli Mosli i suradnici, a objavljeno je u *American Journal of Gastroenterology*, zaključuje da je fekalni kalprotektin najosjetljiviji indikator za otkrivanje upalnih aktivnosti kod pacijenata sa simptomatskim upalnim bolestima crijeva (15).

U ovom istraživanju uspoređene su dvije različite imunokemijske metode. Prva metoda koristi kemiluminescentnu imunološku analizu, dok se druga metoda temelji na lateks-aglutinacijskoj imunoturbidimetriji. Osim što određuju kalprotektin, oba analizatora imaju širu primjenu za mjerenje različitih parametara. Konkretno, analizator BIO-FLASH koristi se u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku, koji se često označava kraticom KZLD, još i za određivanje antitijela na kardiolipine klase IgG, antitijela na kardiolipine klase IgM, antitijela na beta-2-glikoprotein 1, kao i antitijela na M2 antigen mitohondrija (10). S druge strane, analizator OC-SENSOR CERES, koji koristi lateks-aglutinacijsku imunoturbidimetriju, može se koristiti za određivanje koncentracije hemoglobina u stolici (12). Analizator BIO-FLASH u Kliničkom bolničkom centru Osijek koristi se od 2018. godine i smješten je na Odjelu za imunološku i alergološku dijagnostiku pri KZLD-u (10). Analizator OC-SENSOR CERES još uvijek prolazi proces validacije i verifikacije, a stigao je u KBC Osijek 2024. godine.

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati i usporediti rezultate koji su dobiveni mjerenjem koncentracije kalprotektina s pomoću dvaju različitih imunokemijskih uređaja. Za postizanje visokih standarda preciznosti, uzorci stolice su prikupljeni u specijaliziranim posudama koje sadrže konzervanse, a zatim su analizirani koristeći automatizirane analizatore. Na temelju rezultata,

provedena je analiza raspodjele varijabli kako bi se utvrdila njihova normalnost, istražena je međusobna korelacija između različitih metoda te su identificirane prisutne statistički značajne razlike.

Spearmanovim koeficijentom korelacije ocijenjena je povezanost dvije skale. Spearmanov koeficijent korelacije ili rang-korelacija koristi se kada skup podataka slijedi ordinalnu ljestvicu ili kada raspodjela podataka značajno odstupa od normalne raspodjele (16). Koristi se ispituje povezanost varijabli mjerenih na manjim uzorcima. Povezanost dvije skale koje su dobivene mjerenjem fekalnog kalprotektina pozitivna je i vrlo dobra.

Kvantifikacija odstupanja između dviju metoda mjerenja fekalnog kalprotektina provedena je s pomoću Passing-Bablok regresijske analize. Ova analiza omogućava procjenu slaganja analitičkih metoda i prepoznavanje mogućih sistemskih odstupanja (17). Na temelju rezultata analize, zaključeno je da postoji i konstantna i proporcionalna razlika između dviju metoda. OC-SENSOR metoda dosljedno daje više vrijednosti nego BIO-FLASH metoda za sve razine kalprotektina, što je vidljivo iz negativnog odsjeka na y-osi koji je prikazan na Slici 1. Ako je vrijednost fekalnog kalprotektina $0 \mu\text{g/g}$ prema BIO-FLASH metodi, OC-SENSOR metoda će pokazati $-82,90 \mu\text{g/g}$, što je u teoriji nemoguće budući da vrijednosti kalprotektina ne mogu biti negativne. To upućuje da postoji sistemski razlika između dviju metoda. Nagib regresijske linije od 5,87 pokazuje proporcionalnu razliku, sugerirajući da se razlika između metoda povećava s porastom koncentracije kalprotektina. To znači da za svaki porast od $1 \mu\text{g/g}$ u BIO-FLASH metodi, OC-SENSOR metoda pokazuje porast od $5,87 \mu\text{g/g}$. Dakle, pri višim koncentracijama fekalnog kalprotektina, OC-SENSOR metoda daje znatno veće vrijednosti u usporedbi s BIO-FLASH metodom.

U analizi usporedivosti dvaju imunokemijskih analizatora, BIO-FLASH i OC-SENSOR Ceres, korištena je Bland-Altman metoda. Većina rezultata mjerena s oba analizatora, osim tri izuzetka, nalazi se unutar raspona $\pm 1,96$ standardnih devijacija, što ukazuje na dobru usklađenost između metoda. Srednja vrijednost razlike između koncentracija fekalnog kalprotektina iznosi $-318,5$ jedinica, što znači da metoda BIO-FLASH, u prosjeku, daje niže rezultate za $318,5$ jedinica u odnosu na OC-SENSOR Ceres. Interval pouzdanosti od 95 % ($-547,6$ do $-89,48$) potvrđuje da je razlika statistički značajna. P-vrijednost, koja je manja od standardne granice od 0,05, dodatno potvrđuje značajnost razlike. Na temelju ovih rezultata, možemo zaključiti da postoji značajna

razlika u mjerenju koncentracije fekalnog kalprotektina između dvaju metoda, što ukazuje na potrebu za pažljivim razmatranjem prilikom odabira metode za kliničke ili istraživačke svrhe.

U istraživanju Oyaerta i sur. iz 2017. godine, koje je objavljeno u časopisu *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, korišteno je ukupno šest različitih metoda za određivanje fekalnog kalprotektina. Istraživanje je uključivalo usporednu analizu nekoliko ELISA (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) kitova i CLIA metoda. Studija je istaknula prednosti CLIA metoda u odnosu na ELISA metode, preporučujući njihovu primjenu u kliničkoj praksi za mjerenje fekalnog kalprotektina (18).

U istraživanju koje su proveli Padoan i suradnici, objavljenom u časopisu *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2018. godine, uspoređene su dvije metode za mjerenje fekalnog kalprotektina: kemiluminiscentni imunološki test i turbidimetrija. Cilj istraživanja bio je utvrditi razlike u rezultatima i pouzdanosti između ovih metoda. Rezultati istraživanja pokazali su da su vrijednosti dobivene CLIA metodom konstantno i proporcionalno niže u usporedbi s vrijednostima dobivenim turbidimetrijskom metodom (19). Rezultati provedenog istraživanja dosljedni su s nalazima Padoana i suradnika te u oba istraživanja, CLIA metoda je pokazala konstantno i proporcionalno niže vrijednosti u usporedbi s turbidimetrijskom metodom.

Na temelju provedenih analiza fekalnog kalprotektina, uočena su značajna odstupanja u rezultatima mjerenja između dviju korištenih metoda. Različite metode analize imaju svoje specifične prednosti i ograničenja, što može dovesti do varijacija u dobivenim rezultatima. Niska usporedivost kvantitativnih rezultata dobivenih različitim imunokemijskim metodama može se pripisati različitim čimbenicima. Ovi čimbenici uključuju varijacije u primjeni različitih vrsta antitijela, kao što su monoklonska antitijela u odnosu na poliklonska antitijela, kao i razlike u životinjskom podrijetlu tih antitijela. Također, usmjerenost antitijela na različite epitopske regije ciljne molekule može značajno utjecati na rezultate mjerenja (20). Primjerice, metoda BIO-FLASH koristi monoklonska antitijela za određivanje koncentracije fekalnog kalprotektina, što omogućuje visoku specifičnost ciljanih molekula (10). S druge strane, metoda OC-SENSOR Ceres se oslanja na poliklonska antitijela (12), koja prepoznaju više epitopa na ciljnom antigenu, što može rezultirati širim rasponom detekcije. Pored toga, zbog nedostatka standardizacije među testovima za određivanje fekalnog kalprotektina u uzorcima stolice, predanalitički čimbenici igraju ključnu ulogu u varijacijama rezultata. Konkretno, čimbenici poput različitih metoda ekstrakcije, vrsta

pufera koji se koriste, uvjeta pohrane uzoraka, te načina razrjeđivanja uzoraka u ekstrakcijskim puferima mogu značajno utjecati na koncentraciju fekalnog kalprotektina koja se mjeri. Ove predanalitičke varijable mogu doprinijeti različitim rezultatima između testova, što dodatno otežava usporedivost i pouzdanost kvantitativnih mjerenja fekalnog kalprotektina (20).

6. ZAKLJUČAK

Provedbom usporedbe različitih metoda na dva imunokemijska analizatora za mjerenje koncentracije fekalnog kalprotektina mogu se iznijeti zaključci:

- 1.) Usporedbom metoda na analizatorima BIO-FLASH i OC-SENSOR Ceres uočena je statistički značajna razlika.
- 2.) Passing - Bablok regresijskom analizom uočena su konstantna i proporcionalna odstupanja između metoda.
- 3.) Neočekivane rezultate dobivene analizom na OC-SENSOR Ceres uređaju treba provjeriti dodatnim testiranjima kako bi se utvrdio uzrok eventualnih interferencija.

7. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Kalprotektin igra važnu ulogu u dijagnozi upalnih bolesti crijeva. Mjerenjem koncentracije fekalnog kalprotektina umanjuje se potreba za invazivnim zahvatima. Cilj istraživanja je izmjeriti koncentraciju kalprotektina koristeći dvije različite imunokemijske metode, te detaljno usporediti i analizirati rezultate dobivene ovim mjerenjima.

Nacrt studije: Ovo istraživanje provedeno je u obliku presječne studije.

Ispitanici i metode: Istraživanje provedeno u srpnju 2024. godine na Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC Osijek obuhvatilo je 30 uzoraka stolice kliničkih i ambulantnih pacijenata radi mjerenja koncentracije fekalnog kalprotektina. Studija je uključivala pacijente različitih dobnih skupina i oba spola. Koncentracija fekalnog kalprotektina mjerila se s dva imunokemijska analizatora, BIO-FLASH® (Biokit, S.A) i OC-SENSOR™ Ceres (EIKEN CHEMICAL Co. LTD., Tokyo, Japan).

Rezultati: Izvrsna povezanost između metoda utvrđena je Spearmanovim koeficijentom korelacije. Passing-Bablok regresijskom analizom uočena su konstantna i proporcionalna odstupanja između metoda. Bland-Altman analizom uočena je statistički značajna razlika između dvije metode.

Zaključak: Provedenom analizom dokazano je da postoji značajna razlika između dvije metode te da je potrebno neočekivane rezultate obraditi dodatnim testovima.

Ključne riječi: analizator, imunokemijske metode, kalprotektin, upalne bolesti crijeva, usporedba

8. SUMMARY

Comparison of methods for determination of calprotectin in stool

Objective of the Study: Calprotectin plays a crucial role in the diagnosis of inflammatory bowel diseases. Measuring the concentration of fecal calprotectin reduces the need for invasive procedures. The objective of this study is to measure the concentration of calprotectin using two different immunochemical methods and to perform a detailed comparison and analysis of the results obtained from these measurements.

Study Design: This research was conducted as a cross-sectional study.

Subjects and Methods: The study, conducted in July 2024 at the Clinical Institute for Laboratory Diagnostics at the University Hospital Center Osijek, included 30 stool samples from inpatient and outpatient subjects for the measurement of fecal calprotectin concentration. The study involved patients of various age groups and both genders. The concentration of fecal calprotectin was measured using two immunochemical analyzers, BIO-FLASH® (Biokit, S.A) and OC-SENSOR™ Ceres (EIKEN CHEMICAL Co., LTD., Tokyo, Japan).

Results: An excellent correlation between the methods was determined using Spearman's correlation coefficient. The Passing-Bablok regression analysis revealed constant and proportional discrepancies between the methods. The Bland-Altman analysis showed a statistically significant difference between the two methods.

Conclusion: The analysis demonstrated a significant difference between the two methods, indicating that unexpected results should be further examined with additional tests.

Keywords: analyzer, calprotectin, comparison, immunochemical methods, inflammatory bowel diseases

9. LITERATURA

1. Linarić, I. Fekalni kalprotektin – koristan dijagnostički biljeg upalnih bolesti crijeva // *Biochemia medica* / Pašalić, Daria (ur.). 2018;52.
2. Rukavina A. Analiza rezultata fekalne elastaze i fekalnog kalprotektina kod pacijenata s i bez upalne bolesti crijeva [Diplomski rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet; 2023. Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:520489>. Datum pristupa: 26.5.2024.
3. Korndörfer IP, Brueckner F, Skerra A. The crystal structure of the human (S100A8/S100A9)₂ heterotetramer, calprotectin, illustrates how conformational changes of interacting α -helices can determine specific association of two EF-hand proteins. *J Mol Biol* 2007;370(5):887–98.
4. Kim MH, Choi JH. An Update on Sepsis Biomarkers. *Infection & Chemotherapy*. 2020;52(1):1-18.
5. Wagner J, i sur. Klinički kolegij VI: KLINIČKA BIOKEMIJA II Priručnik za vježbe. Osijek: Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku; 2021.
6. Kasper DL, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J. Harrison: Principi interne medicine (džepni priručnik). 20th ed. New York: McGraw-Hill Education; 2018.
7. Porter RS, Kaplan JL. MSD priručnik za liječnike. 19th ed. Zagreb: Placebo; 2012.
8. Petrač D i sur., Interna medicina. Zagreb: Medicinska naklada; 2008.
9. Wang X, Cheng Z. Cross-Sectional Studies: Strengths, Weaknesses, and Recommendations. *Chest*. 2020;158(1):65-71.
10. KBC Osijek. Upute za korištenje uređaja BIO FLASH [Interni dokument]. Osijek: KBC Osijek; 2018.
11. Čvorišćec D, Čepelak I. Štrausova medicinska biokemija. 3. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2009.
12. KBC Osijek. Pojednostavljeni Korisnički Priručnik za uređaj OC – SENSOR Ceres [interni dokument]. Osijek: KBC Osijek; 2024.
13. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet Lond Engl*. 08. veljača 1986;1(8476):307–10.

14. Bablok W, Passing H. Application of statistical procedures in analytical instrument testing. *J Autom Chem.* 1985;7(2):74–9.
15. Mosli MH, Zou G, Garg SK, Feagan SG, MacDonald JK, Chande N, Sandborn WJ, i sur., C-Reactive Protein, Fecal Calprotectin, and Stool Lactoferrin for Detection of Endoscopic Activity in Symptomatic Inflammatory Bowel Disease Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Gastroenterol.* 2015;110(6):802-820
16. Ariens E, Sabin C. *Medical Statistics at a Glance.* 2nd ed. Oxford: Blackwell Publishing; 2005.
17. Bilić-Zulle L. Comparison of methods: Passing and Bablok regression. *Biochem Med (Zagreb).* 2011;21(1):49-52.
18. Oyaert M, Boel A, Jacobs J, Van den Breemt S, De Sloovere M, Vanpoucke H, i sur., Analytical performance and diagnostic accuracy of six different faecal calprotectin assays in inflammatory bowel disease. *Clinical Chemistry Laboratory Medicine (CCLM)* 2017;55(10):1564-73.
19. Padoan A, D’Inca R, Scapellato M, De Bastiani R, Caccaro R, Mescoli C, i sur., Improving IBD diagnosis and monitoring by understanding preanalytical, analytical and biological fecal calprotectin variability. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM).* 2018;56(11): 1926-35.
20. Beljan A. Kvantitativna analiza fekalnog kalprotektina novom kemiluminiscentnom metodom na analizatoru Bio-Flash (Inova Diagnostics) [Diplomski rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet; 2022 Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:840166> . Datum pristupa: 25.7.2024.

10. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Lara Malecki

Datum i mjesto rođenja: 9.9.2002., Vukovar, Republika Hrvatska

Adresa stanovanja: Olajnica 9, Vukovar, Republika Hrvatska

Kontakt: +385 99 328 4246

E – mail adresa: laramalecki@gmail.com

Obrazovanje:

2009. – 2017. Osnovna škola Dragutina Tadijanovića Vukovar

2017. – 2021. II. Gimnazija Osijek

2021. – 2024. Medicinski fakultet Osijek, Sveučilišni prijediplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika