

Validering och implementering av EliA Calprotectin 2 för mätning av fekalt kalprotektin med immunanalysatorn Phadia 250

Camilla Ahlqvist

Examensarbete för (YH)-examen inom social- och hälsovård

Utbildning: Bioanalytiker (YH)

Vasa 2017



EXAMENSARBETE

Författare: Camilla Ahlqvist

Utbildning och ort: Bioanalytiker, Vasa

Handledare: Camilla Ribacka och Diana Kujala

Titel: Validering och implementering av EliA Calprotectin 2 för mätning av fekalt kalprotektin med immunanalysatorn Phadia 250

Datum 29.11.2017

Sidantal 56

Bilagor 3

Abstrakt

Kalprotektin är ett protein som förekommer rikligt i neutrofila granulocyter, som utsöndrar kalprotektin i tarmlumen vid inflammatoriska tarmsjukdomar (IBD, inflammatory bowel disease). Den ökade kalprotektinutsöndringen innebär högre kalprotektinhalt i avföringen och tyder på tarminflammation. Fekal kalprotektinundersökning (F-Calpro) kan användas för särskiljning mellan IBD och funktionell tarmsjukdom (IBS, irritable bowel syndrome), vid uppföljningen och behandlingen av IBD samt att förutspå aktivare sjukdomsperioder hos IBD-patienter.

Examensarbetets syfte var att validera och implementera kalprotektinanalysmetoden EliA Calprotectin 2 med immunanalysatorn Phadia 250. Metoden som användes med Phadia 250 för att mäta kalprotektinhalten benämns EliA och är en fluorescensenzymimmunometod (FEIA). De uppmätta kalprotektinhalterna som erhöles med EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2 jämfördes. EliA Calprotectin 2 hade uppdaterade reagens jämfört med EliA Calprotectin, men båda analyserna utfördes med samma EliA-metod.

För examensarbetet samlades 67 avföringsprover. Avföringsproverna späddes med reagens från EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2, varefter kalprotektinhalten i de två olika spädningarna analyserades med Phadia 250.

EliA Calprotectin 2 har enligt tillverkaren en bättre känslighet än EliA Calprotectin, vilket kan antydast från detta examensarbete. EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2 jämfördes och en högre kalprotektinhalt uppmättes oftare med EliA Calprotectin 2. EliA Calprotectin 2 bedömdes pålitlig att ersätta EliA Calprotectin. En skillnad fanns i de uppmätta kalprotektinhalterna, som troligen berodde på den bättre känsligheten hos EliA Calprotectin 2. Implementeringen av EliA Calprotectin 2 för Phadia 250 genomfördes efter valideringen.

Språk: Svenska

Nyckelord: kalprotektin, avföring, feces, validering, reagensjämförelse, EliA Calprotectin 2, Phadia 250

OPINNÄYTETYÖ

Tekijä: Camilla Ahlqvist

Koulutus ja paikkakunta: Bioanalytiikka, Vaasa

Ohjaajat: Camilla Ribacka ja Diana Kujala

Nimike: EliA Calprotectin 2 kalprotektiinireagenssin validointi ja käyttöönotto Phadia 250 -immunoanalyyttorilla ulosteen kalprotektiinipitoisuuden mittaamiseen

Päivämäärä 29.11.2017 Sivumäärä 56 Liitteet 3

Tiivistelmä

Neutrofiilisissä granulocyteissa on runsaasti proteiinia, varsinkin kalprotektiinia. Neutrofiilit vapauttavat kalprotektiinia suoliston lumeniin tulehduksellisissa suolistosairauksissa (IBD, inflammatory bowel disease). Lisääntynyt kalprotektiinieritys tarkoittaa korkeampaa kalprotektiinipitoisuutta ulosteessa ja viittaa mahdolliseen suolistotulehdukseen. Ulosteen kalprotektiinipitoisuutta (F-Calpro) voidaan käyttää IBD:n ja ärtyvän suoliston oireyhtymän (IBS, irritable bowel syndrome) erotusdiagnoosissa, IBD-potilaiden seurannassa ja hoidossa, sekä IBD-potilaiden aktiivisen sairausvaiheen ennustamisessa.

Opinnäytetyön tarkoitus oli validoida ja ottaa käyttöön kalprotektiinianalyysimenetelmä, EliA Calprotectin 2, Phadia 250 -immunoanalyyttorilla. Kalprotektiinipitoisuuden määrittämiseen Phadia 250 -immunoanalyyttorilla käytettyä fluoroentsyymi-immunomenetelmää (FEIA) kutsutaan EliA-menetelmäksi. EliA Calprotectin 2 -analyysipaketin reagenssit on uudistettu. Opinnäytetyössä verrattiin EliA-menetelmällä mitattuja kalprotektiinipitoisuuksia alkuperäisillä (EliA Calprotectin) ja uudistetuilla (EliA Calprotectin 2) reagensseilla.

Opinnäytetyössä kerättiin 67 ulostenäytettä. Ulostenäytteet laimennettiin alkuperäisillä (EliA Calprotectin) ja uudistetuilla (EliA Calprotectin 2) reagensseilla, minkä jälkeen kalprotektiinipitoisuus analysoitiin molemmista laimennuksista Phadia 250 -immunoanalyyttorilla.

EliA Calprotectin 2 -analyysillä on valmistajan mukaan aiempaa parempi herkkyys, mikä myös ilmenee tässä opinnäytetyössä. Vertailussa EliA Calprotectin 2 antoi useammin korkeampia kalprotektiinipitoisuuksia kuin EliA Calprotectin. EliA Calprotectin 2 hyväksyttiin luotettavana EliA Calprotectin -analyysin korvaajana. Mitatuissa kalprotektiinipitoisuuksissa oli ero, joka luultavasti riippui EliA Calprotectin 2 -analyysin paremmasta herkkyydestä. EliA Calprotectin 2 -analyysin käyttöönotto Phadia 250 -immunoanalyyttorilla toteutettiin validoinnin jälkeen.

Kieli: Ruotsi

Avainsanat: kalprotektiini, uloste, validointi, reagenssivertailu, EliA Calprotectin 2, Phadia 250 -immunoanalyyttori

BACHELOR'S THESIS

Author: Camilla Ahlqvist

Degree Programme: Biomedical Laboratory Scientist

Supervisors: Camilla Ribacka and Diana Kujala

Title: The validation and implementation of EliA Calprotectin 2 assay for measurement of faecal calprotectin levels with the Phadia 250 immunoanalyser

Date	29.11.2017	Number of pages	56	Appendices	3
------	------------	-----------------	----	------------	---

Abstract

Calprotectin is an abundant protein in neutrophilic granulocytes and is released from neutrophilic granulocytes into the intestinal lumen during inflammatory bowel disease (IBD). The increased release of calprotectin causes a higher calprotectin level in faeces and is an indication of intestinal inflammation. Faecal calprotectin analysis (F-Calpro) can be used to differentiate between IBD and irritable bowel syndrome (IBS), to monitor and treat IBD patients and to predict a more active disease period in IBD patients.

The aim of this thesis was to validate and implement the EliA Calprotectin 2 assay for measurement of calprotectin levels with the Phadia 250 immunoanalyser. The method used with Phadia 250 to measure the calprotectin level is called EliA and is a fluorescence enzyme immunoassay (FEIA). The measured calprotectin levels with EliA Calprotectin and EliA Calprotectin 2 were compared. EliA Calprotectin 2 had updated reagents compared to EliA Calprotectin, however, both assays used the same EliA method.

For the thesis 67 faecal samples were collected. The faecal samples were diluted with reagents from EliA Calprotectin and EliA Calprotectin 2, and the calprotectin level was analysed from the two different dilutions with the Phadia 250 immunoanalyser.

EliA Calprotectin 2 has a higher sensitivity than EliA Calprotectin according to the manufacturer, which can be indicated from this thesis. EliA Calprotectin and EliA Calprotectin 2 were compared, and a higher calprotectin level was more often measured with EliA Calprotectin 2. EliA Calprotectin 2 was approved as reliable to replace EliA Calprotectin. There was a difference between the measured calprotectin levels, which probably was due to the higher sensitivity of EliA Calprotectin 2. The implementation of EliA Calprotectin 2 for Phadia 250 was done after the validation.

Language: Swedish

Key words: calprotectin, stool, faeces, validation, comparison of reagents, EliA Calprotectin 2, Phadia 250

Innehållsförteckning

1	Introduktion.....	1
2	Syfte och frågeställningar	2
3	Teoretisk bakgrund.....	3
3.1	Kalprotektin	3
3.2	Fekalt kalprotektin	4
3.3	Inflammatoriska tarmsjukdomar	5
3.3.1	Crohns sjukdom	6
3.3.2	Ulcerös kolit.....	7
3.4	Brister med kalprotektin som fekal markör för IBD	7
3.5	POC-tester för kalprotektinanalys	9
3.6	Serumkalprotektin som markör för andra sjukdomar.....	10
3.7	Preanalytik och provhantering inför kalprotektinanalys	11
3.8	EliA – en fluorescensenzymimmunometod som detekteras med Phadia 250	12
3.9	Validering av en metod	13
3.9.1	Selektivitet, specificitet och känslighet	14
3.9.2	Mätområde, linjäritet, detektions- och kvantifieringsgräns.....	15
3.9.3	Avvikelse, utbyte, interferensmotstånd och noggrannhet	15
3.9.4	Repetierbarhet, reproducerbarhet och mätosäkerhet.....	15
3.10	Validering av immunologiska metoder	16
4	Material och metoder.....	18
4.1	Material och reagens för kalprotektinanalys.....	18
4.2	Spädning av avföringsprover och förberedelser för kalprotektinanalys	19
4.3	Phadia 250 - immunanalysator.....	20
4.4	Förberedelser av Phadia 250 immunanalysatorn för kalprotektinanalys	21
4.5	Processen för EliA i Phadia 250 immunanalysatorn.....	23

4.6 Precisionstest.....	25
4.7 Statistiska beräkningar.....	25
5 Resultat och tolkning.....	26
5.1 Jämförelse mellan EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2	26
5.1.1 Mätområdet	26
5.1.2 Likheter och skillnader i den uppmätta kalprotektinhalten	27
5.1.3 Skillnader i frekvensen av uppmätta analysvar	30
5.1.4 Känsligheten	31
5.1.5 Specificiteten	32
5.1.6 Referensvärdet.....	33
5.2 Skillnader i positiva och negativa analysvar	34
5.3 Precisionstestet – repeterbarhetstest.....	35
6 Diskussion och kritisk granskning.....	38
6.1 Preanalytiska faktorer inverkan på jämförelsen.....	38
6.2 Finns det behov av olika referensvärden för kalprotektin?	41
6.3 Potentiellt ökad risk för falska positiva svar för IBD-patienter	43
7 Avslutning.....	47
8 Etiska överväganden.....	48
9 Källförteckning.....	49

Bilaga 1 – Rådata

Bilaga 2 – Tabell över positiva och negativa analysvar

Bilaga 3 – Den godkända anhållan om tillstånd för lärdomsprovet

1 Introduktion

Kalprotektinbestämning från avföring ger viktig information om inflammatoriska tarmsjukdomar, som Crohns sjukdom och ulcerös kolit (Sipponen & Kolho 2011, s. 2631). Kalprotektin är ett protein som utsöndras mest från neutrofila granulocyter. Vid inflammatoriska tarmsjukdomar är kalprotektinhalten högre än normalt, vilket beror på att de neutrofila granulocyterna vandrar till tarmlumen och utsöndrar kalprotektin. Fekal kalprotektinundersökning (F-Calpro) är användbar vid uppföljning och behandling av inflammatoriska tarmsjukdomar. Undersökningen visar hur aktiv inflammationen är och kan förutsäga perioder med förvärrat sjukdomstillstånd (Sipponen & Kolho 2011, s. 2631–2632). Med kalprotektinbestämning kan man skilja mellan inflammatoriska tarmsjukdomar som kallas IBD (irritable bowel disease) och funktionell tarmsjukdom som kallas IBS (irritable bowel syndrome) (Tibble m.fl. 2000a, s. 510).

Symtomen för IBD och IBS liknar varandra med bland annat diarré och magsmärtor (Walsham & Sherwood 2016, s. 23). Differentieringen mellan IBD och IBS grundar sig på att vid IBS förekommer vanligen ingen tarminflammation (Grundmann & Yoon 2010, s. 692). Kalprotektinhalten är därmed inte förhöjd vid IBS på grund av att tarmen inte är inflammerad. I Finland har antalet patienter som lider av inflammatoriska tarmsjukdomar ökat märkbart under de senaste 25 åren (Nykopp 2015). Ökningen i antalet IBD-patienter beror även på att metoderna för diagnostiseringen har utvecklats och mera forskning kring IBD har ökat kunskapen.

Målet med lärdomsprovet var att validera och implementera kalprotektinanalysmetoden EliA Calprotectin 2 med immunanalysatorn Phadia 250. EliA Calprotectin 2 har uppdaterade reagens jämfört med EliA Calprotectin, som ska ersättas. Med undersökningen kontrollerades om det fanns skillnader i den uppmätta kalprotektinhalten mellan det tidigare använda EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2 som validerades. Implementeringen, dvs. ibruktagandet, av den uppdaterade metoden för kalprotektinanalys genomfördes efter valideringen.

Lärdomsprovet var ett beställningsarbete av kemist Diana Kujala vid Social- och hälsovårdsverkets kliniska laboratorium i Jakobstad. Undersökningen utfördes under tidsperioden 18.4 – 2.6.2017 vid Social- och hälsovårdsverkets kliniska laboratorium i Jakobstad. Diana Kujala var handledare för det praktiska arbetet.

2 Syfte och frågeställningar

Syftet med arbetet är att validera och implementera EliA Calprotectin 2, som har nya reagens, och jämföra med EliA Calprotectin som ska ersättas. Mätningen av halten av fekalt kalprotektin (F-Calpro) utförs med immunanalysatorn Phadia 250. Reagenserna för EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2 skiljer sig medan metoden, EliA, är samma. I texten benämns de jämförande undersökningarna förenklat EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2 med beaktande att de skiljer sig angående reagenserna. Enligt tillverkarens egna undersökningar har den nyare EliA Calprotectin 2 bättre känslighet för IBD, 98,0 %, jämfört med 88,9 % hos EliA Calprotectin. Specificiteten för IBD är däremot lägre på 75,9 % för EliA Calprotectin 2 medan EliA Calprotectin har 79,5 % specificitet (Thermo Scientific 2014a, s. 3).

Frågeställningarna som arbetet fokuserar på är att undersöka om det finns variationer i den uppmätta kalprotektinhalten mellan EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2 och ifall EliA Calprotectin 2 kan tillförlitligt implementeras i den dagliga laborieverksamheten för analys av fekalt kalprotektin istället för EliA Calprotectin. De möjliga skillnaderna som förekommer i uppmätta kalprotektinhalter mellan EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2 kan bero på den enligt tillverkaren bättre känsligheten hos EliA Calprotectin 2. Känsligheten kontrolleras genom att undersöka om det finns en skillnad i den uppmätta kalprotektinhalten vid användning av den nyare EliA Calprotectin 2 jämfört med EliA Calprotectin med Phadia 250 immunanalysatorn. I arbetet undersöks samma avföringsprov med EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2.

3 Teoretisk bakgrund

I den teoretiska bakgrunden tas upp information om fekalt kalprotektin, inflammatoriska tarmsjukdomarna Crohns sjukdom och ulcerös kolit och brister med fekalt kalprotektin som markör för IBD. Dessutom beskrivs preanalytiska faktorer inför kalprotektinanalys, metodbeskrivning av fluorescensenzymimmunometoden EliA som används för mätningen av kalprotektinhalten samt vilka egenskaper som kan undersökas vid validering av en analysmetod.

3.1 Kalprotektin

Kalprotektin är ett metallbindande protein som består av 93 aminosyror och hör till proteinfamiljen S100 (Bild 1) (Korndörfer m.fl. 2007). S100 proteinfamiljen är alla små proteiner på 10–12 kDa, som främst består av alfa-helixar och binder kalcium- eller zinkjoner (Sedaghat & Notopoulos 2008, s. 198–199). Kalprotektin är ett protein som frigörs främst från neutrofila granulocyter, men även från monocyter och aktiverade makrofager. Kalprotektin utgör ca 60 % av allt protein som finns i neutrofila granulocyters cytoplasma. Kalprotektins kompletta

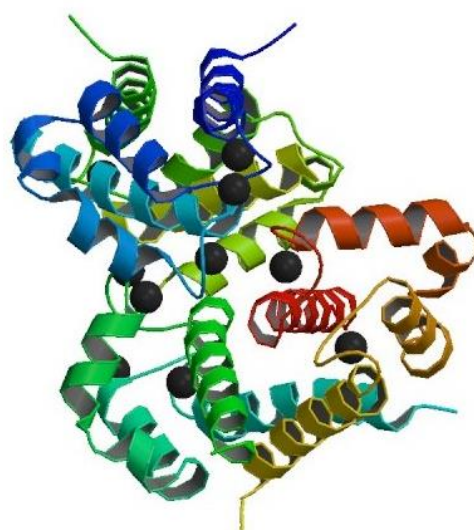


Bild 1. Kristallstrukturen av kalprotektin från människa. Proteinstrukturen består av alfa-helixar och bollarna representerar bundna kalciumjoner (Korndörfer m.fl. 2007). Bilden är från rcsb.org, PDB ID: 1XK4.

biologiska funktion är inte känd förutom att det binder kalcium och zink samt har immunregulatoriska uppgifter (Sipponen & Kolho 2011, s. 2631).

Kalprotektin utsöndras vid neutrofilaktivering och när monocyter fäster vid endotel, därför kan kalprotektin mätas från plasma, ledvätska, spott, likvor, urin och feces (Sipponen & Kolho 2011, s. 2631). Plasmakalprotektinhalten kan öka upp till 40 gånger från det normala värdet på grund av infektioner och inflammationer. Kalprotektinhalten är normalt kring sex gånger högre i avföring jämfört med i plasma (Sipponen & Kolho 2011, s. 2631). För att påvisa IBD har mätning av kalprotektin från avföring visats vara mera specifikt jämfört med t.ex. CRP (C-reaktivt protein)

(Lehmann m.fl. 2015, s. 27). Blodprov har låg sensitivitet och specificitet för att detektera IBD och det är svårt att hitta korrelationer till kliniska symtom (Tibble m.fl. 2000b, s. 17–19).

3.2 Fekalt kalprotektin

Det finns mycket kalprotektin i neutrofila granulocyter som vid inflammation vandrar genom tarmväggen till tarmlumen. Antalet neutrofila granulocyter ökar i tarmen och därmed ökar även kalprotektinhalten i avföringen (Vermeire m.fl. 2006, s. 428). Mätningen av kalprotektin från avföring används vid uppföljning av inflammatoriska tarmsjukdomarna Crohns sjukdom och ulcerös kolit. Kalprotektinhalten korrelerar med neutrofilantalet i tarmlumen och är specifikt förhöjt vid inflammatoriska tarmsjukdomar (Carlsson m.fl. 2012, s. 485).

Referensvärdet, som används i Finland, är att halten kalprotektin i avföring ska vara under 100 µg/g kalprotektin (Väisänen 2015; Katajamäki & Havana 2016; Anttonen 2017). Det betyder i detta fall att kalprotektinhalter över 100 µg/g tyder på tarminflammation medan kalprotektinhalter under 100 µg/g tyder på att det inte förekommer en tarminflammation. Det har gjorts undersökningar kring det lämpligaste referensvärdet för fekalt kalprotektin. I en jämförande litteraturstudie utförd av von Roon m.fl. (2007) var resultatet att 100 µg/g är bättre än 50 µg/g för diagnostiseringen av IBD (von Roon m.fl. 2007, s. 811).

Kalprotektin finns normalt i avföring, under 50 µg/g, och varierar med åldern och därför finns det förslag på kalprotektinreferensvärden för friska personer enligt åldern (D'Angelo m.fl. 2017, s. 294). För 2 – 9-åringar finns ett föreslaget referensvärde på under 166 µg/g kalprotektin och den högre kalprotektinhalten är troligen på grund av att barn har normalt större permeabilitet i tarmens mukosa och skillnader i tarmens mikrobiota (Joshi m.fl. 2010, s. 261; D'Angelo m.fl. 2017, s. 294). För 10 – 59-åringar föreslås referensvärdet under 51 µg/g kalprotektin och under 112 µg/g kalprotektin för personer över 60 år (Joshi m.fl. 2010, s. 261).

Andra fall där kalprotektin är förhöjt är bland annat vid maligniteter i mag-tarmkanalen, polyper i mag-tarmkanalen, skador i tarmslemhinnan på grund av antiinflammatoriska läkemedel, bakterie- eller virusinfektioner i mag-tarmkanalen,

divertikulit, allergiska reaktioner i tarmen samt nekrosenterokolit hos nyfödda (Sipponen & Kolho 2011, s. 2632). Vid celiaki har man inflammation i slemhinnan men kalprotektinhalten är inte nödvändigtvis förhöjt och därför används inte kalprotektinundersökning vid diagnostisering av celiaki. Det har visats att fekalt kalprotektin ökar med åldern och vikt och minskar med motion och ökat fiberintag (Sipponen & Kolho 2011, s. 2632).

3.3 Inflammatoriska tarmsjukdomar

Till de inflammatoriska tarmsjukdomarna, IBD, hör ulcerös kolit och Crohns sjukdom (Sipponen & Kolho 2011, s. 2631). I Finland finns cirka 46 000 personer med IBD och över 2000 nya IBD-patienter diagnostiseras årligen (Crohn ja Colitis ry 2017). Antalet diagnostiserade har tredubblats under 1990–2010-talen (Nykopp 2015). Enligt Folkpensionsanstaltens (FPA) uppgifter har antalet barn med IBD fyrdubblats under de senaste 20 åren (Crohn ja Colitis ry 2017). Medelåldern för barn som insjuknar i IBD är 12 år, men IBD diagnostiseras hos allt yngre barn (Crohn ja Colitis ry 2017). Både Crohns sjukdom och ulcerös kolit är kroniska och karakteriseras av perioder av remission, dvs. lugnare sjukdomstillstånd, och aktivare sjukdomstillstånd (Vermeulen m.fl. 2012, s. 3; Jussila 2014, s. 30). Perioderna av remission kan variera från månader till år och vissa patienter är aldrig i remission (Vermeulen m.fl. 2012, s. 5).

Etiologin är inte helt känd för IBD, men sjukdomen orsakas troligen av genetiska faktorer samtidigt som miljöfaktorer och dieten påverkar (Jussila 2014, s. 16; Vermeulen m.fl. 2012, s. 3; Adams & Bornemann 2013, s. 699). Vid IBD pågår en obefogad immunreaktion och personen förlorar toleransen mot tarmens normala mikrobiota. Det förekommer troligen fel i tarmens barriärfunktion och immunsystem, vilket leder till kronisk inflammation (Vermeulen m.fl. 2012, s. 3). Personer med IBD har en även större risk att insjukna i ändtarmscancer (Ullman & Itzkowitz 2011, s. 1807).

Diagnostiseringen av IBD baseras på uteslutningsmetoden. Ofta används flera olika undersökningsmetoder, som histologiska, radiologiska och biokemiska undersökningar samt endoskopi (Jussila 2014, s. 30; Vermeulen m.fl. 2012, s. 3). Från blodprov undersöker man bland annat förekomsten av inflammation, infektion,

vätskebalansen och anemi. Från fecesprov görs mikrobiologiska undersökningar. Förekomsten av IBD-specifika antikroppar mot autoantigener och mikrober kan även undersökas. Perinukleära anti-neutrofila cytoplasmiska antikroppar, pANCA, finns hos 60 – 80 % av patienter med ulcerös kolit och hos 5 – 25 % av patienter med Crohns sjukdom. Antikroppar mot *Saccharomyces cerevisiae*, ASCA, finns hos 50 – 80 % av patienter med Crohns sjukdom, men endast hos mindre än 10 % av patienter med ulcerös kolit (Vermeulen m.fl. 2012, s. 3). Vid IBD undersökning bör både pANCA och ASCA testas för att få en tydligare diagnostisering (Kaukoranta 2013).

Målet med behandlingen av IBD är att hålla sjukdomen i remission för att tarmens mukosa ska kunna läka (Jussila 2014, s. 34). Behandlingen är individuell och påverkas av sjukdomsaktiviteten, inflammationsområdet och tidigare medicinering (Jussila 2014, s. 34; Vermeulen 2012, s. 5). Läkemedel som används är bl.a. glukokortikoider, aminosalicylater, kortikosteroider, metotrexat och biologiska läkemedel som anti-TNF α -antikroppar (Sipponen 2017, s. 115). Läkemedelsbehandling leder inte alltid till remission och då kan operation bli aktuellt. Hos 30 % av patienter med ulcerös kolit krävs att ändtarmen avlägsnas och hos 75 % av patienter med Crohns sjukdom krävs att en del av tunntarmen avlägsnas (Jussila 2014, s. 38).

3.3.1 Crohns sjukdom

Crohns sjukdom är en kronisk tarminflammationssjukdom, som förekommer hos både barn och vuxna (Kittanakom m.fl. 2017, s. 1; Jussila 2014, s. 26). Tarminflammationen kan påträffas i hela mag-tarmkanalen i flera regioner samtidigt (Vermeulen m.fl. 2012, s. 3). I 30 % av fallen förekommer inflammationen i tunntarmen, 20 % har inflammation endast i tjocktarmen och 50 % har inflammation i både tunntarmen och tjocktarmen samtidigt. Därtill förekommer även ofta inflammatoriska områden i övre mag-tarmkanalen (Vermeulen m.fl. 2012, s. 3).

Crohns sjukdom diagnostiseras oftare hos yngre personer i åldrarna 15 – 24 och senare i 40 års åldern (Vermeulen m.fl. 2012, s. 3; Jussila 2014, s. 26). I Finland insjuknar cirka 9 per 100 000 personer årligen (Crohn ja Colitis ry 2017). Det har framkommit att rökare har en större risk att insjukna i Crohns sjukdom (Jussila 2014,

s. 19). Symtomen vid Crohns sjukdom är diarré, magsmärtor, viktninskning och blodig avföring (Jussila 2014, s.30).

3.3.2 Ulcerös kolit

Ulcerös kolit är en kronisk tarmsjukdom i tjocktarmen och kan påträffas antingen endast vid rektum, i områden närmare tunntarmen eller i hela tjocktarmen (Adams & Bornemann 2013, s. 699). Sett på hela världen är ulcerös kolit vanligare än Crohns sjukdom, medan Crohns sjukdom är vanligare i industriländer (Adams & Bornemann 2013, s. 699). I Finland insjuknar årligen cirka 25 per 100 000 personer i ulcerös kolit (Sipponen 2015, s. 801). Sjukdomen är något vanligare hos män än hos kvinnor och uppkommer ofta redan i 20 – 35 års ålder, medan övriga diagnostiseras i 50 – 60 års åldern (Nykopp 2015). Symtomen för ulcerös kolit är diarré, blodig avföring och magsmärtor (Jussila 2014, s. 30).

3.4 Brister med kalprotektin som fekal markör för IBD

Det finns flera olika brister kopplat till användningen av fekala markörer för diagnostiseringen och uppföljningen av IBD (Lehmann m.fl. 2015, s. 28). Fekala markörer, som kalprotektin, är inte specifika för IBD. Kalprotektin kan detekteras t.ex. vid kolorektalcancer, födoämnesallergier och bakteriell mag- och tarminflammation (gastroenterit) (Lehmann m.fl. 2015, s. 28). Kalprotektin finns jämnt fördelat i feces, men kalprotektinhalten påverkas av fysiologiska faktorer som ålder, komorbiditet och dagliga variationer. Det finns inget validerat referensvärde för definieringen av aktiv sjukdomsfas och sjukdom i remission. Det optimala referensvärdet har inte definierats främst på grund av olika kliniska situationer och metoderna som används. Kalprotektin kan inte användas för att skilja mellan Crohns sjukdom och ulcerös kolit. Dessutom kan patienterna vara motvilliga att hantera och samla upp avföringsprovet (Lehmann m.fl. 2015, s. 28–29).

Ett problem med kalprotektinbestämningen är att det inte finns ett internationellt bestämt referensvärde (D'Angelo m.fl. 2017, s. 299). Det finns förslag på referensvärden på 50 µg/g, 100 µg/g och 250 µg/g för fekalt kalprotektin (D'Angelo

m.fl. 2017, s. 296; Lobatón m.fl. 2013, s. 1034). Referensvärdet som används bestäms enligt metoden som används, tillverkarens rekommendationer, forskning och det kliniska förhållningssättet för behandlingen. Dessutom finns det inte bestämda riktlinjer för kalprotektinhalter på 50–150 µg/g som kallas "gråzonen" ifall referensvärdet 100 µg/g används. Det är då upp till läkaren att från övriga tester bedöma patientens fortsatta behandling (D'Angelo m.fl. 2017, s. 299; Kittanakom m.fl. 2017, s. 4).

En annan svårighet med kalprotektin är att det inte finns en jämförbar standard för kalprotektin mellan olika kalprotektinanalysmetoder (Whitehead m.fl. 2013, s. 59). Det leder till att det förekommer skillnader hos de uppmätta kalprotektinhalterna mellan de olika analysmetoderna och det rekommenderas att patientuppföljningen görs på samma laboratorium eller vid laboratorier som använder samma metod och apparat för att få jämförbara resultat (Whitehead m.fl. 2013, s. 59–60; Prell m.fl. 2014, s. 5; Kittanakom m.fl. 2017, s. 8).

Det finns förslag på att det kunde vara bättre med ett högre referensvärde för kalprotektin för patienter med diagnostiserad IBD och ett lägre referensvärde vid sällningsundersökningar (D'Inca m.fl. 2007, s. 436). De flesta tillverkare föreslår att en kalprotektinhalt på över 50 µg/g skulle klassificeras som positivt, vilket indikerar att patienten troligen har en tarminflammation (Tibble m.fl. 2000a, s. 510). Det har funnits ett förslag på att införa ett lägre referensvärde på 30 µg/g kalprotektin för att förbättra känsligheten vid särskiljandet av IBS och IBD. Ett lägre referensvärde kunde även vara bättre för att förutspå klinisk remission och bedöma behandlingsresponsen (Tibble m.fl. 2000a, s. 510). Ett lägre referensvärde leder till minskat antal falska negativa svar, men ökat antalet falska positiva svar, med bättre känslighet och lägre specificitet (Theodorsson m.fl. 2012, s. 45). På motsvarande sätt om referensvärdet är satt högt blir känsligheten sämre och specificiteten högre, dvs. flera falska negativa men färre antal falska positiva resultat (Theodorsson m.fl. 2012, s. 45).

Det finns även andra fekala markörer än kalprotektin (Lehmann m.fl. 2015, s. 29). Möjligheterna att använda exempelvis laktoferrin, hemoglobin, metalloproteinaser och myeloperoxidaser som fekala markörer för IBD undersöks (Lehmann m.fl. 2015, s. 29–30). Speciellt laktoferrin påminner om kalprotektin och bland annat förekommer högre laktoferrinhalter vid aktiv ulcerös kolit jämfört med inaktiv ulcerös

kolit eller Crohns sjukdom, dessutom kan man skilja mellan IBD och IBS (Sipponen m.fl. 2008, s. 1227; D'Inca m.fl. 2007, s.436).

3.5 POC-tester för kalprotektinanalys

Ett ökat antal IBD-patienter har lett till ökad efterfrågan på snabbtest för sjukdomsuppföljning. Under de senaste åren har det utvecklats POCT (Point Of Care Testing) för kalprotektinanalys. Heida m.fl. (2017) har undersökt kalprotektin POC-testet IBDoc (Bühlmann Laboratories AG, Schönenbuch, Schweiz), med vilken patienten kan utföra testet hemma (Heida m.fl. 2017, s. 1743). Patienten samlar själv avföringen med en sticka och späder provet som droppas i en testkasset. Patienten använder sedan en applikation på sin smarttelefon för att avläsa svaret i testkassetten med telefonens kamera efter 12 minuter. Svaret klassificeras som lågt, medel eller högt och svaret skickas till en dataportal varifrån en läkare kan granska svaret (IBDoc u.å.; Heida m.fl. 2017, s. 1743–1744). I undersökningen jämfördes resultaten från IBDoc med resultaten från en ELISA-metod och kalprotektinhalterna stämde tillräckligt bra överens i de fall kalprotektinhalterna var under 500 µg/g. Heida m.fl. (2017) rekommenderade att uppmätta halter över 500 µg/g, med IBDoc, borde verifieras med en annan metod t.ex. en ELISA-metod (Heida m.fl. 2017, s. 1743, 1747–1748).

Puolanne m.fl. (2016) jämförde POC-testet Prevent ID CalDetect (Preventis Immunodiagnosics, Bensheim, Tyskland) med en ELISA-metod (Puolanne m.fl. 2016, s. 826). Resultatet visade att snabbtestet Prevent ID CalDetect, korrelerade med ELISA-metoden (Puolanne m.fl. 2016, s. 828). Deras rekommendation var att använda snabbtest för att identifiera patienter med aktivt sjukdomstillstånd och endast analysera positiva resultat från snabbtest med den mera tidskrävande och noggrannare ELISA-metoden (Puolanne m.fl. 2016, s. 830).

3.6 Serumkalprotektin som markör för andra sjukdomar

Serumkalprotektin är inte pålitligt som markör för IBD, eftersom det ger en bild av en systemisk inflammation (McCann m.fl. 2017, s. 535). Den forskning som finns som jämför serumkalprotektin och CRP vid inflammationstillstånd ger motstridiga resultat. Hare m.fl. (2013) och Meuwis m.fl. (2013) fann båda en korrelation mellan serumkalprotektin och CRP medan McCann m.fl. (2017) inte fann en korrelation mellan serumkalprotektin och CRP (Hare m.fl. 2013, s. 245; Meuwis m.fl. 2013, s. 682; McCann m.fl. 2017, s. 534).

Det bedrivs forskning kring möjligheterna att använda serumkalprotektin som markör för andra sjukdomstillstånd. Serumkalprotektin har undersökts som möjlig markör främst vid inflammatoriska sjukdomstillstånd som t.ex. akut blindtarmsinflammation (Schellekens m.fl. 2013), reumatoid artrit (Inciarte-Mundo m.fl. 2016) och vid AAV (anti-neutrofil cytoplasmisk antikroppassocierad vaskulit s.k. ANCA-associerad vaskulit) som är en specifik typ av njurinflammation (Pepper m.fl. 2013). Överlag forskas det kring ifall kalprotektin är en bättre inflammationsmarkör än CRP och det utvecklas serumkalprotektinanalyser som kan tillämpas på kemianalysatorer (Nilsen m.fl. 2015).

Pedersen m.fl. (2014) studerade sambandet mellan höga halter plasmakalprotektin och hjärt-kärlsjukdomar hos typ 2 diabetes mellitus patienter (Pedersen m.fl. 2014, s. 1). De fann dock inga bevis på att plasmakalprotektin kunde användas som markör för hjärt-kärlsjukdomar (Pedersen m.fl. 2014, s. 7). Däremot hittades ett samband hos typ 2 diabetes mellitus patienter mellan hög halt plasmakalprotektin och övervikt, perifera kärlsjukdomar och metabolt syndrom (Pedersen m.fl. 2014, s. 4). En möjlig orsak till förhöjda kalprotektinhalter vid hjärt-kärlsjukdomar kan vara en följd av inflammationen vid bildandet av aterosklerotiskt plack i kärlen (Pedersen m.fl. 2014, s. 6). I två skilda studier undersöktes kalprotektinhalten från serum som markör för sepsis hos nyfödda (Terrin m.fl. 2011, s. 5; Decembrino m.fl. 2015, s. 3). Serumkalprotektin är känsligare och kan detekteras snabbare än CRP, men mer forskning behövs för att utreda kalprotektins användbarhet som sepsismarkör (Decembrino m.fl. 2015, s. 1–3).

3.7 Preanalytik och provhantering inför kalprotektinanalys

Laboratorieundersökningsprocessen delas traditionellt in i preanalytiska fasen, analytiska fasen och postanalytiska fasen. Benämningen pre-preanalytiska fasen har tillkommit och innebär de steg som utförs utanför det kliniska laboratoriet, som valet av analyser och beställningen av undersökningen av läkaren, provtagning, märkning av provet med patientuppgifter, transporten samt mottagandet av provet (Plebani 2012, s. 85). I pre-preanalytiska fasen påverkar ofta den information patienten får från annan vårdpersonal t.ex. angående fastprov. Till den preanalytiska fasen hör arbetsmoment efter provmottagningen och innan den analytiska fasen, som sortering av prov, centrifugering, avskiljning, alikvotering och förvaring innan analysen (Plebani m.fl. 2014, s. 106–107). I laboratorieundersökningsprocessen sker de flesta fel, upp till 75 %, i den preanalytiska fasen, vilket innefattar pre-preanalytiska fasen (Plebani 2012, s. 85; Plebani m.fl. 2014, s. 107). De flesta av dessa steg kan och har automatiserats under de senaste åren för att minska på de preanalytiska felen (Caragher m.fl. 2017, s. 60–61).

En preanalytisk faktor att ta i beaktande inför kalprotektinanalys från avföringsprov är rekommendationen att ta avföringsprovet från morgonavföring om möjligt, men det är inte nödvändigt (Sipponen & Kolho 2011, s. 2631). Icke-steroida antiinflammatoriska läkemedel (NSAID, non steroidal anti-inflammatory drugs) kan höja kalprotektinhalten eftersom de kan skada tarmslemhinnan, vilket kan leda till tarminflammation. Därför rekommenderas att patienten håller upp med användningen av NSAID läkemedel 1 – 2 veckor innan kalprotektinundersökningen. Kalprotektinbestämningen kan göras från ett gram avföring och avföringskonsistensen påverkar inte nämnvärt (Sipponen & Kolho 2011, s. 2631–2632). Inför provtagningen får patienten en specifik burk för avföringsprovet från laboratoriet. Burken har en sked i locket och den rekommenderade provmängden är en ordentlig tesked avföring. Patienten kan sedan förvara provet i rumstemperatur vid transporten till laboratoriet (Väisänen 2015).

Före kalprotektinanalysen späds avföringsprovet med ett kommersiellt kit. Enligt tillverkaren ska avföringsproverna för EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2 spädas med skilda kommersiella kit, EliA Stool Extraction kit respektive EliA Stool Extraction kit 2. Kalprotektin är stabilt i avföringen innan spädning, vilket beror på

att proteinet är proteasresistent och avföringen kan förvaras en vecka i kylskåpstemperatur eller frysas innan analysen (Carlsson m.fl. 2012, s. 485; Sipponen & Kolho 2011, s. 2632). Kalprotektin har däremot en annorlunda hållbarhet i spädningarna. Avföringsspädningen med EliA Stool Extraction kit 2 håller i rumstemperatur i tre dagar, sju dagar i kylskåpstemperatur och tre månader i frys (Thermo Scientific 2014b, s. 1). Avföringsspädningarna gjorda med EliA Stool Extraction kit har sämre hållbarhet, 24 timmar i kylskåp, och tillverkaren rekommenderar att inte förvara avföringsspädningarna i kylskåp över natten, eftersom kalprotektinhalten då kan minska. Hållbarheten i frys är tre månader för avföringsspädningar med EliA Stool Extraction kit (Thermo Scientific 2012b, s. 1).

3.8 EliA – en fluorescensenzymimmunometod som detekteras med Phadia 250

Metoden som används med immunanalysatorn Phadia 250 (Thermo Scientific, MA, USA) för att mäta kalprotektinhalten benämns EliA och är en fluorescensenzymimmunometod, FEIA (Fluorescence Enzyme Immuno Assay) (Thermo Scientific 2015a, s. 1). För Phadia 250 betecknas kalprotektinmetoden EliA Calprotectin eller EliA Calprotectin 2 och är ämnat för in vitro kvantitativ mätning av kalprotektinhalten från avföring från människa (Thermo Scientific 2015a, s. 1).

EliA-reaktionsbrunnarnas polystyrenyta är täckt med monoklonala antikroppar som specifikt binder till kalprotektin (Bild 2A och 2B). Efter att kalprotektin har bundit tillsätts en enzymmärkt detektionsantikropp, konjugatet, som binder specifikt till kalprotektin från människa (Bild 2C). Konjugat-antikroppen är märkt med enzymet β -galaktosidas. Det bildas ett kalprotektin-konjugat-komplex. Därefter tillsätts en framkallningslösning som innehåller ett substrat. Substratet är 4-metyl-umbelliferyl- β -D-galaktosid som förkortas 4-MUF. Enzymet på antikroppen omvandlar substratet som börjar fluorescera (Bild 2D). Reaktionen stoppas och fluorescensen detekteras för att mäta kalprotektinhalten i provet. Fluorescensintensiteten är proportionerligt till mängden kalprotektin, dvs. mycket kalprotektin ger högt fluorescensvärde. (Thermo Scientific 2012a, s. 102; Thermo Scientific 2015a, s. 1). Denna metod där antigenet fångas upp av en antikropp och detekteras med hjälp av en annan

antikropp kallas sandwich-metod, eftersom antigenet hamnar mellan två antikroppar (Bild 2D) (Koivunen & Krogsrud 2006, s. 493).

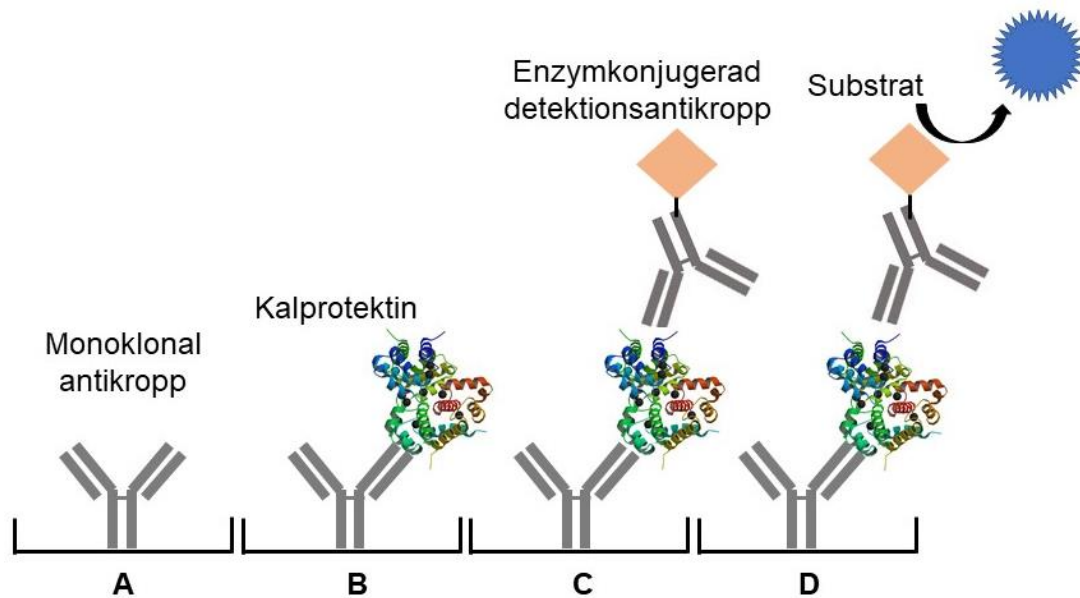


Bild 2. Metodprincipen för sandwich EIA/ELISA för detektering av kalprotektin med monoklonala antikroppar. En beskrivning av de olika reaktionerna som sker i ELISA-reaktionsbrunnen. A) Monoklonala antikroppar från möss finns fästa i reaktionsbrunnarna. B) Vid inkuberingen med patientprov fäster kalprotektin till de monoklonala antikropparna. C) Enzymantikroppkomplex specifikt för kalprotektin fäster till en annan epitop på kalprotektin. D) Framkallningslösning, innehållande substratet 4-MUF, tillsätts och fluorescens uppstår efter en enzymatisk reaktion mellan enzymet, β -galaktosidas, och substratet. Bilden av kristallstrukturen (Korndörfer m.fl. 2007) av kalprotektin är från rcsb.org, PDB ID: 1XK4. (Egen bild).

3.9 Validering av en metod

Valideringen är en process där analysmetoden testas för att bekräfta att metoden är vetenskapligt hållbar och lämplig för det tilltänkta användningsområdet (Hiltunen m.fl. 2011, s. 24). Metodvalidering är en viktig del för att uppnå tillförlitlighet för metoden. En metodvalidering görs t.ex. varje gång en ny metod tas i bruk, när en ny metod utvecklas för ett visst ändamål, ifall metoden som används förnyas eller användningsområdet breddas, ifall kemikalietillverkaren byts eller materialet som analyseras byts samt ifall det framkommer från kvalitetskontrollerna att någonting har inträffat med metoden som används. Vid valideringen kan man undersöka selektivitet, specificitet, linjäritet, mätområdet, detektionsgränsen, kvantifieringsgränsen, avvikelser, utbyte, interferensmotstånd, känslighet,

noggrannhet, repeterbarhet, reproducerbarhet och mätosäkerhet (Hiltunen m.fl. 2011, s. 24–27).

3.9.1 Selektivitet, specificitet och känslighet

Metodens selektivitet betyder hur bra metoden kan bestämma halten av en specifik substans, när det samtidigt finns andra substanser som kan störa i lösningen (Hiltunen m.fl. 2011, s. 10). En metod med bra specificitet mäter endast den specifika substansen i fråga. Både selektiviteten och specificiteten störs ofta av andra faktorer och det är svårt att ha en metod som är helt selektiv och/eller specifik för en viss substans (Hiltunen m.fl. 2011, s. 11). Känsligheten är metodens förmåga att detektera små förändringar i provmaterialet, dvs. om metoden är känslig ger en liten förändring i koncentration ett stort utslag vid detektionen (Hägg 2016, s. 21). Känsligheten och specificiteten påverkar varandra. Det betyder att om referensvärdet som är valt är högt leder det till en lägre känslighet dvs. flera falska negativa resultat, medan specificiteten är högre och man får färre falskt positiva resultat (Theodorsson m.fl. 2012, s. 45).

På motsvarande sätt om referensvärdet är satt lågt blir känsligheten högre och specificiteten lägre (färre falska negativa men fler antal falska positiva resultat). Känsligheten och specificiteten är specifika för en viss metod och anger säkerheten hos metoden att urskilja absolut sjuka patienter samt absolut friska patienter (Theodorsson m.fl. 2012, s. 46). Provsvaret anges som positivt eller negativt och påverkar patientens fortsatta behandling, vilket betyder att specificiteten och känsligheten är viktiga. Exempelvis kan en metod ha 90 % känslighet och 70 % specificitet. Det betyder att känsligheten urskiljer sjukdomen hos 90 % av insjuknade, men ger 10 % falska negativa. Specificiteten på 70 % betyder att metoden eliminerar sjukdom hos 70 % men ger falskt positiva resultat hos 30 % (Theodorsson m.fl. 2012, s. 47).

3.9.2 Mätområde, linjäritet, detektions- och kvantifieringsgräns

Mätområdet är det område inom vilket ett resultat är pålitligt (Hiltunen m.fl. 2011, s. 11). Med linjäritet menas metodens förmåga att inom ett specifikt område ge en acceptabel linjär korrelation mellan resultatet och den undersökta substansens koncentration (Hiltunen m.fl. 2011, s. 12). Detektionsgränsen anger den lägsta koncentration som kan mätas och som skiljer sig från ett nollprov tillräckligt tydligt för att ge ett pålitligt resultat. Kvantifieringsgränsen anger den minsta koncentration som kan detekteras, men som man anger med ett osäkerhetsvärde (Hiltunen m.fl. 2011, s. 13).

3.9.3 Avvikelse, utbyte, interferensmotstånd och noggrannhet

Det kan finnas avvikelser som kan bero på t.ex. felkalibrering, systematisk felavläsning av apparaten eller att apparaten inte har underhållits korrekt. Utbyte betyder analysmetodens effektivitet att detektera den undersökta substansens totala mängd (Hiltunen m.fl. 2011, s. 13–16). Interferensmotstånd anger hur känslig metoden är och hur mycket resultateten som fås med metoden påverkas av små förändringar i testförhållanden, laboratoriet eller den person som utför arbetet (Hiltunen m.fl. 2011, s. 16; Hägg 2016, s. 22). Resultaten som erhålls är pålitliga även om det förekommer detalj avvikelser i metodprocessen. Även om olika laboratorier använder sig av samma metoder finns det avvikelser mellan hur metoden utförs mellan laboratorierna. Faktorer som kan påverka är t.ex. personen som utför arbetet, reagenserna, temperaturen och pH-värden (Hiltunen m.fl. 2011, s. 16–17). En methods noggrannhet anger att resultaten är nära det verkliga värdet (Ehder 2005, s. 35).

3.9.4 Repeterbarhet, reproducerbarhet och mätosäkerhet

Repeaterbarheten uppnås när mätningar kan utföras vid samma förhållanden inom ett kort tidsintervall (Hiltunen m.fl. 2011, s. 19). Förhållandefaktorerna som behålls är bland annat att samma person utför mätningarna med samma apparat och

samma reagenser används. Repeterbarheten undersöks genom att upprepa undersökningen av prover med olika koncentrationer (Hiltunen m.fl. 2011, s. 19). Reproducerbarhet betyder att ett prov kan mätas med samma metod i olika laboratorier som har olika apparater och resultatet blir samma. Reproducerbarheten kan testas under en längre tidsperiod (Hiltunen m.fl. 2011, s. 20). Det finns alltid en osäkerhetsfaktor vid mätresultat, därför är det viktigt att vara medveten om den möjliga mätosäkerheten (Hiltunen m.fl. 2011, s. 35). De faktorer som kan påverka är bland annat apparaturkalibreringar, apparathanteringen, temperaturskillnader, personalens kunskaper, provtagningen, provhanteringen och felberäkningar (Hiltunen m.fl. 2011, s. 38–42).

3.10 Validering av immunologiska metoder

De immunologiska metoderna kan delas in i två grupper (primär och sekundär interaktion) på basen av hur resultatet tolkas (Hägg 2016, s. 43). Till den ena gruppen (primär interaktion) hör metoder som tolkas visuellt t.ex. agglutinationstest och test som tolkas med fluorescensmikroskop. Till den andra gruppen (sekundär interaktion) hör metoder där resultatet mäts av en apparat t.ex. EIA, FEIA och immunelektrokemiluminiscensmetoder (ECLIA). Vid validering av metoder som hör till den första gruppen är det viktigt att ta i beaktande faktorer som provets hållbarhet, inkubationstemperatur, metodkänslighet, metodspecificitet samt provformen som plasma, serum, likvor, saliv eller feces. En annan faktor är avvikelser från normalprov t.ex. om provet är hemolytiskt eller lipemiskt (Hägg 2016, s. 43).

Metoderna som hör till den andra gruppen är oftast kommersiella och tillverkaren har validerat metoden (Hägg 2016, s. 14). Tillverkarens resultat angående känslighet och specificitet är oftast bra och det är svårt för ett vanligt laboratorium att nå samma resultat i praktiken. I laboratoriet verifieras att metoden fungerar i de egna förhållandena. Man kan undersöka repeterbarheten, reproducerbarheten, känsligheten, specificiteten och provformens påverkan. Om tillverkaren har meddelat egenskaper hos provet som kan påverka resultatet måste man i laboratoriet testa eller i svaret observera den möjliga påverkan. Många immunologiska metoder kan utföras på kemianalysatorer. Ifall man planerar att börja utföra immunologiska metoder med en kemianalysator måste analysatorns

lämplighet utredas och valideras. I de fall en ny apparat anskaffas, t.ex. en immunanalysator, måste apparaten valideras. Man jämför den nya och gamla apparatens uppmätta analys svar för att utreda om det finns skillnader i den uppmätta halten undersökt substans (Hägg 2016, s.14, 43).

4 Material och metoder

Undersökningen utfördes enligt instruktioner från kemist Diana Kujala och enligt tillverkarnas instruktioner. Respondenten framställde självständigt spädningarna av avföringsproverna och utförde kalprotektinanalyserna med immunanalysatorn Phadia 250. Utförandet gjordes under veckorna 16 – 22 (18.4 – 2.6.2017) vid kliniska laboratoriet vid Social- och hälsovårdsverket i Jakobstad. Under veckorna samlades sammanlagt 67 avföringsprov för kalprotektinanalys. De uppmätta kalprotektinhalterna jämfördes mellan EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2. Under det praktiska arbetet användes fecesprover från patienter och den uppmätta kalprotektinhalten med EliA Calprotectin rapporterades vidare. De uppmätta kalprotektinhalterna från båda analyserna togs tillvara.

4.1 Material och reagens för kalprotektinanalys

Material och reagens som behövdes för analysen av kalprotektin med EliA Calprotectin eller EliA Calprotectin 2 är reaktionsbrunnar, positiv och negativ kontroll, sample diluent (spädningslösning), konjugat, kalibratorbrunnar, EliA Stool Extraction kit eller EliA Stool Extraction Kit 2, development solution (framkallningslösning), stop solution (stopplösning), kalibratorstrip, kurvkontrollstrip och mellanspädningsplatta (Thermo Scientific 2015a, s. 1–2). Kalibratorstripen innehöll kalprotektin från människa i koncentrationerna 0, 3, 10, 20, 200 och 750 ng/ml. Kurvkontrollstripen innehöll 20 ng/ml kalprotektin från människa. Tillverkaren anger inte i reagensbeskrivningen kalprotektinhalterna i positiva och negativa kontrollen, utan nämner endast att de innehåller kalprotektin från människoblod (Thermo Scientific 2015a, s. 1–2).

Material och reagens för EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2 var olika och produkterna som användes för EliA Calprotectin 2 benämndes t.ex. EliA Calprotectin 2 well, Calprotectin 2 conjugate och EliA Calprotectin 2 calibrator strips. Vilket betyder att man inte kunde använda reagens från EliA Calprotectin för EliA Calprotectin 2, om det benämndes specifikt "EliA Calprotectin 2". Samma spädningslösning, framkallningslösning, stopplösning, samt positiva och negativa kontroll användes för både EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2.

4.2 Spädning av avföringsprover och förberedelser för kalprotektinanalys

För detta arbete användes EliA Stool Extraction kit och EliA Stool Extraction kit 2 (Thermo Scientific, MA, USA) för framställningen av avföringsspädningarna. För framställningen följdes tillverkarens instruktioner från "How to prepare an EliA™ Calprotectin 2 stool test - Stool extraction in six quick and easy steps" (Thermo Scientific 2014b, s. 1). Instruktionerna för framställningen av avföringsspädningarna var samma för båda spädningsskiten. EliA Stool Extraction kit och EliA Stool Extraction kit 2 skiljde sig i att de hade olika Extraction buffert (extraktionsbuffert) och olika volymer av extraktionsbuffert (Bild 3A) (Thermo Scientific 2014b, s. 1). Mängden extraktionsbuffert i EliA Stool Extraction kit-rören var 750 µl och innehöll Tris-buffert och natriumazid (0,05 %) (Thermo Scientific 2012b, s. 1; Thermo Scientific 2015b, s.1). I EliA Stool Extraction kit 2-rören som användes fanns 1,3 ml av EliA Calprotectin 2 extraktionsbuffert som innehöll Tris-buffert, natriumazid (0,05 %) och serumalbumin från nötkreatur (BSA) (Thermo Scientific 2014b, s. 1; Thermo Scientific 2015a, s. 1).

Avföringen samlades i stickan som fanns fast i rörets ljusblåa kork (Bild 3B). Mängden avföring skulle endast täcka fårorna i stickan (Bild 3C) och överskottsmaterial stannade i korken när stickan fördes genom ett hål i den mörkblåa korken. Avföringen kom i kontakt med extraktionsbufferten med hjälp av stickan. Avföringen och vätskan homogeniserades med en omblandare. Det är viktigt att avföringen som samlas i stickans fåror lossnar från fårorna för att den rätta mängden avföring analyseras. Avföringslösningen inkuberades i 10 minuter och centrifugerades sedan i 10 minuter vid 3000 x g. Efter centrifugeringen skruvades den mörkblåa korken bort och samtidigt avlägsnades stickan i den ljusblå korken. Supernatanten överfördes till ett rör som passade i provrörsställningarna i Phadia 250 analysatorn (Thermo Scientific 2014b, s. 1).

Vid analysen av kalprotektin från spädningarna gjorda med EliA Stool Extraction kit användes reagens för EliA Calprotectin. På motsvarande sätt användes reagens för EliA Calprotectin 2 för analysen av kalprotektin från spädningarna gjorda med EliA Stool Extraction kit 2. Spädningarna framställdes dagen innan analysdagen för de egentliga patientproverna som späddes med EliA Stool Extraction kit och förvarades i kylskåp. Spädningarna för EliA Calprotectin 2 gjordes parallellt och förvarades i

kyllskåp om analysen utfördes inom en vecka. Däremot om EliA Calprotectin 2 analysen troligen skulle utföras mer än en vecka efter avföringsspädningen tillretts förvarades avföringsspädningarna i frys. Avföringsspädningarna för EliA Calprotectin 2 förvarades i frys oftare under de första veckorna av det praktiska arbetet. Det berodde på att Phadia 250 analysatorn inte var inprogrammerad för EliA Calprotectin 2 reagens och det var inte möjligt ännu då att analysera kalprotektinhalter med EliA Calprotectin 2 reagens. Utförandet och processen var lika för EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2, förutom att en del reagens och material var specifika för respektive undersökning.

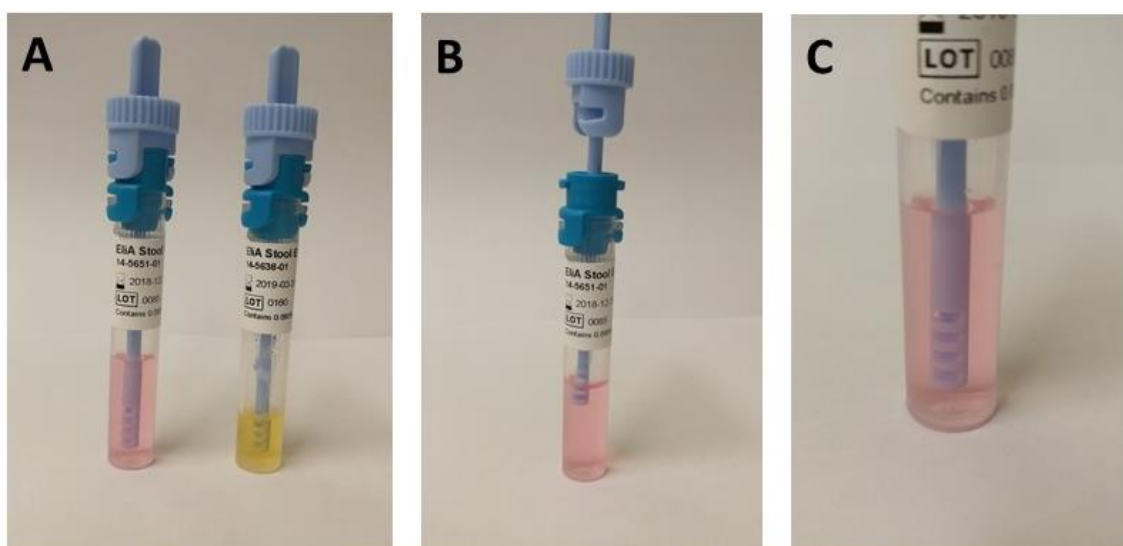


Bild 3. A) Till vänster EliA Stool Extraction kit-2-röret och till höger EliA Stool Extraction kit-röret. Volymskillnaden av extraktionsbufferten mellan rören ses även. B) Stickan för uppsamlingen av avföringen finns i den ljusblå korken. C) I bilden syns tydligare de fyra fårorna som skulle fyllas med avföringen. Fårorna såg likadana ut för EliA Stool Extraction kit-röret. (Egna bilder).

4.3 Phadia 250 - immunanalysator

Phadia 250 (Thermo Scientific, MA, USA) är en immunanalysator där tillverkarens egna ImmunoCAP- och EliA-metoder används (Thermo Scientific 2012a, s. 79). Med ImmunoCAP kan IgE, totala IgE, IgG, IgG4, ECP (Eosinophile Cationic Protein) och tryptas detekteras från serum eller plasma. Fokus i detta arbete var på EliA-metoden. Med EliA-metoden kan IgG, IgA och IgM detekteras från serum eller plasma och kalprotektin från avföring (Thermo Scientific 2012a, s. 79, 87, 94).

Phadia 250 har en kapacitet på 200 – 250 prov per dag och 50 prov kan placeras samtidigt i analysatorn. För ett EliA-prov tog det cirka två timmar från placering i analysatorn tills det att provet hade analyserats (Thermo Scientific 2012a, s. 119).

Phadia 250 med EliA Calprotectin 2 hade ett mätområde från 3,8 µg/g (detektionsgränsen) till 6000 µg/g (Thermo Scientific 2015a, s. 4). Kalprotektinhalter över 3,8 µg/g ansågs som pålitliga resultat för EliA Calprotectin 2. Jämförelsevis hade EliA Calprotectin ett pålitligt mätområde från 15 µg/g till 3000 µg/g kalprotektin. Vid tolkningen av resultatet gav Phadia 250 analysatorn kalprotektinhalter under 50 µg/g som negativa och över 50 µg/g som positiva (Thermo Scientific 2015a, s. 4). Negativt resultat betyder att patienten inte har inflammation i tarmen, medan ett positivt resultat innebär att patienten troligen har en tarminflammation.

4.4 Förberedelser av Phadia 250 immunanalysatorn för kalprotektinanalys

Innan kalprotektinanalysen förbereddes analysatorn med reagens (Bild 4A). För att analysatorn skulle fungera behövdes destillerat vatten (Rinse) och tvättlösning (Wash). Tvättlösningen var en blandning av destillerat vatten, washing solution concentrate och washing solution additive. Övriga reagens placerades ut i Phadia 250 analysatorn via kommandoskärmen och strekkodsavläsaren (Bild 4B). Bild 4A och 4B visar delar av Phadia 250 analysatorn som var synliga hela tiden, medan Bild 5 även schematiskt visar de delar som fanns under analysatorns skyddshöljen. Bland annat syntes inte lagret för reaktionsbrunnarna som hölls kallt (Bild 4B och Bild 5i) och reaktionskarusellerna (Bild 5b och Bild 5e).

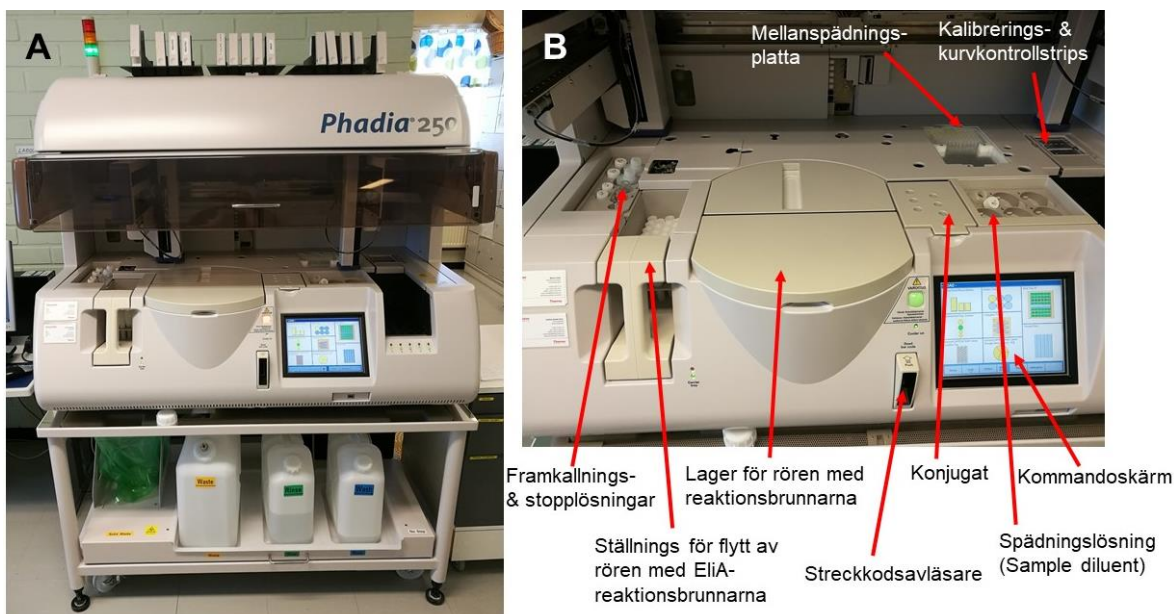


Bild 4. A) Bilden visar Phadia 250 immunanalysatorn. Behållarna för destillerat vatten (Rinse) och tvättlösningen (Wash) är i mitten respektive till höger. B) Bilden visar en närmare bild av Phadia 250 analysatorn med utplacerade reagens. Via kommandoskrimen och streckodsavläsaren placerades reagensen till respektives plats. Bilden kan jämföras med Bild 5 som visar en schematisk bild av Phadia 250 analysatorns delar och reagensutplaceringar. (Egna bilder).

Reagens och material som placerades i analysatorn på bestämda positioner var spädningslösning (Bild 5k), framkallningslösning (Bild 5a), stopplösning (Bild 5a), konjugat (Bild 5j), kalibratorstrip och kurvkontrollstrip (Bild 5g) samt mellanspänningsplatta (Bild 5f). Reaktionsbrunnarna och kalibratorbrunnarna placerades i ställning för flytt (Bild 5h) till lagret för brunnarna (Bild 5i). Reaktionsbrunnarna och kalibratorbrunnarna fanns i speciella rör som innehöll 12 eller 16 reaktionsbrunnar per rör. Reaktionsbrunnarna och konjugatet hölls i en kyld omgivning i analysatorn (Bild 5i och 5j) medan de andra lösningarna var i rumstemperatur. Kurvkontroll- och kalibreringsstriperna placerades i en separat ställning (Bild 5g).

Efter att alla reagens var utplacerade valdes vilken metod som användes. Vid val av metod meddelade analysatorn ifall kurvkontroll eller kalibrering behövde utföras. Analysatorn gick igenom en initialiseringsprocess först som tog cirka 10 minuter och där ingick även blank-kontroll. Analysatorn började automatiskt med kurvkontroll eller kalibrering. Därefter placerade negativa och positiva kontrollen i en skild provrörsställning. Negativa och positiva kontrollen kördes innan varje analys.

Innan EliA Calprotectin 2 proverna analyserades tinades de upp om de varit frysta och centrifugerades i 10 minuter vid 3000 x g. Även prov som förvarats i

kylskåpstemperatur centrifugerades. Korkarna avlägsnades och provrören placerades i provrörsställningen med streckkoden synligt för att Phadia 250 analysatorns streckkodsavläsare som fanns vid början av provrörsställningarnas placering i analysatorn (Bild 5m). Provrörsställningarna hade plats för 10 provrör och analysatorn hade plats för fem ställningar (Bild 5m).

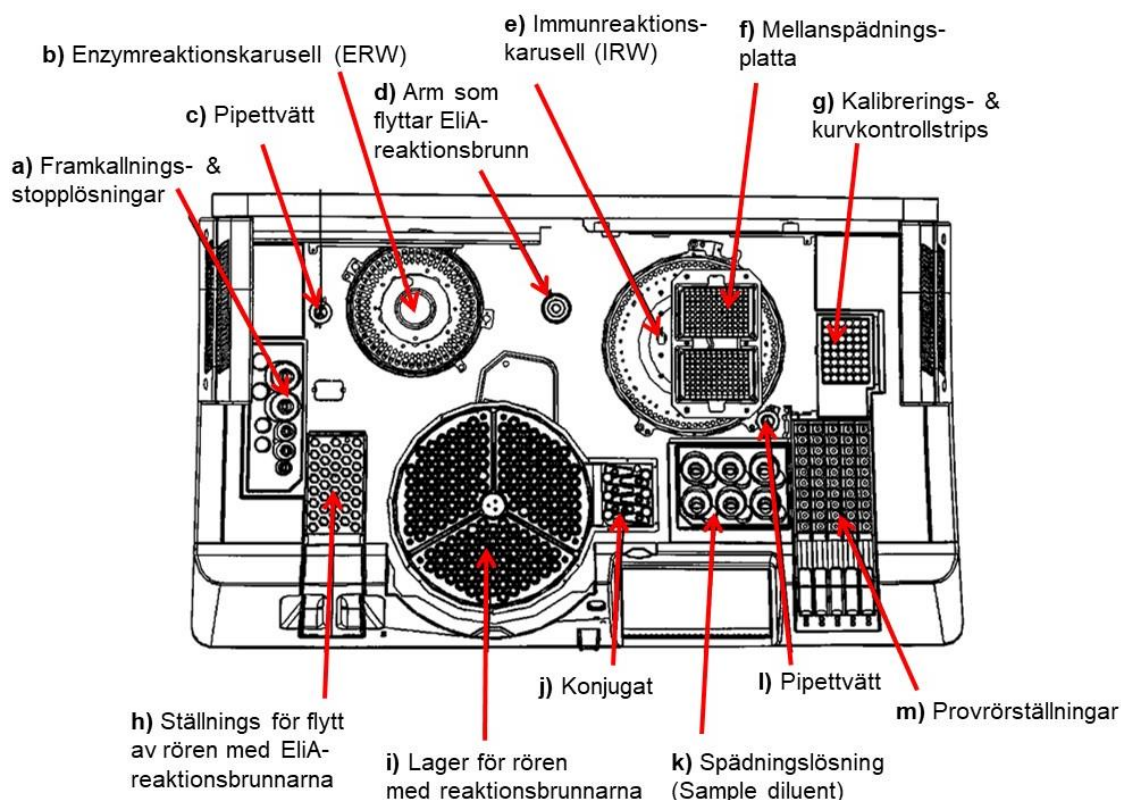


Bild 5. Delar av Phadia 250. Enzymreaktionskarusellen, ERW, (b) och immunreaktionskarusellen, IRW (e), lagret för rören med reaktionsbrunnarna (i) samt pipettvättarna (c och l) är inne i analysatorn och kan inte ses om inte det yttre höljet avlägsnas. Bilden är modifierad från Phadia 250 snabbinstruktionsbok (Thermo Scientific u.å).

4.5 Processen för EliA i Phadia 250 immunanalysatorn

Processen började med att en EliA-reaktionsbrunn per prov placerades av analysatorn i immunreaktionskarusellen, IRW (Bild 5e). Karusellen rörde sig ett steg per minut vilket betydde att en reaktionsbrunn per minut placerades ut. Efter 7 minuter späddes provet med spädningslösning i mellanspänningsplattan och överfördes till den tillhörande reaktionsbrunnen i immunreaktionskarusellen. Därefter inkuberades provet i 30 minuter i 37 °C för att kalprotektin i patentprovet

skulle binda till EliA-reaktionsbrunnens monoklonala antikroppar mot kalprotektin. IRW var temperaturreglerad och hölls vid 37 °C. Efter inkuberingen tvättades reaktionsbrunnen med tvättlösning för att avlägsna obundet material innan konjugatet tillsattes. Konjugatet var en enzymmärkt detektionsantikropp som band till en annan epitop än EliA-reaktionsbrunnens antikropp på kalprotektin. Konjugat-kalprotektin-komplexet inkuberades i 28 minuter 37 °C och sedan tvättades reaktionsbrunnen med tvättlösning för att avlägsna obundet material.

Analysatorn flyttade sedan reaktionsbrunnen från immunreaktionskarusellen till enzymreaktionskarusellen, ERW (Bild 5b). Framkallningslösning som innehöll ett substrat tillsattes och provet inkuberades i 39 minuter 37 °C. ERW var också temperaturreglerad och hölls vid 37 °C. Enzymet på antikroppen omvandlade substratet som började fluorescera. Efter inkubationen tillsattes stopplösning som stoppade reaktionen och fluorescensen mättes av fluorescensmätaren. Dataprogrammet omvandlade fluorescensintensiteten till mg/kg kalprotektin ($\mu\text{g/g}$ kalprotektin) (Thermo Scientific 2012a, s. 102; Thermo Scientific 2015a, s. 1; Thermo Scientific 2012a, s. 130-132). Tabell 1 beskriver händelseförloppet stegvist.

Tabell 1. Det stegvisa händelseförloppet i EliA i Phadia 250 immunanalysatorn (Thermo Scientific 2012a, s. 130–132).

Steg	Händelse
1. Utplacering av EliA-reaktionsbrunn i IRW	EliA-reaktionsbrunnen togs ur behållaren för brunnarna. Reaktionsbrunnen placerades i IRW
2. Spädning och pipettering av prov	Analysatorn spädde provet 1:100 för EliA Calprotectin och 1:200 för EliA Calprotectin 2 i EliA-reaktionsbrunnen
3. Inkubering	Provet inkuberades 30 minuter i 37 °C
4. Tvättning	Provet tvättades med 800 μl tvättlösning
5. Konjugat	90 μl konjugat pipetterades till EliA-reaktionsbrunnen
6. Inkubering	Konjugatet inkuberades 28 minuter i 37 °C
7. Tvättning	Konjugat som inte fäst tvättades bort med 800 μl tvättlösning
8. Förflyttning till ERW	EliA-reaktionsbrunnen flyttades från IRW till ERW
9. Pipettering av framkallningslösning	90 μl framkallningslösning pipetterades till EliA-reaktionsbrunnen
10. Inkubering	Framkallningslösningen inkuberades 39 minuter i 37 °C
11. Pipettering av stopplösning	200 μl stopplösning pipetterades till reaktionsbrunnen och provet blandades för reaktion mellan framkallningslösningen och stopplösningen
12. Överföring av processerat prov	80 μl prov överfördes till fluorometern
13. Fluorescensmätning	Fluorescensintensitet mättes

4.6 Precisionstest

Repeterbarheten undersöktes med ett precisionstest innan EliA Calprotectin 2 implementerades. Motsvarande prover för EliA Calprotectin 2 valdes enligt kalprotektinhalter som uppmätts med EliA Calprotectin under en analysdag. Fem avföringsprov valdes från analysen med EliA Calprotectin med uppmätta kalprotektinhalter både över och under 100 µg/g. Fem nya avföringsprover späddes med EliA Stool Extraction kit 2. De fem avföringsproverna för EliA Calprotectin 2 analyserades vardera fem gånger med Phadia 250 under samma dag, med samma reagens och av samma person.

4.7 Statistiska beräkningar

Resultaten som erhöles var kvantitativa dvs. i form av siffror, jämfört med kvalitativa resultat som består av text (Bringsrud Fekjær 2016, s. 13). Resultaten samlades in i en Exceltabell efter varje analys. Resultatet från undersökningen analyserades med statistiska jämförelser med hjälp av Microsoft Excel. Slutsatserna av resultatet har dragits från de jämförelser som gjordes på datamaterialet.

Utgående från precisionstestet beräknades statistiska värden som jämfördes mellan proverna. De värden som räknades ut var medelvärdet, standardavvikelsen, variationskoefficienten (CV) och medelvärdets medelfel (SEM). Standardavvikelsen anger hur mycket spridning det är på värdena från medelvärdet (Bringsrud Fekjær 2016, s. 39). Standardavvikelsen räknades med Excels STDAV.P funktion. Variationskoefficienten anger förhållandet på standardavvikelsen till medelvärdet (Ejlertsson 2003, s. 93 - 94). Variationskoefficienten räknades manuellt med formeln $CV = \frac{s}{m} \times 100$, där s = standardavvikelsen och m = medelvärdet. Medelvärdets medelfel tar i beaktande både standardavvikelsen och provantalet (Altman & Bland 2005, s. 903). Medelvärdets medelfel minskar vid en större provmängd, eftersom chansen för variationer inom proverna minskar. Medelvärdets medelfel beräknades manuellt med formeln $SEM = \frac{SD}{\sqrt{n}}$, där SD = standardavvikelse och n = antalet observationer (Altman & Bland 2005, s. 903).

5 Resultat och tolkning

Målet med arbetet var att validera och implementera nya EliA Calprotectin 2 och jämföra med EliA Calprotectin som skulle ersättas. Avföringsprover analyserades med både EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2 och resultaten jämfördes för att undersöka om det fanns variationer i de uppmätta kalprotektinhalterna och för att kontrollera att EliA Calprotectin 2 var tillförlitlig. De 67 avföringsproverna analyserades med EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2 efter att de spätts med respektive EliA Stool Extraction kit. Proverna analyserades först med EliA Calprotectin och senare med EliA Calprotectin 2. Ett precisionstest utfördes för att kontrollera repeterbarheten hos EliA Calprotectin 2 som validerades. De uppmätta kalprotektinhalterna från analyserna av 67 avföringsprov presenteras nedan.

5.1 Jämförelse mellan EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2

Jämförelsen mellan EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2 grundade sig i de uppmätta halterna av kalprotektin vid analyserna. Kalprotektinhalterna som uppmättes med EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2 sattes i en Exceltabell. I Bilaga 1 finns rådata för undersökningen där kalprotektinhalterna uppmätta med EliA Calprotectin är ordnade från den största kalprotektinhalten till den minsta kalprotektinhalten med motsvarande uppmätta halt med EliA Calprotectin 2. Därtill anges i tabellen i Bilaga 1 skillnaderna i den uppmätta kalprotektinhalten mellan EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2 för varje enskilt prov både som differens och procentuellt.

5.1.1 Mätområdet

EliA Calprotectin hade ett mätområde på 15 – 3000 µg/g och uppmätta halter under 15 µg/g var inte pålitliga enligt tillverkaren (Thermo Scientific 2015b, s. 4). Av de 67 avföringsproverna uppmättes 22 prov under 15 µg/g. Kalprotektinhalterna var troligen låga i proverna, men analysmetodens resultat borde inte anses pålitliga vid så lågt uppmätta halter. En kalprotektinhalt uppmättes till över 3000 µg/g med EliA

Calprotectin, men kunde inte ge ett mera exakt svar än > 3000 µg/g. Jämförelsevis hade EliA Calprotectin 2 ett mätområde på 3,8 – 6000 µg/g och endast ett prov var under 3,8 µg/g. Den högsta kalprotektinhalten som uppmättes var 6770 µg/g.

5.1.2 Likheter och skillnader i den uppmätta kalprotektinhalten

Det fanns en viss skillnad i den uppmätta kalprotektinhalten mellan EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2. Högre kalprotektinhalter uppmättes oftare med EliA Calprotectin 2 än med EliA Calprotectin. Medelvärdet för de uppmätta kalprotektinhalten med EliA Calprotectin var 265 µg/g kalprotektin. Jämförelsevis var medelvärdet för de uppmätta kalprotektinhalten med EliA Calprotectin 2 465 µg/g kalprotektin, vilket visar att överlag har högre kalprotektinhalter uppmätts med EliA Calprotectin 2 för de 67 avföringsproverna.

I Tabell 2 finns de 10 proverna som har minst skillnader i den uppmätta kalprotektinhalten mellan EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2. EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2 har uppmätt liknande resultat både vid lägre och högre kalprotektinhalter. Vid låga halter, under 15 µg/g kalprotektin, uppmätta med EliA Calprotectin var skillnaderna som störst jämfört med den uppmätta kalprotektinhalten med EliA Calprotectin 2 (mera nedan och i Tabell 4).

Vid jämförelse av den uppmätta kalprotektinhalten hos kontrollerna mellan EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2 fanns en liten skillnad. Medelvärdet för kalprotektinhalten för den positiva kontrollen för EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2 var 285 µg/g respektive 216 µg/g. För den negativa kontrollen uppmättes ett medelvärde på kalprotektinhalten för EliA Calprotectin 26 µg/g och 24 µg/g med EliA Calprotectin 2. Det bör påpekas att under det praktiska arbetet utfördes åtta EliA Calprotectin analyser och endast fyra EliA Calprotectin 2 analyser, eftersom prov för EliA Calprotectin 2 samlades under några veckor inför varje analys.

Tabell 2. De 10 proverna med minsta skillnaderna i den uppmätta kalprotektinhalten mellan EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2. Differensen och den procentuella skillnaden är uträknad. Kalprotektinhalten är utplockade från tabellen i Bilaga 1.

Prov nr	EliA µg/g	EliA 2 µg/g	Differens	Procent skillnad
44	20	20	0	0 %
12	329	341	12	4 %
32	69	73	4	6 %
9	443	474	31	7 %
17	217	234	17	8 %
6	823	894	71	9 %
27	83	91	8	10 %
39	41	37	-4	-10 %
43	21	18	-3	-14 %
37	49	58	9	18 %

I Tabell 3 finns 10 prover utplockade från tabellen i Bilaga 1 med största skillnaderna i kalprotektinhalten med EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2 inom mätområdet för EliA Calprotectin (15 – 3000 µg/g). Hos dessa 10 prov i Tabell 3 har den högre kalprotektinhalten uppmätts med EliA Calprotectin 2. Skillnader fanns både vid lägre och högre kalprotektinhalten. Vid de flesta av dessa 10 fall har skillnaderna en klinisk betydelse. Eftersom kalprotektinhalten uppmätta med EliA Calprotectin 2 tyder på tarminflammation medan kalprotektinhalten uppmätta med EliA Calprotectin inte nödvändigtvis tyder på inflammation i tarmen.

Tabell 3. De största skillnaderna i de uppmätta kalprotektinhalten mellan EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2 för halter över 15 µg/g. Differensen och den procentuella skillnaden är uträknad. Kalprotektinhalten är utplockade från tabellen i Bilaga 1.

Prov nr	EliA µg/g	EliA 2 µg/g	Differens	Procent skillnad
26	97	770	673	694 %
35	55	315	260	473 %
42	25	119	94	376 %
24	120	562	442	368 %
40	36	145	109	303 %
4	1180	4491	3311	281 %
21	125	444	319	255 %
7	629	2094	1465	233 %
22	125	394	269	215 %
28	80	242	162	203 %

De största skillnaderna mellan EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2 fanns ändå vid de låga kalprotektinhalterna under 15 µg/g. Prov med uppmätta kalprotektinhalter under 15 µg/g med EliA Calprotectin är enligt tillverkaren inte är pålitliga men i den kliniska resultatrapporteringen svarades ändå låga halter som < 15 µg/g. I Tabell 4 finns de 10 största skillnaderna i kalprotektinhalten av de 67 jämförda avföringsproverna. Den procentuella skillnaden blir stor även om det inte alltid har en klinisk betydelse. Exempelvis är skillnaderna för prov 61, 62, 55 och 57 i Tabell 4 stora, men beror på att den uppmätta kalprotektinhalten med EliA Calprotectin varit mycket lågt.

Tabell 4. De största skillnaderna i de uppmätta kalprotektinhalterna mellan EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2 inberäknat även halter under 15 µg/g. Kalprotektinhalterna uppmätta under 15 µg/g med EliA Calprotectin borde inte tas i beaktande på grund av opålitligheten. Tabellen visar att stora skillnader fanns vid låga uppmätta halter med EliA Calprotectin jämfört med motsvarande uppmätta halt med EliA Calprotectin 2. Endast prov nr 26 och prov nr 35 överlappar från Tabell 2. Differensen och den procentuella skillnaden är uträknad. Kalprotektinhalterna är utplockade från tabellen i Bilaga 1.

Prov nr	EliA µg/g	EliA 2 µg/g	Differens	Procent skillnad
61	2,5	81	78,5	3140 %
62	2,2	56	53,8	2445 %
55	3	68	65	2167 %
57	2,8	61	58,2	2079 %
53	3,7	31	27,3	738 %
26	97	770	673	694 %
58	2,7	19	16,3	604 %
47	11	72	61	555 %
49	7,1	45	37,9	534 %
35	55	315	260	473 %

Orsaken till skillnaden i den uppmätta kalprotektinhalten berodde troligen på den enligt tillverkaren bättre känsligheten hos EliA Calprotectin 2. Mätningarna från undersökningen tyder på att tillverkarens påstående om bättre känslighet hos EliA Calprotectin 2 stämmer. Den bättre känsligheten betyder att ett större utslag erhöles vid detektionen. I och med att EliA Calprotectin hade en övre gräns vid 3000 µg/g blev skillnaderna även tydliga vid de höga kalprotektinhalterna uppmätta med EliA Calprotectin 2, som hade en övre gräns på 6000 µg/g. De höga halterna över 3000 µg/g kunde därmed inte jämföras ordentligt. Skillnaderna i kalprotektinhalterna mellan EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2 kan även bero på den lägre specificiteten hos EliA Calprotectin 2.

5.1.3 Skillnader i frekvensen av uppmätta analyssvar

Spridningen över de uppmätta kalprotektinhalterna var koncentrerade till under 500 µg/g för både EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2. I Bild 6 är frekvenserna utsatta med 50 µg/g intervaller från 0 – 500 µg/g. Inom detta intervall fanns 59 av 67 (88 %) EliA Calprotectin analyssvar och 58 av 67 (87 %) EliA Calprotectin 2 analyssvar. Övriga kalprotektinhalter fanns utspridda upp till 3000 µg/g för EliA Calprotectin och upp till 6770 µg/g för EliA Calprotectin 2. De flesta kalprotektinhalter var uppmätta under 50 µg/g kalprotektin för både EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2. De största skillnaderna i antalet analyssvar per intervall fanns vid 0–50 µg/g och vid 300–350 µg/g. Överlag var antalet prov per intervall, frekvenserna, jämna mellan EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2. I den teoretiska bakgrunden tas upp benämningen gråzonen som innebär kalprotektinhalter mellan 50 – 150 µg/g. I examensarbetets mätningar var 17 av 67 (25 %) prov inom gråzonen med EliA Calprotectin och 15 av 67 (22 %) prov med EliA Calprotectin 2.

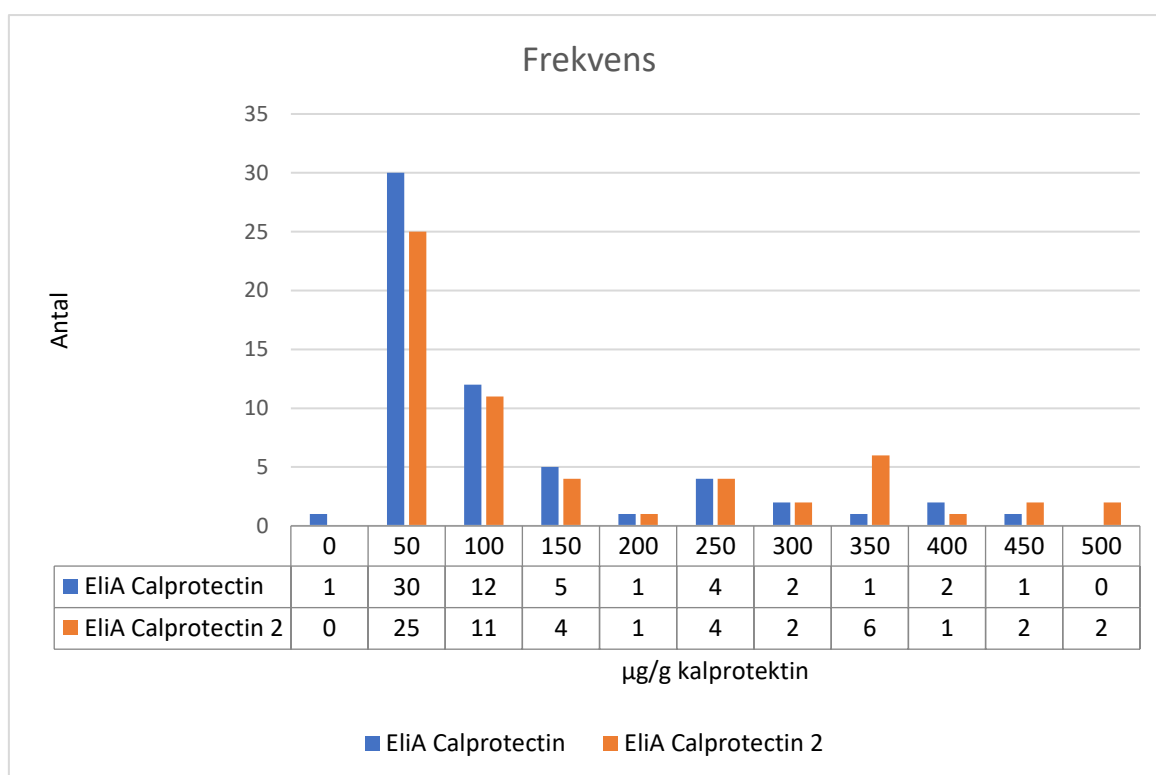


Bild 6. Frekvenserna och spridningen för kalprotektinhalterna för EliA Calprotectin (blå) och EliA Calprotectin 2 (orange). Totalt 59 prov för EliA Calprotectin uppmättes inom 0 – 500 µg/g och 58 prov för EliA Calprotectin 2. Halterna är fördelade med 50 µg/g intervaller.

5.1.4 Känsligheten

Med EliA Calprotectin 2 uppmättes oftare en högre kalprotektinhalt, vilket tyder på att EliA Calprotectin 2 är känsligare än EliA Calprotectin. Att EliA Calprotectin 2 är känsligare betyder att den är bättre att detektera små förändringar i kalprotektinhalten och ger ett större utslag. Detta stämmer överens med tillverkarens egna jämförande undersökningar mellan EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2. Enligt tillverkaren har EliA Calprotectin 2 en känslighet på 98,0 %, medan EliA Calprotectin har en känslighet på 88,9 % för IBD (Thermo Scientific 2014a, s. 3).

Medelvärden för de uppmätta kalprotektinhalten med EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2 var 265 µg/g respektive 465 µg/g, vilket påvisar att EliA Calprotectin 2 överlag har gett ett större utslag under mätningarna. Med beaktande på känsligheten hos EliA Calprotectin 2 kan man från kalprotektinmätningarna anta att låga kalprotektinhalter som uppmättes, exempelvis under 50 µg/g, verkligen innehöll lite kalprotektin. EliA Calprotectin 2 är känsligare för låga kalprotektinhalter och ger således starkare utslag ifall kalprotektin finns i provet. Däremot är specificiteten lägre med EliA Calprotectin 2 och det finns därför en större risk att störande substanser har påverkat och gett falskt höga kalprotektinhalter (mera om specificitet nedan).

I de flesta jämförelser mellan avföringsprovernans kalprotektinhalter uppmättes en högre halt med EliA Calprotectin 2 än med EliA Calprotectin. Det fanns undantag där kalprotektinhalten uppmättes till en högre halt med EliA Calprotectin än med EliA Calprotectin 2. I Tabell 5 finns ett utdrag från tabellen i Bilaga 2 över fall där den uppmätta kalprotektinhalten var lägre med EliA Calprotectin 2 jämfört vid mätningen med EliA Calprotectin. Vid 12 fall av 67 (18 %) fanns denna skillnad. Däremot resulterade det inte i en skillnad angående ifall analysvaret anses som positivt eller negativt, som avgörs vid 100 µg/g. Skillnaderna är speciellt av betydelse med kalprotektinhalter kring referensvärdet 100 µg/g.

Känsligheten påverkar även vid lägre kalprotektinhalter. Känsligheten med EliA Calprotectin 2 är som nämnts bättre än med EliA Calprotectin. Den bättre känsligheten leder till ett större utslag vid förekomsten av kalprotektin. Den bättre känsligheten betyder att man bättre kan lita på att det finns kalprotektin i provet. Låga kalprotektinhalter, kring 50 µg/g, är mera pålitliga med EliA Calprotectin 2 än

med EliA Calprotectin, eftersom starkare utslag troligen fås med EliA Calprotectin 2 även vid mindre mängder kalprotektin.

Tabell 5. Skillnader i kalprotektinhalten när EliA Calprotectin 2 uppmätt en lägre halt än EliA Calprotectin. Den gröna färgen indikerar att resultatet är positivt eller negativt hos både EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2 (jämför Tabell 7 och tabellen i Bilaga 2). Utplockade analysvar från tabellen i Bilaga 2.

	EliA µg/g	EliA 2 µg/g	
Positiv	>3000	1279	Positiv
Positiv	516	339	Positiv
Positiv	373	291	Positiv
Positiv	363	223	Positiv
Positiv	272	215	Positiv
Negativ	99	52	Negativ
Negativ	69	24	Negativ
Negativ	56	34	Negativ
Negativ	54	29	Negativ
Negativ	49	17	Negativ
Negativ	41	37	Negativ
Negativ	21	18	Negativ

5.1.5 Specificiteten

Det är svårare att bedöma och analysera specificiteten från denna undersökning och därför har ingen djupare tolkning gjorts. Specificiteten för IBD är enligt tillverkaren något lägre hos EliA Calprotectin 2 på 75,9 % jämfört med EliA Calprotectins specificitet på 79,5 % (Thermo Scientific 2014a, s. 3). Specificiteten kan bedömas i samband med känsligheten och referensvärdet. Den lägre specificiteten hos EliA Calprotectin 2 betyder att det förekommer flera falska positiva svar jämfört med EliA Calprotectin. Från resultatet från examensarbetet var 24 av 67 positiva (35,8 %) med EliA Calprotectin och 43 av 67 negativa (64,2 %) (Tabell 6). Med EliA Calprotectin 2 var 31 av 67 positiva (46,3 %) och 36 av 67 negativa (53,7 %). Examensarbetets undersökning visade att flera prov var positiva med EliA Calprotectin 2 och stämmer överens med tillverkarens resultat, men det kan även betyda att det förekom falska positiva.

Den procentuella skillnaden i specificitet, enligt tillverkaren, mellan EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2 är liten, under 5 %. Det bör ändå tas i beaktande att risken är högre att kalprotektinhalter, precis över 100 µg/g, uppmätta med EliA Calprotectin 2 kan vara falska positiva. Den lägre specificiteten med EliA Calprotectin 2 kan betyda att andra substanser än kalprotektin har påverkat och möjligen resulterat i en falskt hög kalprotektinhalt.

Tabell 6. Antalet och andelen positiva och negativa analysvar uppmätta med EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2. Totalt analyserades 67 avföringsprov.

	EliA Calprotectin		EliA Calprotectin 2	
	Positiv	Negativ	Positiv	Negativ
Antal	24	43	31	36
Procent	35,8 %	64,2 %	46,3 %	53,7 %

5.1.6 Referensvärdet

Referensvärdet som används är att halten kalprotektin i avföring ska vara under 100 µg/g (Väisänen 2015; Katajamäki & Havana 2016; Anttonen 2017). Phadia 250 analysatorn hade jämförelsevis ett referensvärde på 50 µg/g. Referensvärdet påverkar känsligheten och specificiteten. Flera prov uppmättes till över 100 µg/g kalprotektin med EliA Calprotectin 2 än med EliA Calprotectin. Andelen positiva resultat med EliA Calprotectin 2 var större, 46,3 %, jämfört med EliA Calprotectin, 35,8 % (Tabell 6). Ifall referensvärdet var 50 µg/g skulle känsligheten bli bättre samtidigt som specificiteten skulle bli lägre, dvs. flera falska positiva resultat.

I Bild 7 är referensvärdet markerat och skillnaden i spridningen (logaritmisk skala) hos kalprotektinhalterna mellan EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2 kan ses. En skiftning uppåt av halterna kan ses i diagrammet för EliA Calprotectin 2 jämfört med EliA Calprotectin i Bild 7. Det vill säga att kalprotektinhalterna uppmätta med EliA Calprotectin 2 överlag var högre jämfört med EliA Calprotectin.

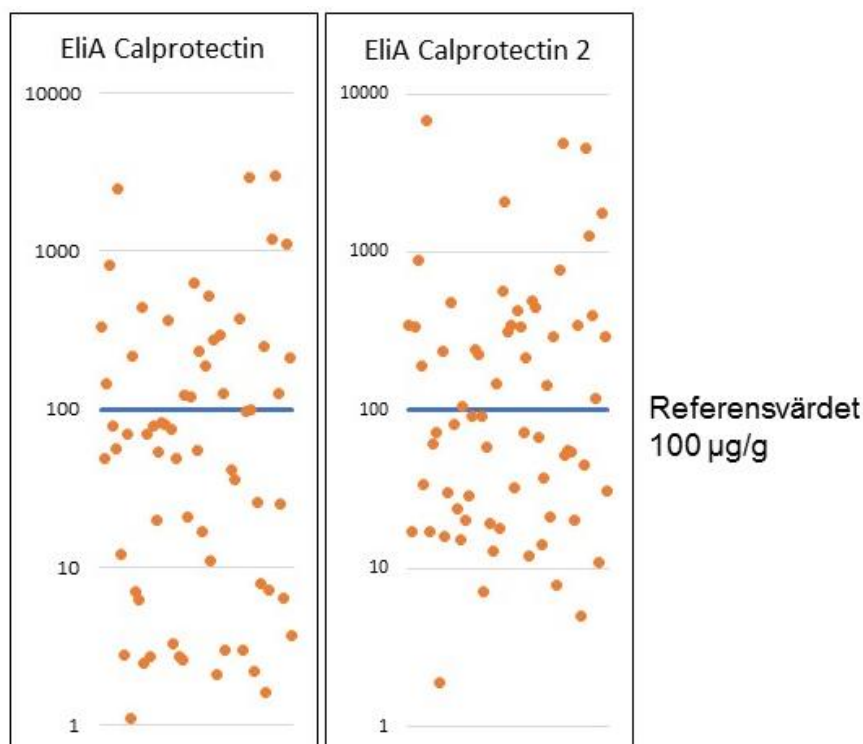


Bild 7. Jämförelse på spridningen av kalprotektinhalterna över och under referensvärdet på 100 µg/g mellan EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2. Y-axeln är i logaritmisk skala för att förtydliga spridningen av punkterna.

5.2 Skillnader i positiva och negativa analys svar

Ett analyserat prov svarades med det numeriska värde som angav kalprotektinhalten i avföringsprovet. Därefter bedömdes svaret som positivt eller negativt beroende på om det var över eller under referensvärdet 100 µg/g. Det betyder att kalprotektinhalter under 100 µg/g är negativa och tyder inte på inflammation, medan kalprotektinhalter över 100 µg/g tyder på inflammation i mag-tarmkanalen. De fall som i denna undersökning hade skillnader i positiva och negativa analys svar finns uppräknade i Tabell 7, som är ett utdrag från tabellen i Bilaga 2.

I 7 fall skulle analysresultatet av patientprovet gett ett avvikande provsvar ifall EliA Calprotectin 2 hade använts. I dessa 7 fall gav EliA Calprotectin ett negativt resultat, dvs. kalprotektinhalten var under 100 µg/g, medan ifall EliA Calprotectin 2 hade använts skulle patientens resultat angetts som positiv, över 100 µg/g. Orsaken till den högre kalprotektinhalten med EliA Calprotectin 2 är troligen den bättre känsligheten. Det förekom inte fall där EliA Calprotectin gav ett positivt resultat och

EliA Calprotectin 2 gav ett negativt resultat. Det fanns dock ett fall där EliA Calprotectin gav en kalprotektinhalt på 99 µg/g och EliA Calprotectin 2 gav en halt på 52 µg/g (Tabell 7). Detta fall är mycket nära en omvänd situation med positivt EliA Calprotectin och negativt med EliA Calprotectin 2.

Tabell 7. Utdrag från tabellen i Bilaga 2 som visar skillnader mellan EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2 vid svarsgivningen positiv eller negativ (indikerat med röd färg). Det förekom 7 fall där resultatet gavs som negativ med EliA Calprotectin och skulle ha svarats positiv med EliA Calprotectin 2. Grön färg indikerar att resultatet är positivt eller negativt hos både EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2. Röd färg indikerar att det positiva eller negativa resultatet skiljde sig mellan EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2.

	EliA µg/g	EliA 2 µg/g	
Negativ	99	52	Negativ
Negativ	97	770	Positiv
Negativ	83	91	Negativ
Negativ	80	242	Positiv
Negativ	79	192	Positiv
Negativ	78	106	Positiv
Negativ	75	91	Negativ
Negativ	69	73	Negativ
Negativ	69	24	Negativ
Negativ	56	34	Negativ
Negativ	55	315	Positiv
Negativ	54	29	Negativ
Negativ	49	17	Negativ
Negativ	49	58	Negativ
Negativ	41	37	Negativ
Negativ	36	145	Positiv
Negativ	26	54	Negativ
Negativ	25	119	Positiv

5.3 Precisionstestet – repeterbarhetstest

Resultatet från precisionstestet för EliA Calprotectin 2 visade att halterna av kalprotektin i proverna var relativt stabila med några undantag (Tabell 8). Prov 2 är inte pålitlig i och med att halterna i fyra av de fem upprepningarna var under den pålitliga detektionsgränsen på 3,8 µg/g. Precisionstestet visade även att mätningarna var stabila både vid låga halter och vid halter kring referensvärdet 100

$\mu\text{g/g}$. Prov 3 skulle, beroende på mätningen, gett ett negativt eller positivt provsvar, eftersom halten mättes både över och under $100 \mu\text{g/g}$. Vid högre halter, som i prov 5, varierade halterna mellan mätningarna mera än vid lägre halter. Däremot var alla resultat för prov 5 över referensvärdet och skulle därmed givit positivt resultat.

Tabell 8. Kalprotektinmätningarna från precisionstestet med EliA Calprotectin 2. Medelvärdet, standardavvikelse, SD, variationskoefficienten, CV, och medelvärdets medelfel, SEM, för de fem proverna i precisionstestet.

Prov	Prov 1 $\mu\text{g/g}$	Prov 2 $\mu\text{g/g}$	Prov 3 $\mu\text{g/g}$	Prov 4 $\mu\text{g/g}$	Prov 5 $\mu\text{g/g}$
Upprepning					
1	7,1	2,0	94	12	139
2	6,1	2,3	110	13	162
3	7,6	2,6	108	14	138
4	8,2	3,0	99	8,3	143
5	20	4,7	100	16	165
Medelvärde	9,8	2,9	102,2	12,7	149,4
SD	5,1	1,0	5,9	2,5	11,7
CV %	52,0	34,5	5,8	19,7	7,8
SEM	2,3	0,4	2,6	1,1	5,2

Värdet på standardavvikelsen, variationskoefficienten och medelvärdets medelfel borde vara när noll för att ange ett bra resultat. Ett mindre värde innebär att mätningarna är mera lika och skiljer sig inte nämnvärt från varandra. Standardavvikelsen är minst för prov 2 ($\text{SD} \pm 1,0 \mu\text{g/g}$) och prov 4 ($\text{SD} \pm 2,5 \mu\text{g/g}$) (Tabell 8). Standardavvikelsen var sämre för prov 1 ($\text{SD} \pm 5,1 \mu\text{g/g}$) i och med den avvikande mätningen på $20 \mu\text{g/g}$ medan övriga är kring $6 - 8 \mu\text{g/g}$. Standardavvikelsen för prov 5 är störst ($\pm 11,7 \mu\text{g/g}$) och kan bero på att mätningarna kan variera mera vid högre halter. Upprepningarna för prov 5 var alla kalprotektinhalter över referensvärdet på $100 \mu\text{g/g}$, vilket har störst betydelse för patientvården. Prov 3 hade $\text{SD} \pm 5,9 \mu\text{g/g}$ och i och med att medelvärdet var $102,2 \mu\text{g/g}$ kan skillnaderna i mätningen betyda ett positivt eller negativt analys svar.

Ifall kalprotektinhalten på $20 \mu\text{g/g}$ för prov 1 utesluts hade medelvärdet, standardavvikelsen, variationskoefficienten och medelvärdets medelfel blivit annorlunda. Medelvärdet skulle då vara $7,3 \mu\text{g/g}$, $\text{SD} \pm 0,8$, CV 11 % och SEM 0,4. Jämfört med resultatet i Tabell 8 är dessa värden bättre.

Variationskoefficienten för prov 1, prov 2 och prov 4 var höga på 52,0 %, 34,5 % respektive 19,7 % jämfört med prov 3 och prov 5 på 5,8 % respektive 7,8 %. Spridningen på mätningarna för prov 3 och prov 5 är relativt lika enligt variationskoefficienten. Överlag skiljer sig variationskoefficienten på de andra proverna och är mera olika varandra än prov 3 och prov 5. Jämförelsevis hade tillverkaren uppnått ett CV värde på 2,5 % (Thermo Scientific 2015a, s. 4), vilket är betydligt bättre än resultatet från detta precisionstest. Tillverkaren hade dock utfört 21 körningar med test-proverna under sju dagar och på tre olika apparater (Thermo Scientific 2015a, s. 4). Medelvärdets medelfel är lägst för prov 2 på 0,4 och högst för prov 5 på 5,2.

Prov 2 har uppmätta kalprotektinhalter som är under detektionsgränsen på 3,8 µg/g och medelvärdet är 2,9 µg/g, vilket betyder att mätningen inte är pålitliga. Även om halterna är låga för prov 2 är de stabila och har minst standardavvikelse och medelvärdets medelfel är lägst. Prov 1 och prov 4 har också låga kalprotektinhalter med medelvärde på 9,8 µg/g respektive 12,7 µg/g. Prov 1 och 4 hade även lägre standardavvikelse och lägre medelvärdets medelfel. Variationskoefficienten var dock högre hos dessa prov. Prov 3 och prov 5 hade sämre standardavvikelse och medelvärdets medelfel, men bättre variationskoefficient jämfört med prov 1, 2 och 4. Prov 3 och 5 skiljer sig från de andra proverna att kalprotektinhalten var högre, prov 3 och prov 5 hade medelvärde på 102,2 µg/g respektive 149,4 µg/g.

6 Diskussion och kritisk granskning

Målet med lärdomsprovet var att efter att arbetet var slutfört kunna ta i bruk den nyare EliA Calprotectin 2 efter EliA Calprotectin. Det praktiska arbetet i lärdomsprovet var att jämföra kalprotektinhalterna mellan EliA Calprotectin och den ersättande EliA Calprotectin 2. Skillnaderna mellan EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2 var att vissa reagens var annorlunda, medan själva metoden, EliA, var samma. Reagenserna som skiljde sig mellan EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2 var extraktionsbufferten för tillredningen av avföringsprovet (EliA Stool Extraction kit 2), konjugatet, reaktionsbrunnarna som innehöll antikroppar mot kalprotektin samt kalibrerings- och kurvkontrollstripen. Övriga reagens användes för både EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2. Patientproverna som användes kom från en heterogen grupp med prover från barn och vuxna samt troligen från både IBD-patienter och icke-IBD-sjuka personer.

6.1 Preanalytiska faktorerers inverkan på jämförelsen

Resultaten tyder på att EliA Calprotectin 2 är känsligare än EliA Calprotectin i och med att högre kalprotektinhalter oftare uppmättes med EliA Calprotectin 2. Däremot var det svårt att fullständigt jämföra EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2, eftersom det fanns flera faktorer som skilde mellan EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2. En del av reagensen, till exempel reaktionsbrunnar och konjugat, var specifika för EliA Calprotectin eller EliA Calprotectin 2. Tillverkaren anger dock inte om eller hur de uppdaterade EliA Calprotectin 2 reagensen skiljer sig från motsvarande reagens för EliA Calprotectin (Thermo Scientific 2015a, s. 1; Thermo Scientific 2015b, s. 1).

För spädningen av avföringsproverna med EliA Stool Extraction kit och EliA Stool Extraction kit 2 skiljde sig extraktionsbuffertens volym i rören på 750 µl respektive 1,3 ml (Bild 3A). Avföringsproverna för EliA Calprotectin 2 späddes mera än proverna för EliA Calprotectin, eftersom det fanns en större mängd extraktionsbuffert i EliA Stool Extraction kit 2-röret än i EliA Stool Extracion kit-röret. Därtill hade en uppdatering gjorts för Phadia 250 analysatorns spädning av EliA Calprotectin 2 proverna. För EliA Calprotectin 2 späddes avföringsproverna 1:200

jämfört med 1:100 för EliA Calprotectin i Phadia 250 analysatorn (Tabell 1). EliA Calprotectin 2 proverna spädades mera än EliA Calprotectin proverna och resulterade ändå i högre kalprotektinhalter. Detta förstärker ytterligare resultatet att känsligheten hos EliA Calprotectin 2 sannolikt var bättre än med EliA Calprotectin.

En annan skillnad mellan EliA Stool Extraction kit och EliA Stool Extraction 2 extraktionsbuffertarna var att den senare innehåller BSA, men tillverkaren anger inte BSA-halten i EliA Stool Extraction kit 2. BSA används t.ex. vid ELISA-metoden, eller här för EliA-metoden, för att förhindra att andra substanser än den undersökta substansen ska fästa i reaktionsbrunnen. För att försäkra sig om en högre specificitet och minska på störande signaler används BSA som blockerare (Xiao & Isaacs 2013, s. 1).

BSA fäster till reaktionsbrunnen och förhindrade att andra antigen fäste till reaktionsbrunnen. BSA störde inte fästandet mellan kalprotektinantikroppen i reaktionsbrunnen och kalprotektin från avföringsspädningen. Enzymkonjugerade detektionsantikroppar fäste endast till kalprotektin och inte till BSA, vilket betyder att BSA inte heller störde i detta steg eller ledde till falska signaler. Vid pipetteringen av avföringsspädningen i analysatorn till reaktionsbrunnen spädades provet och troligen kommer endast en liten mängd BSA med. I och med att BSA fanns i extraktionsbufferten från EliA Stool Extraction kit 2 kunde det leda till något högre specificitet hos EliA Calprotectin 2 jämfört med EliA Calprotectin. Däremot är specificiteten högre hos EliA Calprotectin enligt tillverkaren och avsaknaden av BSA i EliA Stool Extraction kit var troligen inte den avgörande faktorn. Det är svårt att avgöra den verkliga nyttan av BSA.

Hållbarheten för avföringsspädningar med EliA Stool Extraction kit var sämre än för EliA Stool Extraction kit 2. Tillverkaren rekommenderade att man inte förvarade avföringsspädningarna med EliA Stool Extraction kit mer än 24 timmar kylskåp. Under det praktiska arbetet i laboratoriet gjordes avföringsspädningarna under eftermiddagen dagen innan kalprotektinanalysen, vilket betydde att avföringsspädningarna vanligtvis förvarades i kylskåp kring 18–20 timmar innan analysen. Det skulle ha varit bättre att tillreda spädningarna samma dag som analysen, men tidsbrist har lett till att man har denna rutin.

Med EliA Stool Extraction kit 2 är detta inte ett problem eftersom den har en bättre hållbarhet och kan förvaras i kylskåp upp till sju dagar. I och med den sämre

hållbarheten med EliA Stool Extraction kit kan det ha påverkat och det är möjligt att lägre kalprotektinhalter har uppmätts med EliA Calprotectin på grund av detta. I ett lärdomsprov gjord av Pennanen och Tiensuu (2013) från Tammerfors yrkeshögskola undersöktes hållbarheten i olika temperaturförhållanden och under olika långa tidsperioder hos avföringsspädningar med EliA Stool Extraction kit. Deras slutsats var att kalprotektinhalten i avföringsspädningarna minskade något efter 24 timmar i kylskåp, men skillnaden är liten och acceptabel (Pennanen & Tiensuu 2013, s. 42). De påpekade ändå att det vore bäst att analysera proverna så snabbt som möjligt efter spädningen med EliA Stool Extraction kit.

Kalprotektin finns jämnt fördelat i avföringen (Lehmann 2015, s. 28). Därför räcker små avföringsprover från patienterna för kalprotektinanalysen. Det kan dock förekomma skillnader under en dag och från dag till dag i kalprotektinmängderna i avföring hos en patient (Lasson m.fl. 2015, s. 31). Under det praktiska steget vid spädningen av avföringsproverna kom frågor upp kring ifall kalprotektin verkligen fanns jämnt fördelat i avföringen. Enligt instruktionerna samlas avföringen i fårorna i stickan från EliA Stool Extraction kit och EliA Stool Extraction kit 2 (Bild 3). Svårigheter att samla avföringen i fårorna förekom ifall avföringen var mycket hård eller väldigt slemaktig. Dessutom var det svårt att få hård avföring att lossna från fårorna efter inkuberingen. Det har getts kritik mot EliA Stool Extraction kitets avföringsstickor eftersom det är speciellt svårt med lösa avföringsprover att samla den rätta mängden i fårorna och kalprotektinhalten underskattades vid analysen (Oyaert m.fl. 2014, s. 395; Kittanakom m.fl. 2017, s. 7).

Ibland fanns matrester med i avföringen och även om man försökte undvika att få med matrester i stickan var det svårt att veta med säkerhet. I och med att de jämförande avföringsproverna spädades med två olika spädningsskit kan man inte med säkerhet veta att den avföring som samlades med avföringsstickorna innehöll samma mängd kalprotektin även om kalprotektin borde vara jämnt fördelat i avföringen. Denna potentiellt störande faktorn skulle ha undvikits ifall det hade varit möjligt att använda samma avföringsspädning för både EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2 analyserna.

6.2 Finns det behov av olika referensvärden för kalprotektin?

Referensvärdet som används i Finland för kalprotektin är att kalprotektinhalten i avföring ska vara under 100 µg/g (Väisänen 2015; Katajamäki & Havana 2016; Anttonen 2017). Jämförelsevis verkar referensvärdet vara under 50 µg/g kalprotektin i Sverige och Norge (Karolinska Universitetslaboratoriet 2017; Akademiska Laboratoriet 2017; Fürst Medicinskt Laboratorium u.å.). Det finns ändå inget internationellt standardiserat eller bestämt referensvärde. Därtill är många resultat inom gråzonen (50 – 150 µg/g), med referensvärdet under 100 µg/g kalprotektin, vilket leder till mera problem för läkaren att bedöma ifall ytterligare undersökningar borde göras för att bekräfta eller utesluta IBD. För prov som uppmäts inom gråzonen kunde ett nytt prov analyseras efter några veckor innan beslut om invasivare undersökningar tas. Respondenten vet inte hur läkarnas riktlinjer är vid bedömningen av kalprotektinresultaten och det finns säkerligen rekommendationer i planeringen av ytterligare undersökningar i oklara fall och den kommande patientvården.

I och med att EliA Calprotectin 2 är känsligare, kunde referensvärdet möjligen höjas något. Ett höjt referensvärde leder till att de falska positiva resultateten minskar, men däremot blir risken större att det förekommer flera falska negativa. Jämförelsevis rekommenderade tillverkaren ett referensvärde på 50 µg/g och man är då garderad mot falska negativa svar, men falska positiva svar förekommer troligen oftare.

Det kunde dessutom finnas olika referensvärden för olika sammanhang. Det kunde finnas ett referensvärde för redan diagnostiserade IBD-patienters sjukdomsuppföljning för att kunna ta i beaktande deras aktivare sjukdomsperioder och remissionsperioder. Ett annat referensvärde kunde bedömas för övriga dvs. friska personer som inte har en IBD diagnos och ta i beaktande skillnader i kalprotektinhalten enligt åldern (D'Angelo m.fl. 2017, s. 294). Det norska Fürst Medicinskt Laboratorium har på deras hemsida om F-Calprotectin uppsatt olika referensområden för uppmätta kalprotektinhalter över 50 µg/g för diagnostisering och kända IBD-patienter. De ger även en tolkning ifall kalprotektinhalten uppmättes till t.ex. 70 µg/g eller 500 µg/g både vid diagnostisering och för IBD-patienter (Fürst Medicinskt Laboratorium u.å.).

För IBD-patienter har det diskuterats ifall kalprotektinreferensvärdet borde vara högre än 100 µg/g för aktivare sjukdomsperioder och det finns förslag på referensvärden på 200 – 250 µg/g (D'Angelo m.fl. 2017, s. 296). Goutorbe m.fl. (2013) rekommenderar för vuxna patienter med Crohns sjukdom ett referensvärde på under 200 µg/g för remissionsperioder och över 400 µg/g för aktivt sjukdomstillstånd, med följden en gråzon på 200 – 400 µg/g (Goutorbe m.fl. 2015, s. 1118). För barnpatienter med IBD har det funnits förslag på att kalprotektinhalter under 250 µg/g indikerar remission och halter över 500 µg/g anger aktivare sjukdomsfas, däremot är kalprotektinhalter på 250 – 500 µg/g i en gråzon för barnpatienterna (Heida m.fl. 2017, s. 1743). Med tanke på dessa forskningar och deras rekommendationer för referensvärden för IBD-patienter förefaller 100 µg/g som enda referensvärde inte tillräckligt för att kunna bedöma kalprotektinhaltens betydelse för alla grupper; friska, personer med annan sjukdom än IBD, IBD-patienter i remission och IBD-patienter med aktiv sjukdom. Däremot kan kalprotektinhalten användas för att utesluta IBS vid högre kalprotektinhalter och IBD vid lägre kalprotektinhalter.

En annan brist som är relaterat till referensvärdet är att det finns flera olika kalprotektinanalyser med olika metoder, men ingen standard för att jämföra kalprotektinanalyssvaret mellan de olika metoderna (Oyaert m.fl. 2017, s. 1572; Whitehead m.fl. 2013, s. 59; Prell m.fl. 2014, s. 5; Kittanakom m.fl. 2017, s. 8). Oyaert m.fl. (2017) jämförde flera olika metoder från olika tillverkare och påpekar att den uppmätta kalprotektinhalten inte kan likställas mellan metoderna (Oyaert m.fl. 2017, s. 1572). Därför är det av intresse att utveckla en standardiserad kalprotektinreferens som olika apparater med olika metoder kan kalibreras mot och därmed förenkla jämförelsen mellan kalprotektinresultaten (Oyaert m.fl. 2017, s. 1572). Det finns en risk att de uppmätta kalprotektinhalterna varierar på grund av olika analysmetoder och inte på grund av t.ex. aktivare sjukdomsfas. Det betyder att det är svårt att jämföra resultatet från olika laboratorier som kan ha olika apparater med olika metoder.

POC-tester, som IBDoc och Prevent ID CalDetect, rekommenderas att användas som sållningstester och är inte lika noggranna som FEIA- eller ELISA-metoder (Heida m.fl. 2017, s. 1742; Puolanne m.fl. 2016, s. 830). Därför finns även ett behov av standardisering för att kunna jämföra IBD-patienternas uppmätta kalprotektinhalter från snabbtesterna med analyser. Ifall användandet av

snabbtester blir vanligare kan bristen att endast ha ett referensvärde på under 100 µg/g kalprotektin bli ännu tydligare, eftersom snabbtesterna inte verkar vara lika noggranna och kan leda till mera varierande resultat.

6.3 Potentiellt ökad risk för falska positiva svar för IBD-patienter

Vid jämförelsen mellan EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2 analys svaren hade några fall ett negativt resultat (under 100 µg/g kalprotektin) med EliA Calprotectin och positivt resultat (över 100 µg/g kalprotektin) med EliA Calprotectin 2 (Tabell 7). Kemisten undersökte några av fallen och det framkom att de flesta hade en tidigare IBD-diagnos. De hade tidigare haft lägre kalprotektinhalter kring 20 – 80 µg/g under remissionperioder och under aktivare sjukdomsperioder kalprotektinhalter på 200 – 1000 µg/g (Kujala, personlig kommunikation, 31 augusti 2017).

Med det nya EliA Calprotectin 2, som är känsligare, kommer IBD-patienternas kalprotektinhalt under remission troligen vara högre än tidigare med EliA Calprotectin. Detta betyder att deras resultat troligen bedöms som positivt oftare än tidigare. Läkarna har informerats om den uppdaterade kalprotektinmetoden, men det finns ändå en risk att patientbehandlingen påverkas i onödan om den nya normalnivån för kalprotektin inte tas i beaktande. Innan implementeringen av EliA Calprotectin 2 kunde det ha varit bra att läkarna hade möjlighet att få parallellsvar för patienterna från både EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2. Från parallellproverna kunde den nya normalnivån för patienten konstaterats.

I Tabell 3 och Tabell 4 finns exempel på stora skillnader i den uppmätta kalprotektinhalten mellan EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2. Skillnaderna kan bero på, förutom känsligheten, även på den lägre specificiteten hos EliA Calprotectin 2. Den lägre specificiteten hos EliA Calprotectin 2 kan möjligen ha påverkats mera av störande substanser som kan finnas i avföringsspädningen. Därför kan det förekomma flera fall av falska positiva resultat med EliA Calprotectin 2. De uppmätta kalprotektinhalterna är ändå pålitliga, men frågan är hur mycket andra substanser stör och hur stor andel de utgör av det detekterade utslaget. Specificiteten hos EliA Calprotectin är lite högre men det utesluter inte att kalprotektinhalterna inte är påverkade av störande substanser.

6.4 Uppmätta kalprotektinhalter utanför mätområdet och frekvensskillnaderna

Mätområdet för EliA Calprotectin var 15 – 3000 µg/g och EliA Calprotectin 2 hade mätområdet 3,8 – 6000 µg/g kalprotektin. Enligt tillverkaren är kalprotektinhalter utanför dessa mätområden inte pålitliga och rekommendationen är att proverna analyseras igen antingen från samma spädning eller genom att tillverka en ny spädning från avföringsprovet. I det praktiska arbetet gjordes inte detta utan patientresultat under 15 µg/g med EliA Calprotectin svarades som < 15 µg/g och inte det exakta numeriska värdet.

En skillnad i frekvensen hos de uppmätta kalprotektinhalterna mellan EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2 fanns inom intervallet 0–50 µg/g (Bild 6), vilket innefattar halter utanför mätområdet. Det måste tas i beaktande att 22 analysvar uppmättes under 15 µg/g med EliA Calprotectin och borde enligt tillverkarens rekommendationer analyseras på nytt. För EliA Calprotectin fanns fler analysvar inom intervallet 0 – 50 µg/g. En lika stor skillnad i frekvenserna fanns vid intervallet 300–350 µg/g där flera analysvar fanns för EliA Calprotectin 2. Skillnaderna i analysvaren vid dessa intervall berodde högst troligen igen på skillnaderna i känsligheten mellan EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2. Den sämre känsligheten hos EliA Calprotectin märks i flera låga kalprotektinhalter uppmätta under 50 µg/g. Den bättre känsligheten hos EliA Calprotectin 2 ledde till att flera analysvar uppmättes över 50 µg/g. Det bidrar till att det finns flera högre uppmätta halter med EliA Calprotectin 2, som t.ex. kring 300 – 350 µg/g. Bild 7 visar även att kalprotektinhalterna överlag är lägre för EliA Calprotectin än EliA Calprotectin 2.

Vid låga halter under 15 µg/g med EliA Calprotectin eller 3,8 µg/g med EliA Calprotectin 2 finns det en risk att för lite provmaterial användes för avföringsspädningen. Det kan bero på avföringskonsistensen om den varit väldigt lös och slemmig, vilket försvårade arbetet med att samla upp avföringen i avföringsstickans fåror från EliA Stool Extraction kit och EliA Stool Extraction kit 2. Ifall avföringen var väldigt hård var det svårt att homogenisera lösningen och det fanns en risk att en del kalprotektin inte kom i EliA Stool Extraction kitets extraktionsbuffert. Hård avföring lossnade ibland inte helt från stickans fåror eller avföringen löstes inte upp och blev i pelleten efter centrifugeringssteget.

6.5 Ytterligare tester som kunde ha utförts för jämförelsen

För valideringen av EliA Calprotectin 2 har kalprotektinhalterna endast jämförts med halterna från analys med EliA Calprotectin. Känsligheten och specificiteten har inte varit möjligt att undersöka tillräckligt utförligt. Slutsatsen att EliA Calprotectin 2 är känsligare har dragits från jämförelser mellan kalprotektinhalterna som uppmättes med EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2. Specificiteten kunde ha kontrollerats genom att mäta prover med en känd kalprotektinhalt, eftersom specificiteten visar hur bra endast den specifika substansen, kalprotektin, mäts. Den positiva kontrollen kunde möjligen ha använts för specificitetsundersökning ifall tillverkaren hade angivit kalprotektinhalten för den positiva kontrollen.

De kalprotektinhalter som uppmättes med den positiva kontrollen för EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2 var relativt lika med medelvärdet 285 µg/g respektive 216 µg/g. Den negativa kontrollens medelvärden var 26 µg/g och 24 µg/g för EliA Calprotectin respektive EliA Calprotectin 2. Den förväntade skillnaden att en högre kalprotektinhalt skulle uppmätas för kontrollerna med EliA Calprotectin 2 uppfylldes inte. En orsak till den mindre skillnaden för kontrollerna mellan EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2 och att en högre kalprotektinhalt för kontrollerna uppmättes med EliA Calprotectin kan bero på provet. Kontrollerna är troligen renare och innehåller inte lika mycket störande substanser som en avföringsspädning. Därför skulle det vara intressant att veta den verkliga kalprotektinhalten i den positiva kontrollen enligt tillverkaren och jämföra med de uppmätta halterna om någon av analysmetoderna var mera exakt. Känsligheten och specificiteten skulle kunna bedömas. Samma kontroller användes för båda analyserna men de hade olika mjukvaruinställningar i Phadia 250 analysatorn (Thermo Scientific 2016, s. 1). Respondenten vet inte hur inställningarna skiljer sig eller om och hur det påverkar mätningen. För specificiteten borde man ha haft uppgifter bl.a. om patienterna verkligen har IBD eller inte har IBD. Därmed kunde andelen falska positiva och falska negativa resultat identifieras.

Precisionstestet, repeterbarhetstestet, som utfördes visade att kalprotektinhalten hölls stabilt. Flera olika halter kunde ha testats vid precisionstestet, t.ex. flera kring 100 µg/g och några vid höga kalprotektinhalter på 3000 – 6000 µg/g. Man kunde ha utfört flera upprepande körningar för precisionstestet t.ex. tio gånger istället för fem och därmed kunde mera pålitliga statistiska resultat erhållits. Med flera repetitioner

kunde avvikande uppmätta halter uteslutits. Precisionstestet utfördes under en dag och man skulle även ha kunnat analysera samma prover inom några dagar för att kontrollera hållbarheten i kylskåp.

Låga kalprotektinhalter som förekom med EliA Calprotectin kunde ha analyserats på nytt eller nya spädningar kunde ha tillretts. För en kontroll av EliA Stool Extraction kit 2 och EliA Calprotectin 2 kunde duplikat av avföringsspädningar från samma avföringsprov tillretts t.ex. från 10 – 20 avföringsprov, för att kontrollera att samma kalprotektinhalter uppmäts.

Flera av EliA Calprotectin 2 avföringsspädningarna frystes efter spädningssteget upp till två veckor innan analystillfället. Ett jämförande test på fryshållbarheten kunde ha utförts genom att analysera EliA Calprotectin 2 proverna innan frysningen och efter upptiningen. Det var däremot inte möjligt eftersom EliA Calprotectin 2 inte fanns inprogrammerat i Phadia 250 i början av det praktiska arbetet av lärdomsprovet. Reproducerbarheten kontrollerades inte, vilket skulle ha inneburit att samma prover analyserades i ett annat laboratorium som använder samma metod.

7 Avslutning

Rutinarbete i ett laboratorium är inte perfekt och det pågår ständigt arbete för att förbättra laboratorieundersökningsprocessen och minska på störande faktorer och preanalytiska fel. Inom den analytiska fasen är validering en viktig process för att minska fel och öka kvaliteten. Målet med lärdomsprovets praktiska arbete var att validera och implementera EliA Calprotectin 2, vilket uppfylldes. EliA Calprotectin och EliA Calprotectin 2 jämfördes och EliA Calprotectin 2 godkändes som pålitlig att ersätta EliA Calprotectin. Det fanns en skillnad i de uppmätta kalprotektinhalterna, som troligen berodde på den något bättre känsligheten hos EliA Calprotectin 2, vilket tillverkaren framhåller.

Flera jämförande tester kunde ha gjorts, som flera repeterbarhetstest med högre kalprotektinhalter för att kontrollera stabiliteten av provet vid höga halter. Den enligt tillverkaren bättre hållbarheten med EliA Stool Extraction kit 2 kunde testas genom att jämföra ifall det förekommer skillnader i kalprotektinhalter om avföringsspädningen förvaras i rumstemperatur i t.ex. två dagar eller i kylskåp i en vecka. Kalprotektinundersökningar från avföring är enkla att utföra och ger bra information om tarminflammationstillstånd. För IBD-patienter används kalprotektinundersökning för sjukdoms- och behandlingsuppföljning. I och med att antalet IBD-patienter ökar kan det i framtiden bli vanligare att IBD-patienter använder sig av POC-tester, som IBDoc, för sjukdomsuppföljningen. Det kan därför bli aktuellt för laboratorier med valideringar mellan kalprotektin-analysatorer och kalprotektin POC-test.

8 Etiska överväganden

Avföringsprov för lärdomsprovets undersökningar togs från patientprov som redan hade undersökts. Inga patientprover togs enbart för examensarbetet. Patientuppgifterna för prov hölls konfidentiella. Samtycke från patienterna behövdes inte. Respondenten vet inte varken personuppgifter eller ifall de patientprov som användes i lärdomsprovet kom från friska personer, personer med annan sjukdom än IBD, nya upptäckta IBD-patienter eller tidigare diagnostiserade IBD-patienter. Respondenten har inte undersökt enskilda resultat och den information som har tagits upp i diskussionen gavs av kemist Diana Kujala. Tillstånd för att utföra undersökningen gavs från Social- och hälsovårdsverket i Jakobstad. En kopia av tillståndet finns i Bilaga 3.

9 Källförteckning

Adams, S.M. & Bornemann, P.H. 2013. Ulcerative colitis. *American Family Physician*. 87(10):699–705.

Akademiska Laboratoriet. 2017. F-Calprotectin. Labhandbok. [Online]: <http://www.labhandbok.se/> [hämtat 2.11.2017].

Altman, D.G. & Bland, J.M. 2005. Standard deviations and standard errors. *BMJ*. 331(7521):903.

Anttonen, M. 2017. Kalprotektiini, ulosteesta. Helsingfors hälso- och sjukvårdsdistrikt, Huslab tutkimusohjekirja. [Online]: <https://huslab.fi/ohjekirja/4871.html> [hämtat 2.11.2017].

Bringsrud Fekjær, S. 2016. Att tolka och förstå statistik. Gleerups Utbildning AB, Malmö.

Caragher, T.E., Lifshitz, M.S. & DeCresce, R. 2017. Chapter 5 – Analysis: Clinical laboratory automation. I: McPherson, R.A. & Pincus, M.R. (red), *Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods*. – 23rd edition. Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri, USA. s. 60-65.

Carlsson, J., Theodorsson, E. & Lindstedt, G. 2012. Kapitel 13 - Digestionsorganens sjukdomar. I: Nilsson-Ehle, P., Berggren Söderlund, M. & Theodorsson, E. (red), *Laurells Kliniska kemi i praktisk medicin*. Lund: Studentlitteratur, s. 443–495.

Crohn ja Colitis ry. 2017. IBD- tulehdukselliset suolistosairaudet. [Online]: <https://crohnjacolitis.fi/tietoa-sairauksista/> [hämtat 21.9.2017].

D'Angelo, F., Felley, C. & Frossard, J.L. 2017. Calprotectin in daily practice: Where do we stand in 2017? *Digestion*. 95(4):293–301.

D'Inca, R., Dal Pont, E., Di Leo, V., Ferronato, A., Fries, W., Vettorato, M.G., Martines, D. & Sturniolo, G.C. 2007. Calprotectin and lactoferrin in the assessment of intestinal inflammation and organic disease. *International Journal of Colorectal Disease*. 22(4):429–437.

Decembrino, L., De Amici, M., Pozzi, M., De Silvestri, A. & Stronati, M. 2015. Serum calprotectin: A potential biomarker for neonatal sepsis. *Journal of Immunology Research*. 147973(2015):1–4.

Ehder, T (red). 2005. *Kemian metrologian opas*. Metrologian neuvottelukunta. Mikes J6/2005. Helsingfors.

Ejlertsson, G. 2003. *Statistik för hälsovetenskaperna*. Studentlitteratur, Lund.

Fürst Medicinskt Laboratorium. u.å. F-Calprotectin. [Online]: <http://www.furstlab.se/analys-och-diagnostik/analyser/calprotectin/> [hämtat 2.11.2017].

Goutorbe, F., Goutte, M., Minet-Quinard, R., Boucher, A-L., Pereira, B., Bommelaer, G. & Buisson, A. 2015. Endoscopic factors influencing fecal calprotectin value in Crohn's disease. *Journal of Crohns and Colitis*. 9(12):1113–1119.

Grundmann, O. & Yoon, S.L. 2010. Irritable bowel syndrome: Epidemiology, diagnosis, and treatment: An update for health-care practitioners. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 25(4):691–699.

Hare, N.C., Kennedy, N.A., Kingstone, K., Arnott, I.D., Shand, A.G., Palmer, K.R., Penman, I.D., Lees, C.W. & Satsangi, J. 2013. PTH-082 Serum calprotectin: A novel biomarker to predict outcome in acute severe ulcerative colitis? *Gut*. 62:244–245.

Heida, A., Knol, M., Kobold, A.M., Bootsman, J., Dijkstra, G. & van Rheenen, P.F. 2017. Agreement between home-based measurement of stool calprotectin and ELISA results for monitoring inflammatory bowel disease activity. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 15:1742–1749.

Hiltunen, E., Linko, L., Hemminki, S., Hägg, M., Järvenpää, E., Saarinen, P., Simonen, S. & Kärhä, P. 2011. *Laadukkaan mittaamisen perusteet*. Metrologian neuvottelukunta. Mikes J4/2011. Esbo.

Hägg, M (red). 2016. *Validoinnin suunnittelun opas*. Metrologian neuvottelukunta. VTT Technology 276. Esbo.

IBDoc. U.å. About IBDoc®. [Online]: <http://www.ibdoc.net/about-ibdoc/?lang=en> [hämtat 18.9.2017].

Inciarte-Mundo, J., Hernández, M.V., Ruiz-Esquide, V., Cabrera-Villalba, S.R., Ramirez, J., Cuervo, A., Pascal, M., Yagüe, J., Canete, J.D. & Sanmarti, R. 2016. Serum calprotectin versus acute-phase reactants in the discrimination of inflammatory disease activity in rheumatoid arthritis patients receiving tumor necrosis factor inhibitors. *Arthritis Care & Research*. 68(7):899–906.

Joshi, S., Lewis, S.J., Creanor, S. & Ayling, R.M. 2010. Age-related faecal calprotectin, lactoferrin and tumour M2-PK concentrations in healthy volunteers. *Annals of Clinical Biochemistry*. 47(3):259–263.

Jussila, A. 2014. Inflammatory bowel disease in Finland; epidemiology, malignancies and mortality. Doktorsavhandling vid medicinska fakulteten vid Helsingfors universitet. Unigrafia, Helsingfors.

Karolinska Universitetslaboratoriet. 2017. Kalprotektin, F-. Provtagningsanvisningar. [Online]: <https://karolinska.se/KUL/Alla-anvisningar/Anvisning/9028> [hämtat 2.11.2017].

Katajamäki, A. & Havana, M. 2016. Kalprotektiini, ulosteesta. Yhtyneet medix laboratoriot, laboratorioskäsiökirja. [Online]: http://www.yml.fi/tuotekuvaus_show.php?tuotenro=604 [hämtat 2.11.2017].

Kaukoranta, S-S. 2013. S-Saccharomyces cerevisiae, vasta-aineet (4880 S-ASCA). Vasa centralsjukhus laboratoriehandbok. [Online]: <http://www.vshp.fi/medserv/klkemi/fi/ohjekirja/4880.htm> [hämtat 4.9.2017].

Kittanakom, S., Shajib, M. S., Garvie, K., Turner, J., Brooks, D., Odeh, S., Issenman, R., Chetty, V.T., Macri, J. & Khan, W.I. 2017. Comparison of fecal calprotectin methods for predicting relapse of pediatric inflammatory bowel disease. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 1450970(2017):1–10.

Koivunen, M.E. & Krogsrud, R.L. 2006. Principles of immunochemical techniques used in clinical laboratories. *Laboratory Medicine*. 37(8):490–497.

Korndörfer, I.P., Brueckner, F. & Skerra, A. 2007. The crystal structure of the human (S100A8/S100A9)₂ heterotetramer, calprotectin, illustrates how conformational changes of interacting alpha-helices can determine specific associations of two EF-hand proteins. *Journal of Molecular Biology*. 370(5):887–898.

Kujala, D; kemist vid Social- och hälsovårdsverkets kliniska laboratorium i Jakobstad. 2017. Personlig kommunikation. 31 augusti.

Lasson, A., Stotzer, P-O., Öhman, L., Isaksson, S., Sapnara, M. & Strid, H. 2015. The intra-individual variability of faecal calprotectin: a prospective study in patients with active ulcerative colitis. *Journal of Crohn's and Colitis*. 9(1):26–32.

Lehmann, F.S., Burri, E. & Beglinger, C. 2015. The role and utility of faecal markers in inflammatory bowel disease. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*. 8(1):23-36.

Lobatón, T., Rodriguez-Moranta, F., Lopez, A., Sánchez, E., Rodriguez-Alonso, L. & Guardiola, J. 2013. A new rapid quantitative test for fecal calprotectin predicts endoscopic activity in ulcerative colitis. *Inflammatory Bowel Diseases*. 19(5):1034-1042.

McCann, R.K., Smith, K. & Gaya, D.R. 2017. A prospective single centre pilot evaluation of a serum calprotectin assay in unselected GI patients. *Clinical Biochemistry*. 50(9):533-536.

Meuwis, M.A., Vernier-Massouille, G., Grimaud, J.C., Bouhnik, Y., Laharie, D., Piver, E., Seidel, L., Colombel, J.F. & Louis, E. 2013. Serum calprotectin as a biomarker for Crohn's disease. *Journal of Crohn's and Colitis*. 7(12):678-683.

Nilsen, T., Sunde, K. & Larsson, A. 2015. A new turbidimetric immunoassay for serum calprotectin for fully automatized clinical analysers. *Journal of Inflammation*. 12(45):1–8.

Nykopp, J. 2015. Tulehduskelliset suolistosairaudet (IBD) ja niiden hoito. Potilaan lääkirilehti. [Online]: <http://www.potilaanlaakarilehti.fi/uutiset/tulehduskelliset-suolistosairaudet-ibd-ja-niiden-hoito/> [hämtat 20.9.2017].

Oyaert, M., Trouvé, C., Baert, F., De Smet, D., Langlois, M. & Vanpoucke, H. 2014. Comparison of two immunoassays for measurement of faecal calprotectin in detection of inflammatory bowel disease: (pre)-analytical and diagnostic performance characteristics. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 52(3):391-397.

Oyaert, M., Boel, A., Jacobs, J., Van den Bremt, S., De Sloovere, M., Vanpoucke, H. & Van Hoovels, L. 2017. Analytical performance and diagnostic accuracy of six different faecal calprotectin assays in inflammatory bowel disease. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 55(10):1564-1573.

Pedersen, L., Nybo, M., Poulsen, M.K., Henriksen, J.E., Dahl, J. & Rasmussen, L.M. 2014. Plasma calprotectin and its associations with cardiovascular disease manifestations, obesity and the metabolic syndrome in type 2 diabetes mellitus patients. *BMC Cardiovascular Disorders*. 14(196):1–8.

Pennanen, E. & Tiensuu, S. 2013. Kalprotektiini – ulostenäytteen esikäsittelyn koestus Fimlab Laboratoriot Oy:ssä. Opinnäytetyö, Bioanalytiikan koulutusohjelma. Tampereen ammattikorkeakoulu. Tammerfors. [Online]: <http://urn.fi/URN:NBN:fi:amk-2013112117671> [hämtat 16.9.2017].

Pepper, R.J, Hamour, S., Chavele, K.M., Todd, S.K., Rasmussen, N., Flint, S., Lyons, P.A., Smith, K.G., Pusey, C.D., Cook, H.T. & Salama, A.D. 2013. Leukocyte and serum S100A8/S100A9 expression reflects disease activity in ANCA-associated vasculitis and glomerulonephritis. *Kidney International*. 83(6):1150-1158.

Plebani, M. 2012. Quality indicators to detect pre-analytical errors in laboratory testing. *The Clinical Biochemist Reviews*. 33(3):85-88.

Plebani, M., Sciacovelli, L., Aita, A. & Chiozza, M.L. 2014. Harmonization of pre-analytical quality indicators. *Biochimica Medica*. 24(1):105-113.

Prell, C., Nagel, D., Freudenberg, F., Schwarzer, A. & Koletzko. 2014. Comparison of three test for faecal calprotectin in children and young adults: A retrospective monocentric study. *BMJ Open*. 4(5):1-7.

Puolanne, A.M., Kolho, K.L., Alfthan, H., Ristimäki, A., Mustonen, H. & Färkkilä, M. 2016. Rapid faecal tests for detecting disease activity in colonic inflammatory bowel disease. *European Journal of Clinical Investigation*. 46(10):825-832.

Schellekens, D.H., Hulsewé, K.W., van Acker, B.A., van Bijnen, A.A., de Jaegere, T.M., Sastrowijoto, S.H., Buurman, W.A. & Derikx, J.P. 2013. Evaluation of the diagnostic accuracy of plasma markers for early diagnosis in patients suspected for acute appendicitis. *Society for Academic Emergency Medicine*. 20(7):703-710.

Sedaghat, F. & Notopoulos, A. 2008. S100 protein family and its application in clinical practice. *Hippokratia* 12(4):198-204.

Sipponen, T., Kärkkäinen, P., Savilahti, E., Kolho, K.L., Nuutinen, H., Turunen, U. & Färkkilä, M. 2008. Correlation of faecal calprotectin and lactoferrin with an endoscopic score for Crohn's disease and histological findings. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 28(10):1221-1229.

Sipponen, T. & Kolho, K.L. 2011. Ulosteen kalprotektiinipitoisuus tulehduksellisissa suolistosairauksissa. *Duodecim*. 127(24):2631-2637.

Sipponen, T. 2015. Haavainen paksusuolitulehdus (colitis ulcerosa). *Duodecim*. 131(8):801-802.

Sipponen, T. 2017. Crohnin tauti. *Duodecim*. 133(1):113-116.

Terrin, G., Passariello, A., Manguso, F., Salvia, G., Rapacciuolo, L., Messina, F., Raimondi, F. & Canani, R.B. 2011. Serum calprotectin: An antimicrobial peptide as a new marker for the diagnosis of sepsis in very low birth weight newborns. *Clinical and Developmental Immunology*. 291085(2011):1-6.

Theodorsson, E., Grankvist, K. & Nilsson-Ehle, P. 2012. Kapitel 2 – Tolkning av analysresultat. I: Nilsson-Ehle, P., Berggren Söderlund, M. & Theodorsson, E. (red), *Laurells Kliniska kemi i praktisk medicin*. Lund: Studentlitteratur, s. 25–51.

Thermo Scientific. 2012a. Phadia 250 User Manual version 1.4. Thermo Fisher Scientific Inc.

Thermo Scientific. 2012b. How to prepare an EliA™ Calprotectin stool test - Stool extraction in six quick and easy steps. Thermo Fisher Scientific Inc.

Thermo Scientific. 2014a. EliA Calprotectin 2 – Rule out inflammatory bowel diseases safely and efficiently. Thermo Fisher Scientific Inc.

Thermo Scientific. 2014b. How to prepare an EliA™ Calprotectin 2 stool test - Stool extraction in six quick and easy steps. Thermo Fisher Scientific Inc.

Thermo Scientific. 2015a. EliA Calprotectin 2 Fluoroenzymeimmunoassay for calprotectin determination for in vitro diagnostic use – Directions for use. Thermo Fisher Scientific Inc.

Thermo Scientific. 2015b. EliA Calprotectin Fluoroenzymeimmunoassay for calprotectin determination for in vitro diagnostic use – Directions for use. Thermo Fisher Scientific Inc.

Thermo Scientific. 2016. EliA Calprotectin positive control 250 for in vitro diagnostic use – Directions for use. Thermo Fisher Scientific Inc.

Thermo Scientific. U.å. Phadia 250 snabbinstruktionsbok. Thermo Fisher Scientific Inc.

Tibble, J., Teahon, K., Thjodleifsson, B., Roseth, A., Sigthorsson, G., Bridger, S., Foster, R., Sherwood, R., Fagerhol, M. & Bjarnason, I. 2000a. A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease. *Gut*. 47(4):506-513.

Tibble, J.A., Sigthorsson, G., Bridger, S., Fagerhol, M.K. & Bjarnason, I. 2000b. Surrogate markers of intestinal inflammation are predictive of relapse in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 119(1):15-22.

Ullman, T.A. & Itzkowitz, S.H. 2011. Intestinal inflammation and cancer. *Gastroenterology*. 140(6):1807–1816.

Vermeire, S., Van Assche, G. & Rutgeerts, P. 2006. Laboratory markers in IBD: Useful, magic, or unnecessary toys? *Gut*. 55(3):426-431.

Vermeulen, N., Bossuyt, X., Rutgeerts, P. & Vermeire, S. 2012. Inflammatory bowel disease. *ImmunoDiagnostics*. 1:3-5.

von Roon, A.C., Karamountzos, L., Purkayastha, S., Reese, G.E., Darzi, A.W., Teare, J.P., Paraskeva, P. & Tekkis, P.P. 2007. Diagnostic precision of fecal calprotectin for inflammatory bowel disease and colorectal malignancy. *American Journal of Gastroenterology*. 102(4):803 – 813.

Väisänen, M. 2015. F-Kalprotektiini, ulosteesta (4803 F-Calpro). Vasa centralsjukhus, laboratoriehandbok. [Online]: <http://www.vshp.fi/medserv/klkemi/fi/ohjekirja/4803.htm> [hämtat 24.8.2017].

Walsham, N.E. & Sherwood, R.A. 2016. Fecal calprotectin in inflammatory bowel disease. *Clinical and Experimental Gastroenterology*. 9:21-29.

Whitehead, S.J., French, J., Brookes, M.J. Ford, C. & Gama, R. 2013. Between-assay variability of faecal calprotectin enzyme-linked immunosorbent assay kits. *Annals of Clinical Biochemistry*. 50(1):53-61.

Xiao, Y. & Isaacs, S.N. 2013. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and blocking with bovine serum albumin (BSA) – not all BSAs are alike. *PMC*. PMID: PMC3432671. S. 1–6.

Bilaga 1 – Rådata

Prov	EliA µg/g	EliA2 µg/g	Skillnad	%-skillnad
1	> 3000	1279	-1721	-57 %
2	2919	4830	1911	65 %
3	2479	6770	4291	173 %
4	1180	4491	3311	281 %
5	1121	1759	638	57 %
6	823	894	71	9 %
7	629	2094	1465	233 %
8	516	339	-177	-34 %
9	443	474	31	7 %
10	373	291	-82	-22 %
11	363	223	-140	-39 %
12	329	341	12	4 %
13	295	495	200	68 %
14	272	215	-57	-21 %
15	247	342	95	38 %
16	234	346	112	48 %
17	217	234	17	8 %
18	214	292	78	36 %
19	186	423	237	127 %
20	145	335	190	131 %
21	125	444	319	255 %
22	125	394	269	215 %
23	122	148	26	21 %
24	120	562	442	368 %
25	99	52	-47	-47 %
26	97	770	673	694 %
27	83	91	8	10 %
28	80	242	162	203 %
29	79	192	113	143 %
30	78	106	28	36 %
31	75	91	16	21 %
32	69	73	4	6 %
33	69	24	-45	-65 %
34	56	34	-22	-39 %
35	55	315	260	473 %
36	54	29	-25	-46 %
37	49	58	9	18 %
38	49	17	-32	-65 %
39	41	37	-4	-10 %
40	36	145	109	303 %
41	26	54	28	108 %
42	25	119	94	376 %
43	21	18	-3	-14 %

44	20	20	0	0 %
45	17	32	15	88 %
46	12	17	5	42 %
47	11	72	61	555 %
48	7,9	20	12,1	153 %
49	7,1	45	37,9	534 %
50	7	16	9	129 %
51	6,3	11	4,7	75 %
52	6,2	30	23,8	384 %
53	3,7	31	27,3	738 %
54	3,3	7,2	3,9	118 %
55	3	68	65	2167 %
56	3	7,9	4,9	163 %
57	2,8	61	58,2	2079 %
58	2,7	19	16,3	604 %
59	2,7	15	12,3	456 %
60	2,6	13	10,4	400 %
61	2,5	81	78,5	3140 %
62	2,2	56	53,8	2445 %
63	2,1	12	9,9	471 %
64	1,6	5	3,4	213 %
65	1,1	1,9	0,8	73 %
66	0,1	21	20,9	-
67	0	14	14	-

Bilaga 2 - Tabell över positiva och negativa analysvar

	EliA µg/g	EliA2 µg/g	
	Pos > 100	Pos > 100	
Positiv	>3000	1279	Positiv
Positiv	2919	4830	Positiv
Positiv	2479	6770	Positiv
Positiv	1180	4491	Positiv
Positiv	1121	1759	Positiv
Positiv	823	894	Positiv
Positiv	629	2094	Positiv
Positiv	516	339	Positiv
Positiv	443	474	Positiv
Positiv	373	291	Positiv
Positiv	363	223	Positiv
Positiv	329	341	Positiv
Positiv	295	495	Positiv
Positiv	272	215	Positiv
Positiv	247	342	Positiv
Positiv	234	346	Positiv
Positiv	217	234	Positiv
Positiv	214	292	Positiv
Positiv	186	423	Positiv
Positiv	145	335	Positiv
Positiv	125	444	Positiv
Positiv	125	394	Positiv
Positiv	122	148	Positiv
Positiv	120	562	Positiv
Negativ	99	52	Negativ
Negativ	97	770	Positiv
Negativ	83	91	Negativ
Negativ	80	242	Positiv
Negativ	79	192	Positiv
Negativ	78	106	Positiv
Negativ	75	91	Negativ
Negativ	69	73	Negativ
Negativ	69	24	Negativ
Negativ	56	34	Negativ
Negativ	55	315	Positiv
Negativ	54	29	Negativ
Negativ	49	17	Negativ
Negativ	49	58	Negativ
Negativ	41	37	Negativ
Negativ	36	145	Positiv
Negativ	26	54	Negativ
Negativ	25	119	Positiv
Negativ	21	18	Negativ

Negativ	20	20	Negativ
Negativ	17	32	Negativ
Negativ	12	17	Negativ
Negativ	11	72	Negativ
Negativ	7,9	20	Negativ
Negativ	7,1	45	Negativ
Negativ	7	16	Negativ
Negativ	6,3	11	Negativ
Negativ	6,2	30	Negativ
Negativ	3,7	31	Negativ
Negativ	3,3	7,2	Negativ
Negativ	3	68	Negativ
Negativ	3	7,9	Negativ
Negativ	2,8	61	Negativ
Negativ	2,7	15	Negativ
Negativ	2,7	19	Negativ
Negativ	2,6	13	Negativ
Negativ	2,5	81	Negativ
Negativ	2,2	56	Negativ
Negativ	2,1	12	Negativ
Negativ	1,6	5	Negativ
Negativ	1,1	1,9	Negativ
Negativ	0,1	21	Negativ
Negativ	0	14	Negativ

Bilaga 3 – Den godkända anhängan om tillstånd för lärdomsprovet


Social- och hälsovårdsverket
 Social- och hälsovårdsverket
 Social- och hälsovårdsverket

ANHÄLLAN OM TILLSTÅND FÖR FORSKNING OCH LÄRDOMSPROV

Allmänna uppgifter om forskningen	Sökandens namn Camilla Ahlqvist	Tfn [Redacted]
	Adress [Redacted]	[Redacted]
	Läroanstalt, utbildningsprogram Yrkehögskolan Novia, Bioanalytiker	
	Studiens namn Validering av nytt kalprotektinreagens och implementering av Phadia 250	
	Beställare av studien Diana Kujala, kliniska laboratoriet vid Social- och hälsovårdsverket	
	Handledare för studien Camilla Ribacka	Kontaktuppgifter [Redacted]
	Syfte med studien Undersöka kalprotektinreagens.	
	Målgrupp för studien (personal, patienter, övriga) Målgruppen är laboratoriets personal som genom studien kommer att få mera kunskap om kalprotektinanalyseringen med det nya reagenset.	
	Datainsamlings och analysmetoder som används i studien (vid behov på bilaga) Analyserar avföringsprover med Phadia 250 och sammanställer resultatet med statistiska analyser.	
	Tidsplan för studien Praktiska utförandet under veckorna 16-22.	
Bilagor	Forskningsplan <input checked="" type="checkbox"/>	
	Meddelande till de som undersöks (finska/svenska)	
	Blankett för samtycke (finska/svenska)	
	Modell för datainsamlingsblankett (frågeformulär)	
Sökandes underskrift	9.3.2017 <i>Camilla Ahlqvist</i>	
	Datum och underskrift 	
Beviljande av tillstånd	Tillstånd beviljat <input checked="" type="checkbox"/>	Tillstånd ej beviljat <input type="checkbox"/>
	Tillstånd beviljas med följande ändringar <input type="checkbox"/>	
	Motivering <i>social- och hälsovårdsverket ser intress - för bindelse bör under tecknas innan undersökningen börjar</i>	
Kontakt-person	Kontaktperson vid Social- och hälsovårdsverket:	
Den beviljandes underskrift	15.3.17 <i>[Signature]</i> <i>pm spöstom chefsläkare</i>	
	Datum och underskrift	chefs läkare/chef för vårdarbetet/ chef för äldreomsorg/chef för socialomsorg
Besluts-paragraf	§ 130/2017	Datum 27.3.17 Handläggare <i>[Signature]</i>
Fördelning	<i>Camilla Ahlqvist, Camilla Ribacka, Diana Kujala, Anna Biren</i>	

15.6.2015 1:0 Överskötarna\Forskning och lärdomsprov\Anhällan om tillstånd för forskning och lärdomsprov.docx