

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATEJA KERNJAK SLAK

MAGISTRSKA NALOGA

Magistrski študij laboratorijske biomedicine

Ljubljana, 2016

*Univerza v Ljubljani*



Fakulteta za farmacijo

MATEJA KERNJAK SLAK

KONCENTRACIJA INFLIKSIMABA KOT BIOOZNAČEVALEC  
KRONIČNE VNETNE ČREVESNE BOLEZNI

INFLIXIMAB TROUGH LEVEL AS A BIOMARKER FOR  
INFLAMMATORY BOWEL DISEASE

MAGISTRSKA NALOGA

Magistrski študij laboratorijske biomedicine

Magistrsko nalogo sem opravila na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo ter na Kliničnem oddelku za gastroenterologijo Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani, pod vodstvom mentorja prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farmacije, višjega svetnika in somentorstvom asist. mag. Davida Drobneteta, dr. med.

Meritve koncentracije infliksimaba v serumu so opravili v Laboratoriju na Univerzi v Leuvnu v Belgiji. Meritve fekalnega kalprotektina so bile narejene na Kliničnem oddelku za gastroenterologijo in Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo, Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani.

## ZAHVALA

Prof. dr. Jošku Osredkarju, mag. farm., višjemu svetniku se zahvaljujem za mentorstvo, napotila, nasvete in posredovanje podatkov.

Posebno zahvalo dolgujem somentorju asist. mag. Davidu Drobnetu, dr. med. za izkazano strokovno pomoč in dragocene nasvete, za vso skrb in motivacijo ter požrtvovalnost in napotke pri nastajanju naloge. Hvala za obsežno nesebično pomoč.

Magistrska naloga je del večjega raziskovalnega projekta, zato se zahvaljujem tudi vsem članom ekipe KVČB na Kliničnem oddelku za gastroenterologijo, UKC Ljubljana, ki je projekt omogočila: prof. dr. Ivanu Ferkolj, dr. med.; Nataši Smrekar, dr. med.; Gregorju Novak, dr. med.; Maticu Koželj, dr. med.; Tini Kurent, dr. med.; študentki med. Poloni Rajar in predstojniku prof. dr. Borutu Štabuc, dr. med.. Zahvaljujem se tudi ekipi KIKKB, UKC Ljubljana, ki je sodelovala na projektu: mladima raziskovalkama Teji Fabjan in Kristini Kumer ter mag. Elizabeti Božnar Alić, spec. med. biokem..

Svojima dragima sodelavcema Sabini Suljić in Marku Flek, ki sta mi stala ob strani in me ves čas študija podpirala, namenjam hvaležen objem.

Mojim najdražjim, soprogu Alojzu ter otrokom Rebeki, Amadeju, Sari in Timoteju, hvala za vso potrpežljivost, razumevanje in moralno podporo, ki ste mi jo nudili vsa leta študija. Zmeraj ste bili in boste v ospredju mojega srca in zavedanja. Imam vas neizmerno rada.

## IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo z naslovom *Koncentracija infliksimaba kot biooznačevalec kronične vnetne črevesne bolezni* samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farmacije, višjega svetnika in somentorstvom asist. mag. Davida Drobneteta, dr. med.

Podpis:

Predsednik komisije: izr. prof. dr. Tomaž Vovk, mag. farm.

Mentor: prof. dr. Joško Osredkar, mag. farmacije, višji svetnik

Somentor: asist. mag. David Drobne, dr.med.

Član: izr. prof. dr. Janez Mravljak

Ljubljana, 2016

# Vsebina

|                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------|----|
| 1. UVOD .....                                                       | 1  |
| 1.1. ANATOMIJA S HISTOLOGIJO PREBAVNE CEVI.....                     | 1  |
| 1.1.1. Zgornja prebavna cev .....                                   | 2  |
| 1.1.2. Spodnja prebavna cev.....                                    | 3  |
| 1.2. KRONIČNA VNETNA ČREVESNA BOLEZEN.....                          | 5  |
| 1.2.1. Ulcerozni kolitis .....                                      | 6  |
| 1.2.2. Crohnova bolezen.....                                        | 7  |
| 1.3. DIAGNOSTIČNE PREISKAVE PRI KVČB .....                          | 9  |
| 1.3.1. Endoskopija s histologijo .....                              | 9  |
| 1.3.2. Slikovne preiskave .....                                     | 10 |
| 1.3.3. Laboratorijske preiskave .....                               | 10 |
| 1.3.3.1. Fekalni kalprotektin.....                                  | 11 |
| 1.4. ZDRAVLJENJE KVČB .....                                         | 12 |
| 1.4.1. Infliksimab .....                                            | 13 |
| 2. IZHODIŠČA IN NAMEN DELA .....                                    | 15 |
| 3. MATERIALI IN METODE.....                                         | 16 |
| 3.1. VZORCI IN POPULACIJA .....                                     | 16 |
| 3.2. DOLOČANJE KONCENTRACIJE IFX.....                               | 17 |
| 3.2.1. Princip metode.....                                          | 17 |
| 3.2.2. Materiali .....                                              | 18 |
| 3.2.3. Postopek dela.....                                           | 18 |
| 3.2.4. Vrednotenje rezultatov .....                                 | 19 |
| 3.3. DOLOČANJE KONCENTRACIJE f-kalp. Z ELISA METODO Calprest® ..... | 19 |
| 3.3.1. Princip metode.....                                          | 19 |
| 3.3.2. Materiali .....                                              | 20 |
| 3.3.3. Postopek dela.....                                           | 20 |
| 3.3.4. Vrednotenje rezultatov .....                                 | 21 |
| 3.4. DOLOČANJE KONCENTRACIJE f-kalp. S Quantum Blue® TESTOM.....    | 21 |
| 3.4.1. Princip metode.....                                          | 22 |
| 3.4.2. Materiali .....                                              | 22 |
| 3.4.3. Postopek dela.....                                           | 23 |

|          |                                                                                                        |    |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.4.4.   | Vrednotenje rezultatov .....                                                                           | 24 |
| 3.5.     | STATISTIČNE METODE .....                                                                               | 25 |
| 4.       | REZULTATI.....                                                                                         | 27 |
| 4.1.     | OSNOVNA STATISTIČNA ANALIZA .....                                                                      | 27 |
| 4.1.1.   | Koncentracija IFX in f-kalprotektina .....                                                             | 27 |
| 4.1.2.   | Vrednosti f-kalp. glede na negativne, mejne in pozitivne rezultate .....                               | 29 |
| 4.1.3.   | Vrednosti IFX glede na nizke, srednje in visoke koncentracije .....                                    | 30 |
| 4.2.     | PRIMERJAVA VREDNOSTI MED BOLNIKI Z UK IN CB.....                                                       | 31 |
| 4.2.1.   | Primerjava koncentracij f-kalp. med UK in CB .....                                                     | 31 |
| 4.2.2.   | Primerjava rezultatov f-kalp. med UK in CB.....                                                        | 32 |
| 4.2.3.   | Primerjava koncentracij IFX med UK in CB .....                                                         | 33 |
| 4.2.4.   | Primerjava nizke, srednje in visoke konc. IFX med UK in CB .....                                       | 34 |
| 4.3.     | POVEZANOST MED VREDNOSTMI IFX IN f-kal.....                                                            | 35 |
| 4.3.1.   | Povezanost med koncentracijo f-kalp. in vrednostjo IFX .....                                           | 35 |
| 4.3.1.1. | Na celotni skupini bolnikov s KVČB.....                                                                | 35 |
| 4.3.1.2. | Na skupini bolnikov z ulceroznim kolitisom.....                                                        | 36 |
| 4.3.1.3. | Na skupini bolnikov s Crohnovo boleznijo .....                                                         | 37 |
| 4.3.2.   | Povezanost med rezultati f-kalp. in vrednostjo IFX.....                                                | 38 |
| 4.3.2.1. | Na celotni skupini bolnikov s KVČB.....                                                                | 38 |
| 4.3.2.2. | Na skupini bolnikov z ulceroznim kolitisom.....                                                        | 40 |
| 4.3.2.3. | Na skupini bolnikov s Crohnovo boleznijo .....                                                         | 41 |
| 4.4.     | DOLOČANJE MEJNE VREDNOSTI KONCENTRACIJE IFX ZA NAPOVED<br>REMISIJE KVČB S KRIVULJO ROC .....           | 43 |
| 4.4.1.   | Mejna vrednost IFX za celotno skupino bolnikov s KVČB.....                                             | 43 |
| 4.4.2.   | Mejna vrednost IFX za skupino bolnikov z UK.....                                                       | 44 |
| 4.4.3.   | Mejna vrednost IFX za skupino bolnikov s CB .....                                                      | 45 |
| 4.5.     | POZITIVNA IN NEGATIVNA NAPOVEDNA VREDNOST MEJNE<br>KONCENTRACIJE IFX ZA NAPOVED REMISIJE BOLEZNI ..... | 46 |
| 5.       | RAZPRAVA .....                                                                                         | 48 |
| 6.       | SKLEPI .....                                                                                           | 53 |
| 7.       | LITERATURA.....                                                                                        | 54 |
|          | PRILOGE .....                                                                                          | i  |

## KAZALO SLIK

|                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Slika 1: Zgradba stene prebavne cevi .....                                                                    | 1  |
| Slika 2: Anatomija in histologija ozkega črevesa.....                                                         | 4  |
| Slika 3: Anatomija in histologija širokega črevesa .....                                                      | 5  |
| Slika 4: Razdelitev ulceroznega kolitisa (Montrealska klasifikacija) .....                                    | 6  |
| Slika 5: Primerjava zdrave črevesne sluznice z UK .....                                                       | 7  |
| Slika 6: Crohnova bolezen z zapleti .....                                                                     | 8  |
| Slika 7: Razdelitev Crohnove bolezni (Montrealska klasifikacija) .....                                        | 9  |
| Slika 8: Sekundarna struktura kalprotektina.....                                                              | 12 |
| Slika 9: Struktura in mehanizem delovanja infliksimaba.....                                                   | 13 |
| Slika 10: Princip IFX ELISA – Leuven metode – shematski prikaz.....                                           | 17 |
| Slika 11: Vrednotenje rezultatov na testni ploščici Quantum Blue® .....                                       | 24 |
| Slika 12: Kvartilna diagrama za izmerjene koncentracije IFX in f-kalp. pri vseh bolnikih s KVČB .....         | 27 |
| Slika 13: Histograma za izmerjene vrednosti IFX in f-kalp. pri vseh bolnikih s KVČB ....                      | 28 |
| Slika 14: Kvartilna diagrama koncentracij f-kalp. pri UK in CB.....                                           | 31 |
| Slika 15: Kvartilni diagrami rezultatov f-kalp. pri UK in CB .....                                            | 32 |
| Slika 16: Kvartilna diagrama koncentracij IFX pri UK in CB .....                                              | 33 |
| Slika 17: Kvartilni diagrami nizkih, srednjih in visokih konc. IFX pri UK in CB.....                          | 34 |
| Slika 18: Kvartilni diagrami konc. f-kalp. pri nizki, srednji in visoki konc. IFX za vse bolnike s KVČB ..... | 35 |
| Slika 19: Kvartilni diagrami konc. f-kalp. pri nizki, srednji in visoki konc. IFX za bolnike z UK .....       | 36 |
| Slika 20: Kvartilni diagrami konc. f-kalp. pri nizki, srednji in visoki konc. IFX za bolnike s CB.....        | 37 |
| Slika 21: Delež rezultatov f-kalp. glede na vrednost IFX za vse bolnike s KVČB.....                           | 39 |

|                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Slika 22: Delež rezultatov f-kalp. glede na vrednost IFX za bolnike z UK .....                                               | 40 |
| Slika 23: Delež rezultatov f-kalp. glede na vrednost IFX za bolnike s CB.....                                                | 42 |
| Slika 24: ROC krivulja vrednosti IFX za razlikovanje bolnikov z aktivno boleznijo in remisijo pri vseh bolnikih s KVČB ..... | 43 |
| Slika 25: ROC krivulja vrednosti IFX za razlikovanje bolnikov z aktivno boleznijo in remisijo pri UK.....                    | 44 |
| Slika 26: ROC krivulja vrednosti IFX za razlikovanje bolnikov z aktivno boleznijo in remisijo pri CB .....                   | 45 |

## KAZALO PREGLEDNIC

|                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Preglednica I: Število in delež vzorcev 88 bolnikov glede na vrsto KVČB.....                                         | 16 |
| Preglednica II: Podajanje in vrednotenje rezultatov testa CP (25).....                                               | 21 |
| Preglednica III: Podajanje in vrednotenje rezultatov s QB testom (31).....                                           | 25 |
| Preglednica IV: Opisna statistika za izmerjene konc. IFX in f-kalp. pri vseh bolnikih s KVČB .....                   | 28 |
| Preglednica V: Opisna statistika za izmerjene koncentracije f-kalp. glede na rezultate pri vseh bolnikih s KVČB..... | 29 |
| Preglednica VI: Opisna statistika za izmerjene nizke, srednje in visoke konc. IFX pri vseh bolnikih s KVČB .....     | 30 |
| Preglednica VII: Primerjava koncentracij f-kalp. med bolniki z UK in CB .....                                        | 31 |
| Preglednica VIII: Primerjava rezultatov f-kalp. med bolniki z UK in CB.....                                          | 32 |
| Preglednica IX: Primerjava koncentracij IFX med bolniki z UK in CB.....                                              | 33 |
| Preglednica X: Primerjava nizke, srednje in visoke konc. IFX med bolniki z UK in CB...                               | 34 |
| Preglednica XI: Konc. f-kalp. pri nizki, srednji in visoki konc. IFX za vse bolnike s KVČB .....                     | 35 |
| Preglednica XII: Spearmanov test korelacije med konc. f-kalp. in vrednostjo IFX za vse bolnike s KVČB .....          | 36 |

|                                                                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Preglednica XIII: Koncentracija f-kalp. pri nizki, srednji in visoki konc. IFX za bolnike z UK .....                                            | 36 |
| Preglednica XIV: Spearmanov test korelacije med konc. f-kalp. in vrednostjo IFX za bolnike z UK.....                                            | 37 |
| Preglednica XV: Koncentracija f-kalp. pri nizki, srednji in visoki konc. IFX za bolnike s CB.....                                               | 37 |
| Preglednica XVI: Spearmanov test korelacije med konc. f-kalp. in vrednostjo IFX za bolnike s CB .....                                           | 38 |
| Preglednica XVII: Število rezultatov f-kalp. glede na vrednost IFX za vse bolnike s KVČB .....                                                  | 38 |
| Preglednica XVIII: Spearmanov test korelacije med rezultati f-kalp. in vrednostjo IFX za vse bolnike s KVČB .....                               | 39 |
| Preglednica XIX: Število rezultatov f-kalp. glede na vrednost IFX pri bolnikih z UK .....                                                       | 40 |
| Preglednica XX: Spearmanov test korelacije med rezultati f-kalp. in vrednostjo IFX za bolnike z UK.....                                         | 41 |
| Preglednica XXI: Število rezultatov f-kalp. glede na vrednost IFX pri bolnikih s CB.....                                                        | 41 |
| Preglednica XXII: Spearmanov test korelacije med rezultati f-kalp. in vrednostjo IFX za bolnike s CB .....                                      | 42 |
| Preglednica XXIII: Izračun AUC z mejnimi vrednostmi IFX pri določeni specifičnosti in občutljivosti za vse bolnike s KVČB.....                  | 44 |
| Preglednica XXIV: Izračun AUC z mejnimi vrednostmi IFX pri določeni specifičnosti in občutljivosti za bolnike z UK .....                        | 45 |
| Preglednica XXV: Izračun AUC z mejnimi vrednostmi IFX pri določeni specifičnosti in občutljivosti za bolnike s CB.....                          | 46 |
| Preglednica XXVI: Kontingenčna tabela za izračun PNV in NNV pri bolnikih s KVČB glede na koncentracijo IFX pri mejni vrednosti 4,05 µg/ml ..... | 46 |
| Preglednica XXVII: Kontingenčna tabela za izračun PNV in NNV pri bolnikih z UK glede na koncentracijo IFX pri mejni vrednosti 2,15 µg/ml .....  | 47 |
| Preglednica XXVIII: Kontingenčna tabela za izračun PNV in NNV pri bolnikih s CB glede na koncentracijo IFX pri mejni vrednosti 3,95 µg/ml ..... | 47 |

## KAZALO PRILOG

|                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Priloga 1: Izmerjene vrednosti f-kalp. in IFX z zbranimi kliničnimi podatki bolnikov s KVČB .....                      | i  |
| Priloga 2: Mejne vrednosti koncentracije IFX pri določeni občutljivosti in specifičnosti ...                           | iv |
| Priloga 3: Mejne vrednosti koncentracije IFX pri določeni občutljivosti in specifičnosti pri bolnikih z UK in CB ..... | vi |

## SEZNAM OKRAJŠAV

|               |                                                                          |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------|
| Ab            | protitelo                                                                |
| ATI           | protitelesa proti infliksimabu                                           |
| AUC           | površina pod ROC krivuljo (area under the ROC curve)                     |
| BSA           | goveji serumski albumin                                                  |
| CB            | Crohnova bolezen                                                         |
| CI            | interval zaupanja (confidence interval)                                  |
| CP            | Calprest <sup>®</sup>                                                    |
| ELISA         | encimskoimunski test (enzyme – linked immunosorbent assay)               |
| f-kalp.       | fekalni kalprotektin                                                     |
| HRP           | hrenova peroksidaza                                                      |
| IFX           | infliksimab                                                              |
| IK            | indeterminirani kolitis (nerazvrščena KVČB)                              |
| IQR           | medkvartilni razpon (interquartile range)                                |
| KVČB          | kronična vnetna črevesna bolezen                                         |
| LN            | lažno negativen izid                                                     |
| LP            | lažno pozitiven izid                                                     |
| MK            | mikroskopski kolitis                                                     |
| NNV           | negativna napovedna vrednost                                             |
| np            | ni podatka                                                               |
| PBS           | izotonični fosfatni pufer                                                |
| PN            | pravilno negativen izid                                                  |
| PNV           | pozitiva napovedna vrednost                                              |
| PP            | pravilno pozitiven izid                                                  |
| QB            | Quantum Blue <sup>®</sup>                                                |
| RFID          | radiofrekvenčna identifikacija (Radio Frequency Identification)          |
| ROC           | krivulja karakteristike sprejemnika (Receiver Operating Characteristics) |
| TNF- $\alpha$ | dejavnik tumorske nekroze $\alpha$                                       |
| UK            | ulcerozni kolitis                                                        |
| YI            | Youden-ov indeks                                                         |

## POVZETEK

Kronična vnetna črevesna bolezen (KVČB) je vnetna bolezen prebavil, ki poteka z akutnimi zagoni in vmesnimi različno dolgimi remisijami. Najpogostejši obliki KVČB sta ulcerozni kolitis (UK) in Crohnova bolezen (CB). Pri oceni aktivnosti vnetja in spremljanju zdravljenja se poslužujemo invazivne in drage preiskave koloileoskopije ter laboratorijske diagnostike. Kot najboljši biokemični označevalec doslej se je izkazal fekalni kalprotektin. Koncentracija infliksimaba (IFX) v serumu bolnikov s KVČB, ki prejemajo vzdrževalno zdravljenje z biološkim zdravilom infliksimab, bi utegnila biti nov biokemični označevalec, saj je koncentracija v krvi obratno sorazmerna s koncentracijo TNF-alfa, ki je glavni vnetni mediator pri KVČB.

Namen naše naloge je bil ugotoviti, kakšna je diagnostična vrednost IFX, kot biološkega označevalca za oceno vnetne aktivnosti KVČB.

Da bi ugotovili diagnostično vrednost IFX, smo koncentracije IFX primerjali z doslej najboljšim biološkim označevalcem f-kalprotektinom. Prospektivno smo sočasno izmerili 102 vrednosti IFX in f-kalprotektina pri skupno 88 bolnikih. Koncentracijo IFX v serumu smo določili z metodo ELISA, koncentracijo f-kalprotektina pa z ELISA metodo in hitrim imunološko kromatografskim testom.

Izračunali smo korelacijo med IFX in f-kalprotektinom in s krivuljo ROC določili vrednosti IFX, ki ločijo med aktivno boleznijo in remisijo (definirano z normalnim ali mejnim f-kalprotektinom). Analize smo najprej opravili na celotni kohorti, nato pa še na obeh podskupinah (UK in CB) posebej. Pri analizi spremenljivk smo uporabili Mann – Whitney U test s 5 % stopnjo tveganja.

Povprečna izmerjena koncentracija IFX v serumskih vzorcih je bila 4,30 µg/ml (IQR: 1,36 – 8,66 µg/ml), povprečna koncentracija f-kalprotektina pa 145,50 µg/g (IQR: 48,55 – 441,80 µg/g). Povprečna koncentracija IFX pri UK (5,55 µg/ml, IQR: 2,06 – 10,63 µg/ml) je bila višja kot pri CB (3,00 µg/ml, IQR: 1,23 – 5,60 µg/ml) ( $p = 0,029$ ). Statistično značilnih razlik v koncentraciji f-kalprotektina med UK (113,00 µg/g, IQR: 49,70 – 567,65 µg/g) in CB (147,35 µg/g, IQR: 42,90 – 440,00 µg/g) ni bilo ( $p = 0,894$ ).

S Spearmanovim testom smo ugotovili zmerno negativno korelacijo med IFX in f-kalprotektinom ( $\rho = -0,240$ ;  $p = 0,016$ ). Najboljša mejna vrednost IFX, ki je napovedovala

remisijo KVČB, je bila 4,05 µg/ml, ob tem je bila površina pod krivuljo ROC 64,4 % ( $p = 0,013$ ). Pozitivna napovedna vrednost pri koncentraciji IFX več kot 4,05 µg/ml za remisijo bolezni je bila 68,1 %, negativna pa 64,2 %. Ob nekoliko višji koncentraciji IFX (6,45 µg/ml) se poveča občutljivost za potrditev remisije bolezni na 74,5 %.

V raziskavi smo potrdili diagnostično vrednost koncentracije IFX kot biološkega označevalca vnetja. Zaradi relativno nizke občutljivosti in specifičnosti pa je njegova klinična uporaba kot biološkega označevalca za ugotavljanje aktivnosti KVČB, omejena.

**Ključne besede:** Kronična vnetna črevesna bolezen, ulcerozni kolitis, Crohnova bolezen, fekalni kalprotektin, infliksimab

## ABSTRACT

Inflammatory bowel disease (IBD) is a chronic inflammatory disorder of gastrointestinal tract characterized with acute flares of disease activity and remissions of various lengths. Its most common forms are ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD). To assess disease activity and response to treatment, laboratory diagnostics, such as calprotectin, and colonoscopy, which is invasive and expensive are used.

Biological drug TNF-inhibitor infliximab is widely used for treatment of IBD. Since infliximab trough levels are inversely correlated to serum TNF-alpha, which is the main proinflammatory cytokine, we hypothesized that infliximab trough level might also be a biomarker of disease activity in patients treated with IFX maintenance treatment.

To assess diagnostic value of IFX as biomarker of disease activity, we correlated IFX trough levels with f-calprotectin. We prospectively collected serum samples of IFX treated patients and fecal samples (102 time-matched samples) of 88 patients on IFX maintenance treatment. IFX trough levels were determined by ELISA and the concentrations of f-calprotectin by ELISA and quantitative lateral flow immunoassay.

We calculated correlation between IFX trough levels and f-calprotectin and we used ROC curve to determine the value of IFX that best separates active disease activity and remission. Analyses were first performed on the entire cohort of patients and then on the two subgroups (UC and CB) separately. Mann - Whitney U test at the 5 % level of risk was used to compare medians.

Median IFX trough level was 4,3 µg/ml (IQR: 1,36 – 8,66 µg/ml), and median f-calprotectin was 145,50 µg/g (IQR: 48,55 – 441,80 µg/g). Median IFX trough level in patients with UC (5,55 µg/ml, IQR: 2,06 – 10,63 µg/ml) was higher than in patients with CD (3,00 µg/ml, IQR: 1,23 – 5,60 µg/ml) ( $p = 0,029$ ). However, there were no differences in median f-calprotectin between UC (113,00 µg/g, IQR: 49,70 – 567,65 µg/g) and CD (147,35 µg/g, IQR: 42,90 – 440,00 µg/g) ( $p = 0,894$ ).

The Spearman's test confirmed a moderate negative correlation between IFX trough levels and f-calprotectin ( $\rho = -0,240$ ;  $p = 0,016$ ). The best cut-off of IFX trough levels to predict remission of IBD was 4.05 mg/ml - with the area under the ROC curve 64,4 % ( $p = 0,013$ ).

The positive predictive value of IFX trough levels of 4.05 mg/ml for remission of IBD was 68.1 %, while the negative predictive value at this trough level was 64.2 %. At a slightly higher IFX trough level (6.45 mg/ml) - sensitivity to predict remission of the disease was 74.5 %.

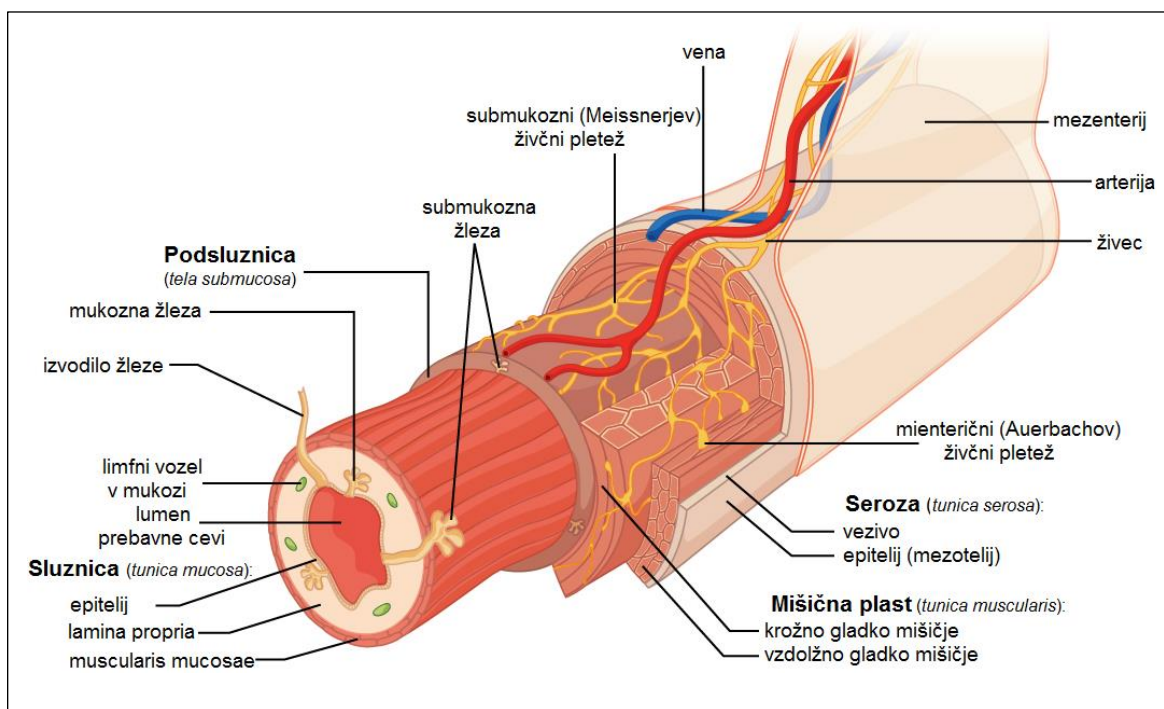
In this study we confirm the diagnostic value of IFX trough levels as a biomarker of disease activity in IBD. However, due to moderate sensitivity and specificity, its role in current clinical practice is limited.

**Key words:** Inflammatory bowel disease, ulcerative colitis, Crohn`s disease, fecal calprotectin, infliximab

## 1. UVOD

### 1.1. ANATOMIJA S HISTOLOGIJO PREBAVNE CEVI

Prebavno cev razvrščamo med prebavila, katerih naloga je sprejem ter kemična in mehanska prebava hrane do vodotopnih snovi, ki lahko prehajajo skozi steno prebavne cevi v kri. Prebavna cev sega od ust do zadnjika, sestavljajo jo ustna votlina, žrelo, požiralnik, želodec ter ozko in široko črevo. Stena prebavne cevi je zgrajena iz sluznice, podsluznice, mišične in zunanje vezivne plasti (slika 1) (1, 2).



**Slika 1:** Zgradba stene prebavne cevi (3)

Sluznico (*tunica mucosa*) sestavljajo večslojni ploščati (ustna votlina, anus) ali enoplastni cilindrični (ostala prebavna cev) epitelij, lamina propria iz rahlega veziva in lamina muscularis mucosae iz gladke mišičnine. V lamini proprie so krvne in limfne žile, limfociti, gladke mišične celice in majhne žleze. Podsluznica (*tela submucosa*) je dobro oživčeno in ožiljeno vezivno tkivo s submukoznim (Meissnerjevim) živčnim pletežem. Mišična plast (*tunica muscularis*) je sestavljena iz dveh ali več plasti gladke mišičnine, ki je na notranji strani krožna, na zunanji pa vzdolžna. Med obema plastema se nahaja vezivno tkivo s krvnimi in limfnimi žilami in mienteričnim (Auerbachovim) živčnim pletežem, ki stimulira kontrakcijo gladke mišičnine in omogoča peristaltiko. Zunanja plast (*tunica serosa*) je

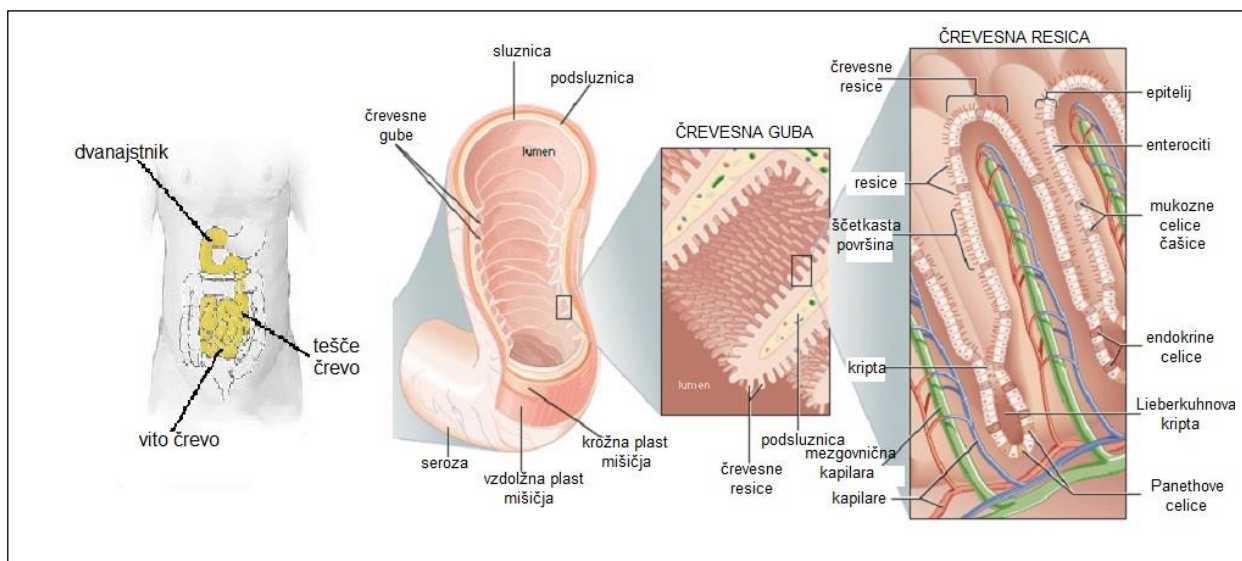
tanka plast rahlega vezivnega tkiva s krvnimi in limfnimi žilami ter maščevjem, ki jo pokriva enoplastni ploščati epitelij (visceralni mezotelij). V trebušni votlini se nadaljuje v mezenterij, ki podpira črevesje in ta v potrebušnico (*peritoneum*), ki na eni strani prekriva organe, na drugi pa trebušno steno. V zgornjem delu prebavne cevi tunico seroso nadomesti debelo vezivno tkivo (*tunica adventitia*), ki direktno povezuje organ z okolico (slika 1) (1, 4).

### **1.1.1. Zgornja prebavna cev**

Zgornja prebavna cev sestoji iz ustne votline, žrela, požiralnika in želodca. Ustna votlina predstavlja začetek prebavne cevi in sega od ustne špranje do goltne ožine, kjer preide v žrelo. Zgrajena je iz večskladnega ploščatega epitelija, veziva lamine proprie in submukoze. Ustne žleze slinavke (obušesna, podčeljustna in podjezična) izločajo slino in encim amilazo, pomemben pri presnovi ogljikovih hidratov. Na prehodu v žrelo ležita skupka limfatičnega tkiva, nebnici (4 – 6). Žrelo delimo na nosni in ustni del ter hipofarinks. Zgrajeno je iz sluznice z žrelnimi žlezami, fibrozne membrane, prečno – progastega mišičja in tanke plasti gostega veziva adventicije. Požiralnik je votla mišičasta cev, ki povezuje žrelo z želodcem. Leži med sapnikom in hrbtenico, deljen na vratni, prsni in trebušni odsek s tremi ožinami. Zgrajen je iz štirih plasti značilnih za prebavila: sluznice, podsluznice, mišične plasti in zunanega fibroznega veziva adventicije, ki pritrjuje požiralnik na sapnik in hrbtenico (2, 4, 7). Želodec je najširši del prebavne cevi v obliki polmeseca z veliko levo in manjšo desno krivino. V spodnjem delu prehaja preko mišice zažemalke v dvanajstnik. Stena želodca je debela od 2 do 3 cm in zgrajena iz štirih plasti. Sluznico tvori enoplastni cilindrični epitel z mukoznimi žlezami, podsluznica iz bogatega veziva pa veže sluznico na podlago in ji omogoča gibanje. Mišična plast je zgrajena iz zunanje vzdolžne, srednje krožne in notranje poševne mišičnine. Zunanja plast seroza je sestavljena iz tanke plasti veziva, prekrita s ploščatim mezotelijem, ki prehaja v potrebušnico na mali krivini na jetra in veliki na prečno široko črevo. V steni želodca se nahaja pet vrst žleznih celic (nediferencirane, mukoidne, pepsinogene, parietalne in enteroendokrine), ki izločajo klorovodikovo kislino in encime, pomembne pri presnovi snovi (2, 4, 6).

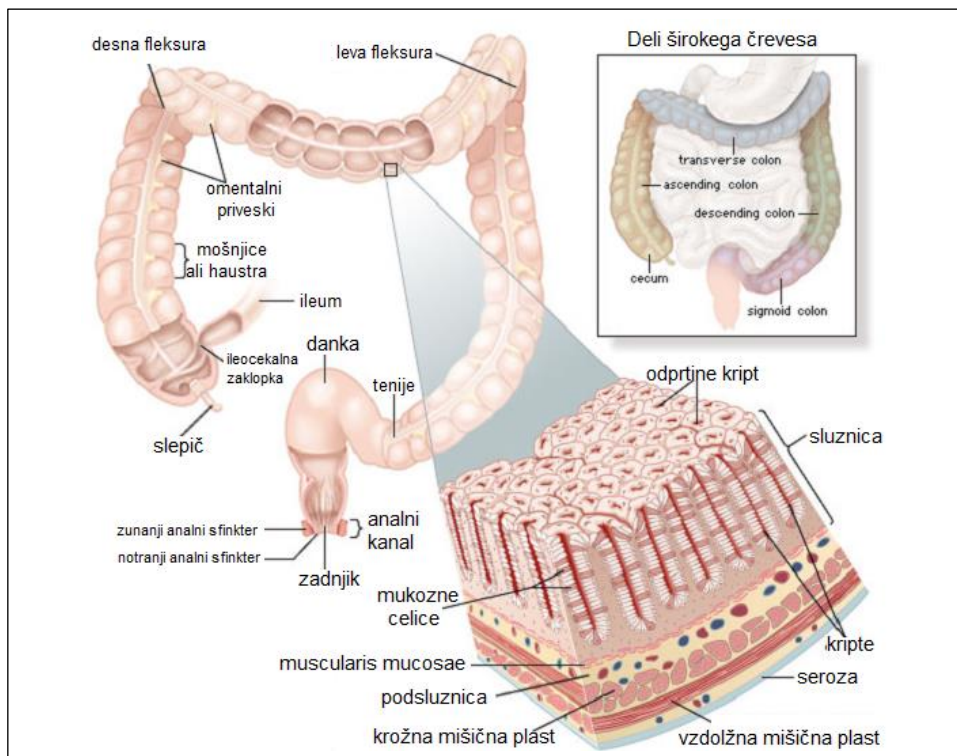
### 1.1.2. Spodnja prebavna cev

Spodnjo prebavno cev sestavljata ozko in široko črevo. Ozko črevo (*intestinum tenue*) je najdaljše, sestavljeno iz dvanajstnika (*duodenum*), teščega čreva (*jejunum*) in vitega čreva (*ileum*) (slika 2). Povezuje želodec in široko črevo, njegova glavna naloga pa je kemična prebava hrane, ki jo omogočajo žolč, sok trebušne slinavke in črevesni sok ter absorpcija hranilnih snovi v kri. Mehansko prebavo hrane, mešanje hrane s prebavnimi sokovi in potiskanje hrane naprej po prebavni cevi omogoča peristaltično gibanje črevesa. Dvanajstnik je najkrajši in najširši del ozkega črevesa in v obliki podkve obkroža glavo trebušne slinavke. Vanj se odpirata skupni žolčni in pankreatični vod, ki se na koncu združita v hepatopankreatični vod. Stena dvanajstnika je grajena iz sluznice, ki tvori visoke krožne gube in tanke črevesne resice, ki povečujejo tudi do šest-krat njegovo resorpcijsko površino. V podsluznici začetnega dela dvanajstnika so zavite in razvejane mukoidne Brunnerjeve žleze, ki nevtralizirajo kisli sok želodca. Mišično plast tvori notranje krožno in zunanje vzdolžno mišičje, peritonej pa prekriva dvanajstnik le s sprednje strani (2, 6). Tešče in vito črevo sta najdaljši del prebavne cevi, imata skupni mezenterij ter zavzemata večji del trebušne votline in medenice. Tešče črevo ima širši lumen in debelejšo steno, gostejše in višje krožne gube, gostejše resice, več žilja in manj limfatičnega tkiva. Sluznico obeh čreva prekrivajo enoskladne visokoprizmatske celice (enterociti), sledi lamina propria s črevesnimi žlezami (Lieberkühnove kripte), ki z epitelijem tvori črevesne resice. Podsluznica vsebuje žile, živce in mezgovnice ter s sluznico oblikuje črevesne gube. Mišična plast sestoji iz debelejše krožne in tanjše vzdolžne mišičnine, zunanja serozna plast pa prehaja v oporek, po katerem do črevesa potekajo žile, živci in mezgovnice. V epitelu ozkega črevesa najdemo nediferencirane kambijske celice, iz katerih se razvijejo absorpcijski enterociti, mukozne žleze čašice, ki izločajo mucin, enteroendokrine celice, ki izločajo peptidne hormone in Panethove celice (slika 2). Panethove celice ležijo na dnu kript, uravnavajo črevesno floro ter dajejo zaščito pred patogenimi mikrobi. Vsebujejo eozinofilne granule in izločajo lizocim, fosfolipazo A<sub>2</sub> in defenzine (1, 2).



**Slika 2:** Anatomija in histologija ozkega črevesa (8, 9)

Široko črevo je zadnji del prebavne cevi, ki se prične s kratkim slepim črevesom (*cecum*) z ileocekalno zaklopko in slepičem. Nadaljuje se v navzgornji kolon (*colon ascendens*), ki se dvigne po desni strani do želodca. Pod želodcem prehaja v prečni kolon na levo stran trebušne votline (*colon transversum*) in zavije navzdol v navzdoljni kolon (*colon descendens*) do esastega širokega črevesa (*colon sigmoideum*) in danke (*rectum*). Na koncu se črevo zoži v analni kanal in konča z zadnjikom (*anus*). V steni analnega kanala sta dve zapiralki, notranji sfinkter iz gladke in zunanji sfinkter iz prečno progaste mišičnine (slika 3). V širokem črevesu poteka absorpcija vode in elektrolitov ter priprava neprebavljivih snovi, ki zapustijo telo. Sluznica je brez resic, kripte so ravne in redkejše, čašic je več kot v ozkem črevesu, Panethovih celic ni. Muscularis mucosae je bolj razvita, limfatičnih foliklov je manj. Podsluznica je debelejša s precej maščobnega tkiva. V mišični plasti so krožno in vzdolžno potekajoče gladke mišice. Notranja krožna plast mišičnine se lahko zajeda v lumen in skupaj s sluznico in podsluznico tvori polmesečne sluznične gube. Zunanja plast seroza je na določenih mestih izbočena z maščobnimi krpami (slika 3) (1, 2, 6).



**Slika 3:** Anatomija in histologija širokega črevesa (10)

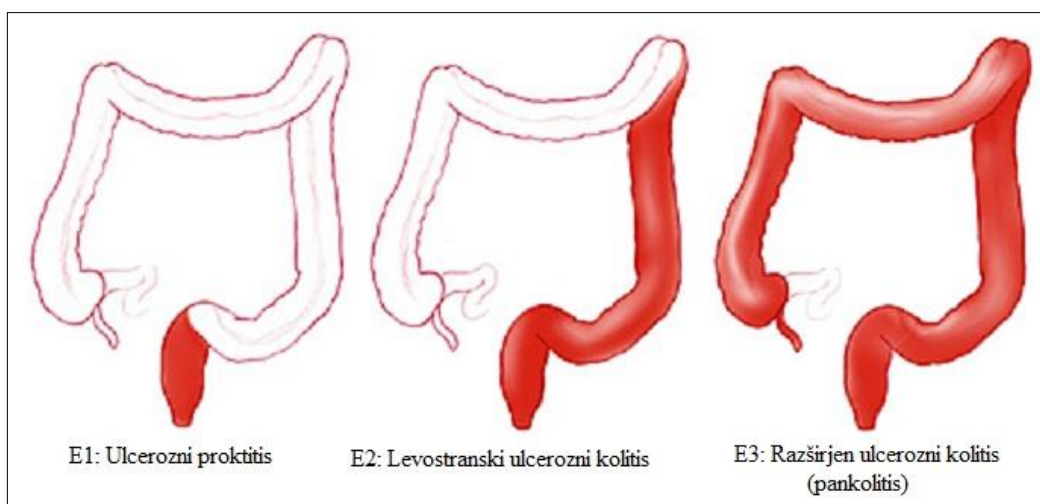
## 1.2. KRONIČNA VNETNA ČREVESNA BOLEZEN

Kronična vnetna črevesna bolezen (KVČB) je redka, kompleksna bolezen prebavil, katere natančen mehanizem nastanka še ni povsem pojasnjen. Potek bolezni je nepredvidljiv z akutnimi zagoni in vmesnimi različno dolgimi remisijami. Nanjo vpliva več med seboj povezanih dejavnikov: genetska predispozicija, imunski sistem, okolje in sestava črevesne mikroflore. Simptomi KVČB so nespecifični in odvisni od lokalizacije in razširjenosti bolezni (11 – 13). Za potrditev diagnoze KVČB so pomembni anamnestični podatki, klinične značilnosti bolezni, laboratorijske, endoskopske, slikovne in histološke preiskave. Po opravljenih diagnostičnih postopkih ugotovimo vrsto in obseg KVČB ter bolnike uvrstimo po Montrealski klasifikaciji, ki je pomembna za zdravljenje, sledenje in prognozo. Med KVČB prištevamo ulcerozni kolitis (UK), Crohnovo bolezen (CB), indeterminirani kolitis (IK) ter mikroskopski kolitis (MK), ki ga delimo na limfocitni in kolagenozni kolitis. UK in CB sta najpogostejši obliki KVČB, o IK pa govorimo, ko UK in CB ni možno med seboj ločiti (14 – 16). Zdravljenje KVČB je osredotočeno na trajno obvladovanje vnetnih procesov v črevesni sluznici, manj akutnih zapletov, kirurških

posegov, bolnišničnih obravnavanj ter izboljšanje kakovosti bolnikovega življenja (17). Za KVČB obolevajo ljudje v vseh starostnih obdobjih, pojavnost in pogostost bolezni sta večji v bolj razvitih deželah. V Sloveniji je bilo od leta 2000 do 2001 novo odkritih primerov UK 5/100.000 prebivalcev in CB 3,6/100.000 prebivalcev. Ocenjena skupna pojavnost KVČB v Sloveniji je bila 13,7/100.000 s postopnim naraščanja v zadnjih treh letih na 18,2/100.000 prebivalcev (11, 18).

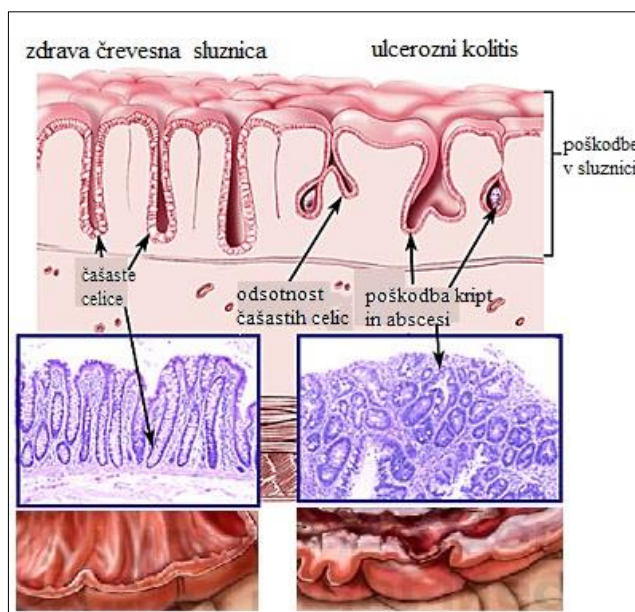
### 1.2.1. Ulcerozni kolitis

Za UK so značilne ponavljajoče se vnetne spremembe, omejene na sluznico širokega črevesa, ki zajame danko in se običajno širi proksimalno, pogosto na celotno široko črevo. Glede na razširjenost vnetja delimo UK na ulcerozni proktitis, levostranski ulcerozni kolitis in razširjen ulcerozni kolitis (pankolitis) (slika 4) (11, 14).



**Slika 4:** Razdelitev ulceroznega kolitisa (Montrealska klasifikacija) (19)

Spremembe v črevesni sluznici so odvisne od razširjenosti, trajanja in števila ponavljajočih se zagonov bolezni. Ob akutnem zagonu bolezni prihaja do povečanega vdora nevtrofilcev v sluznico črevesa in nastanka površinskih razjed, ki zakrvavijo. Kopičenje nevtrofilcev v kriptah vodi v nastanek majhnih abscesov, v sluznici propadajo čašaste celice, povečane krvavitve pa so posledica čezmernega povečanja žilja v sluznici (slika 5). V obdobju obnavljanja sluznice nastajajo lažni polipi, ki so pokazatelj predhodnih vnetij. Pogostejše jih zasledimo v kolonu (11, 20).



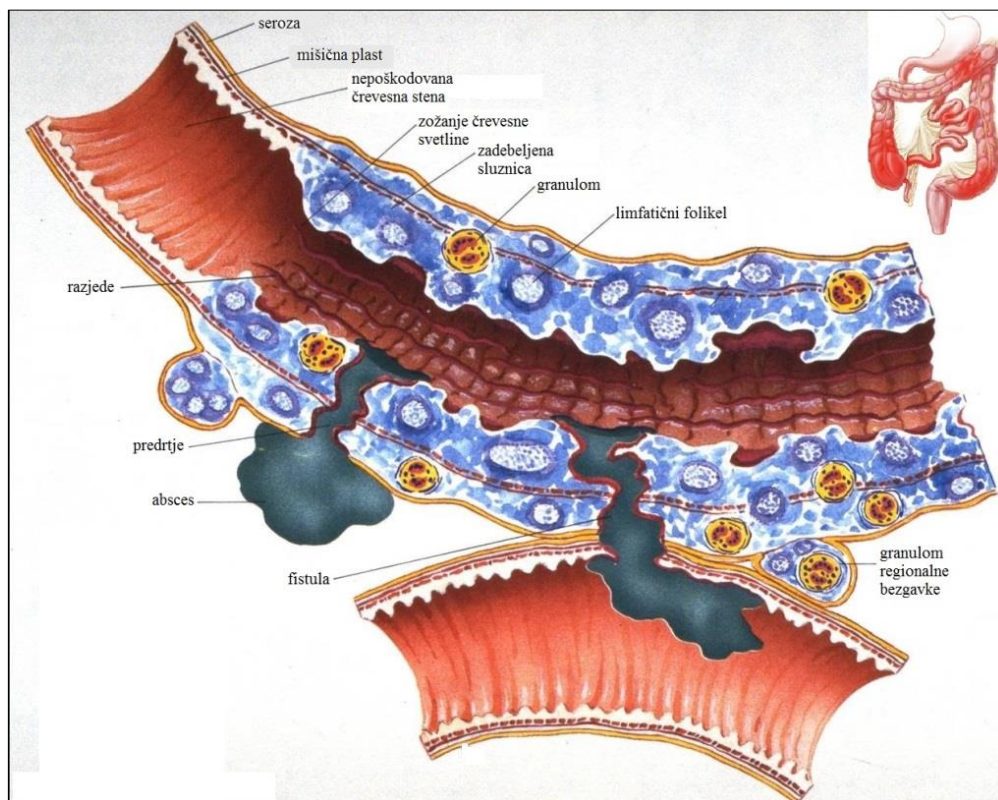
**Slika 5:** Primerjava zdrave črevesne sluznice z UK (21, 22)

Bolezni znaki UK so driska, krvava driska z ali brez sluzi, bolečine v trebuhu, lažen poziv k odvajanju, povišana telesna temperatura, slabokrvnost in hujšanje. Glede na klinično sliko ločimo blago, zmerno in težko potekajoči UK. Blago potekajoča oblika bolezni poteka pri polovici bolnikov, pri približno 3 % bolnikov pa se lahko razvijejo akutni zapleti kot so masivna krvavitev, fulminantni kolitis, toksični megakolon in perforacija črevesa. Pri do 35 % primerov se razvijejo izven črevesna bolezenska znamenja, najpogostejše so prizadeti sklepi, koža, sluznica in oči (11, 13, 20).

## 1.2.2. Crohnova bolezen

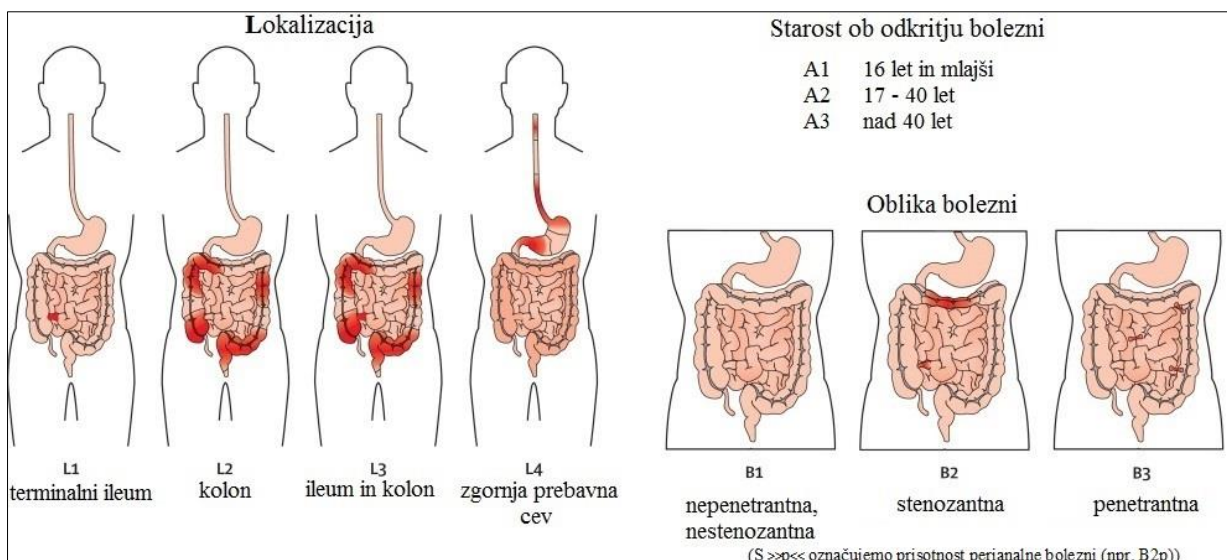
Pri CB se vnetne aktivnosti najpogostejše pojavljajo v terminalnem delu ozkega črevesa in v širokem črevesu, vendar pa lahko bolezen zajame celotno prebavno cev od ust do zadnjika. Vnetje se širi vzdolž prebavne cevi neprekinjeno ali s presledki in običajno zajame vse sloje črevesne stene ter prodre tudi v sosednje organe. Sluznica postane zadebeljena, črevesna svetlina se zoži, razjede pa lahko prodirajo v podsluznico in mišični sloj. Poveča se število vnetnih celic v skoraj vseh plasteh črevesne stene. Nevtrofilci prehajajo iz cirkulacije v sluznico, prodrejo v črevesni epitelij in povzročajo vnetje imenovano kriptitis. Kopičenje nevtrofilcev v svetlini kript vodi do kriptnih abscesov.

Skupki makrofagov pa tvorijo granulome (slika 6). Z nastankom globokih fisur se tvorijo fistule po katerih se vnetje razširi tudi v sosednje organe: kožo, nožnico in sečni mehur (11, 20).



**Slika 6:** Crohnova bolezen z zapleti (23, 24)

Klinični potek CB je med bolniki različen, spreminja se s trajanjem bolezni, poteka s ponavljajočimi vnetnimi zagoni in vodi v zaplete. Pojavlja se dlje trajajoča driska, krčevita bolečina v trebuhu, utrujenost, hujšanje in blago povišana temperatura. Klinične značilnosti CB so odvisne od lokalizacije, intenzivnosti in razširjenosti vnetnega dogajanja, opredeljuje jih Montrealska klasifikacija na osnovi starosti ob odkritju bolezni, lokalizaciji in obliki bolezni (slika 7). Tudi pri CB se razvijejo izven črevesna bolezenska znamenja s prizadetostjo kože, sluznice, oči in sklepov (11, 13, 14).



**Slika 7:** Razdelitev Crohnove bolezni (Montrealska klasifikacija) (25)

### 1.3. DIAGNOSTIČNE PREISKAVE PRI KVČB

Z diagnostičnimi preiskavami izključujemo druge bolezni s podobnimi simptomi in znaki ter potrjujemo in razvrstimo KVČB v skupino UK, CB, IK ali MK. Odkrivamo morebitne zaplete, ocenjujemo vnetno aktivnost, uspeh zdravljenja in napoved poslabšanja bolezni. Pri tem se poleg anamneze in kliničnega pregleda poslužujemo še laboratorijskih, endoskopskih, slikovnih in histoloških preiskav (14).

#### 1.3.1. Endoskopija s histologijo

Najpomembnejša diagnostična preiskava je endoskopija s katero lahko že makroskopsko na podlagi razporeditve, oblike, intenzivnosti in obsega poškodb na črevesni sluznici ločimo CB in UK. Z rektosigmoidoskopijo pregledamo danko in esasti del črevesa, s koloileoskopijo pa celotno široko črevo in končni del tankega črevesa. S preiskavo ne moremo razlikovati KVČB od vnetja povzročenega zaradi okužb z mikroorganizmi. Preiskavi nista primerni pri hudem akutnem zagonu bolezni in toksičnem megakolonu. Ob endoskopski preiskavi z biopsijskimi kleščami odvzamemo tudi vzorce tkiva za histološko preiskavo. Histološka preiskava nam omogoča določitev mikroskopskih značilnosti KVČB ter ločitev bolezni med posameznimi oblikami. Prikažemo stopnjo aktivnosti vnetja in

morebitno displazijo pri dolgoletni bolezni. Pri histološkem pregledu so vidni granulomi, kriptni abscesi, lažni polipi in limfni folikli. Za podrobnejšo opredelitev bolezni je pogostokrat potrebna kirurška odstranitev dela črevesa. Histološka preiskava je potrebna tudi pri diagnozi in razlikovanju kolagenskega in limfocitnega MK (11, 14, 16).

### **1.3.2. Slikovne preiskave**

Ko ocena razširjenosti bolezni z endoskopijo ni mogoča, uporabljamo slikovne preiskave. Poslužujemo se jih predvsem za odkrivanje bolezni v ozkem črevesu in v zgornji prebavni cevi ter zapletov kot so stenoze, fistule, abscesi, bezgavke, zožitve črevesne svetline in perianalne zaplete. Preiskave so hitre, primerne ob akutnem zagonu bolezni, specifične in občutljive, vendar nekatere manj dostopne z dolgimi čakalnimi dobami in drage. Med slikovne preiskave sodijo RTG slikanje trebuha, jejunoileografija (RTG kontrastna preiskava), magnetno resonančna enterografija (MRE), CT enterografija (CTE), MR medenice, transabdominalni ultrazvok, endoskopski ultrazvok (EUZ) in kapsularna endoskopija. MRE je najbolj zanesljiva slikovna preiskava. Zaradi odsotnosti sevanja, visoke kontrastne in prostorske ločljivosti ima velik pomen pri postavitvi diagnoze in sledenju bolnikov s CB (14, 16, 26).

### **1.3.3. Laboratorijske preiskave**

Laboratorijske preiskave so nespecifične, vendar nam omogočajo vpogled v splošno bolnikovo stanje, razširjenost in intenzivnost vnetnega dogajanja, uspešnost zdravljenja ter napoved poslabšanja bolezni. Povišane so vrednosti označevalcev akutnega vnetja: C – reaktivnega proteina (CRP), hitrost eritrocitne sedimentacije (SR), orosomukoida ter število levkocitov in trombocitov, vendar zgolj nakazujejo aktivno vnetno dogajanje pri že ugotovljeni bolezni. Povišana vrednost CRP in SR je bolj izražena pri akutnem vnetju debelega črevesa in manj tankega črevesja ter prisotna v večji meri pri CB in manj pri UK. Ob akutnem zagonu KVČB najdemo v plazmi bolnikov tudi povišane vrednosti proteinov komplementnega, koagulacijskega in fibrinolitičnega sistema, antiproteaze ter transportne proteine (ceruloplazmin, haptoglobulin). Pri bolnikih z dlje trajajočo boleznijo v odvisnosti od oblike bolezni ter prisotnih zapletov so v plazmi lahko znižani albumini, transferin,  $\alpha$ -

fetoproteini in elektroliti, kot posledica krvavitev, malabsorpcije železa, vitamina B<sub>12</sub>, folatov in aminokislin ter izgub skozi vneto sluznico (11, 16, 27).

Pri bolnikih z UK so v serumu prisotna pANCA (perinuklearna antinevtrofilna citoplazemska protitelesa), pri CB pa ASCA (anti-Saccharomyces cerevisiae protitelesa). Zaradi visoke specifičnosti in nizke občutljivosti se določevanje navedenih protiteles za postavitev diagnoze CB in UK priporoča le kot dopolnilo k utečenim diagnostičnim metodam, pri težjem razlikovanju med UK in CB ter predvsem pri otroški populaciji, kjer sta občutljivost in specifičnost višji (70 % in 93 %) (16).

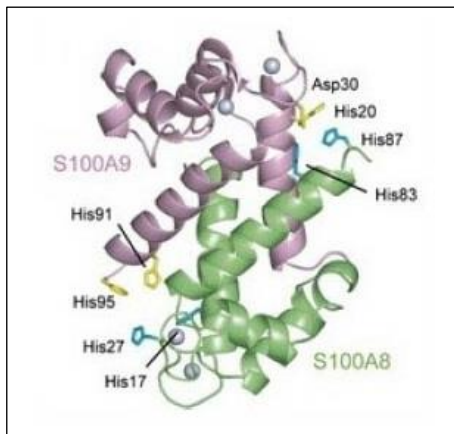
Za ločevanje KVČB od infekcijskega kolitisa določujemo v vzorcu blata patogene bakterije, viruse, parazite in toksine. Z blatom se izločajo tudi levkociti, serumski proteini in produkti levkocitov. Med fekalne označevalce, ki jih zadnja leta navaja strokovna literatura sodijo kalprotektin, laktoferin, fekalna elastaza,  $\alpha_1$ -antitripsin, mieloperoksidaza, lizocim in z indijem označeni fekalni levkociti. Za oceno in spremljanje vnetnega procesa pri KVČB se je doslej najbolj izkazal kalprotektin (16, 27).

#### **1.3.3.1. Fekalni kalprotektin**

Kalprotektin, imenovan tudi kot L1 protein, MRP8/14 protein, kalgranulin A/B, 27E10 antigen ali kompleks S100A8/S100A9, je 24 kD velik heterodimer (ali 48 kD velik tetramer). Sestavljen je iz dveh proteinskih monomerov iz družine S100, ki imata sposobnost vezave kalcija (slika 8). Vezava kalcija povzroči konformacijsko spremembo proteina iz heterodimera v heterotetramer. Kalprotektin vsebuje tudi histidinski zaporedji, ki vežeta cink in sodelujeta v njegovi antibakterijski dejavnosti (28, 29).

Kalprotektin je citoplazemski protein nevtrofilnih granulocitov (30 – 60 %), monocitov in reaktivnih makrofagov. Sprosti se s stimulacijo celic ali celično smrtjo. V nižjih koncentracijah ga lahko najdemo v plazmi (< 2 mg/l pri zdravi populaciji), urinu, črevesni tekočini in blatu. Povišane vrednosti kalprotektina najdemo pri malignih in vnetnih stanjih, kot so različne bakterijske infekcije, sepsa, meningitis, pljučnica, tuberkuloza, pri revmatoidnem artritisu, okužbah prebavil, aktivni obliki KVČB in gastrointestinalnem raku. Ob akutnem zagonu KVČB večje število nevtrofilnih granulocitov prehaja iz periferne krvi v črevesno sluznico. Po razpadu nevtrofilcev se sprosti kalprotektin, ki ga lahko izmerimo v blatu, kjer je obstojen 7 dni. Fekalni kalprotektin (f-kalp.) se zato

uporablja kot neinvazivni presejalni test pri razlikovanju KVČB od sindroma razdražljivega črevesa ter za spremljanje vnetnega procesa pri KVČB. Določujemo ga s kvantitativnimi ELISA testi ali hitrimi imunološkimi kromatografskimi testi (16, 27, 28).



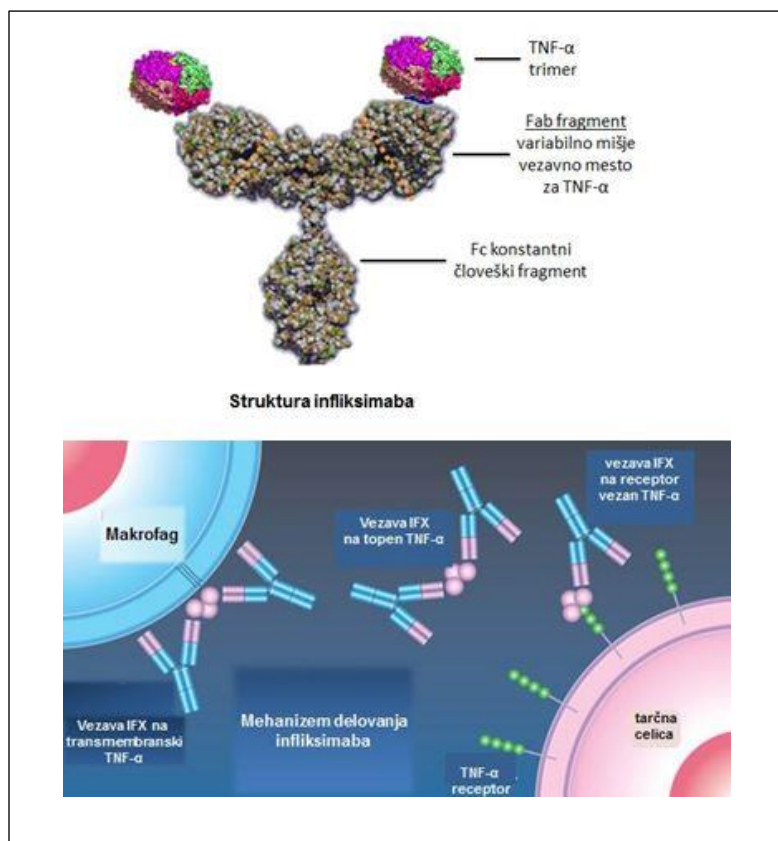
**Slika 8:** Sekundarna struktura kalprotektina (30)

## 1.4. ZDRAVLJENJE KVČB

Cilj zdravljenja KVČB vključuje izboljšanje kliničnih simptomov, klinično remisijo, remisijo brez kortikosteroidov, celjenje črevesne sluznice in histološko remisijo. Pri zdravljenju sledimo veljavnim smernicam Evropske organizacije za Crohnovo bolezen in kolitis. Glede na razširjenost in aktivnost bolezni ter odgovor na zdravljenje uvedemo ustrezen algoritem zdravljenja, da dosežemo načrtovane cilje, zmanjšamo zaplete bolezni, kirurške posege in hospitalizacije ter bolnikom omogočimo normalno kakovost življenja. Zdravila, ki se uporabljajo pri zdravljenju, so 5-aminosalicilati (sulfasalazin, mesalazin), imunomodulatorji (azatioprin, merkaptopurin, metotreksat, ciklosporin), kortikosteroidi (metilprednizolon, budezoid) in biološka zdravila (zaviralci TNF- $\alpha$ : infliksimab, adalimumab) (11, 17).

### 1.4.1. Infliksimab

Infliksimab (IFX) je himerno človeško – mišje IgG1 monoklonsko protitelo, ki vsebuje približno 75 % človeškega proteina in 25 % mišjega. Z veliko afiniteto in specifičnostjo se veže na transmembranske in topne oblike TNF- $\alpha$ , tvori stabilne komplekse in izniči njegovo biološko aktivnost (slika 9). TNF- $\alpha$  je glavni posrednik akutnega vnetnega odziva. Pri nizkih koncentracijah deluje protibakterijsko, pri višjih in dlje trajajočih vnetjih pa vodi do morfoloških sprememb črevesne sluznice. Infliksimab prepreči njegovo vezavo na receptorje TNF- $\alpha$  ter posledično zavre izražanje provnetnih genov, adhezijskih molekul za monocite in nevtrofilce, nastanek ostalih citokinov, kopičenje nevtrofilcev, adhezijo na žilni endotelij ter diferenciacijo vnetnih celic. Hkrati pa sproži apoptozo aktiviranih monocitov in limfocitov T v sluznici prebavne cevi (31, 32).



**Slika 9:** Struktura in mehanizem delovanja infliksimaba (33, 34)

Infliksimab uporabljamo za zdravljenje hude, aktivne Crohnove bolezni, kjer zdravljenje s standardnimi zdravili ni uspešno, za zdravljenje aktivne CB s fistulami in hudih oblik

ulceroznega kolitisa, neodzivnega na običajno zdravljenje. Zdravilo bolniki prejemajo v bolnišnici v intravenskem odmerku 5 mg/kg telesne teže (TT) v 2 – 4 urni infuziji v tednih 0, 2 in 6 za vzpostavitev remisije in nato za vzdrževanje vsakih 8 tednov. Če se učinkovitost zdravila zmanjša, lahko odmerek zdravila zvečamo na 10 mg/kg TT ali zmanjšamo interval med posameznimi zdravljenji. Številne klinične raziskave so dokazale veliko odzivnost na zdravljenje tako pri otrocih, mladostnikih kot tudi odraslih bolnikih. Manjši delež bolnikov pa se na zdravljenje z IFX ne odziva. To so primarno neodzivni bolniki, ki se že na začetku zdravljenja ne odzivajo na IFX, bolniki pri katerih učinek zdravila popušča, nekateri pa razvijejo preobčutljivostne reakcije na IFX. Pri približno 28 % bolnikov, ki prejema IFX, se razvijejo antihimerna protitelesa proti IFX (ATI), ki zmanjšajo učinek zdravljenja in povečajo tveganje za infuzijske reakcije. Neželeni učinki zdravljenja z IFX so lahko infuzijske reakcije, okužbe, pojav avtoimunih protiteles in tveganje za rakave bolezni. Odločitev o uvedbi biološke terapije z IFX sprejema konzilij za KVČB na podlagi sprejetih smernic. Po uvedbi terapije bolnika spremljamo in preverjamo laboratorijske izvide (hemogram, elektroliti, CRP, albumini, jetrni testi, f-kalprotektin), ocenjujemo uspešnost zdravljenja ter po enoletnem zdravljenju izvedemo kontrolno koloileoskopijo. Pri bolnikih s popuščanjem učinka IFX določamo serumsko koncentracijo ATI, vse bolj pa se priporoča tudi določanje koncentracije TNF- $\alpha$  in prostega IFX v serumu bolnikov, ki so na rednem vzdrževalnem zdravljenju z IFX (17, 31, 32, 35).

## 2. IZHODIŠČA IN NAMEN DELA

Cilj zdravljenja KVČB je, da dosežemo popolno zacelitev sluznice, saj imajo bolniki po uvedbi terapije boljši dolgoročni izhod (manj hospitalizacij, operacij in odpovedi črevesa), kot tisti pri katerih popolne zacelitve sluznice ne dosežemo.

Uspešnost zdravljenja ugotavljamo z endoskopskimi preiskavami, ki so invazivne, drage, z možnostjo resnih zapletov (npr. predrtje prebavne cevi) in lahko boleče. Posledično obstaja velika želja po biokemičnem označevalcu, ki bi nadomestil ali vsaj zmanjšal število endoskopskih preiskav. Kot najboljši biokemični označevalec doslej se je za oceno aktivnosti vnetnega dogajanja pri KVČB izkazal fekalni kalprotektin (36).

Merjenje koncentracije infliksimaba v serumu bolnikov, ki prejemajo terapijo z biološkim zdravilom infliksimab, bi utegnila biti nov označevalec za oceno aktivnosti vnetja in spremljanje uspešnosti zdravljenja pri bolnikih s KVČB.

Namen naloge je ugotoviti, ali obstaja medsebojna povezanost med vrednostmi IFX in f-kalprotektinom ter ugotoviti ali lahko z določeno koncentracijo IFX ločimo med bolniki z aktivno boleznijo (povišan f-kalp.) in remisijo (negativni in mejni rezultati f-kalp.).

Primerjave bomo ugotavljali na celotni preiskovani skupini bolnikov s KVČB ter na skupini bolnikov z UK in CB.

Hipoteze:

1. Med koncentracijo IFX in f-kalprotektinom obstaja negativna korelacija: bolniki z nizkim f-kalprotektinom imajo višje koncentracije IFX in obratno
2. Med bolniki z UK in CB obstajajo razlike povprečnih vrednostih IFX
3. Obstaja mejna vrednost IFX, ki loči med bolniki z aktivno boleznijo in remisijo

### 3. MATERIALI IN METODE

#### 3.1. VZORCI IN POPULACIJA

Na Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana prejema 286 bolnikov s KVČB vzdrževalno zdravljenje z IFX. Iz elektronske baze Kliničnega oddelka za gastroenterologijo smo pridobili klinične podatke 88 bolnikov (skupno 102 vzorca), ki so imeli znotraj 60 dni, v obdobju od leta 2013 do 2015, sočasno izmerjeno koncentracijo IFX v serumu in f- kalp. v blatu. Klinični podatki zajemajo spol in starost bolnikov ter vrsto KVČB v času preiskave. Raziskava je zajela 52 bolnikov moškega in 36 ženskega spola v starosti od 19 do 75 let.

Število in delež vzorcev 88 bolnikov glede na vrsto KVČB:

**Preglednica I:** Število in delež vzorcev 88 bolnikov glede na vrsto KVČB

| vrsta KVČB             | št. vzorcev (delež) | št. bolnikov (delež) |
|------------------------|---------------------|----------------------|
| <b>CB</b>              | 38 (37,3 %)         | 32 (36,4 %)          |
| <b>UK</b>              | 42 (41,2 %)         | 35 (39,8 %)          |
| <b>IK</b>              | 10 (9,8 %)          | 9 (10,2 %)           |
| <b>ni podatka (np)</b> | 12 (11,8 %)         | 12 (13,6 %)          |

Vzorci venske krvi so bili odvzeti pred aplikacijo IFX v epruvete z aktivatorjem strjevanja in ločitvenim gelom. Vzorci seruma (najmanj 200 µl) so bili po centrifugiranju venske krvi (10 min. pri 1960 obr./min) preneseni v označen vsebnik ter do pošiljanja v analizo shranjeni na - 20 °C. V analizo so bili odposlani na suhem ledu (od ponedeljka do srede) s priloženim identifikacijskim dokumentom (37). Meritve koncentracije IFX v serumu, ki smo jih uporabili pri statistični analizi, so bile narejene z IFX ELISA - Leuven metodo v Laboratoriju na Univerzi v Leuvnu v Belgiji.

Za določitev f-kalp. so bili odvzeti vzorci prvega jutranjega blata in do analize shranjeni na 2 – 8 °C (do 6 dni). Vrednosti f-kalp. so bile v 37 vzorcih določene s kvantitativnim imunološkim hitrim testom Quantum Blue<sup>®</sup> (38) in v 65 vzorcih z ELISA metodo

Calprest® (39), na Kliničnem oddelku za gastroenterologijo in Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo, Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani.

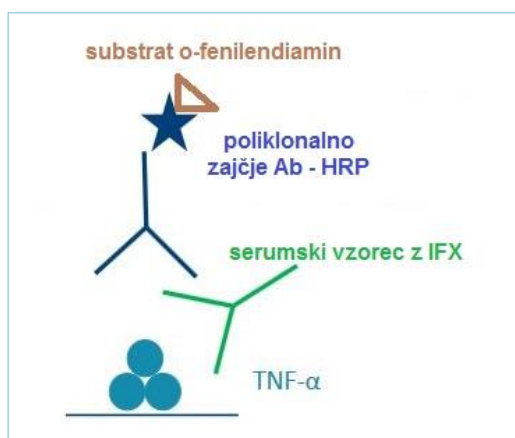
V okviru večjega raziskovalnega projekta na Kliničnem oddelku za gastroenterologijo in hepatologijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, je bilo s strani Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko, pridobljeno etično sprejemljivo pozitivno mnenje (soglasje št. 45/5/14 podano na 13. seji, maja 2014) za pridobitev vzorcev bolnikov s KVČB za analizo IFX. Fekalni vzorci so bili pridobljeni iz redne diagnostike in spremljanja bolezni.

## 3.2. DOLOČANJE KONCENTRACIJE IFX

Koncentracija IFX je bila izmerjena z optimizirano in ovrednoteno ELISA metodo, razvito v Laboratoriju za terapevtska in diagnostična protitelesa na Univerzi v Leuvnu v Belgiji.

### 3.2.1. Princip metode

IFX ELISA – Leuven je indirektna encimsko imunska metoda na trdnem nosilcu, pri kateri so vdolbine na mikrotitrski plošči prekrivane z rekombinantnim TNF- $\alpha$ . Nanj se specifično veže IFX iz seruma bolnikov. Sekundarno monospecifično poliklonalno zajčje protiteleso označeno s hrenovo peroksidazo (HRP) se veže na pritrjen IFX iz seruma bolnikov. Po dodatku substrata o-fenilendiamina / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> poteka reakcija s hrenovo peroksidazo, vezano v konjugatu s sekundarnim protitelesom (slika 10). Količina nastalega oksidirane o-fenilendiamina je premo sorazmerna koncentraciji IFX prisotnega v vzorcu. Intenziteto nastalega obarvanega kompleksa določamo spektrofotometrično pri valovni dolžini 490 nm (40, 41).



**Slika 10:** Princip IFX ELISA – Leuven metode – shematski prikaz (41)

### 3.2.2. Materiali

- rekombinantni TNF- $\alpha$  (PreproTech, London, UK),
- izotonični fosfatni pufer (PBS) za spiranje,
- 1 % goveji serumski albumin (BSA) (Sigma Aldrich) v PBS za preprečitev nespecifične vezave proteinov iz seruma na ploščico,
- konjugat monospecifičnega zajčjega poliklonalnega Ab in HRP (Leuven, Belgija),
- standard: 75 ng/ml IFX,
- substrat o-fenilendiamin (Acros Organics, Geel, Belgija),
- 0,003 % (v/v) vodikov peroksid,
- 0,1 M natrijev citrat in 0,2 M di-natrijev fosfatni pufer, pH 5,
- 2 M raztopina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> za zaustavitev reakcije,
- mikrotitrne plošče s 96 vdolbinami (Costari; Corning Inc., NY, USA),
- čitalec mikrotitrskih plošč ELx808IU (Bio-tek Instruments Inc.) s stresalnikom in inkubatorjem ter filtri za merjenje valovnih dolžin od 340 – 900 nm,
- pipete in nastavki za pipete (40).

### 3.2.3. Postopek dela

V vdolbine mikrotitrskih plošč nanese rekombinantni TNF- $\alpha$  in pustimo čez noč na 4 °C. Odvečno raztopino odlijemo in speremo nevezan TNF- $\alpha$ . Nanesemo 1 % BSA v PBS in inkubiramo 2 uri na sobni temperaturi. Odlijemo pufer in vdolbinice speremo. Nanesemo serumske vzorce, razredčene v 1 % BSA / PBS in inkubiramo 2 uri na 37 °C. Odvečne vzorce seruma odlijemo in speremo ter nanesemo konjugat monospecifičnega zajčjega poliklonalnega Ab in HRP. Inkubiramo 1 uro na sobni temperaturi in po inkubaciji odlijemo raztopino konjugata ter vdolbinice speremo. Nato nanesemo 400  $\mu$ g/ml substrata o-fenilendiamina in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v 0,1 M natrijevem citratu in 0,2 M di-natrijevem fosfatnem pufru. Reakcijo zaustavimo z 2 M raztopino H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in izmerimo absorbance pri 490 nm z uporabo spektrofotometričnega čitalca mikrotitrskih ploščic. Aparat izriše umeritveno krivuljo in glede na koncentracijo IFX v standardu poda koncentracije IFX v vzorcih (40).

### **3.2.4. Vrednotenje rezultatov**

Spodnja meja detekcije IFX je 0,3 µg/ml in zgornja meja 22,5 µg/ml. Optimalno območje koncentracije IFX v serumu, za oceno njegove učinkovitosti pri kliničnem odzivu, se giblje od 3,0 do 7,0 µg/ml. Pri vrednostih, ki so nižje od 0,3 µg/ml se priporoča merjenje koncentracije ATI (41). Za lažjo statistično obdelavo izmerjenih koncentracij IFX, smo vsem vrednostim IFX ( $n = 26$ ) pod detekcijskim območjem dodelili vrednost 0,3 µg/ml in vsem nad detekcijskim območjem vrednost 12,0 µg/ml.

Glede na navedbo v literaturi (42) smo vrednosti IFX razdelili v tri različne skupine: z nizko ( $< 3,0$  µg/ml), srednjo (3,0 – 7,0 µg/ml) in visoko ( $> 7,0$  µg/ml) koncentracijo.

## **3.3. DOLOČANJE KONCENTRACIJE f-kalp. Z ELISA METODO Calprest<sup>®</sup>**

Calprest<sup>®</sup> je neinvaziven presejalni test za kvantitativno določevanje f-kalp. in omogoča odkrivanje prisotnosti vnetnega procesa na črevesni sluznici. Uporablja se za razlikovanje KVČB od sindroma razdražljivega črevesa ter za spremljanje in oceno uspešnosti zdravljenja KVČB (39).

### **3.3.1. Princip metode**

Calprest<sup>®</sup> je indirektna encimsko imunska metoda na trdnem nosilcu. Kalprotektin iz vzorca se direktno veže na primarno protitelo, vezano na mikrotitrski plošči. Sekundarno poliklonalno zajčje Ab označeno z alkalno fosfatazo se veže na pritrjen f-kalp. iz vzorca. Po dodatku substrata in v prisotnosti encima nastane barvna reakcija, katere intenziteto merimo s spektrofotometričnim čitalcem. Izmerjena absorbanca nastale barvne reakcije je premosorazmerna količini f-kalp. prisotnega v vzorcu. Koncentracijo f-kalp. v vzorcu izračunamo s pomočjo umeritvene krivulje šestih standardov (39).

### 3.3.2. Materiali

Testni komplet Calprest<sup>®</sup>, proizvajalca Eurospital (Eurospital SpA, Trst) za 96 testov vsebuje:

- mikrotitrne plošče s prevlečenim primarnim poliklonalnim Ab (12 × 8)
- pokrov
- kalibracijske raztopine z znanimi koncentracijami kalprotektina (6 × 1,0 ml)
- kontrolni raztopini (2 × 1,0 ml)
- konjugat – z alkalno fosfatazo označena sekundarna zajčja Ab (1 × 15 ml)
- 2,5 × raztopina za ekstrakcijo (2 × 50 ml)
- 20 × raztopina za spiranje (1 × 50 ml)
- 10 × raztopina za redčenje (1 × 20 ml)
- substrat (1 × 15 ml)

Komplet za zbiranje in ekstrakcijo vzorcev blata proizvajalca Eurospital (Eurospital SpA, Trst) vsebuje 100 kosov epruvet z 2,5 ml ekstrakcijske raztopine in merilno palčko s štirimi radialnimi zarezi za odvzem vzorca blata. Na dnu epruvete se nahaja filter za zbiranje nečistoč, ki ga lahko odstranimo. Merilna palčka je pritrjena na zamašek z navojem. Povprečen volumen preiskovanega vzorca blata je 58 mg, razredčenega z ekstrakcijsko raztopino v razmerju 1:43.

Oba kompleta shranjujemo na temperaturi od 2 – 8 °C ter ju pred uporabo prenesemo na sobno temperaturo (39, 43).

### 3.3.3. Postopek dela

Z merilno palčko, ki jo potopimo v vzorec blata, vzorec prenesemo v epruveto, ki vsebuje ekstrakcijsko raztopino in epruveto zapremo. Vzorec shranjujemo na 2 – 8 °C in ga v 48 urah dostavimo do laboratorija. Na stresalniku vsebino epruvete dobro pretresemo (30 – 60 s) in mešamo še 20 min na stresalniku za epruvete. Postopek stresanja in mešanja še enkrat ponovimo. Epruveto centrifugiramo 5 min pri 3000 obr./min, odlomimo kapico na dnu epruvete ter vsebino prenesemo v čisto epruveto. Vzorec pred analizo še enkrat centrifugiramo, da odstranimo morebitne ostanke fekalnega materiala. Vzorec lahko takoj analiziramo ali pa shranimo do 3 mesece na – 20°C. Preden vzorec vstavimo v

avtomatizirano napravo za izvajanje ELISA postopka, ga razredčimo v razmerju 1:50 z raztopino za redčenje. Vse ostale reagente, potrebne za analizo, ustrezno razredčimo in postavimo v napravo, izberemo ustrezen program in odčitamo rezultate. Pri razredčitvi vzorca 1:50 so dobljeni rezultati f-kalp. v območju med 15,6 in 500 µg/g vzorca. Če so pričakovane vrednosti kalprotektina višje, vzorce ustrezno redčimo in redčitev upoštevamo pri izračunu (39, 43).

### 3.3.4. Vrednotenje rezultatov

Proizvajalec navaja 95 % diagnostično občutljivost, 93 % diagnostično specifičnost in 98 % negativno napovedno vrednost testa. Izmerjene koncentracije f-kalp. podamo glede na rezultat s pozitivno, mejno in negativno vrednostjo in rezultate ovrednotimo glede na prisotnost oz. odsotnost vnetja (38).

**Preglednica II:** Podajanje in vrednotenje rezultatov testa CP (38)

| <b>koncentracija f-kalp. [µg/g]</b> | <b>rezultat</b>    | <b>vrednotenje rezultata</b> |
|-------------------------------------|--------------------|------------------------------|
| < 50                                | negativna vrednost | brez vnetja                  |
| 50 - 100                            | mejna vrednost     | šibko vnetje                 |
| > 100                               | pozitivna vrednost | akutno vnetje                |

## 3.4. DOLOČANJE KONCENTRACIJE f-kalp. S Quantum Blue<sup>®</sup> TESTOM

Quantum Blue<sup>®</sup> je hitri imunološki kromatografski test za kvantitativno določanje f-kalp. v vzorcih blata z uporabo Quantum Blue<sup>®</sup> čitalca. Hitri test je kalibriran z fCAL<sup>™</sup> ELISA metodo (Bühlmann). Namenjen je razlikovanju KVČB od sindroma razdražljivega črevesa ter za spremljanje in oceno uspešnosti zdravljenja KVČB (44, 45).

### 3.4.1. Princip metode

Monoklonalno Ab, visoko specifično za kalprotektin je pritrjeno na reakcijsko membrano testne ploščice. Sekundarno detekcijsko monoklonalno Ab konjugirano z koloidnim zlatom, se po dodatku razredčenega vzorca in delovanju kapilarnega vleka, sprostí na reakcijsko plast. Kalprotektin iz vzorca se veže s sekundarnim Ab konjugiranim z koloidnim zlatom, nastali kompleks pa se po sprostitvi veže na monoklonalno Ab pritrjeno na reakcijsko membrano (testna linija). Nevezano sekundarno Ab se veže z kozjimi – proti mišjimi Ab na kontrolni membrani (kontrolna linija). Intenziteto nastalega produkta na testni in kontrolni liniji se kvantitativno izmeri z namenskim čitalcem. Čitalec izračuna koncentracijo f-kalp. v vzorcu s pomočjo umeritvene krivulje, na podlagi 10 kalibracijskih točk petih različnih vzorcev blata znane koncentracije (44).

### 3.4.2. Materiali

- Testni komplet Quantum Blue<sup>®</sup>, proizvajalca Bühlmann (Bühlmann Laboratories AG, Schönenbuch, Švica) za 25 testov:
  - 25 vakuumsko pakiranih testnih ploščic,
  - 125 ml ekstrakcijskega pufra pripravljenega za uporabo,
  - RFID kartica (radiofrekvenčna identifikacijska kartica) za uskladitev čitalca in testnega kompleta
- Komplet dveh kontrol (2 × 0,5 ml) z nizko in visoko vsebnostjo f-kalp.
- Komplet za zbiranje in ekstrakcijo vzorcev blata Smart – Prep, proizvajalca Bühlmann:
  - 50 epruvet,
  - 50 kapic za nanos vzorca,
  - 10 × 5 lopatic
- Stresalnik za epruvete
- Pipete z nastavki (10 – 200 µl in 1 ml)
- Centrifuga za mikroepruvete
- Epruvete
- Quantum Blue<sup>®</sup> čitalec proizvajalca Bühlmann

Testni komplet in kontrole shranjujemo na temperaturi od 2 – 8 °C in pred analizo prenesemo na sobno temperaturo (44).

### 3.4.3. Postopek dela

Za ekstrakcijo in pripravo vzorca za analizo potrebujemo manj kot 1 g vzorca blata. Vzorce zbiramo v sterilne lončke za blato in jih lahko do priprave za testiranje hranimo na 2 – 8 °C do 6 dni. Za daljše shranjevanje pripravimo ekstrakt in ga hranimo 7 dni na 2 – 8 °C ali 24 mesecev na -20 °C (44).

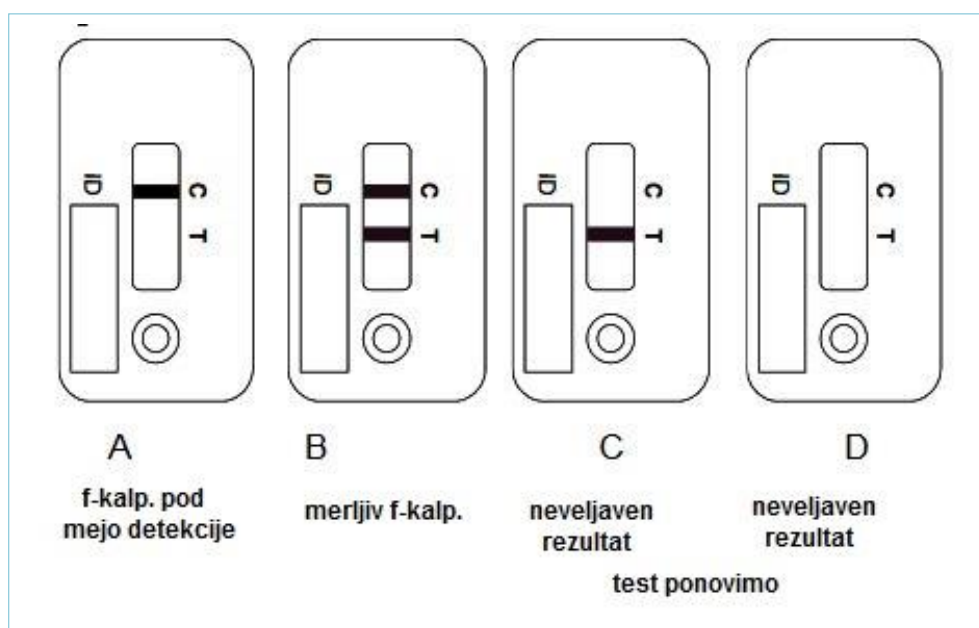
Priprava vzorca blata za analizo: s pomočjo lopatice in kapice, iz kompleta za zbiranje in pripravo vzorcev blata Smart – prep, odvajamo z odtisom vzorec blata. Kapico namestimo na dno priložene epruvete in dodamo 4 ml ekstrakcijskega pufra. Epruveto zamašimo in vzorec homogeniziramo 1 minuto, s stresanjem na stresalniku za epruvete, dokler ni vidnih večjih delcev. Vzorce blata z večjo gostoto pred homogenizacijo pustimo stati od 10 – 15 min v ekstrakcijskem pufu. Ekstrakt vzorca prenesemo v sterilno epruveto in centrifugiramo 5 min pri 3000 obr./min ter supernatant odpipetiramo v sterilno mikroeprevetko. Vzorce lahko centrifugiramo pred ali po razredčenju, vendar morajo biti razredčeni vzorci analizirani v nekaj urah. Nerazredčene ekstrakte vzorcev (supernatant) lahko shranjujemo 7 dni na 2 – 8 °C ali na - 20 °C do 24 mesecev in jih pred uporabo ponovno centrifugiramo (44, 46).

Postopek testiranja: priključimo Quantum Blue<sup>®</sup> čitalec in nastavimo program za določanje f-kalp. z odštevalnikom inkubacijskega časa. Testni komplet prenesemo na sobno temperaturo. Za uskladitev čitalca in testnega kompleta uporabimo RFID kartico. Supernatant razredčimo v razmerju 1:16 s priloženim ekstrakcijskim pufrom (20 µl supernatanta + 300 µl ekstrakcijskega pufra). Pred nanosom vzorca na testno ploščico ga pustimo 5 min na sobni temperaturi, da se stabilizira. Na testno ploščico nanese 60 µl razredčenega vzorca in jo vstavimo v čitalec. Zaženemo program in po približno 12 minutah odčitamo rezultat, ki se izpiše na monitorju. Izmerimo lahko koncentracije v merilnem območju od 30 – 1800 µg/g f-kalp., ki so primerljive z ELISA metodo (44, 45, 47, 48).

### 3.4.4. Vrednotenje rezultatov

Vrednotenje rezultatov na testni ploščici (slika 11):

- kontrolna linija (C) mora biti vidna v vsakem primeru (A in B)
- če testna linija (T) po 12 min inkubacije ni vidna (A), je koncentracija f-kalp. pod mejo določljivosti
- če je testna linija (T) po 12 min inkubacije vidna (B) bo čitalec izračunal koncentracijo f-kalp. v vzorcu
- v primeru C, ko je na testni ploščici vidna samo testna linija (T) in v primeru D, ko ni vidne nobene linije, je rezultat neveljaven in je potrebno test ponoviti na novi testni ploščici (44).



**Slika 11:** Vrednotenje rezultatov na testni ploščici Quantum Blue® (44)

Proizvajalec navaja 84,4 % občutljivost in 94,5 % specifičnost testa. Glede na izmerjeno koncentracijo f-kalp. podamo rezultate z negativno, mejno in pozitivno vrednostjo ter jih ovrednotimo glede na odsotnost oz. prisotnost vnetnega procesa (44).

**Preglednica III:** Podajanje in vrednotenje rezultatov s QB testom (44)

| <b>koncentracija f-kalp. [<math>\mu\text{g/g}</math>]</b> | <b>rezultat</b>    | <b>vrednotenje rezultata</b> |
|-----------------------------------------------------------|--------------------|------------------------------|
| < 50                                                      | negativna vrednost | brez vnetja                  |
| 50 - 200                                                  | mejna vrednost     | šibko vnetje                 |
| > 200                                                     | pozitivna vrednost | akutno vnetje                |

Vsem koncentracijam f-kalp., pod ali nad detekcijskim območjem smo nastavili vrednosti, ki ne vplivajo na interpretacijo in vrednotenje rezultatov, omogočajo pa nam statistično obdelavo. 29 pridobljenim vrednostim f-kalp. pod detekcijskim območjem smo dodelili vrednost 30,0  $\mu\text{g/g}$  in vsem nad detekcijskim območjem vrednost 1000  $\mu\text{g/g}$ .

Vrednosti f-kalp., ki so bile izmerjene z dvema različnima metodama, smo na podlagi virov (45, 49, 50) glede na primerljivost hitrih testov z ELISA metodo za uporabo pri statističnih analizah združili.

### 3.5. STATISTIČNE METODE

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabljali statistični program IBM® SPSS® verzijo 20. Dobljene vrednosti smo prikazali v preglednicah in grafično s kvartilnimi diagrami, histogrami in strukturnimi stolpci. Za posamezen parameter smo izračunali osnovne statistike. Glede na nenormalno porazdelitev naših podatkov smo srednje vrednosti prikazovali z mediano in medkvartilnim razponom (IQR) ter uporabljali neparametrične statistične teste.

Povezanost med vrednostmi IFX in f-kalp. smo ugotavljali s Spearmanovim koeficientom korelacije, razlike med povprečnimi vrednostmi pa z Mann – Whitneyevim U testom. Pri izračunani stopnji značilnosti  $p \leq 0,05$  smo ničelne domneve zavrnili in sprejeli alternativne. Optimalno mejno vrednost IFX za ločevanje med bolniki z aktivno boleznijo (pozitivni rezultati f-kalp.) in remisijo (negativni in mejni rezultati f-kalp.) smo določili s

pomočjo ROC krivulje in Youden-ovega indeksa. Z namenom, da bi test uporabili za odkrivanje prisotne aktivne bolezni, smo določili mejno vrednost IFX tudi pri višji občutljivosti. Izračunana površina pod ROC krivuljo (AUC) nam je podala mero za kvaliteto diagnostičnega testa. Za izračun pogojne diagnostične verjetnosti (pozitivno in negativno napovedno vrednost) smo uporabili standardno kontingenčno tabelo in naslednji enačbi:

$$PNV = \frac{PP}{PP+LP} \qquad NNV = \frac{PN}{PN+LN}$$

Legenda: PP – pravilno pozitiven izid, LP – lažno pozitiven izid, PN – pravilno negativen izid, LN – lažno negativen izid, PNV – pozitivna napovedna vrednost, NNV – negativna napovedna vrednost

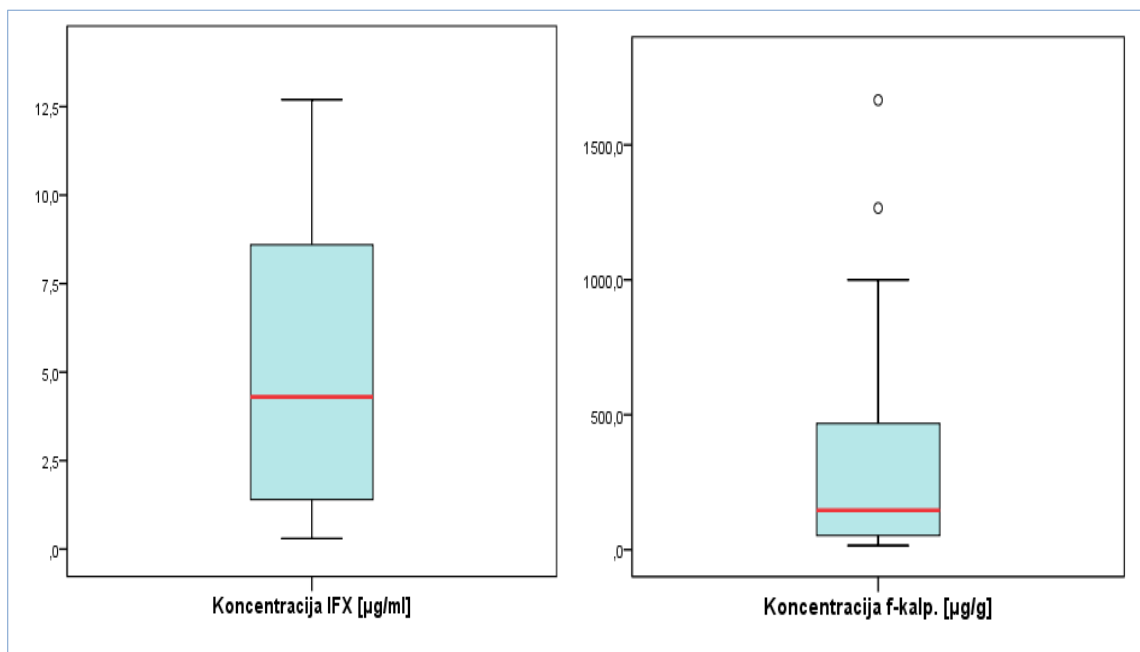
## 4. REZULTATI

### 4.1. OSNOVNA STATISTIČNA ANALIZA

Vse podatke, ki smo jih bodisi pridobili ali poiskali v informacijskem računalniškem sistemu Kliničnega oddelka za gastroenterologijo, smo zbrali in uredili ter so prikazani v Prilogi 1.

#### 4.1.1. Koncentracija IFX in f-kalprotektina

S kvartilnim diagramom smo prikazali razpršenost naših podatkov, izstopajoče vrednosti (krožci), srednjo vrednost mediano (rdeča črta) in IQR (moder pravokotnik) za celotno skupino bolnikov s KVČB (slika 12).

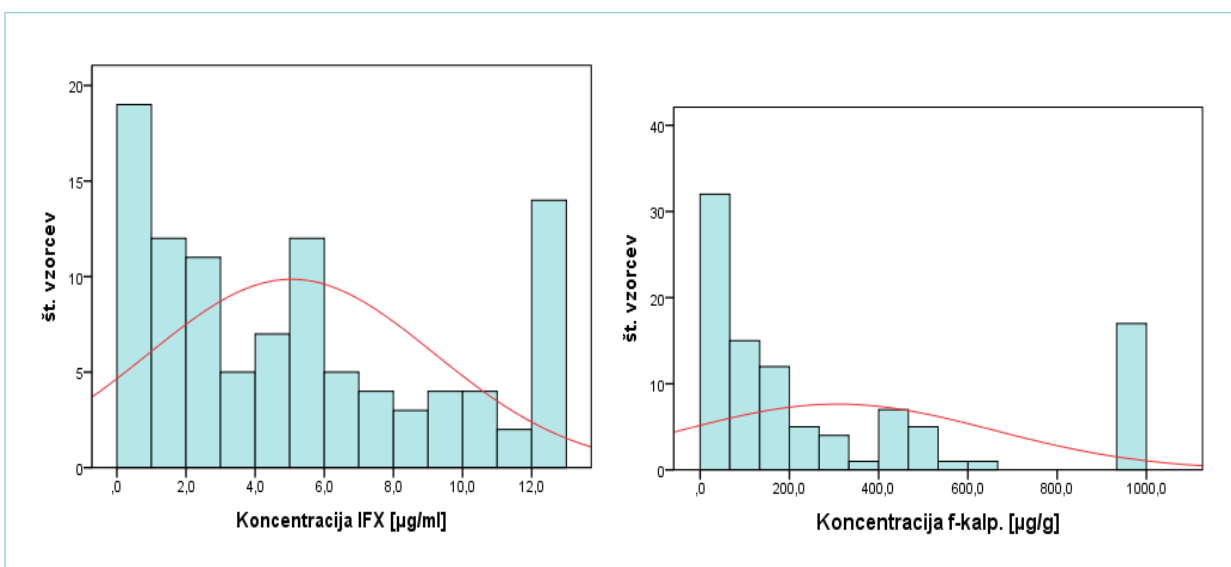


**Slika 12:** Kvartilna diagrama za izmerjene koncentracije IFX in f-kalp. pri vseh bolnikih s KVČB

Opisne statistike za posamezen parameter so prikazane v preglednici IV ter histograma s prikazano krivuljo normalne porazdelitve na sliki 13.

**Preglednica IV:** Opisna statistika za izmerjene konc. IFX in f-kalp. pri vseh bolnikih s KVČB

|                      | Koncentracija IFX [ $\mu\text{g/ml}$ ] | Koncentracija f-kalp. [ $\mu\text{g/g}$ ] |
|----------------------|----------------------------------------|-------------------------------------------|
| Št. vzorcev          | 102                                    | 100                                       |
| Aritmetična sredina  | 5,052                                  | 307,770                                   |
| Standardna deviacija | 4,1260                                 | 348,0929                                  |
| Standardna napaka    | 0,4085                                 | 34,8093                                   |
| Mediana              | 4,30                                   | 145,50                                    |
| IQR razpon           | 1,36 – 8,66                            | 48,55 – 441,80                            |
| Minimum              | 0,3                                    | 16,1                                      |
| Maksimum             | 12,7                                   | 1000,0                                    |
| Skewness             | 0,505                                  | 1,197                                     |
| Shapiro – Wilk (p)   | 0,000                                  | 0,000                                     |



**Slika 13:** Histograma za izmerjene vrednosti IFX in f-kalp. pri vseh bolnikih s KVČB

#### 4.1.2. Vrednosti f-kalp. glede na negativne, mejne in pozitivne rezultate

Podatki o negativnih, mejnih in pozitivnih rezultatih f-kalp. so prikazani z opisno statistiko v preglednici V za celotno skupino bolnikov s KVČB.

**Preglednica V:** Opisna statistika za izmerjene koncentracije f-kalp. glede na rezultate pri vseh bolnikih s KVČB

| Koncentracija f-kalp.<br>[µg/g] | Rezultati f-kalprotektina |             |                |
|---------------------------------|---------------------------|-------------|----------------|
|                                 | negativen                 | mejen       | pozitiven      |
| Št. vzorcev                     | 18                        | 31          | 51             |
| Delež vzorcev                   | 18,0 %                    | 31,0 %      | 51,0 %         |
| Aritmetična sredina             | 31,672                    | 78,097      | 544,822        |
| Standardna deviacija            | 9,5951                    | 44,5557     | 348,1761       |
| Standardna napaka               | 2,2616                    | 8,0024      | 48,7544        |
| Mediana                         | 30,0                      | 69,2        | 430,7          |
| IQR razpon                      | 26,2 – 41,8               | 52,6 – 94,7 | 222,3 – 1000,0 |
| Minimum                         | 16,1                      | 30,0        | 102,6          |
| Maksimum                        | 47,2                      | 182,0       | 1000,0         |
| Skewness                        | 0,115                     | 0,987       | 0,346          |
| Shapiro-Wilk (p)                | 0,125                     | 0,002       | 0,000          |

### 4.1.3. Vrednosti IFX glede na nizke, srednje in visoke koncentracije

Podatki o izmerjenih vrednosti IFX glede na nizko, srednjo in visoko koncentracijo so v preglednici VI prikazani za celotno skupino bolnikov s KVČB.

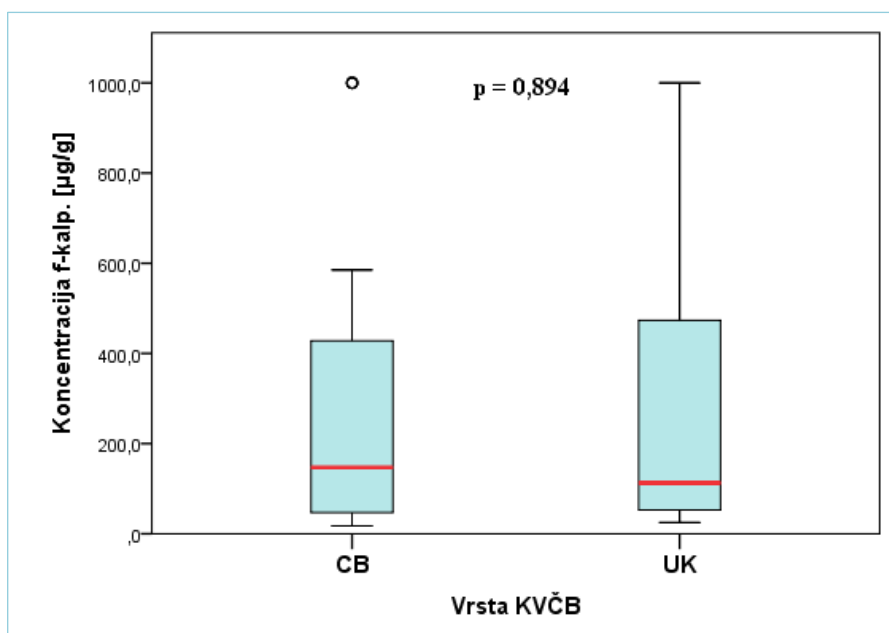
**Preglednica VI:** Opisna statistika za izmerjene nizke, srednje in visoke konc. IFX pri vseh bolnikih s KVČB

|                      | Koncentracija IFX [ $\mu\text{g/ml}$ ] |                     |                |
|----------------------|----------------------------------------|---------------------|----------------|
|                      | nizka (< 3,0)                          | srednja (3,0 – 7,0) | visoka (> 7,0) |
| Št. vzorcev          | 42                                     | 29                  | 31             |
| Delež vzorcev        | 41,2 %                                 | 28,4 %              | 30,4 %         |
| Aritmetična sredina  | 1,124                                  | 4,928               | 10,490         |
| Standardna deviacija | 0,8418                                 | 1,0773              | 1,7562         |
| Standardna napaka    | 0,1299                                 | 0,2001              | 0,3154         |
| Mediana              | 1,1                                    | 5,0                 | 11,0           |
| IQR razpon           | 0,3 – 2,0                              | 4,2 – 5,7           | 9,0 – 12,0     |
| Minimum              | 0,3                                    | 3,1                 | 7,2            |
| Maksimum             | 2,8                                    | 6,7                 | 12,7           |
| Skewness             | 0,501                                  | - 0,110             | - 0,623        |
| Shapiro-Wilk (p)     | 0,000                                  | 0,227               | 0,000          |

## 4.2. PRIMERJAVA VREDNOSTI MED BOLNIKI Z UK IN CB

### 4.2.1. Primerjava koncentracij f-kalp. med UK in CB

Primerjavo koncentracij f-kalp. med bolniki z UK in CB smo prikazali grafično (slika 14) in z izračunanimi statistikami prikazanimi v preglednici XII.



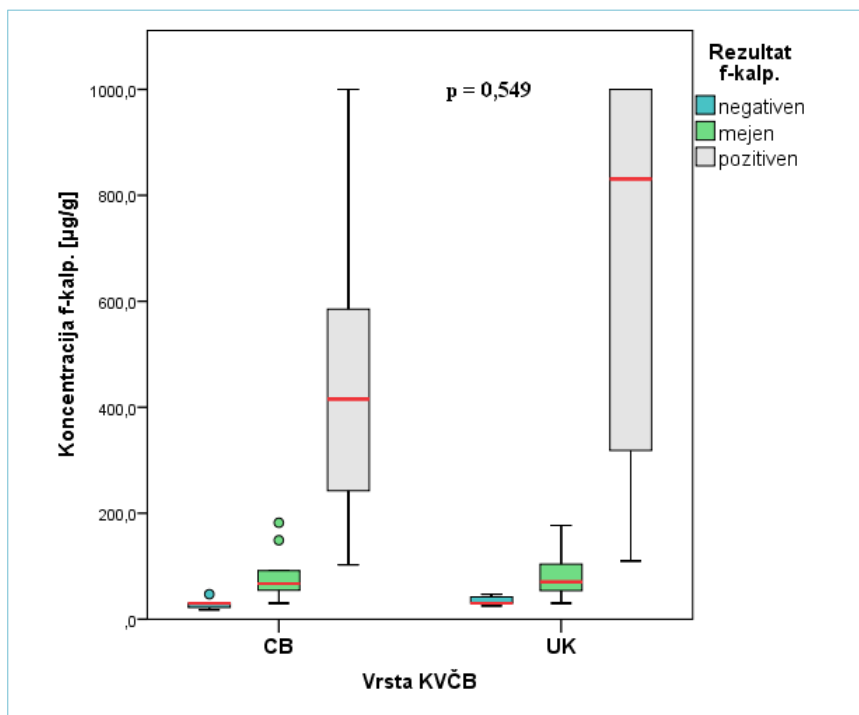
**Slika 14:** Kvartilna diagrama koncentracij f-kalp. pri UK in CB

**Preglednica VII:** Primerjava koncentracij f-kalp. med bolniki z UK in CB

|                      | Koncentracija f-kalp. [µg/g] |                |
|----------------------|------------------------------|----------------|
|                      | UK                           | CB             |
| Št. vzorcev          | 41                           | 38             |
| Mediana              | 113,00                       | 147,35         |
| IQR razpon           | 49,70 – 567,65               | 42,90 – 440,00 |
| Mann – Whitney U (p) | <b>0,894</b>                 |                |

## 4.2.2. Primerjava rezultatov f-kalp. med UK in CB

Negativne, mejne in pozitivne rezultate f-kalp. med bolniki z UK in CB smo prikazali na sliki 15 in v preglednici VIII.



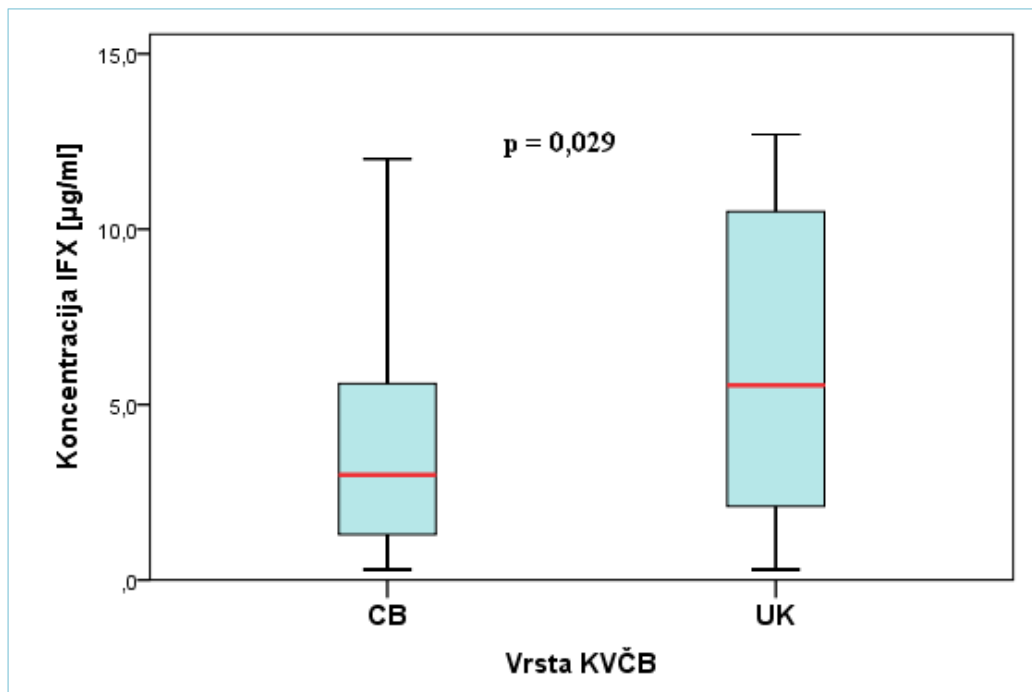
**Slika 15:** Kvartilni diagrami rezultatov f-kalp. pri UK in CB

**Preglednica VIII:** Primerjava rezultatov f-kalp. med bolniki z UK in CB

| vrsta KVČB | rezultat f-kalp. | št. vzorcev | mediana [µg/g] | IQR razpon [µg/g] | Mann-Whitney U test (p) |
|------------|------------------|-------------|----------------|-------------------|-------------------------|
| <b>UK</b>  | negativen        | 7           | 30,00          | 30,00 – 41,90     | <b>0,549</b>            |
|            | mejen            | 16          | 70,40          | 53,30 – 108,43    |                         |
|            | pozitiven        | 18          | 831,00         | 294,53 – 1000,00  |                         |
| <b>CB</b>  | negativen        | 8           | 29,70          | 20,13 – 30,00     |                         |
|            | mejen            | 9           | 67,10          | 42,25 – 120,30    |                         |
|            | pozitiven        | 21          | 415,50         | 230,95 – 792,50   |                         |

### 4.2.3. Primerjava koncentracij IFX med UK in CB

Primerjavo koncentracij IFX med bolniki z UK in CB prikazujemo s kvartilnima diagramoma (slika 16) in z osnovno statistiko (preglednica IX).



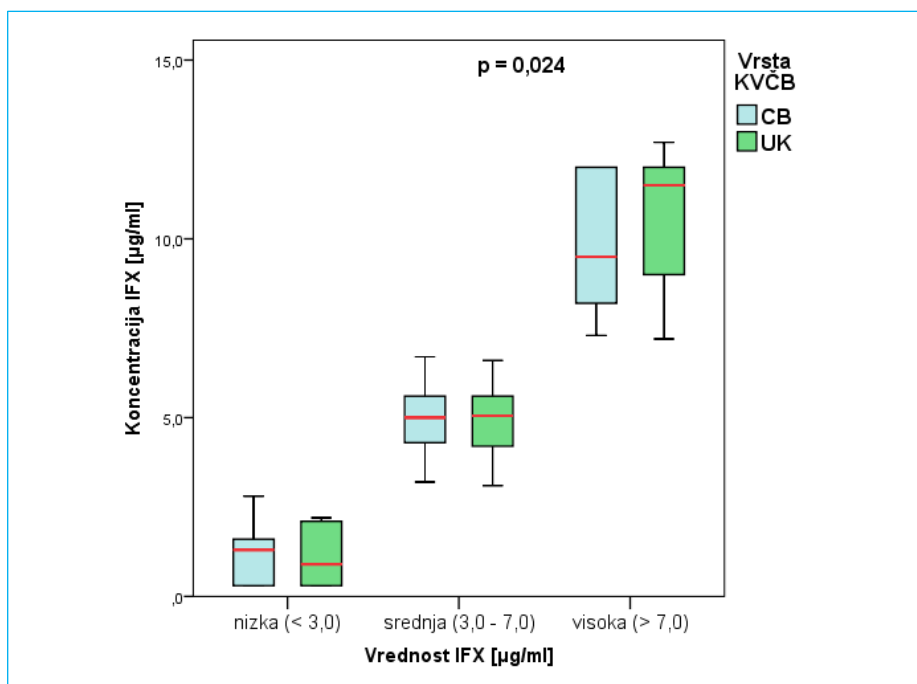
**Slika 16:** Kvartilna diagrama koncentracij IFX pri UK in CB

**Preglednica IX:** Primerjava koncentracij IFX med bolniki z UK in CB

|                      | Koncentracija IFX [µg/ml] |             |
|----------------------|---------------------------|-------------|
|                      | UK                        | CB          |
| Št. vzorcev          | 42                        | 38          |
| Mediana              | 5,55                      | 3,00        |
| IQR razpon           | 2,06 – 10,63              | 1,23 – 5,60 |
| Mann – Whitney U (p) | <b>0,029</b>              |             |

#### 4.2.4. Primerjava nizke, srednje in visoke konc. IFX med UK in CB

Slika 17 in preglednica X prikazuje primerjavo nizkih ( $< 3,0 \mu\text{g/ml}$ ), srednjih ( $3,0 - 7,0 \mu\text{g/ml}$ ) in visokih ( $> 7,0 \mu\text{g/ml}$ ) koncentracij IFX med bolniki z UK in CB.



**Slika 17:** Kvartilni diagrami nizkih, srednjih in visokih konc. IFX pri UK in CB

**Preglednica X:** Primerjava nizke, srednje in visoke konc. IFX med bolniki z UK in CB

| vrsta<br>KVČB | koncentracija<br>IFX | št.<br>vzorcev | mediana<br>[ $\mu\text{g/ml}$ ] | IQR razpon<br>[ $\mu\text{g/ml}$ ] | Mann-Whitney U<br>test (p) |
|---------------|----------------------|----------------|---------------------------------|------------------------------------|----------------------------|
| <b>UK</b>     | nizka                | 14             | 0,90                            | 0,30 – 2,10                        | <b>0,024</b>               |
|               | srednja              | 10             | 5,05                            | 4,18 – 5,68                        |                            |
|               | visoka               | 18             | 11,50                           | 8,98 – 12,00                       |                            |
| <b>CB</b>     | nizka                | 19             | 1,30                            | 0,30 – 1,70                        |                            |
|               | srednja              | 13             | 5,00                            | 3,95 – 5,60                        |                            |
|               | visoka               | 6              | 9,50                            | 7,98 – 12,00                       |                            |

### 4.3. POVEZANOST MED VREDNOSTMI IFX IN f-kalp.

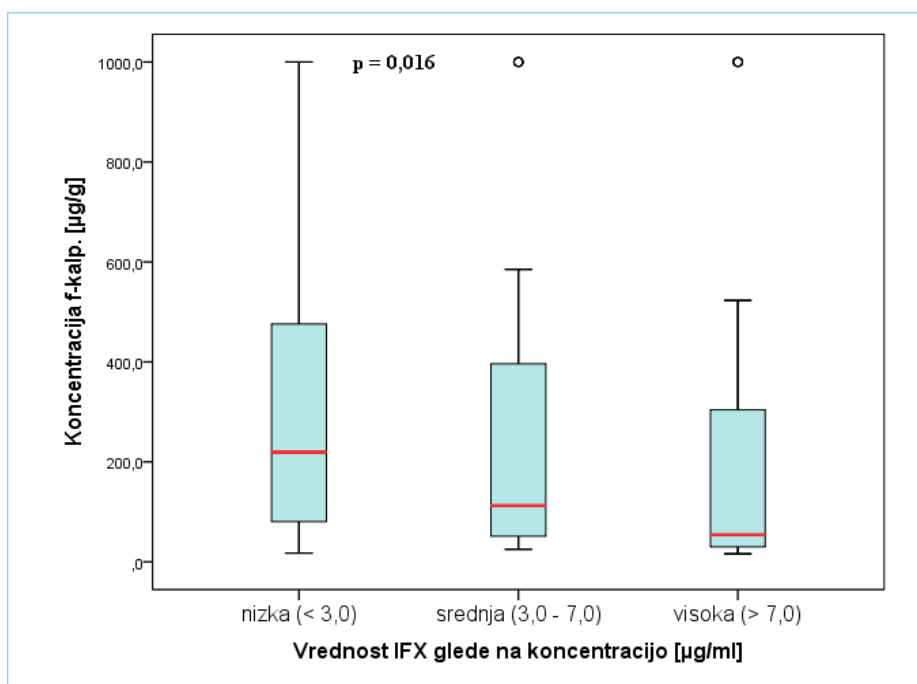
#### 4.3.1. Povezanost med koncentracijo f-kalp. in vrednostjo IFX

Medsebojno povezanost med koncentracijo f-kalp. in vrednostjo IFX pri nizki, srednji in visoki koncentraciji smo prikazali v preglednicah in grafično.

##### 4.3.1.1. Na celotni skupini bolnikov s KVČB

**Preglednica XI:** Konc. f-kalp. pri nizki, srednji in visoki konc. IFX za vse bolnike s KVČB

| koncentracija f-kalp.<br>[μg/g] | vrednost IFX [μg/ml] |                     |                |
|---------------------------------|----------------------|---------------------|----------------|
|                                 | nizka (< 3,0)        | srednja (3,0 – 7,0) | visoka (> 7,0) |
| Št. vzorcev                     | 41 / 100             | 28 / 100            | 31 / 100       |
| Delež vzorcev                   | 41,0 %               | 28,0 %              | 31,0 %         |
| Mediana f-kalp. [μg/g]          | <b>219,4</b>         | <b>112,8</b>        | <b>55,4</b>    |
| IQR [μg/g]                      | 77,3 – 569,0         | 49,0 – 413,5        | 30,0 – 318,6   |



**Slika 18:** Kvartilni diagrami konc. f-kalp. pri nizki, srednji in visoki konc. IFX za vse bolnike s KVČB

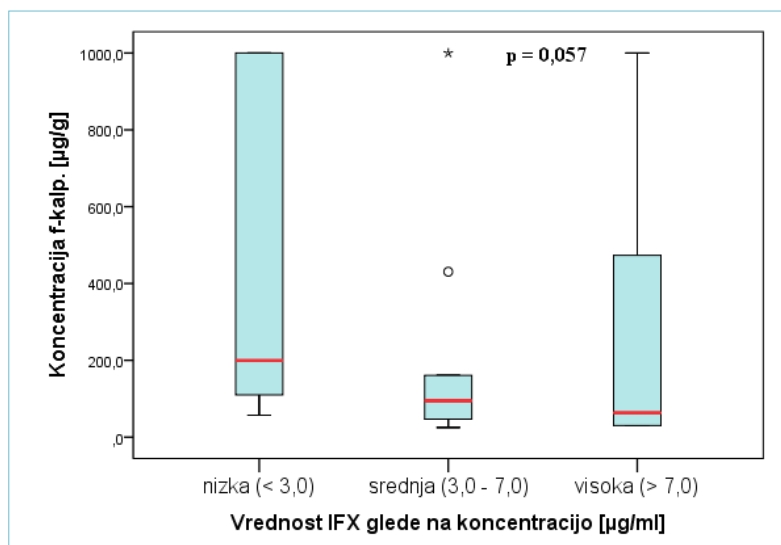
**Preglednica XII:** Spearmanov test korelacije med konc. f-kalp. in vrednostjo IFX za vse bolnike s KVČB

| KVČB                                                                | koncentracija f-kalp. / vrednost IFX |
|---------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| Spearmanov koeficient korelacije                                    | <b>- 0,240*</b>                      |
| p (stopnja značilnosti)                                             | <b>0,016</b>                         |
| št. vzorcev                                                         | 100                                  |
| *Korelacija je signifikantna pri stopnji tveganja 0,05 (2-stransko) |                                      |

#### 4.3.1.2. Na skupini bolnikov z ulceroznim kolitisom

**Preglednica XIII:** Koncentracija f-kalp. pri nizki, srednji in visoki konc. IFX za bolnike z UK

| koncentracija f-kalp.<br>[μg/g] | vrednost IFX [μg/ml] |                     |                |
|---------------------------------|----------------------|---------------------|----------------|
|                                 | nizka (< 3,0)        | srednja (3,0 – 7,0) | visoka (> 7,0) |
| Št. vzorcev                     | 14 / 41              | 9 / 41              | 18 / 41        |
| Delež vzorcev                   | 34,1 %               | 22,0 %              | 43,9 %         |
| Mediana f-kalp. [μg/g]          | <b>199,7</b>         | <b>94,7</b>         | <b>63,5</b>    |
| IQR [μg/g]                      | 102,6 – 1000,0       | 38,4 – 295,8        | 30,0 – 605,0   |



**Slika 19:** Kvartilni diagrami konc. f-kalp. pri nizki, srednji in visoki konc. IFX za bolnike z UK

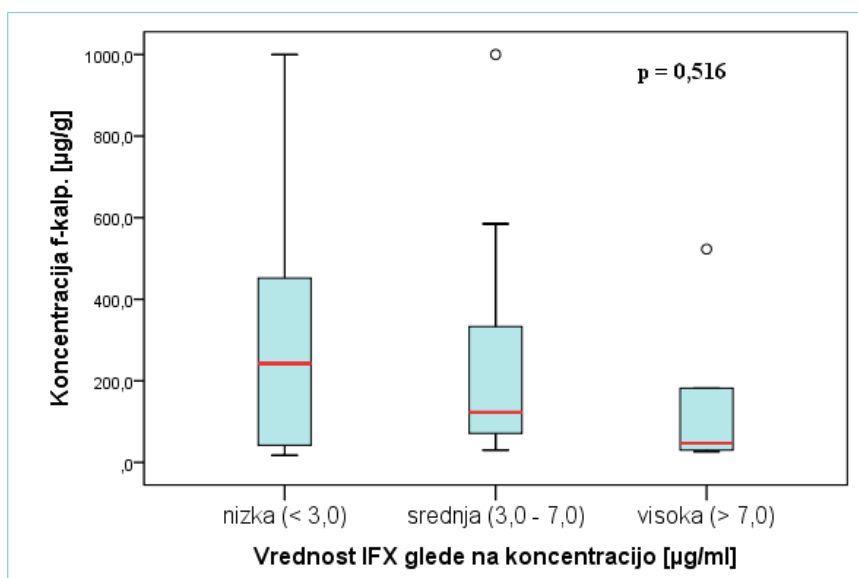
**Preglednica XIV:** Spearmanov test korelacije med konc. f-kalp. in vrednostjo IFX za bolnike z UK

| UK                               | koncentracija f-kalp. / vrednost IFX |
|----------------------------------|--------------------------------------|
| Spearmanov koeficient korelacije | <b>- 0,300</b>                       |
| p (stopnja značilnosti)          | <b>0,057</b>                         |
| št. vzorcev                      | 41                                   |

#### 4.3.1.3. Na skupini bolnikov s Crohnovo boleznijo

**Preglednica XV:** Koncentracija f-kalp. pri nizki, srednji in visoki konc. IFX za bolnike s CB

| koncentracija f-kalp.<br>[μg/g] | vrednost IFX [μg/ml] |                     |                |
|---------------------------------|----------------------|---------------------|----------------|
|                                 | nizka (< 3,0)        | srednja (3,0 – 7,0) | visoka (> 7,0) |
| Št. vzorcev                     | 19 / 38              | 13 / 38             | 6 / 38         |
| Delež vzorcev                   | 50,0 %               | 34,2 %              | 15,8 %         |
| Mediana f-kalp. [μg/g]          | <b>242,5</b>         | <b>122,9</b>        | <b>114,6</b>   |
| IQR [μg/g]                      | 30,0 – 476,0         | 63,6 – 347,5        | 29,1 – 492,3   |



**Slika 20:** Kvartilni diagrami konc. f-kalp. pri nizki, srednji in visoki konc. IFX za bolnike s CB

**Preglednica XVI:** Spearmanov test korelacije med konc. f-kalp. in vrednostjo IFX za bolnike s CB

| <b>CB</b>                        | <b>koncentracija f-kalp. / vrednost IFX</b> |
|----------------------------------|---------------------------------------------|
| Spearmanov koeficient korelacije | <b>- 0,109</b>                              |
| p (stopnja značilnosti)          | <b>0,516</b>                                |
| št. vzorcev                      | 38                                          |

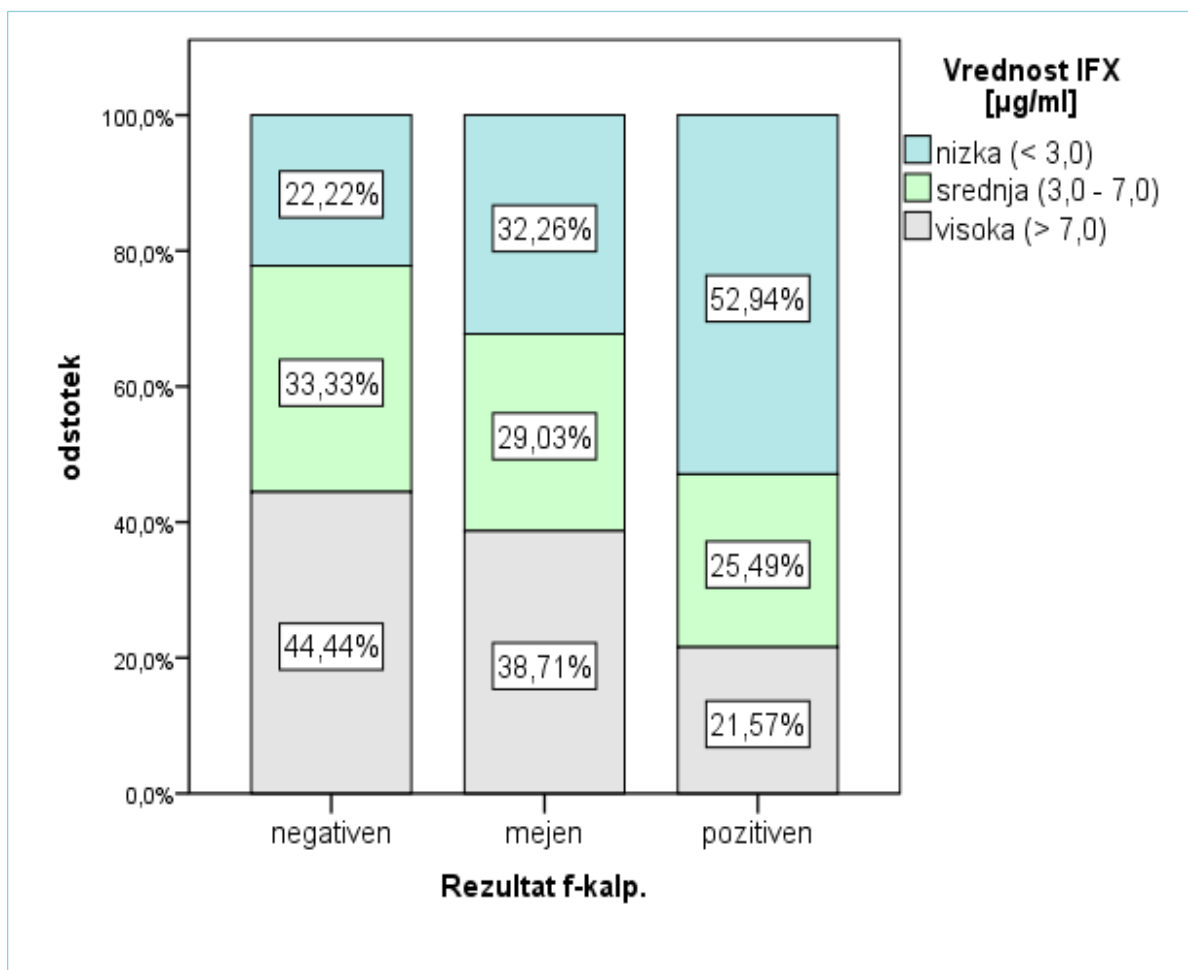
### 4.3.2. Povezanost med rezultati f-kalp. in vrednostjo IFX

Negativne, mejne in pozitivne rezultate f-kalp. pri nizki, srednji in visoki koncentraciji IFX smo prikazali s frekvenčno porazdelitvijo v preglednicah in s strukturnimi stolpci.

#### 4.3.2.1. Na celotni skupini bolnikov s KVČB

**Preglednica XVII:** Število rezultatov f-kalp. glede na vrednost IFX za vse bolnike s KVČB

| <b>rezultati<br/>f-kalp.</b> | <b>vrednost IFX [µg/ml]</b> |                            |                          | <b>skupaj</b> |
|------------------------------|-----------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------|
|                              | <b>nizka (&lt; 3,0)</b>     | <b>srednja (3,0 - 7,0)</b> | <b>visoka (&gt; 7,0)</b> |               |
| <b>negativen</b>             | 4                           | 6                          | 8                        | 18            |
| <b>mejna vrednost</b>        | 10                          | 9                          | 12                       | 31            |
| <b>pozitiven</b>             | 27                          | 13                         | 11                       | 51            |
| <b>skupaj</b>                | 41                          | 28                         | 31                       | 100           |



**Slika 21:** Delež rezultatov f-kalp. glede na vrednost IFX za vse bolnike s KVČB

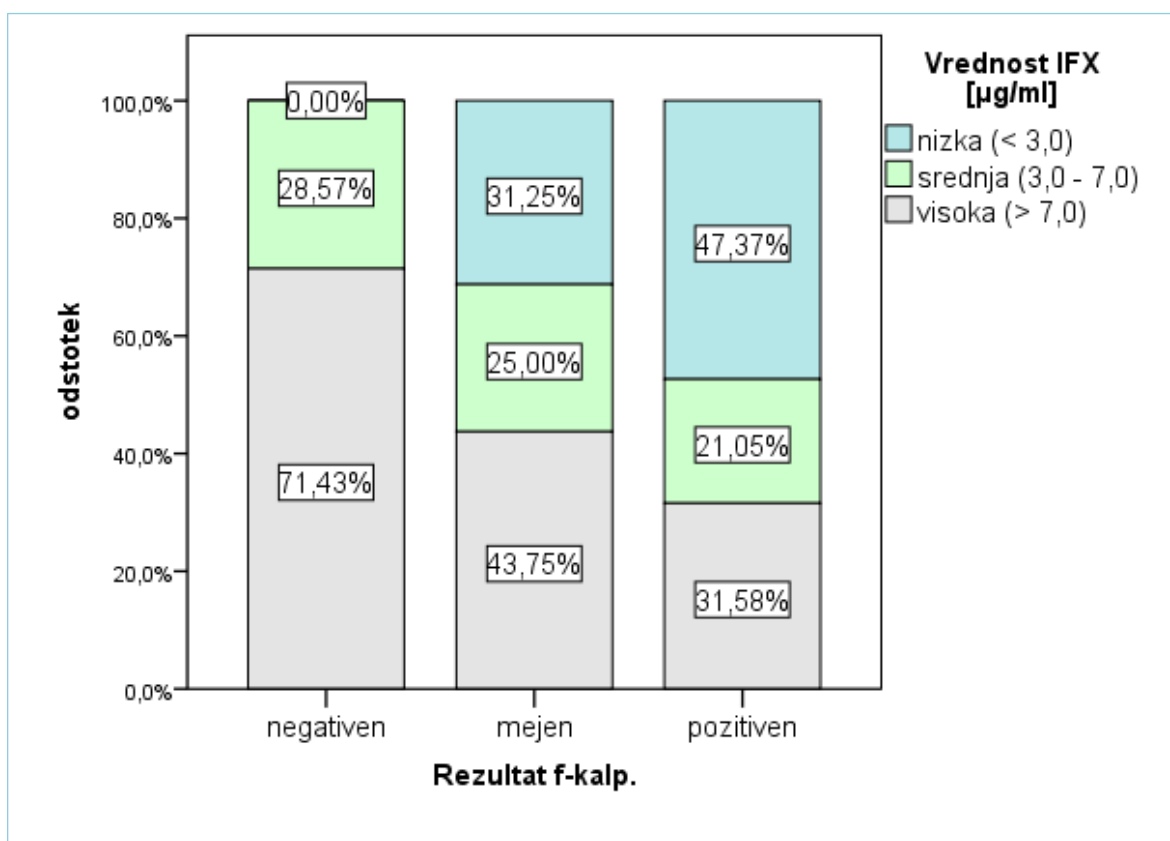
**Preglednica XVIII:** Spearmanov test korelacije med rezultati f-kalp. in vrednostjo IFX za vse bolnike s KVČB

| KVČB                                                                | rezultati f-kalp. / vrednost IFX |
|---------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| Spearmanov koeficient korelacije                                    | - 0,267*                         |
| p (stopnja značilnosti)                                             | 0,007                            |
| št. vzorcev                                                         | 100                              |
| *Korelacija je signifikantna pri stopnji tveganja 0,01 (2-stransko) |                                  |

#### 4.3.2.2. Na skupini bolnikov z ulceroznim kolitisom

**Preglednica XIX:** Število rezultatov f-kalp. glede na vrednost IFX pri bolnikih z UK

| rezultati<br>f-kalp. | vrednost IFX [ $\mu\text{g/ml}$ ] |                     |                | skupaj |
|----------------------|-----------------------------------|---------------------|----------------|--------|
|                      | nizka (< 3,0)                     | srednja (3,0 - 7,0) | visoka (> 7,0) |        |
| negativen            | 0                                 | 2                   | 5              | 7      |
| mejna vrednost       | 5                                 | 4                   | 7              | 16     |
| pozitiven            | 9                                 | 4                   | 6              | 19     |
| skupaj               | 14                                | 10                  | 18             | 42     |



**Slika 22:** Delež rezultatov f-kalp. glede na vrednost IFX za bolnike z UK

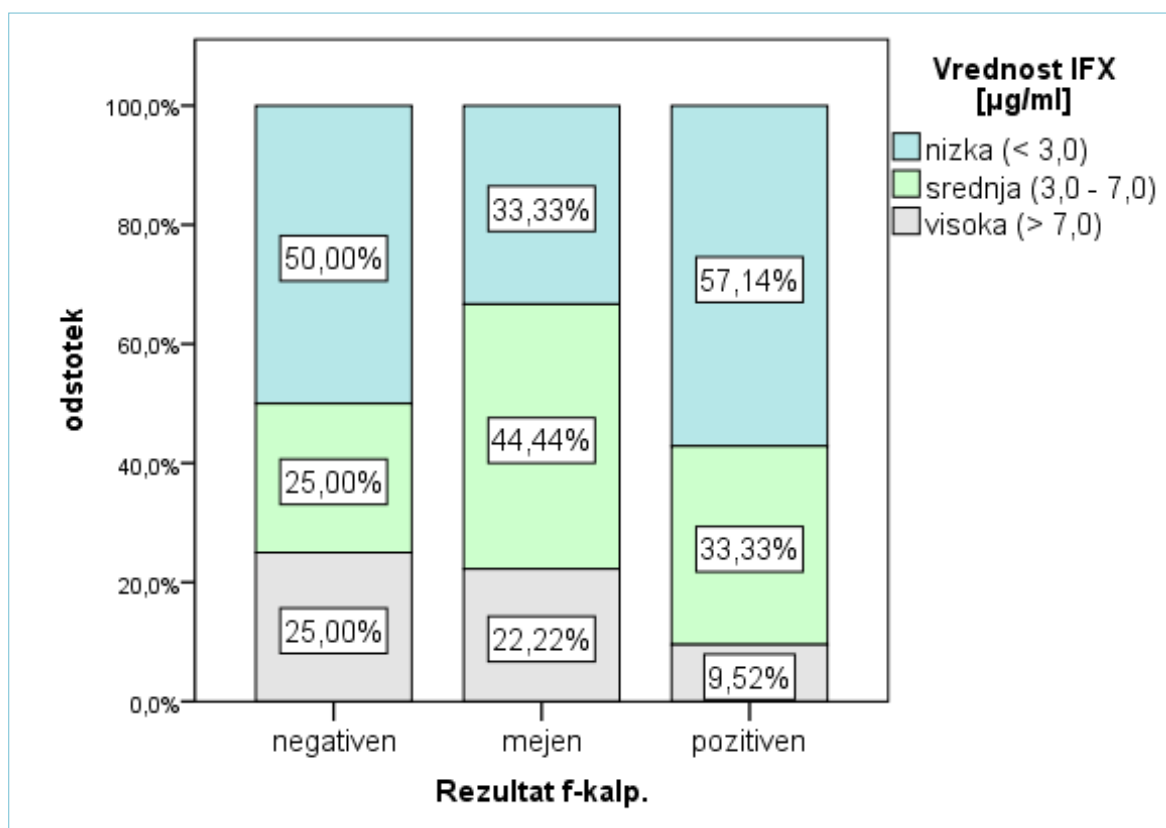
**Preglednica XX:** Spearmanov test korelacije med rezultati f-kalp. in vrednostjo IFX za bolnike z UK

| UK                                                                  | rezultati f-kalp. / vrednost IFX |
|---------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| Spearmanov koeficient korelacije                                    | <b>- 0,326*</b>                  |
| p (stopnja značilnosti)                                             | <b>0,035</b>                     |
| št. vzorcev                                                         | 42                               |
| *Korelacija je signifikantna pri stopnji tveganja 0,05 (2-stransko) |                                  |

#### 4.3.2.3. Na skupini bolnikov s Crohnovo boleznijo

**Preglednica XXI:** Število rezultatov f-kalp. glede na vrednost IFX pri bolnikih s CB

| rezultati<br>f-kalp.  | vrednost IFX [µg/ml] |                     |                | skupaj |
|-----------------------|----------------------|---------------------|----------------|--------|
|                       | nizka (< 3,0)        | srednja (3,0 - 7,0) | visoka (> 7,0) |        |
| <b>negativen</b>      | 4                    | 2                   | 2              | 8      |
| <b>mejna vrednost</b> | 3                    | 4                   | 2              | 9      |
| <b>pozitiven</b>      | 12                   | 7                   | 2              | 21     |
| skupaj                | 19                   | 13                  | 6              | 38     |



**Slika 23:** Delež rezultatov f-kalp. glede na vrednost IFX za bolnike s CB

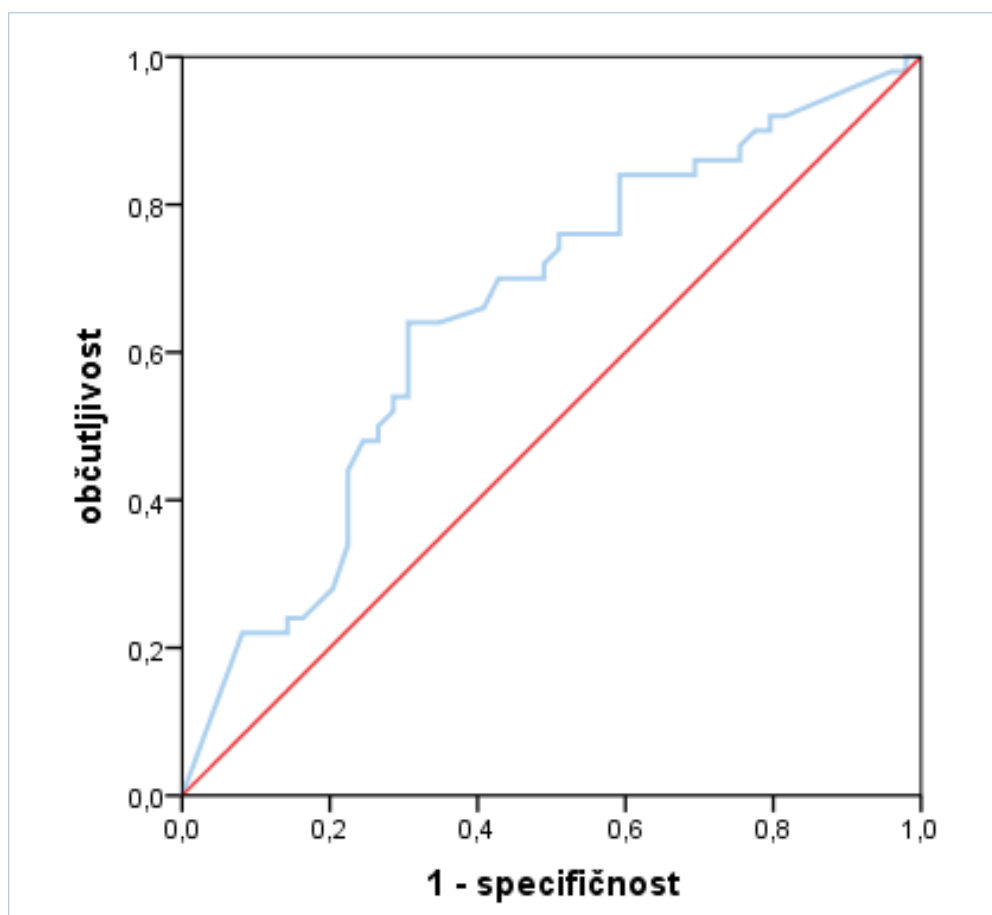
**Preglednica XXII:** Spearmanov test korelacije med rezultati f-kalp. in vrednostjo IFX za bolnike s CB

| CB                               | rezultati f-kalp. / vrednost IFX |
|----------------------------------|----------------------------------|
| Spearmanov koeficient korelacije | - 0,162                          |
| p (stopnja značilnosti)          | 0,331                            |
| št. vzorcev                      | 38                               |

## 4.4. DOLOČANJE MEJNE VREDNOSTI KONCENTRACIJE IFX ZA NAPOVED REMISIJE KVČB S KRIVULJO ROC

### 4.4.1. Mejna vrednost IFX za celotno skupino bolnikov s KVČB

Izračunane mejne vrednosti pri določeni občutljivosti in specifičnosti so prikazane v prilogi 2. Optimalna mejna vrednost izračunana z Youden-ovim indeksom (YI) pri celotni skupini bolnikov s KVČB je navedena v preglednici XXIII.



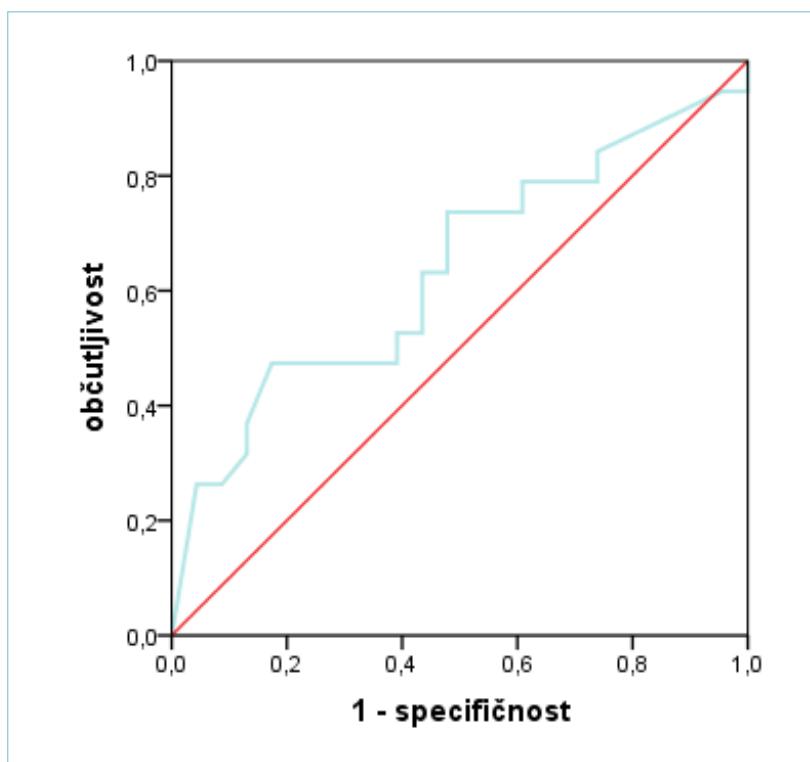
**Slika 24:** ROC krivulja vrednosti IFX za razlikovanje bolnikov z aktivno boleznijo in remisijo pri vseh bolnikih s KVČB

**Preglednica XXIII:** Izračun AUC z mejnimi vrednostmi IFX pri določeni specifičnosti in občutljivosti za vse bolnike s KVČB

| Mejna vrednost IFX | specifičnost | občutljivost | AUC<br>(95 % interval zaupanja)      |
|--------------------|--------------|--------------|--------------------------------------|
| 4,05 µg/ml (YI)    | 69,4 %       | 62,7 %       | 0,644 (p = 0,013)<br>(0,536 - 0,753) |
| 6,45 µg/ml         | 42,9 %       | 74,5 %       |                                      |

#### 4.4.2. Mejna vrednost IFX za skupino bolnikov z UK

Izračunane mejne vrednosti koncentracije IFX pri določeni občutljivosti in specifičnosti za skupino bolnikov z UK so prikazane v prilogi 3. Iz prikazanih podatkov in s pomočjo ROC krivulje (slika 25) smo izbrali mejno vrednost koncentracije IFX za bolnike z UK ter izračunali AUC.



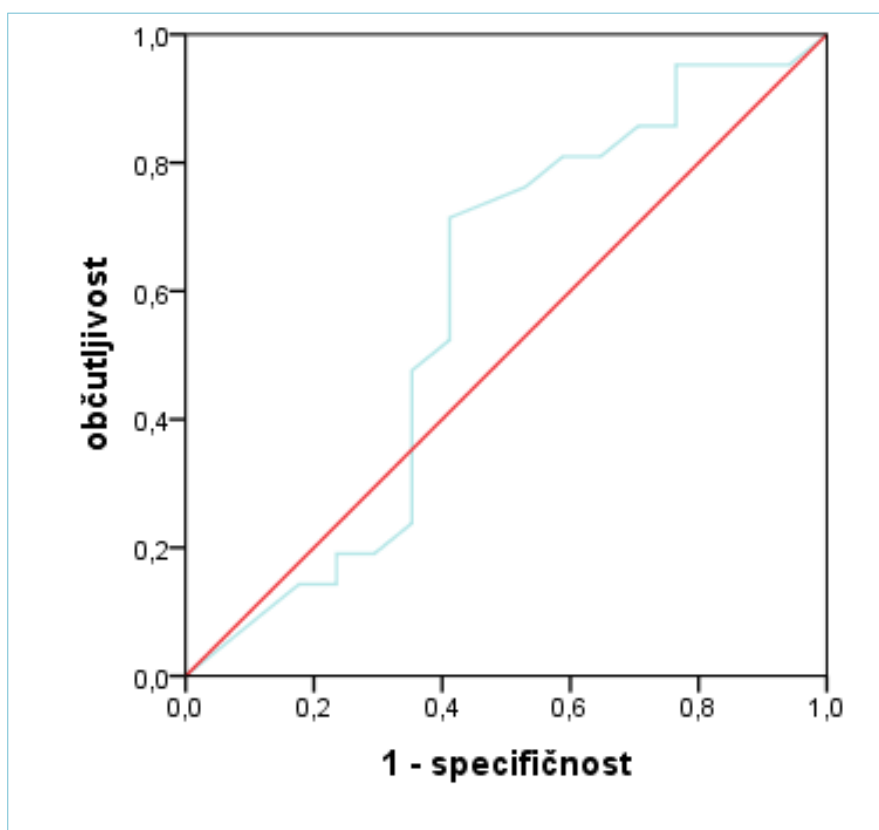
**Slika 25:** ROC krivulja vrednosti IFX za razlikovanje bolnikov z aktivno boleznijo in remisijo pri UK

**Preglednica XXIV:** Izračun AUC z mejnimi vrednostmi IFX pri določeni specifičnosti in občutljivosti za bolnike z UK

| mejna vrednost<br>IFX | specifičnost | občutljivost | AUC<br>(95 % interval zaupanja) |
|-----------------------|--------------|--------------|---------------------------------|
| 2,15 µg/ml (YI)       | 82,6 %       | 47,4 %       | 0,636 (p = 0,133)               |
| 7,30 µg/ml            | 52,2 %       | 73,7 %       | (0,463 – 0,810)                 |

#### 4.4.3. Mejna vrednost IFX za skupino bolnikov s CB

Izračunane mejne vrednosti koncentracije IFX pri določeni občutljivosti in specifičnosti za skupino bolnikov s CB so prikazane v prilogi 3. Iz prikazanih podatkov in s pomočjo ROC krivulje smo izbrali mejno vrednost konc. IFX tudi za bolnike s CB ter izračunali AUC.



**Slika 26:** ROC krivulja vrednosti IFX za razlikovanje bolnikov z aktivno boleznijo in remisijo pri CB

**Preglednica XXV:** Izračun AUC z mejnimi vrednostmi IFX pri določeni specifičnosti in občutljivosti za bolnike s CB

| mejna vrednost<br>IFX | specifičnost | občutljivost | AUC<br>(95 % interval zaupanja) |
|-----------------------|--------------|--------------|---------------------------------|
| 3,95 µg/ml (YI)       | 58,8 %       | 71,4 %       | 0,580 (p = 0,403)               |
| 4,65 µg/ml            | 47,1 %       | 76,2 %       | (0,385 – 0,775)                 |

#### 4.5. POZITIVNA IN NEGATIVNA NAPOVEDNA VREDNOST MEJNE KONCENTRACIJE IFX ZA NAPOVED REMISIJE BOLEZNI

Za celotno skupino bolnikov s KVČB in obe podskupini (UK in CB) smo izračunali pogojne verjetnosti glede na mejne vrednosti IFX določene z Youden-ovim indeksom. V preglednicah so prikazani deleži bolnikov z aktivno boleznijo in remisijo glede na določene mejne vrednosti IFX.

**Preglednica XXVI:** Kontingenčna tabela za izračun PNV in NNV pri bolnikih s KVČB glede na koncentracijo IFX pri mejni vrednosti 4,05 µg/ml

| KVČB                   | IFX > 4,05 µg/ml | IFX ≤ 4,05 µg/ml | skupaj |
|------------------------|------------------|------------------|--------|
| <b>Remisija</b>        | PN = 34 (69,4 %) | LP = 15 (30,6 %) | 49     |
| <b>Aktivna bolezen</b> | LN = 19 (37,3 %) | PP = 32 (62,7 %) | 51     |
| skupaj                 | 53               | 47               | 100    |

$$PNV_{KVČB} = 68,1 \%$$

$$NNV_{KVČB} = 64,2 \%$$

**Preglednica XXVII:** Kontingenčna tabela za izračun PNV in NNV pri bolnikih z UK glede na koncentracijo IFX pri mejni vrednosti 2,15 µg/ml

| UK                     | IFX > 2,15 µg/ml | IFX ≤ 2,15 µg/ml | skupaj |
|------------------------|------------------|------------------|--------|
| <b>Remisija</b>        | PN = 19 (82,6 %) | LP = 4 (17,4 %)  | 23     |
| <b>Aktivna bolezen</b> | LN = 10 (52,6 %) | PP = 9 (47,4 %)  | 19     |
| skupaj                 | 29               | 13               | 42     |

$$PNV_{UK} = 69,2 \%$$

$$NNV_{UK} = 65,5 \%$$

**Preglednica XXVIII:** Kontingenčna tabela za izračun PNV in NNV pri bolnikih s CB glede na koncentracijo IFX pri mejni vrednosti 3,95 µg/ml

| CB                     | IFX > 3,95 µg/ml | IFX ≤ 3,95 µg/ml | skupaj |
|------------------------|------------------|------------------|--------|
| <b>Remisija</b>        | PN = 10 (58,8 %) | LP = 7 (41,2 %)  | 17     |
| <b>Aktivna bolezen</b> | LN = 6 (28,6 %)  | PP = 15 (71,4 %) | 21     |
| skupaj                 | 16               | 22               | 38     |

$$PNV_{CB} = 68,2 \%$$

$$NNV_{CB} = 62,5 \%$$

## 5. RAZPRAVA

Kronična vnetna črevesna bolezen je nekontrolirano vnetje prebavne cevi, ki poteka kronično z akutnimi zagoni. Vzroki za nastanek bolezni še niso povsem pojasnjeni, potekajo pa številne raziskave v smeri genetskih in okoljskih dejavnikov (12). Bolezen je v Sloveniji redka, vendar pa beležimo dramatičen porast v incidenci (18/100.000), kar nas uvršča med države s trenutno najvišjo incidenco bolezni v zadnjem desetletju. Njena pojavnost je večja v bolj razvitih deželah, zanjo pa obolevajo tako ženske kot moški vseh starosti (18).

Najpogostejši obliki KVČB sta ulcerozni kolitis in Crohnova bolezen, ki se med seboj razlikujeta glede na razširjenost vnetja v prebavni cevi ter makroskopskih in histoloških značilnostih. Potrjevanje KVČB in ločevanje med različnimi oblikami bolezni temelji na endoskopskih, rentgenskih in histoloških preiskavah. Laboratorijskih preiskav krvi in blata se poslužujemo pri oceni aktivnosti vnetja in spremljanju zdravljenja. Koloileoskopija je edini zanesljivi način za ugotavljanje zaceljenosti črevesne sluznice, ki je glavni cilj zdravljenja KVČB (13, 17).

Zaradi pogostega kontrolnega izvajanja koloileoskopij, ki je invazivna, draga in neprijetna za bolnika, je veliko raziskav uperjenih v iskanje biokemičnega označevalca, ki bi lahko nadomestil ali zmanjšal število tovrstnih preiskav (27, 51). Fekalni kalprotektin se je doslej izkazal kot najboljši biokemični označevalec za oceno aktivnosti vnetnega dogajanja pri KVČB. Je zelo občutljiv, vendar nespecifičen, saj je lahko povišan tudi pri infekcijskih in malignih boleznih prebavne cevi, cirozi jeter, portalni hipertenziji in uporabi antirevmatikov (36, 52). Dodatno je lahko povišan zaradi trajnih sprememb na sluznici črevesa, ki so posledica vnetij in tako ne odraža nujno vnetnega dogajanja na sluznici v danem trenutku; posledično je lahko lažno pozitiven, zato se v primerih ko gre za velike spremembe v obravnavi bolnikov (pred uvedbo biološke terapije ali pred operacijo) vedno opravi koloileoskopija (53).

Infliksimab je biološko zdravilo, ki se veže na TNF- $\alpha$  in se uporablja za zdravljenje hudih oblik KVČB ter pri bolnikih, pri katerih je običajno zdravljenje neuspešno. Veže se na prosti TNF- $\alpha$  in s tem povzroči nevtralizacijo njegovega provnetnega delovanja ter tako deluje močno protivnetno (31, 32). V primeru zelo velikega vnetnega bremena se infliksimab hitro porabi, zato koncentracije padejo. Zaradi teh značilnosti bi utegnil biti

IFX tudi biološki označevalec aktivnosti vnetja, saj bi pričakovali da bo ob dobro kontrolirani bolezni malo prostega TNF- $\alpha$  in posledično koncentracije IFX višje in obratno ob aktivni bolezni. Na osnovi teh spoznanj smo se odločili v naši nalogi ugotoviti ali lahko z določeno koncentracijo IFX ločimo med bolniki z aktivno boleznijo in remisijo.

### **Urejanje in prikazovanje podatkov**

Na Kliničnem oddelku za gastroenterologijo smo pridobili podatke 88 bolnikov (skupno 102 vzorca), ki so prejeli vzdrževalno zdravljenje z IFX ter so imeli znotraj 60 dni sočasno izmerjen f-kalprotektin in koncentracijo IFX v serumu. Identificirali smo 52 bolnikov moškega in 36 ženskega spola v starosti od 19 do 75 let. Pri 36,4 % bolnikov je bila prisotna CB, pri 39,8 % pa UK. Vrednosti f-kalprotektina so bile v 37 vzorcih določene s hitrim testom Quantum Blue<sup>®</sup> (44), v preostalih vzorcih pa z ELISA metodo Calprest<sup>®</sup> (38). Na podlagi različnih virov (45, 49, 50) o primerljivosti hitrih testov z ELISA metodo, smo vrednosti f-kalprotektina za uporabo pri statističnih analizah združili. Vsem pridobljenim vrednostim f-kalprotektina in IFX s koncentracijami pod ali nad detekcijskim območjem smo nastavili vrednosti, ki ne vplivajo na interpretacijo in vrednotenje rezultatov, omogočajo pa nam statistično obdelavo. Izmerjene vrednosti IFX smo razporedili v tri skupine, glede na nizko ( $< 3,0 \mu\text{g/ml}$ ), srednjo ( $3,0 - 7,0 \mu\text{g/ml}$ ) in visoko ( $> 7,0 \mu\text{g/ml}$ ) koncentracijo. Pri postavitvi skupin smo sledili smernicam navedenim v literaturi (42), glede optimalnega območja IFX v serumu za oceno njegove učinkovitosti pri kliničnem odzivu. Največji delež vzorcev v naši preiskovani skupini bolnikov je imelo izmerjeno nizko koncentracijo IFX.

### **Statistična obdelava pridobljenih podatkov**

V začetnem delu naloge smo se osredotočili na vsak posamezen parameter. S kvartilnima diagramoma smo prikazali veliko razpršenost pridobljenih vrednosti za f-kalprotektin in IFX ter iz nadaljnje statistične analize izključili dve izstopajoči vrednosti f-kalprotektina, ki bi na nadaljnje izbrane statistike imele prevelik vpliv. Porazdeljenost obeh parametrov smo prikazali grafično v obliki histograma ter ugotovili, da se vrednosti spremenljivk ne porazdeljujejo normalno. Navedeno smo potrdili tudi s testom normalnosti Shapiro - Wilk, saj je bila stopnja značilnosti ( $p = 0,000$ ) manjša od 5 % stopnje tveganja. S testom normalnosti smo izključili možnost uporabe parametričnih testov pri nadaljnji statistični analizi naših podatkov. Zaradi velike razpršenosti in nesimetrično porazdeljenih vrednosti

f-kalprotektina in IFX nam srednja vrednost vzorca mediana bolje predstavlja statistično maso, zato uporabljamo za mero srednje vrednosti mediano in IQR.

Izračunana povprečna srednja vrednost IFX je 4,30 µg/ml (IQR: 1,36 – 8,66 µg/ml) in f-kalprotektina 145,50 µg/g (IQR: 48,55 – 441,80 µg/g). Povprečna koncentracija IFX pri bolnikih z UK je nekoliko višja (5,55 µg/ml, IQR: 2,06 – 10,63 µg/ml) kot pri bolnikih s CB (3,00 µg/ml, IQR: 1,23 – 5,60 µg/ml). Razlika povprečnih vrednosti koncentracije IFX v vzorcih med opredeljenima skupinama bolnikov z UK in CB je signifikantno različna ( $p = 0,029$ ), nismo pa ugotovili razlik v koncentraciji f-kalprotektina. Ti rezultati povedo, da so bili bolniki z UK in CB v približno enako globoki remisiji bolezni, vendar pa so bile za ohranjanje take kontrole bolezni potrebne višje koncentracije IFX pri UC kot pri CB. Ta spoznanja so v skladu s teorijo vnetnega bremena, ki je mnogo višji pri UK kot pri CB, najverjetneje zaradi površine prizadete sluznice, ki je mnogo večja pri UK kot pri CB (13, 14).

Porazdeljenost podatkov IFX glede na nizko, srednjo in visoko koncentracijo je enakomerna, znotraj skupin je manjša razpršenost podatkov. Prav tako obstajajo statistično značilne razlike ( $p = 0,024$ ) povprečnih vrednosti IFX znotraj skupin med bolniki z UK in CB. Razlika je predvsem opazna pri visokih koncentracijah IFX, kjer je pri vzorcih z UK izmerjena povprečna vrednost 11,5 µg/ml, pri vzorcih s CB pa 9,5 µg/ml. Pri f-kalprotektinu izstopajo pozitivno ovrednoteni rezultati, ker jih je številčno največ in so tudi najbolj razpršeni. Statistično značilnih razlik povprečnih koncentracij f-kalprotektina glede na negativne, mejne in pozitivne rezultate, med bolniki z UK in CB ni. Koncentracije f-kalprotektina so pri vseh ovrednotenih rezultatih z UK višje kot pri CB. Razlika je najopaznejša pri pozitivnih rezultatih, kjer je izmerjena povprečna koncentracija f-kalprotektina pri UK 831,00 µg/g in pri CB 415,00 µg/g. Ta spoznanja so skladna s spoznanji iz literature, kjer so vrednosti f-kalprotektina višje v primeru prizadetosti debelega črevesa (značilno za UC) kot v primeru prizadetosti tankega črevesa (53).

### **Povezanost med vrednostmi IFX in f-kalprotektinom**

Pri preverjanju povezanosti med vrednostmi IFX in f-kalprotektina pri celotni skupini bolnikov s KVČB, smo izmerili najvišje koncentracije f-kalprotektina (219,4 µg/g, IQR: 77,3 – 569,0 µg/g) pri nizkih koncentracijah IFX in najnižje (55,4 µg/g, IQR: 30,0 – 318,6 µg/g) pri visokih koncentracijah IFX. Prav tako je bilo največ pozitivno ovrednotenih

rezultatov f-kalprotektina (52,9 %) v skupini z nizko koncentracijo IFX, medtem ko je bilo 44,4 % negativnih rezultatov f-kalprotektina zabeleženo v skupini z visoko koncentracijo IFX.

Izračunan Spearmanov koeficient korelacije ( $-0,240$ ;  $p = 0,016$  pri 5 % tveganju) med koncentracijo f-kalprotektina in vrednostmi IFX nakazuje na zmerno negativno monotono povezanost. Prav tako pa tudi med rezultati f-kalprotektina in vrednostmi IFX obstaja zmerno negativna monotona korelacija ( $-0,267$ ;  $p = 0,007$  pri 1 % tveganju). Bolniki z nizkimi vrednostmi f-kalprotektina imajo izmerjene višje koncentracije IFX, kar smo pričakovali, saj je koncentracija IFX obratno sorazmerna z vnetnim dogajanjem. S tem potrjujemo našo hipotezo, da je koncentracija IFX biološki označevalec aktivnosti KVČB in sicer v obeh primerih, ko smo nizke, srednje in visoke koncentracije IFX primerjali s f-kalprotektinom kot zvezno in kot ordinalno spremenljivko.

Ko smo skupino bolnikov s KVČB razdelili na dve podskupini, na bolnike z UK in CB, smo dobili numerično enake trende, vendar pa nismo dobili statistično signifikantnih rezultatov, kar pripisujemo zmanjšani statistični moči. Če bi želeli potrditi naša spoznanja še pri obeh podskupinah posebej, bi za raziskavo potrebovali dva do trikrat večji vzorec.

### **Določanje mejne vrednosti koncentracije IFX ter pozitivne in negativne napovedne vrednosti mejne koncentracije IFX za napoved remisije KVČB**

Cilj naše naloge je bil določiti mejno vrednost IFX, s katero bi lahko ločili bolnike s KVČB, ki so na vzdrževalni terapiji z infliksimabom, na tiste pri katerih je prisotna aktivna bolezen in tiste v remisiji. Remisijo smo definirali z mejnim ali normalnim f-kalprotektinom (negativni in mejni rezultati), kar je ustrezno glede na druge študije, kjer se običajno koncentracije f-kalprotektina pod 150 (ali celo 250) pojasnjuje kot dober pokazatelj remisije (36).

Ena od prioritet te raziskave je bila ugotoviti, če obstaja mejna vrednost IFX s katero bi lahko ločili aktivno bolezen od remisije. Optimalno mejno vrednost IFX smo določili s pomočjo ROC krivulje in Youden-ovega indeksa. Mejno vrednost IFX smo določili tudi pri višji občutljivosti z namenom, da bomo z večjo verjetnostjo lahko izločili bolnike, ki so v remisiji KVČB. Koncentracija IFX pri mejni vrednosti  $4,05 \mu\text{g/ml}$  z 62,7 % občutljivostjo in 69,4 % specifičnostjo nam lahko služi glede na AUC vrednost (0,644 s 95 % CI: 0,536 – 0,753;  $p = 0,013$ ) kot zmerno zmožljiv test za oceno vnetne aktivnosti pri

bolnikih s KVČB. Pri bolnikih z UK in CB smo določili v povprečju nekoliko nižji mejni vrednosti IFX kot pri celotni skupini bolnikov s KVČB.

Pri koncentracijah IFX nad mejno vrednostjo 4,05 µg/ml je imelo 64,2 % bolnikov remisijo KVČB (negativni in mejni rezultati f-kalp.), pod mejno vrednostjo IFX pa 68,1 % bolnikov aktivno KVČB (pozitivni rezultati f-kalp.).

Pri višji občutljivosti (74,5 %) smo določili mejno vrednost pri 6,45 µg/ml IFX. Pri višjih koncentracijah IFX v serumu bomo z večjo verjetnostjo lahko izločili bolnike v remisiji KVČB. To je bil tudi eden od naših namenov raziskave, saj lahko na osnovi te ugotovitve, omenjenim bolnikom zagotovimo, da so v remisiji bolezni in da zato ne potrebujejo koloileoskopije.

Bolj relevantne rezultate bi dobili, če bi za opredelitev vnetnega stanja pri bolnikih s KVČB uporabili koloileoskopijo, ki velja kot edini zanesljivi način za ugotavljanje endoskopske remisije, vendar bi s tem bolnike dodatno obremenili. Zaradi invazivnosti preiskave pa se želimo v čim večji meri izogniti pogostim kontrolnim pregledom s koloileoskopijo. Ker smo v nalogo želeli vključiti čim večje število bolnikov s KVČB, smo uporabili izmerjene koncentracije f-kalprotektina z dvema različnima, vendar glede na navedbe v literaturi (44, 45, 49, 50, 54), primerljivima metodama. Kljub temu bi bilo ustrežnejše in primernejše v nadaljnje raziskave vključiti koncentracije f-kalprotektina izmerjene samo z eno analitsko metodo. Na ta način bi zmanjšali velike razpone med vrednostmi in za opredelitev bolnikov z aktivno boleznijo in remisijo uporabili le eno mejno vrednost f-kalprotektina. Z nadaljnjimi raziskavami bi bilo smiselno tudi preveriti, kako se mejna vrednost IFX spreminja, glede na različne mejne vrednosti f-kalprotektina za ocenitev vnetnega dogajanja. V literaturi (36, 55 – 57) smo namreč zasledili, da so različni avtorji za opredelitev vnetnega dogajanja uporabili drugačne mejne vrednosti f-kalprotektina (od 50 do 250 µg/g).

V naši raziskavi smo potrdili prvi dve hipotezi, saj smo dokazali povezavo med koncentracijo IFX in f-kalprotektinom ter da obstajajo razlike v koncentraciji IFX med bolniki z UK in CB. Tretjo hipotezo smo potrdili samo delno, saj ima ugotovljena specifičnost in občutljivost koncentracije IFX omejeno klinično vrednost, za ločevanje bolnikov z aktivno boleznijo od tistih v remisiji.

## 6. SKLEPI

V nalogi smo ugotavljali klinično uporabnost infliksimaba, kot biooznačevalca za oceno aktivnosti kronične vnetne črevesne bolezni, na celotni preiskovani skupini bolnikov s KVČB ter na preiskovani skupini bolnikov z ulceroznim kolitisom in Crohnovo boleznijo.

Naše ugotovitve:

- Obstaja statistično značilna višja povprečna koncentracija IFX v vzorcih z UK (5,55 µg/ml) kot v vzorcih s CB (3,00 µg/ml).
- Zmerna negativna povezanost je potrjena med koncentracijo f-kalprotektina in vrednostjo IFX. Bolniki z nizkimi vrednostmi f-kalprotektina imajo izmerjene višje koncentracije IFX.
- Pri bolnikih z UK smo zabeležili višjo povezanost med vrednostmi IFX in f-kalprotektinom kot pri bolnikih s CB.
- Koncentracija IFX pri mejni vrednosti 4,05 µg/ml nam lahko služi kot zmerno zmožljiv test za oceno vnetne aktivnosti pri bolnikih s KVČB, saj je imelo 64,2 % bolnikov s koncentracijo IFX nad 4,05 µg/ml remisijo bolezni.

## 7. LITERATURA

1. Mescher AL: Junqueira's basic histology: text and atlas. 13th ed. Bloomington, Indiana, 2013: 289-319.
2. [http://medrazgl.si/arhiv/mr10\\_4\\_01.pdf](http://medrazgl.si/arhiv/mr10_4_01.pdf) (dostopno 04.04.2016)
3. [https://cnx.org/resources/cfa0a944ef93cbf70c104f57c04cbd286ca74e3b/2402\\_Layers\\_of\\_the\\_Gastrointestinal\\_Tract.jpg](https://cnx.org/resources/cfa0a944ef93cbf70c104f57c04cbd286ca74e3b/2402_Layers_of_the_Gastrointestinal_Tract.jpg) (dostopno 04.04.2016)
4. <https://www.yumpu.com/xx/document/view/41565105/3-zgradba-prebavil-in-organskih-sistemov-povezanih-z-njimi/59> (dostopno 06.04.2016)
5. <http://www.medenosrce.net/component/attachments/download/6332> (dostopno 05.04.2016)
6. Marieb EN: Essentials of human anatomy & physiology. Eleventh edition, Pearson, Boston, 2015: 632.
7. Saletinger R.: Anatomija, fiziologija z osnovami patologije višješolski učbenik, Doba Epis, Maribor, 2012.
8. <http://www.britannica.com/science/small-intestine> (dostopno 06.04.2016)
9. <http://teachmeanatomy.info/abdomen/gi-tract/small-intestine/> (dostopno 06.04.2016)
10. <http://www.britannica.com/science/large-intestine> (dostopno 06.04.2016)
11. Košnik M, Mrevlje F, Štajer D, Černelč P, Koželj M, Andoljšek D, et al.: Bolezni prebavil. In: Interna medicina, 4.izdaja, Littera picta : Slovensko medicinsko društvo, Ljubljana, 2011: 584–592.
12. Novak G, Drobne D, Nataša S, Ferkolj I, Štabuc B.: Etiopatogeneza kronične vnetne črevesne bolezni. Gastroenterolog 2014; 18(1): 4–9.
13. Pernat Drobež C.: Klinične značilnosti ulceroznega kolitisa in Crohnove bolezni. Gastroenterolog 2014; 18(1): 17–22.
14. Koželj, Matjaž, Koželj M.: Diagnostični algoritem kronične vnetne črevesne bolezni. Gastroenterolog 2014; 18(1): 29–34.
15. Langmead L.: Inflammatory bowel disease. Oxford University Press 2008; 174.
16. Nikolaus S, Schreiber S.: Diagnostics of Inflammatory Bowel Disease. Gastroenterology 2007; 133(5): 1670–89.
17. Ferkolj I.: Cilji zdravljenja pri kronični vnetni črevesni bolezni. Gastroenterolog 2014; 18(1): 39–44.
18. Baraga D, Tatjana C, Ferkolj I.: Epidemiologija bolnikov s kronično vnetno črevesno boleznijo v družinski medicini. Gastroenterolog 2014; 18(1): 10–7.

19. [https://gi.jhsps.org/Upload/200710261337\\_41896\\_000.jpg](https://gi.jhsps.org/Upload/200710261337_41896_000.jpg) (dostopno 11.01.2015)
20. Noffsinger A.: Inflammatory bowel disease In Gastrointestinal diseases (Atlas of Nontumor Pathology), American Registry of Pathology in collaboration with the Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D. C., 2007: 675–728.
21. [https://gi.jhsps.org/Upload/200710261334\\_49208\\_000.jpg](https://gi.jhsps.org/Upload/200710261334_49208_000.jpg) (dostopno 11.01.2015)
22. <http://medivisuals1.com/chronic-ulcerative-colitis-cuc-30203003x.aspx> (dostopno 11.01.2015)
23. <http://www.doctortipster.com/wp-content/uploads/2011/07/crohns-disease21.jpg> (dostopno 17.01.2015)
24. [http://2.bp.blogspot.com/-BJ0SUY3UKoo/UaEYqpL\\_5gl/AAAAAAAAA8/Cj\\_5h2nA-aU/s1600/CrohnsDisease.jpg](http://2.bp.blogspot.com/-BJ0SUY3UKoo/UaEYqpL_5gl/AAAAAAAAA8/Cj_5h2nA-aU/s1600/CrohnsDisease.jpg) (dostopno 17.01.2015)
25. <http://www.thelancet.com/cms/attachment/2007392993/2029546419/gr3.jpg> (dostopno 17.01.2015)
26. Podkrajšek M, Vivoda M.: Slikovne diagnostične metode pri kronični vnetni črevesni bolezni. *Gastroenterolog* 2014; 18(1): 35–8.
27. D. Desai, W. A. Faubion, W. J. Sandborn.: Biological Activity Markers in Inflammatory Bowel Disease: Serological Markers. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007; 25(3): 247–55.
28. STŘÍŽ I, TREBICHAŮSKÝ I.: Calprotectin - a Pleiotropic Molecule in Acute and Chronic Inflammation. *PhysiolRes.* 2004; 53: 245–53.
29. Vogl T, Gharibyan AL, Morozova-Roche LA.: Pro-Inflammatory S100A8 and S100A9 Proteins: Self-Assembly into Multifunctional Native and Amyloid Complexes. *Int J Mol Sci.* 2012; 13(12): 2893–917.
30. <http://www.cloud-clone.us/topic/Calprotectin-A-heterodimeric-complex-composed-by-S100A8-S100A9.pdf> (dostopno 03.01.2016)
31. Štrukelj B, Kos J, Bozovičar K, Bratkovič T, Lunder M, Glavač I, et al.: *Biološka zdravila: od gena do učinkovine*, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007.
32. Yapali S, Hamzaoglu HO.: Anti-TNF Treatment in Inflammatory Bowel Disease. *Ann Gastroenterol* 2007; 20(1): 48–53.
33. <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Infliximab&oldid=723651389> (dostopno 04.03.2016)
34. <http://www.peterbullartstudio.co.uk/webcontent/?cat=8> (dostopno 04.03.2016)
35. Urlep Žužej D, Mičetić - Turk D, Dolinšek J.: Biološka zdravila v zdravljenju otrok in mladostnikov s kronično vnetno črevesno boleznijo. *Gastroenterolog* 2010; 14(1): 47–55.
36. Burri E, Beglinger C.: Faecal calprotectin - a useful tool in the management of inflammatory bowel disease. *Swiss Med Wkly.* 2012; 142: w13557

37. <https://pharm.kuleuven.be/biotech/TherandDiagAnt/infliximab-adalimumab-hoofdfolder/information-for-trough-level-determination-sheet> (dostopno 12.04.2016)
38. <http://www.calprotectintest.com/english/calprest.html> (dostopno 15.04.2016)
39. <http://eurolambda.sk/shared/files/Calprest.pdf> (dostopno 15.04.2016)
40. Vande Casteele N, Buurman DJ, Sturkenboom MGG, Kleibeuker JH, Vermeire S, Rispens T, et al.: Detection of infliximab levels and anti-infliximab antibodies: a comparison of three different assays. *Aliment Pharmacol Ther.* 2012; 36(8): 765–71.
41. <http://www.bebpa.org/wp-content/uploads/2013/10/Ann-Gils.pdf> (dostopno 08.04.2016)
42. Vande Casteele N, Ferrante M, Van Assche G, Ballet V, Compernelle G, Van Steen K, et al.: Trough concentrations of infliximab guide dosing for patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2015; 148(7): 1320–1329.e3.
43. [http://www.calprotectintest.com/english/device\\_for\\_stool\\_collection.html](http://www.calprotectintest.com/english/device_for_stool_collection.html) (dostopno 15.04.2016)
44. [https://www.buhlmannlabs.ch/wp-content/uploads/2015/03/LF-CAL25\\_IFU-CE\\_15-02-09.pdf](https://www.buhlmannlabs.ch/wp-content/uploads/2015/03/LF-CAL25_IFU-CE_15-02-09.pdf) (dostopno 15.04.2016)
45. Coorevits L, Baert FJ, Vanpoucke HJM.: Faecal calprotectin: comparative study of the Quantum Blue rapid test and an established ELISA method. *Clin Chem Lab Med CCLM FESCC.* 2013; 51(4): 825–31.
46. [https://www.buhlmannlabs.ch/wp-content/uploads/2015/03/101110\\_b-cal-rd-1.pdf](https://www.buhlmannlabs.ch/wp-content/uploads/2015/03/101110_b-cal-rd-1.pdf) (dostopno 15.04.2016)
47. <https://www.buhlmannlabs.ch/wp-content/uploads/2015/03/lfcapi044ml-014e.pdf> (dostopno 15.04.2016)
48. [https://www.buhlmannlabs.ch/wp-content/uploads/2015/01/2015-03-06-A5ESLF00-DH-1001-Quantum-Blue-Reader-User-Manual-V10\\_EN.pdf](https://www.buhlmannlabs.ch/wp-content/uploads/2015/01/2015-03-06-A5ESLF00-DH-1001-Quantum-Blue-Reader-User-Manual-V10_EN.pdf) (dostopno 15.04.2016)
49. Oyaert M, Trouvé C, Baert F, De Smet D, Langlois M, Vanpoucke H.: Comparison of two immunoassays for measurement of faecal calprotectin in detection of inflammatory bowel disease: (pre)-analytical and diagnostic performance characteristics. *Clin Chem Lab Med CCLM FESCC.* 2014; 52(3): 391–7.
50. <https://dk.um.si/lzpisGradiva.php?id=22036> (dostopno 15.04.2016)
51. Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P.: Laboratory markers in IBD: useful, magic, or unnecessary toys? *Gut.* 2006; 55(3): 426–31.
52. García-Sánchez V, Iglesias-Flores E, González R, Gisbert JP, Gallardo-Valverde JM, González-Galilea Á, et al.: Does fecal calprotectin predict relapse in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis?. *J Crohns Colitis* 2010; 4(2): 144–52.
53. Kurent T, Drobne D.: Pomen fekalnega kalprotektina pri kronični vnetni črevesni bolezni. *Gastroenterolog* 2015; 19(1): 17–24.

54. Sydora MJ, Sydora BC, Fedorak RN.: Validation of a point-of-care desk top device to quantitate fecal calprotectin and distinguish inflammatory bowel disease from irritable bowel syndrome. *J Crohns Colitis* 2012; 6(2): 207–14.
55. Huang VW, Prosser C, Kroeker KI, Wang H, Shalapay C, Dhami N, et al.: Knowledge of Fecal Calprotectin and Infliximab Trough Levels Alters Clinical Decision-making for IBD Outpatients on Maintenance Infliximab Therapy. *Inflamm Bowel Dis.* 2015; 21(6): 1359–67.
56. D’Haens G, Ferrante M, Vermeire S, Baert F, Noman M, Moortgat L, et al.: Fecal calprotectin is a surrogate marker for endoscopic lesions in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2012; 18(12): 2218–24.
57. Vestergaard TA, Nielsen SL, Dahlerup JF, Hornung N.: Fecal calprotectin: assessment of a rapid test. *Scand J Clin Lab Invest* 2008; 68(4): 343–7.

**PRILOGE****Priloga 1:** Izmerjene vrednosti f-kalprotektina in IFX z zbranimi kliničnimi podatki bolnikov s KVČB

| Št. vzorca | Spol   | Starost | Vrsta KVČB | Metoda določanja f-kalp. | Konc. f-kalp. [µg/g] | Rezultat f-kalp. | Konc. IFX [µg/ml] | Vredost IFX glede na konc. [µg/ml] |
|------------|--------|---------|------------|--------------------------|----------------------|------------------|-------------------|------------------------------------|
| 1.         | ženski | 25      | CB         | Calprest                 | 219,4                | pozitiven        | < 0,30            | nizka (< 3,0)                      |
| 2.         | ženski | 25      | CB         | Calprest                 | 18,0                 | negativen        | < 0,30            | nizka (< 3,0)                      |
| 3.         | moški  | 33      | CB         | Calprest                 | < 15,6               | negativen        | 1,3               | nizka (< 3,0)                      |
| 4.         | ženski | 50      | UK         | Calprest                 | 72,8                 | mejen            | 12,7              | visoka (> 7,0)                     |
| 5.         | moški  | 63      | IK         | Calprest                 | 74,1                 | mejen            | 1,2               | nizka (< 3,0)                      |
| 6.         | ženski | 20      | UK         | Calprest                 | 473,3                | Pozitiven        | > 12,00           | visoka (> 7,0)                     |
| 7.         | ženski | 48      | IK         | Calprest                 | 304,0                | pozitiven        | 10,4              | visoka (> 7,0)                     |
| 8.         | ženski | 60      | CB         | Calprest                 | > 500                | pozitiven        | 1,4               | nizka (< 3,0)                      |
| 9.         | moški  | 28      | UK         | Calprest                 | 222,3                | pozitiven        | < 0,30            | nizka (< 3,0)                      |
| 10.        | moški  | 44      | np*        | Calprest                 | 468,0                | pozitiven        | < 0,30            | srednja (3,0 - 7,0)                |
| 11.        | ženski | 52      | CB         | Calprest                 | < 15,6               | negativen        | 4,3               | srednja (3,0 - 7,0)                |
| 12.        | ženski | 41      | UK         | Calprest                 | < 15,6               | negativen        | 8,9               | visoka (> 7,0)                     |
| 13.        | moški  | 19      | CB         | Calprest                 | 17,5                 | negativen        | < 0,30            | nizka (< 3,0)                      |
| 14.        | moški  | 31      | IK         | Calprest                 | 43,8                 | negativen        | 6,5               | srednja (3,0 - 7,0)                |
| 15.        | moški  | 59      | UK         | Calprest                 | 94,7                 | mejen            | 5,1               | nizka (< 3,0)                      |
| 16.        | ženski | 42      | UK         | Calprest                 | > 500                | Pozitiven        | > 12,00           | visoka (> 7,0)                     |
| 17.        | moški  | 48      | np         | Calprest                 | 166,9                | pozitiven        | < 0,30            | nizka (< 3,0)                      |
| 18.        | moški  | 41      | UK         | Calprest                 | 46,8                 | negativen        | 4,2               | srednja (3,0 - 7,0)                |
| 19.        | ženski | 38      | np         | Calprest                 | 150,3                | Pozitiven        | > 12,00           | visoka (> 7,0)                     |
| 20.        | moški  | 35      | UK         | Calprest                 | < 15,6               | Negativen        | > 12,00           | visoka (> 7,0)                     |
| 21.        | ženski | 25      | np         | Calprest                 | 144,6                | pozitiven        | 2,0               | nizka (< 3,0)                      |
| 22.        | ženski | 50      | UK         | Calprest                 | 318,6                | pozitiven        | 9,0               | visoka (> 7,0)                     |
| 23.        | ženski | 38      | UK         | Calprest                 | 55,4                 | Mejen            | > 12,00           | visoka (> 7,0)                     |
| 24.        | ženski | 26      | UK         | Calprest                 | > 500                | pozitiven        | 2,1               | nizka (< 3,0)                      |
| 25.        | ženski | 26      | UK         | Calprest                 | > 500                | pozitiven        | 6,6               | srednja (3,0 - 7,0)                |
| 26.        | ženski | 36      | UK         | Calprest                 | 430,7                | pozitiven        | 5,0               | srednja (3,0 - 7,0)                |
| 27.        | ženski | 36      | UK         | Calprest                 | 66,5                 | mejen            | 4,3               | srednja (3,0 - 7,0)                |
| 28.        | moški  | 25      | CB         | Calprest                 | 67,1                 | mejen            | 0,4               | nizka (< 3,0)                      |
| 29.        | ženski | np      | CB         | Calprest                 | 415,5                | pozitiven        | 1,0               | nizka (< 3,0)                      |
| 30.        | ženski | 25      | UK         | Calprest                 | 139,8                | pozitiven        | 2,1               | nizka (< 3,0)                      |
| 31.        | ženski | 28      | IK         | Calprest                 | 16,1                 | Negativen        | > 12,00           | visoka (> 7,0)                     |
| 32.        | ženski | 42      | CB         | Calprest                 | < 15,6               | negativen        | 4,3               | srednja (3,0 - 7,0)                |
| 33.        | ženski | 38      | UK         | Calprest                 | 25,1                 | negativen        | 3,1               | srednja (3,0 - 7,0)                |
| 34.        | moški  | 34      | CB         | Calprest                 | 55,7                 | mejen            | 6,0               | srednja (3,0 - 7,0)                |
| 35.        | moški  | 75      | CB         | Calprest                 | > 500                | pozitiven        | 2,7               | nizka (< 3,0)                      |
| 36.        | moški  | np      | np         | Calprest                 | 445,5                | pozitiven        | 5,8               | srednja (3,0 - 7,0)                |
| 37.        | moški  | 55      | CB         | Calprest                 | 91,6                 | mejen            | 5,6               | srednja (3,0 - 7,0)                |
| 38.        | moški  | 33      | CB         | Calprest                 | 29,4                 | negativen        | 1,01              | nizka (< 3,0)                      |

| Št. vzorca | Spol   | Starost | Vrsta KVČB | Metoda določanja f-kalp. | Konc. f-kalp. [µg/g] | Rezultat f-kalp. | Konc. IFX [µg/ml] | Vredost IFX glede na konc. [µg/ml] |
|------------|--------|---------|------------|--------------------------|----------------------|------------------|-------------------|------------------------------------|
| 39.        | moški  | 47      | CB         | Calprest                 | 26,5                 | negativen        | 8,2               | visoka (> 7,0)                     |
| 40.        | ženski | 41      | UK         | Calprest                 | 41,8                 | negativen        | 10,5              | visoka (> 7,0)                     |
| 41.        | moški  | 31      | IK         | Calprest                 | 411,1                | pozitiven        | 1,2               | nizka (< 3,0)                      |
| 42.        | moški  | 31      | IK         | Calprest                 | 78,0                 | mejen            | 6,4               | srednja (3,0 - 7,0)                |
| 43.        | moški  | 37      | UK         | Calprest                 | 109,9                | pozitiven        | < 0,30            | nizka (< 3,0)                      |
| 44.        | ženski | 42      | UK         | Calprest                 | > 500                | pozitiven        | 16,3              | visoka (> 7,0)                     |
| 45.        | moški  | 44      | CB         | Calprest                 | 145,3                | pozitiven        | 5,0               | srednja (3,0 - 7,0)                |
| 46.        | moški  | 45      | CB         | Calprest                 | 102,6                | pozitiven        | 3,6               | srednja (3,0 - 7,0)                |
| 47.        | ženski | 22      | CB         | Calprest                 | 242,5                | pozitiven        | 1,3               | nizka (< 3,0)                      |
| 48.        | moški  | 52      | CB         | Calprest                 | 54,5                 | mejen            | 2,7               | nizka (< 3,0)                      |
| 49.        | moški  | 42      | UK         | Calprest                 | 52,6                 | mejen            | 9,3               | visoka (> 7,0)                     |
| 50.        | moški  | 34      | CB         | Calprest                 | 145,7                | pozitiven        | 2,5               | nizka (< 3,0)                      |
| 51.        | ženski | 36      | UK         | Calprest                 | < 15,6               | Negativen        | > 12,00           | visoka (> 7,0)                     |
| 52.        | ženski | 36      | UK         | Calprest                 | 160,9                | pozitiven        | 5,5               | srednja (3,0 - 7,0)                |
| 53.        | moški  | 25      | CB         | Calprest                 | 122,9                | pozitiven        | 6,7               | srednja (3,0 - 7,0)                |
| 54.        | ženski | 38      | UK         | Calprest                 | 41,9                 | Negativen        | > 12,00           | visoka (> 7,0)                     |
| 55.        | moški  | 59      | np         | Calprest                 | 53,2                 | mejen            | 11,7              | visoka (> 7,0)                     |
| 56.        | moški  | 32      | UK         | Calprest                 | 56,9                 | mejen            | 2,1               | nizka (< 3,0)                      |
| 57.        | moški  | 53      | UK         | Calprest                 | 69,2                 | mejen            | 0,4               | nizka (< 3,0)                      |
| 58.        | ženski | 26      | UK         | Calprest                 | > 500                | pozitiven        | 2,0               | nizka (< 3,0)                      |
| 59.        | moški  | 28      | CB         | Calprest                 | 409,3                | pozitiven        | 1,4               | nizka (< 3,0)                      |
| 60.        | ženski | 36      | UK         | Calprest                 | 71,6                 | mejen            | 7,4               | visoka (> 7,0)                     |
| 61.        | moški  | 25      | CB         | Calprest                 | 482,0                | pozitiven        | 36,7              | visoka (> 7,0)                     |
| 62.        | moški  | 29      | CB         | Calprest                 | > 500                | pozitiven        | 4,3               | srednja (3,0 - 7,0)                |
| 63.        | moški  | 20      | UK         | Calprest                 | 80,5                 | mejen            | 2,2               | nizka (< 3,0)                      |
| 64.        | moški  | 39      | CB         | Calprest                 | 47,2                 | negativen        | 9,8               | visoka (> 7,0)                     |
| 65.        | moški  | 21      | CB         | Calprest                 | 71,5                 | mejen            | 5,4               | srednja (3,0 - 7,0)                |
| 66.        | moški  | 55      | CB         | Quantum Blue             | < 100                | mejen            | 9,2               | visoka (> 7,0)                     |
| 67.        | ženski | 35      | np         | Quantum Blue             | 202,8                | pozitiven        | 2,0               | nizka (< 3,0)                      |
| 68.        | moški  | 51      | CB         | Quantum Blue             | < 100                | mejen            | < 0,30            | nizka (< 3,0)                      |
| 69.        | moški  | 47      | CB         | Quantum Blue             | 182,0                | Mejen            | > 12,00           | visoka (> 7,0)                     |
| 70.        | ženski | 46      | CB         | Quantum Blue             | 325,0                | pozitiven        | 1,7               | nizka (< 3,0)                      |
| 71.        | moški  | 59      | UK         | Quantum Blue             | 150,0                | mejen            | 16,6              | visoka (> 7,0)                     |
| 72.        | moški  | 39      | UK         | Quantum Blue             | 662,0                | pozitiven        | 1,4               | nizka (< 3,0)                      |
| 73.        | moški  | 58      | UK         | Quantum Blue             | > 1800               | pozitiven        | < 0,30            | nizka (< 3,0)                      |
| 74.        | ženski | 38      | UK         | Quantum Blue             | > 1800               | pozitiven        | < 0,30            | nizka (< 3,0)                      |
| 75.        | moški  | 28      | UK         | Quantum Blue             | < 100                | mejen            | 4,1               | srednja (3,0 - 7,0)                |
| 76.        | ženski | np      | np         | Quantum Blue             | < 100                | Mejen            | > 12,00           | visoka (> 7,0)                     |
| 77.        | moški  | 50      | IK         | Quantum Blue             | 100,0                | mejen            | 8,6               | visoka (> 7,0)                     |
| 78.        | moški  | 22      | CB         | Quantum Blue             | 333,0                | pozitiven        | 5,6               | srednja (3,0 - 7,0)                |
| 79.        | moški  | 35      | UK         | Quantum Blue             | < 100                | mejen            | 7,6               | visoka (> 7,0)                     |

| Št. vzorca | Spol   | Starost | Vrsta KVČB | Metoda določanja f-kalp. | Konc. f-kalp. [µg/g] | Rezultat f-kalp. | Konc. IFX [µg/ml] | Vredost IFX glede na konc. [µg/ml] |
|------------|--------|---------|------------|--------------------------|----------------------|------------------|-------------------|------------------------------------|
| 80.        | moški  | 37      | np         | Quantum Blue             | 1666,0               | pozitiven        | < 0,30            | nizka (< 3,0)                      |
| 81.        | ženski | np      | np         | Quantum Blue             | > 1800               | pozitiven        | 4,0               | srednja (3,0 - 7,0)                |
| 82.        | moški  | 63      | IK         | Quantum Blue             | > 1800               | pozitiven        | 3,3               | srednja (3,0 - 7,0)                |
| 83.        | ženski | 28      | UK         | Quantum Blue             | 177,0                | mejen            | < 0,30            | nizka (< 3,0)                      |
| 84.        | ženski | 40      | UK         | Quantum Blue             | 127,1                | mejen            | 5,9               | srednja (3,0 - 7,0)                |
| 85.        | moški  | 44      | np         | Quantum Blue             | 147,0                | mejen            | 0,6               | nizka (< 3,0)                      |
| 86.        | moški  | 31      | UK         | Quantum Blue             | > 300                | pozitiven        | 7,2               | visoka (> 7,0)                     |
| 87.        | moški  | 25      | CB         | Quantum Blue             | 428,0                | pozitiven        | 1,5               | nizka (< 3,0)                      |
| 88.        | moški  | 37      | UK         | Quantum Blue             | 416,0                | pozitiven        | < 0,30            | nizka (< 3,0)                      |
| 89.        | ženski | 38      | CB         | Quantum Blue             | 476,0                | pozitiven        | 2,8               | nizka (< 3,0)                      |
| 90.        | moški  | 35      | np         | Quantum Blue             | 36,0                 | negativen        | 5,2               | srednja (3,0 - 7,0)                |
| 91.        | moški  | 47      | CB         | Quantum Blue             | > 1800               | pozitiven        | < 0,30            | nizka (< 3,0)                      |
| 92.        | moški  | 42      | UK         | Quantum Blue             | 1266,0               | pozitiven        | 5,6               | srednja (3,0 - 7,0)                |
| 93.        | ženski | 36      | UK         | Quantum Blue             | <100                 | mejen            | 10,4              | visoka (> 7,0)                     |
| 94.        | ženski | 22      | CB         | Quantum Blue             | > 1800               | pozitiven        | < 0,30            | nizka (< 3,0)                      |
| 95.        | ženski | 22      | CB         | Quantum Blue             | 362,0                | pozitiven        | 3,2               | srednja (3,0 - 7,0)                |
| 96.        | ženski | 45      | CB         | Quantum Blue             | 523,0                | pozitiven        | 7,3               | visoka (> 7,0)                     |
| 97.        | moški  | 32      | UK         | Quantum Blue             | 113,0                | mejen            | 1,4               | nizka (< 3,0)                      |
| 98.        | ženski | 26      | UK         | Quantum Blue             | > 1800               | pozitiven        | 11,0              | visoka (> 7,0)                     |
| 99.        | moški  | 38      | CB         | Quantum Blue             | 585,0                | pozitiven        | 3,3               | srednja (3,0 - 7,0)                |
| 100.       | ženski | 28      | IK         | Quantum Blue             | 242,0                | pozitiven        | 10,0              | visoka (> 7,0)                     |
| 101.       | moški  | 31      | IK         | Quantum Blue             | > 1800               | pozitiven        | < 0,30            | nizka (< 3,0)                      |
| 102.       | moški  | 21      | CB         | Quantum Blue             | 149,0                | mejen            | 5,0               | srednja (3,0 - 7,0)                |

\*np – ni podatka

**Priloga 2:** Mejne vrednosti koncentracije IFX pri določeni občutljivosti in specifičnosti

| <b>mejna vrednost</b> | <b>občutljivost</b> | <b>1 - specifičnost</b> |
|-----------------------|---------------------|-------------------------|
| - 0,700               | 0,000               | 0,000                   |
| 0,350                 | 0,216               | 0,082                   |
| 0,500                 | 0,216               | 0,122                   |
| 0,800                 | 0,216               | 0,143                   |
| 1,005                 | 0,235               | 0,143                   |
| 1,105                 | 0,235               | 0,163                   |
| 1,250                 | 0,255               | 0,184                   |
| 1,350                 | 0,275               | 0,204                   |
| 1,450                 | 0,333               | 0,224                   |
| 1,600                 | 0,353               | 0,224                   |
| 1,850                 | 0,373               | 0,224                   |
| 2,050                 | 0,431               | 0,224                   |
| 2,150                 | 0,471               | 0,245                   |
| 2,350                 | 0,471               | 0,265                   |
| 2,600                 | 0,490               | 0,265                   |
| 2,750                 | 0,510               | 0,286                   |
| 2,950                 | 0,529               | 0,286                   |
| 3,150                 | 0,529               | 0,306                   |
| 3,250                 | 0,549               | 0,306                   |
| 3,450                 | 0,588               | 0,306                   |
| 3,800                 | 0,608               | 0,306                   |
| (YI) 4,050            | 0,627               | 0,306                   |
| 4,150                 | 0,627               | 0,327                   |
| 4,250                 | 0,627               | 0,347                   |
| 4,650                 | 0,647               | 0,408                   |
| 5,050                 | 0,686               | 0,429                   |
| 5,150                 | 0,686               | 0,449                   |
| 5,300                 | 0,686               | 0,469                   |
| 5,450                 | 0,686               | 0,490                   |
| 5,550                 | 0,706               | 0,490                   |
| 5,700                 | 0,725               | 0,510                   |
| 5,850                 | 0,745               | 0,510                   |
| 5,950                 | 0,745               | 0,531                   |
| 6,200                 | 0,745               | 0,551                   |
| 6,450                 | 0,745               | 0,571                   |
| 6,550                 | 0,745               | 0,592                   |
| 6,650                 | 0,765               | 0,592                   |
| 6,950                 | 0,784               | 0,592                   |

| <b>mejna vrednost</b> | <b>občutljivost</b> | <b>1-specifičnost</b> |
|-----------------------|---------------------|-----------------------|
| 7,250                 | 0,804               | 0,592                 |
| 7,350                 | 0,824               | 0,592                 |
| 7,500                 | 0,824               | 0,612                 |
| 7,900                 | 0,824               | 0,633                 |
| 8,400                 | 0,824               | 0,653                 |
| 8,750                 | 0,824               | 0,673                 |
| 8,950                 | 0,824               | 0,694                 |
| 9,100                 | 0,843               | 0,694                 |
| 9,250                 | 0,843               | 0,714                 |
| 9,550                 | 0,843               | 0,735                 |
| 9,900                 | 0,843               | 0,755                 |
| 10,200                | 0,863               | 0,755                 |
| 10,450                | 0,882               | 0,776                 |
| 10,750                | 0,882               | 0,796                 |
| 11,350                | 0,902               | 0,796                 |
| 11,850                | 0,902               | 0,816                 |
| 12,350                | 1,000               | 0,980                 |
| 13,700                | 1,000               | 1,000                 |

**Priloga 3: Mejne vrednosti koncentracije IFX pri določeni občutljivosti in specifičnosti pri bolnikih z UK in CB**

| bolniki z UK   |              |                  | bolniki s CB   |              |                  |
|----------------|--------------|------------------|----------------|--------------|------------------|
| mejna vrednost | občutljivost | 1 - specifičnost | mejna vrednost | občutljivost | 1 - specifičnost |
| -0,700         | 0,000        | 0,000            | -0,700         | 0,000        | 0,000            |
| 0,350          | 0,263        | 0,043            | 0,350          | 0,143        | 0,176            |
| 0,900          | 0,263        | 0,087            | 0,700          | 0,143        | 0,235            |
| 1,700          | 0,316        | 0,130            | 1,005          | 0,190        | 0,235            |
| 2,050          | 0,368        | 0,130            | 1,155          | 0,190        | 0,294            |
| (YI) 2,150     | 0,474        | 0,174            | 1,350          | 0,238        | 0,353            |
| 2,650          | 0,474        | 0,217            | 1,450          | 0,333        | 0,353            |
| 3,600          | 0,474        | 0,261            | 1,600          | 0,381        | 0,353            |
| 4,150          | 0,474        | 0,304            | 2,100          | 0,429        | 0,353            |
| 4,250          | 0,474        | 0,348            | 2,600          | 0,476        | 0,353            |
| 4,650          | 0,474        | 0,391            | 2,750          | 0,524        | 0,412            |
| 5,050          | 0,526        | 0,391            | 3,000          | 0,571        | 0,412            |
| 5,300          | 0,526        | 0,435            | 3,250          | 0,619        | 0,412            |
| 5,550          | 0,579        | 0,435            | 3,450          | 0,667        | 0,412            |
| 5,750          | 0,632        | 0,435            | (YI) 3,950     | 0,714        | 0,412            |
| 6,250          | 0,632        | 0,478            | 4,650          | 0,762        | 0,529            |
| 6,900          | 0,684        | 0,478            | 5,200          | 0,810        | 0,588            |
| 7,300          | 0,737        | 0,478            | 5,500          | 0,810        | 0,647            |
| 7,500          | 0,737        | 0,522            | 5,800          | 0,857        | 0,706            |
| 8,250          | 0,737        | 0,565            | 6,350          | 0,857        | 0,765            |
| 8,950          | 0,737        | 0,609            | 7,000          | 0,905        | 0,765            |
| 9,150          | 0,789        | 0,609            | 7,750          | 0,952        | 0,765            |
| 9,850          | 0,789        | 0,652            | 8,700          | 0,952        | 0,824            |
| 10,450         | 0,789        | 0,696            | 9,500          | 0,952        | 0,882            |
| 10,750         | 0,789        | 0,739            | 10,900         | 0,952        | 0,941            |
| 11,500         | 0,842        | 0,739            | 13,000         | 1,000        | 1,000            |
| 12,350         | 0,947        | 0,957            |                |              |                  |
| 14,500         | 0,947        | 1,000            |                |              |                  |
| 17,300         | 1,000        | 1,000            |                |              |                  |