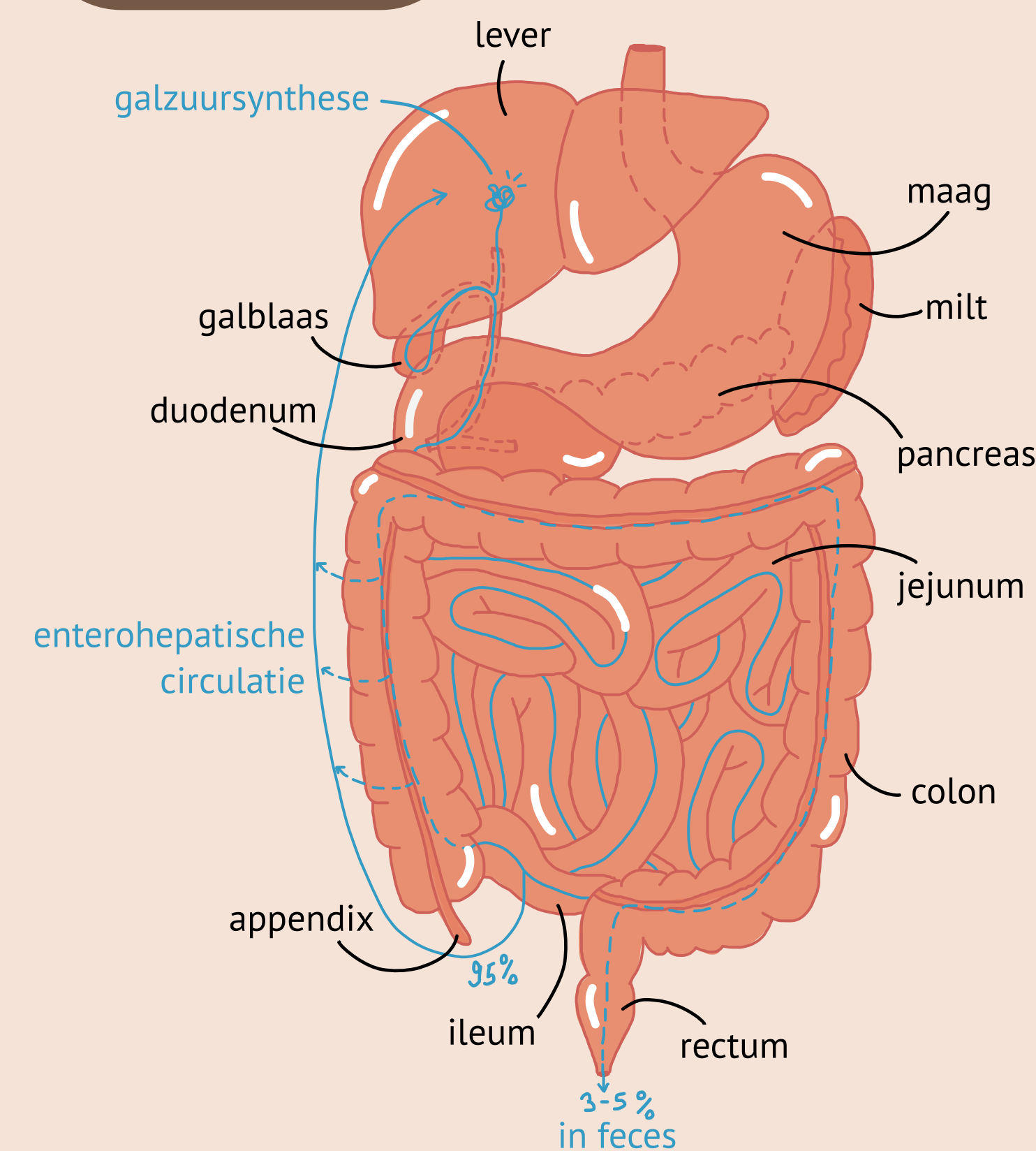


Validatie van een commercieel assay voor fecale galzuurkwantificatie op de EUROIMMUN Analyzer I

S. Otto, ing. E. Houben, H. Ceulemans, E. Guilliams, N. Pieters, S. Willebrords, prof. apr. K. Verbeke
UZ Leuven Laboratoriumgeneeskunde Digestie & Absorptie

Inleiding



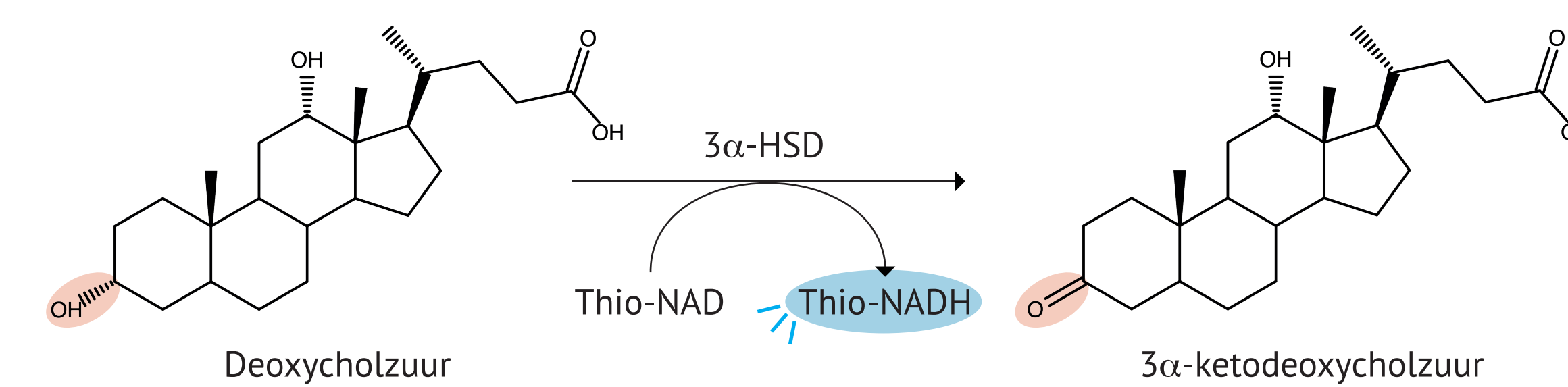
Galzuren worden gesynthetiseerd uit cholesterol in de lever en zijn belangrijk voor de vertering en absorptie van vetten en vetoplosbare vitamines (1). De hoeveelheid galzuren in feces kan een indicatie zijn voor een probleem bij de enterohepatische circulatie of bij de galzuursynthese. Deze problemen kunnen zorgen voor ziektebeelden zoals cholestase, diarree en steatorree (2,3).

Momenteel wordt op de dienst Laboratoriumgeneeskunde te UZ Leuven gebruik gemaakt van een 'lab developed test' (LDT) voor galzuurkwantificatie in fecesstalen. Het huidige project omvat de validatie van een nieuwe test voor galzuurkwantificatie in fecesstalen. Deze nieuwe test maakt gebruik van een commercieel beschikbaar assay (DRG Instruments GmbH, Bile Acids (stool) DX COL-6194) en een geautomatiseerd ELISA-systeem (EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, EUROIMMUN Analyzer I).

Materiaal & methoden

De validatie omvat een methodevergelijking en het bepalen van de precisie en de juistheid. Voor de methodevergelijking werden 20 stalen geselecteerd. Hierbij werden de resultaten vergeleken met de LDT en werd de sensitiviteit en specificiteit bepaald.

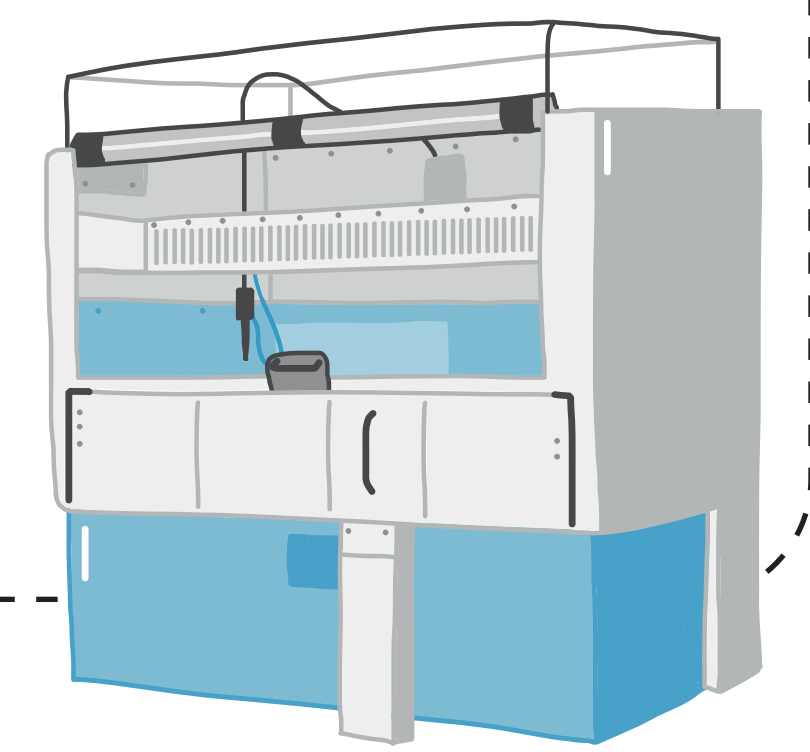
Voor de precisie werden drie fecesstalen geselecteerd in drie verschillende ranges. Per staal werden zes galzuurextracties uitgevoerd op dezelfde dag. Daarna werden gedurende drie dagen telkens twee extracten per staal gemeten. Per range werd de CV% berekend.



Figuur 1 Schematische voorstelling van de enzymatische reactie die deoxycholzuur, een secundair galzuur, ondergaat tijdens de meting aan de hand van het commerciële assay. 3α-HSD = 3α-hydroxysteroid dehydrogenase.

De juistheid werd geëvalueerd door het analyseren van zes stalen EKE-stalen.

Per staal werd 15 mg niet-gehomogeniseerd feces gecollecteerd met een dipstick applicatiesysteem (Immundiagnostik AG, IDK Extract®). De galzuren werden geëxtraheerd met behulp van de beschikbare buffer (IDK Extract 2,5x). De extractie werd herhaald bij een selectie aan stalen waarbij zelf 15 mg fecesstaal werd afgewogen. Het principe van de fotometrische assay berust op een enzymatische reactie (Figuur 1). Alle extracten werden geanalyseerd op de EUROIMMUN Analyzer I en de fecale galzuurconcentraties werden berekend aan de hand van de standaardcurve.

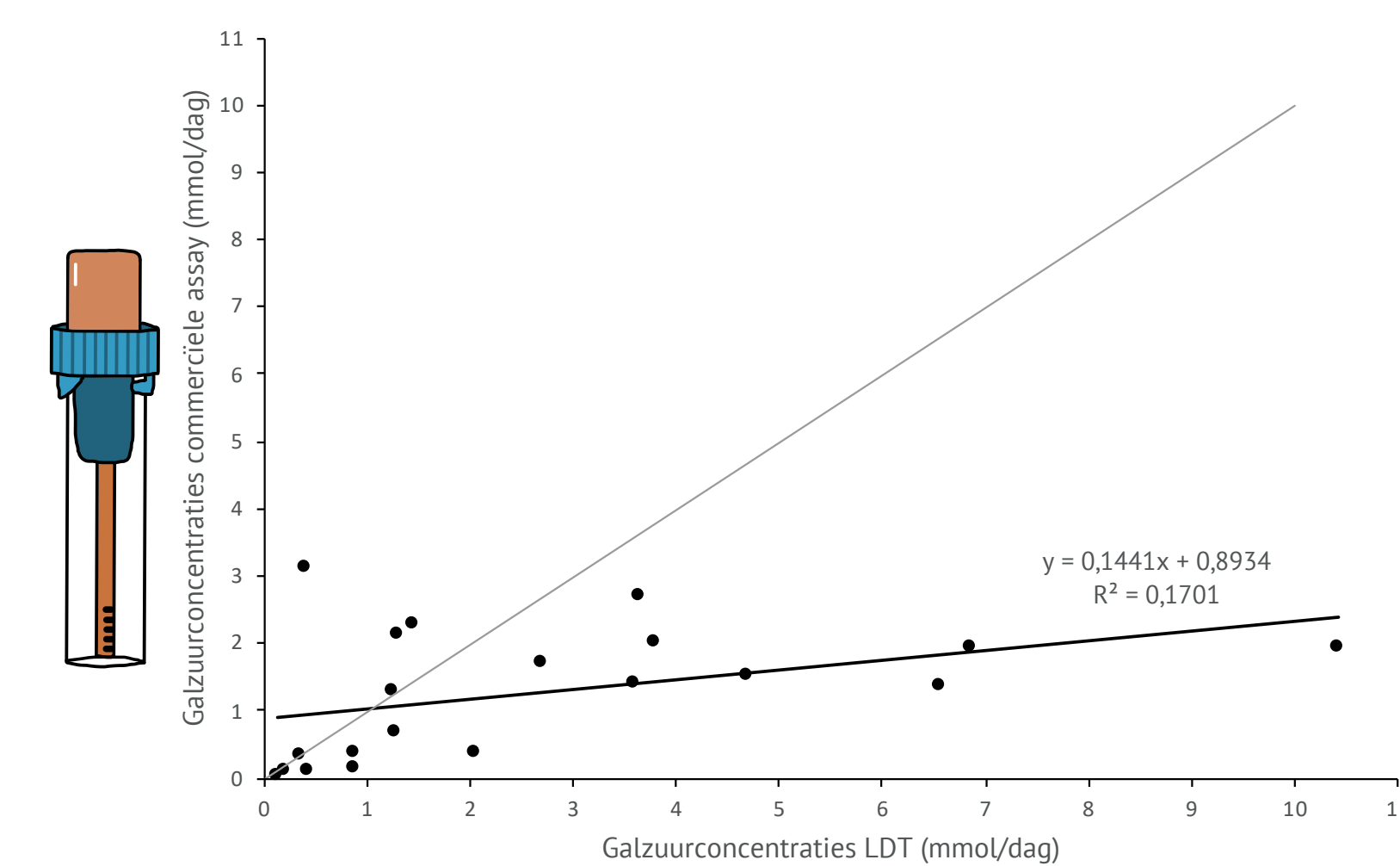


Resultaten & discussie

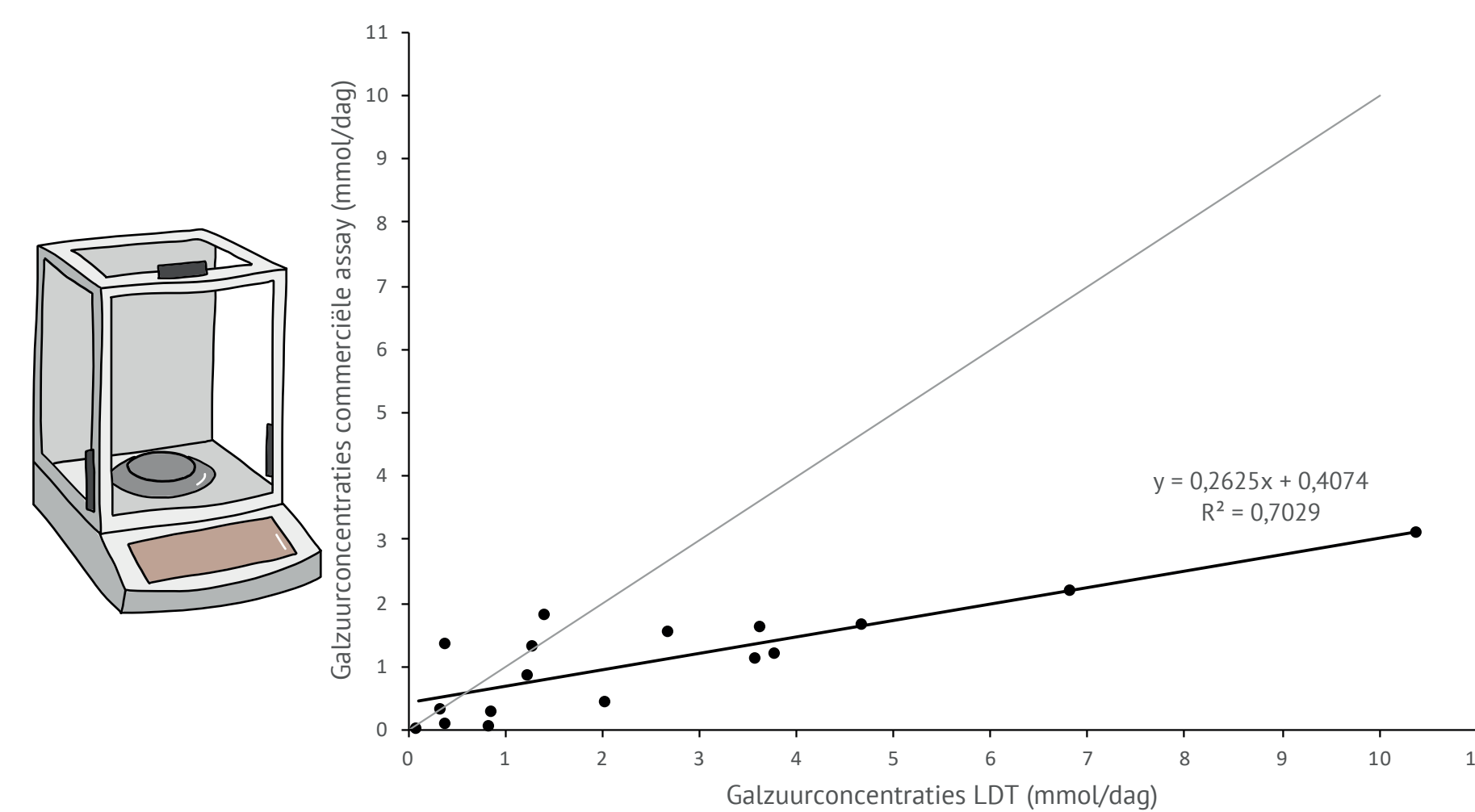
Op basis van de spreidingsgrafieken is er weinig correlatie tussen de LDT en het commerciële assay als de dipstick gebruikt wordt (Figuur 2). De correlatie tussen beide methodes is groter als 15 mg fecesstaal afgewogen wordt, maar in het algemeen liggen de resultaten van het commerciële assay lager dan de resultaten van de LDT (Figuur 3). De sensitiviteit en specificiteit van het commerciële assay ten opzichte van de LDT zijn echter wel groter dan 80%, dit betekent dat er ondanks de lage correlatie toch weinig vals positieve en vals negatieve stalen gemeten werden met het commerciële assay (Tabel 1). Een lage correlatie kan enerzijds te wijten zijn aan

de verkeerde bewaring van reagens 1 en 2 doordat foutieve bewaarcondities vermeld stonden op de reagentia. Anderzijds is er een verschil in voorbereiding van de fecesstalen. Bij de LDT worden namelijk gehomogeniseerde en gelyofiliseerde fecesstalen gebruikt in tegenstelling tot niet-gehomogeniseerde en verse fecesstalen die gebruikt worden bij het commerciële assay.

De CV%'s van de analyse van de precisie liggen hoger dan de waarde van 5,9% vermeld in de bijsluiters (Tabel 2). De resultaten van de juistheid liggen in lijn met de resultaten van de methodevergelijking (Tabel 3).



Figuur 2 Resultaten van de LDT ten opzichte van de resultaten van het commerciële assay waarbij het dipstick applicatiesysteem gebruikt werd tijdens de extractiestap.



Figuur 3 Resultaten van de LDT ten opzichte van de resultaten van het commerciële assay waarbij ongeveer 15 mg fecesstaal werd afgewogen tijdens de extractiestap.

Tabel 1 A. Sensitiviteit en specificiteit van het commerciële assay bij gebruik van de dipstick (n = 20); B. Sensitiviteit en specificiteit van het commerciële assay bij het afwegen van 15mg fecesstaal (n = 17).

	+ LDT	- LDT
A. + commerciële assay	84,6%	14,3%
- commerciële assay	15,4%	85,7%
B. + commerciële assay	81,8%	16,7%
- commerciële assay	18,2%	83,3%

Tabel 2 Resultaten van de analyse van de precisie. HR = hoge range (> 2,0 mmol/dag), MR = midden range (± 1,0 mmol/dag), LR = lage range (0,2 – 0,3 mmol/dag).

Range	c _{galzuur} LDT (mmol/dag)	Gemiddelde c _{galzuur} commerciële assay (mmol/dag)	SD	CV%
HR	6,56	1,380	0,312	22,57
MR	1,28	0,668	0,158	23,68
LR	0,21	0,117	0,008	7,03

Tabel 3 Resultaten van de analyse van de juistheid.

Staal	c _{galzuur} commerciële assay (µmol/g)	Gemiddelde c _{galzuur} EKE-rapport (µmol/g)
E1	0,932	4,2
E2	0,298	0,80
E3	1,556	2,7
E4	0,832	3,3
E5	1,986	3,6

Conclusie

De validatie is nog niet afgerond en er zullen nieuwe metingen uitgevoerd worden met reagentia die op de correcte condities bewaard werden. Doordat er een grotere correlatie is tussen de LDT en het commerciële assay bij het afwegen van 15 mg fecesstaal, wordt geopteerd voor deze methode in plaats van de methode met het dipstick applicatiesysteem.

Referenties

1. Tazuma S, Takikawa H. Bile Acids in Gastroenterology: Basic and Clinical. 1st 2017. ed. Tokyo: Springer Japan; 2017.
2. Blanco A, Blanco G. Chapter 12 - Digestion—Absorption. In: Blanco A, Blanco G, editors. Medical Biochemistry (Second Edition); Academic Press; 2022. p. 281-306.
3. Vitek L. Bile acid malabsorption in inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis. 2015;21(2):476-83.
4. Figuren, illustraties en tabellen: eigen werk