

Vergelijking van alternatieve natriumchloride oplossingen bij de uitvoering van cellcount op fecesstalen

Alyssa Bastaens; Chloë Verspecht en Iris Reniers, Labo Moleculaire Bacteriologie Rega Instituut

Introductie

Bij het cellcount experiment wordt een bevroren fecesstaal opgelost in natriumchloride (NaCl). Na een aantal verdunningsstappen wordt het aantal cellen gemeten met behulp van flowcytometrie.

In het onderzoek worden drie soorten NaCl-stockoplossingen vergeleken, deze zijn NaCl in infuuszakken, in flessen en een zelfgemaakte stock. Het onderzoek is van belang voor de continuïteit van het uitvoeren van de cellcount op de fecesstalen. Voor de onderzochte stalen was er twintig liter (L) NaCl nodig.

Het cellcount experiment wordt gebruikt om de sequencer data na PCR op de fecesstalen juist te kunnen interpreteren. [1]

Door eerdere studies, die de stabiliteit van medicijnen in NaCl onderzochten, wordt er in het uitgevoerde experiment geen significant verschil in resultaat verwacht. [2]

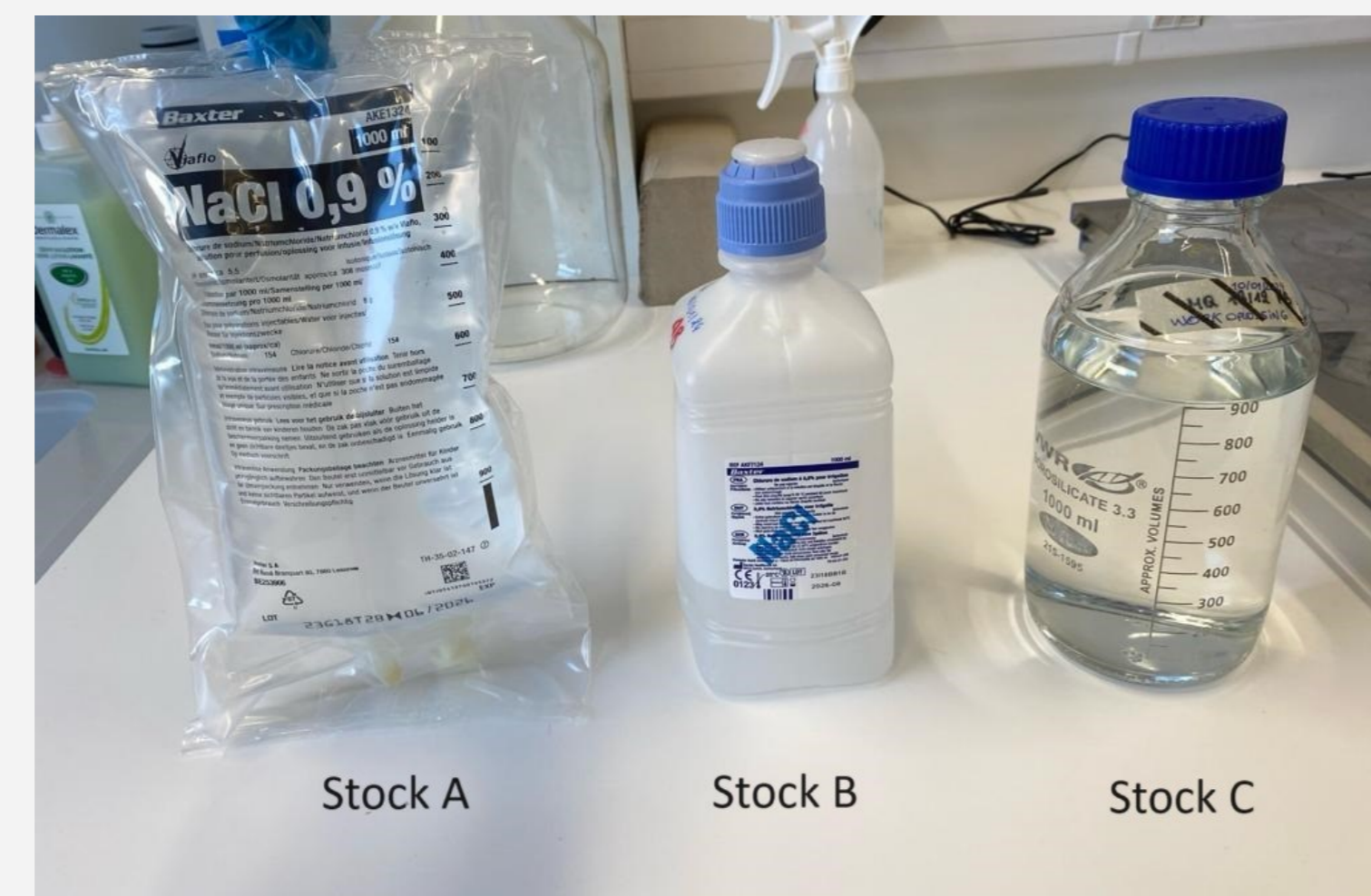
Het doel van het onderzoek is, geven de verschillende NaCl-stockoplossing een verschil in resultaat na flowcytometrisch onderzoek op fecesstalen?

Materiaal en methode

1. Voorbereiding

Bij afname werd de 'Bristol stool score' (BSS) ingevuld. De stalen werden gewogen en overgezet op divimats. Elke divimat is voorzien van elf gaten. Er werden per donor twee divimats gevuld. Deze werden ingevroren in -80°C. Na minimum 24 uur werden de pellets getransfereerd naar een tube.

2. NaCl stock

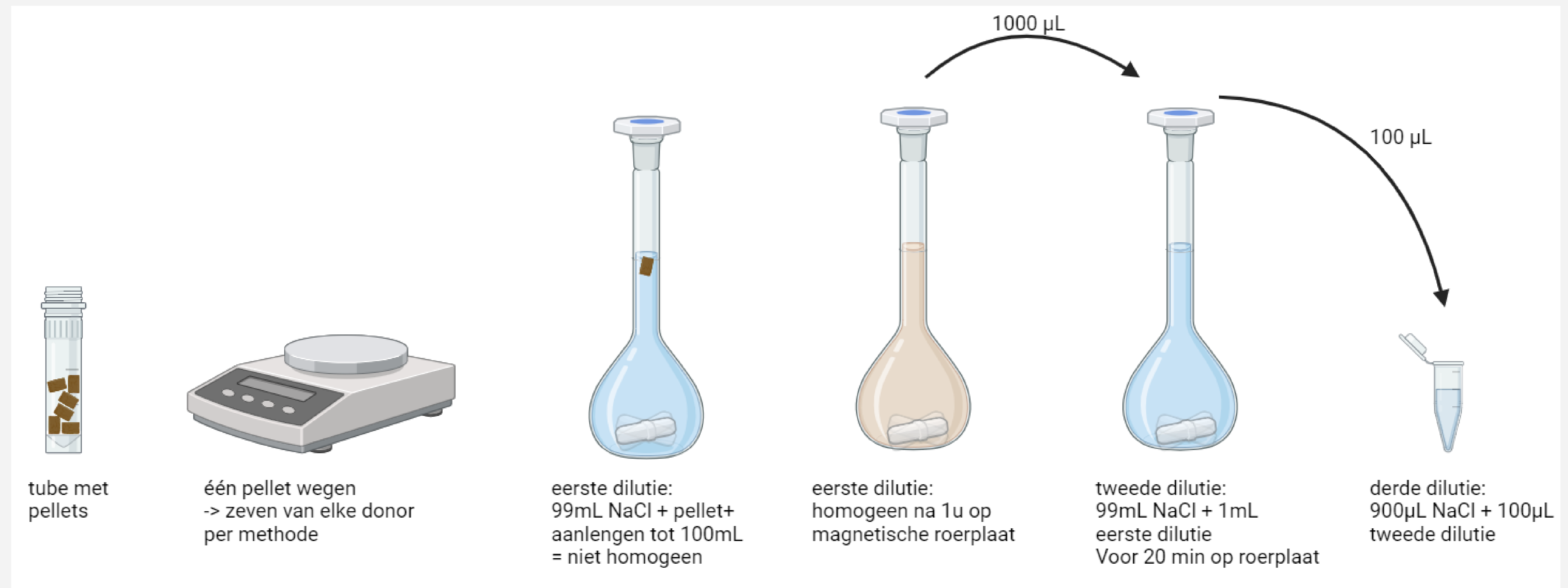


3. Cellcount

Scan de QR-code voor meer visualisatie. In figuur 1 wordt het cellcount procedure schematisch voorgesteld.



visualisatie



Figuur 1: schematische voorstelling van het cellcount procedure, apart uitgevoerd voor stock A, B en C; biorender

4. Cytoflex S Beckman Coulter

Aan de derde dilutie reactietubes werd 1 microliter (µL) van het fluorochroom SYBR green toegevoegd, de stalen werden opgemengd met de vortex en hierna twintig minuten op de heatblock (37°C en in het donker) geplaatst. Er werd van elk staal 200µL toegevoegd aan de deepwellplaat. De stalen werden telkens in duplo geanalyseerd. Ook werd er telkens een negatieve controle gebruikt, deze bevat 1 milliliter (mL) NaCl-stockoplossing.

Resultaten

Per methode werden zeven pellets van elke donor geanalyseerd. De resultaten werden geïnterpreteerd aan de hand van een boxplot, methodevergelijking en de correlatie.

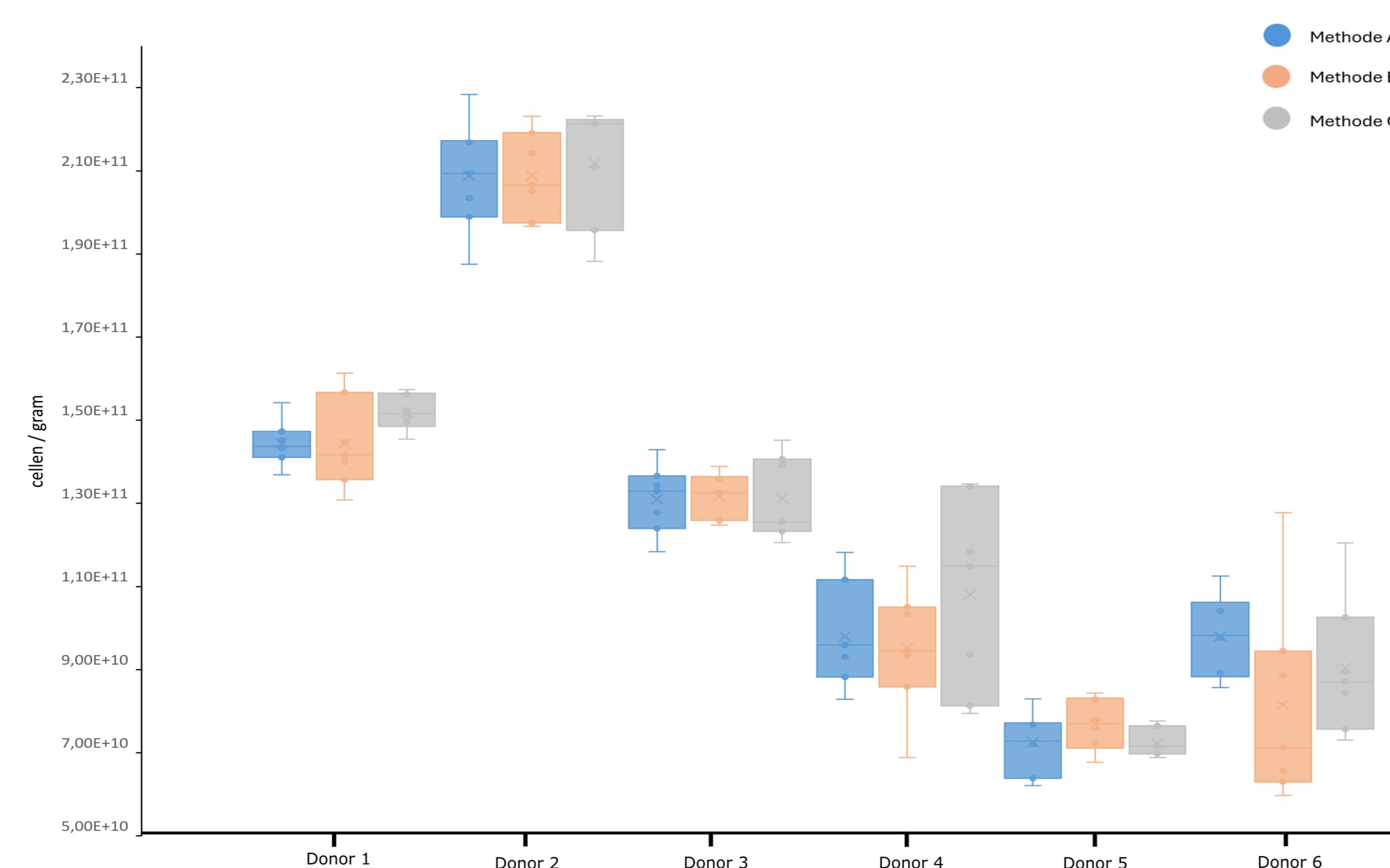
De boxplot is weergegeven in figuur 2. Bij de boxplot werd één uitschieter waargenomen, deze waarde werden uit de data gehaald. Zo kon de data niet onterecht beïnvloed worden. De uitschieter is onafhankelijk van de methode, de oorzaak is hoogstwaarschijnlijk een manipulatieve fout. Bij de methodevergelijking werd eerst een F-test uitgevoerd, de conclusie was dat hypothese 0 geaccepteerd kon worden. Dit wil zeggen dat de methoden een gelijke standaarddeviatie hebben. Hierna werd een T-test uitgevoerd, hieruit bleek dat nagenoeg alle resultaten op een gelijk gemiddelde wezen. Ook hier werd hypothese 0 geaccepteerd, dit doordat de P- of kanswaarde groter was dan alfa. Alfa bedroeg 0,05.

Uit de test voor de pearsons correlatie bleek dat tussen de methoden een duidelijke correlatie aanwezig is. Deze gegevens zijn te zien in tabel 1.

Tabel 1: De pearsons correlatie wordt per methode getoond.

Vergelijking	Pearsons correlatie
A vs B	0,932389
B vs C	0,934567
A vs C	0,927766

Als laatste werd de prijs van de methode vergeleken, hieruit bleek dat stock A en B vele malen duurder zijn. De kosten voor 20L zouden respectievelijk 51,20-93,20 euro en 58 euro zijn. De kostprijs voor stock C, de zelfgemaakte NaCl-oplossing, zou voor 20L maar 10,40 euro bedragen.



Figuur 2: Voorstelling per donor, elke methode krijgt één kleur, de waarde op de y-as zijn vermeld in cellen/g. Het gemiddelde, de afzonderlijke waarde en de standaarddeviatie worden weergegeven. Zonder uitschieters.

Conclusie

Als alle resultaten samen bekeken worden, kan er besloten worden dat de drie methoden overeen komen. Er kan dus in nood gewisseld worden tussen de stockoplossingen. De resultaten zullen hetzelfde blijven.

Na alle afwegingen kan stock C als voordeligste bekeken worden. Er zijn wel bijkomende voorbereidingsstappen nodig.

Voor bijkomstig onderzoek is het aangeraden om een grotere steekproef te bekijken. Zo kunnen eventuele verborgen verschillen nog achterhaald worden.

Dankwoord

Met dank aan Iris Reniers, Chloë Verspecht en Jara Wagemans.

Speciale dank aan Iris Reniers en Chloë Verspecht voor de praktische uitvoering, aan Sebastian Proost voor de hulp bij de statistische analyse.

Referenties

1. Props R., Kerckhof FM., Rubbens P., De Vrieze J., Hernandez Sanabria E., Waegeman W., Monsieurs P., Hammes F., Boon N. Absolute quantification of microbial taxon abundances. Nature. 2017; 584-587
2. Xia J., Chen P. Pubmed [Internet]. [Geraadpleegd op 13 december 2023]. Beschikbaar op <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32256048/>