

# Analyse van variatie in fecaal calprotectine

Jarne De Roover, Chloë Verspecht, Iris Reniers, Jara Wagemans

VIB-KU Leuven Center for Microbiology, Molecular Bacteriology, Rega Institute



KU LEUVEN



## Introductie

Calprotectine is een eiwit dat vrijgezet wordt door neutrofiële witte bloedcellen in het maag-darmkanaal tijdens ontstekingsprocessen. Het wordt in verhoogde concentraties gemeten in de stoelgang bij inflammatoire darmziekten (IBD) zoals de ziekte van Crohn en colitis ulcerosa. Hoewel deze parameter niet specifiek is voor een bepaalde aandoening, kan calprotectine in eerste instantie gebruikt worden om een IBD te onderscheiden van niet-inflammatoire problemen zoals het prikkelbare darm syndroom (PDS). Hoewel een endoscopie echter de gouden standaard is voor de diagnose van een IBD, is deze methode duur, onaangenaam en vaak onnodig in het geval van het PDS. Het bepalen van fecaal calprotectine biedt een minder invasieve onderscheidingsmethode.

Eerdere studies hebben aangetoond dat de concentratie calprotectine binnen een individu fluctueert. Omdat één enkele meting slechts een momentopname is, bestaat de mogelijkheid dat een diagnose wordt gemist indien de analyse op een ongunstig moment uitgevoerd wordt. Dit roept de vraag op of één enkele meting volstaat, of dat er herhaalde metingen nodig zijn. Door stoelgangstalen van gezonde vrijwilligers met een maand tussen de afnames te analyseren, wordt onderzocht of herhaalde metingen nodig zijn voor een nauwkeurige diagnose.

## Materiaal & methoden

**Doel:** Proberen vaststellen of er een significante verandering is tussen de concentratie calprotectine van tijds punt 1 en tijds punt 2.

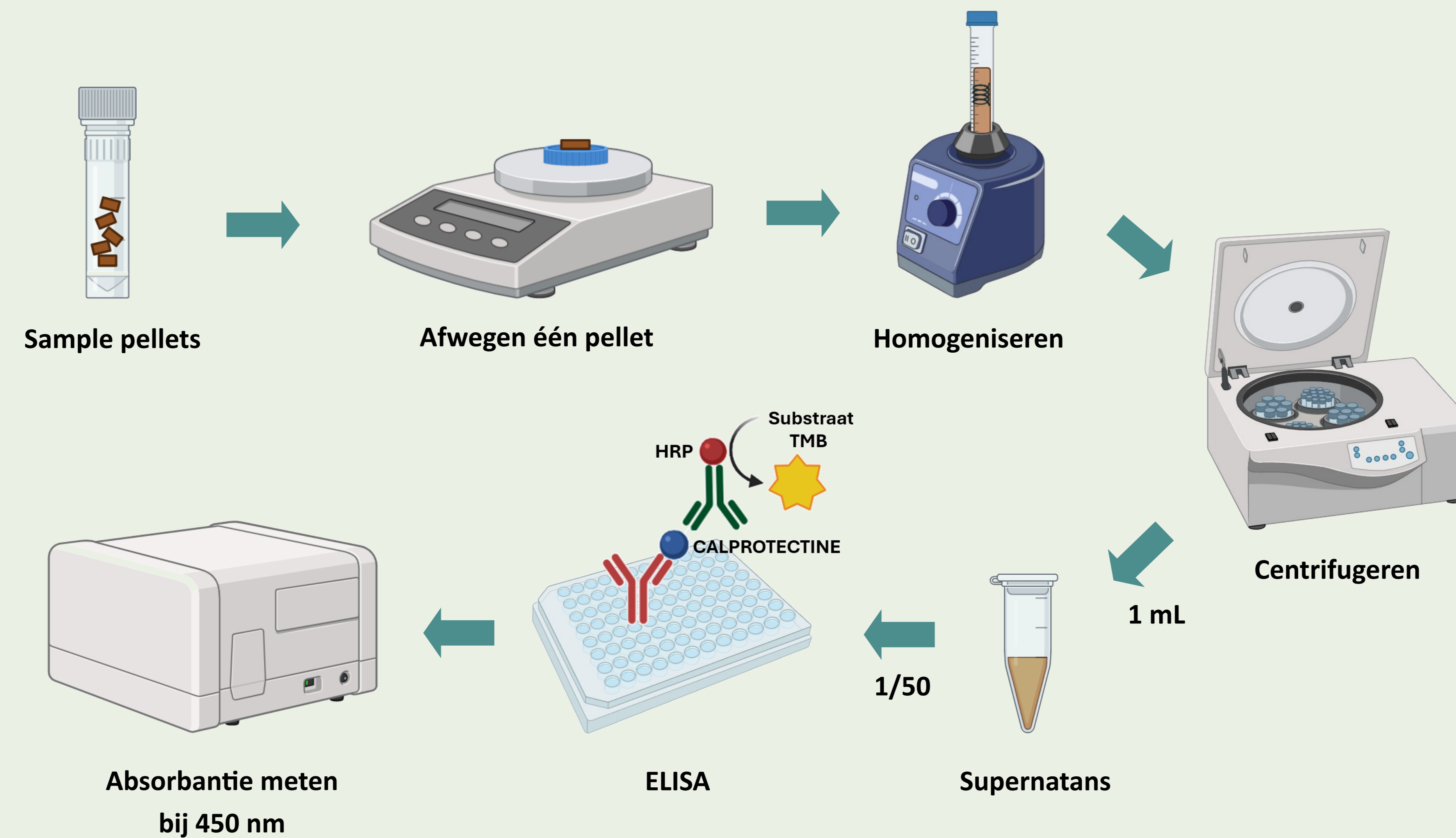
**Stalen:** 40 deelnemers stonden tweemaal een stoelgangstaal af met telkens een maand tussen de afname.

### Extractie van Calprotectine

Eén pellet van de diepgevroren fecesstalen werd telkens afgewogen en opgelost in 4 mL extractiebuffer uit de fCAL ELISA kit van Bühlmann Laboratories. De stalen zijn grondig opgemengd door te vortexen met behulp van een veer om een homogene oplossing te bekomen.

### ELISA

De test werd uitgevoerd op 80 stalen verdund in een verhouding van 1/150 met incubatiebuffer. De 96-well ELISA-plate is gecoat met muis anti-calprotectine antilichamen. Als secundair antilichaam wordt er gebruik gemaakt van muis anti-calprotectine antilichaam gelabeld met het enzym, horseradish peroxidase (HRP). Als substraat werd tetramethylbenzidine (TMB) toegevoegd. In de eerste twee kolommen is een standaardreeks *in duplo* opgenomen met twee controles (low & high).

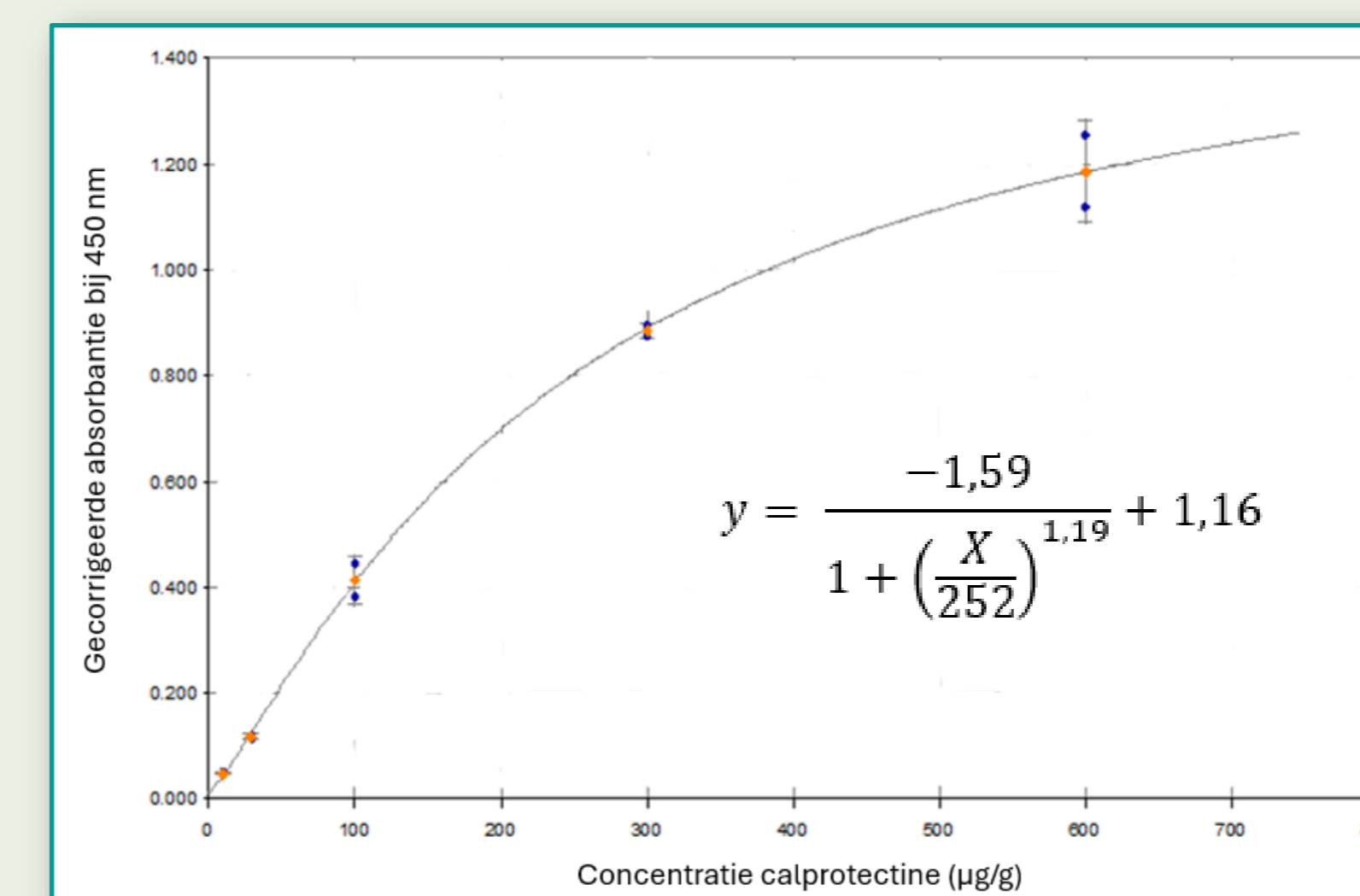


Figuur 1: Schematische voorstelling van het extractieprotocol en ELISA

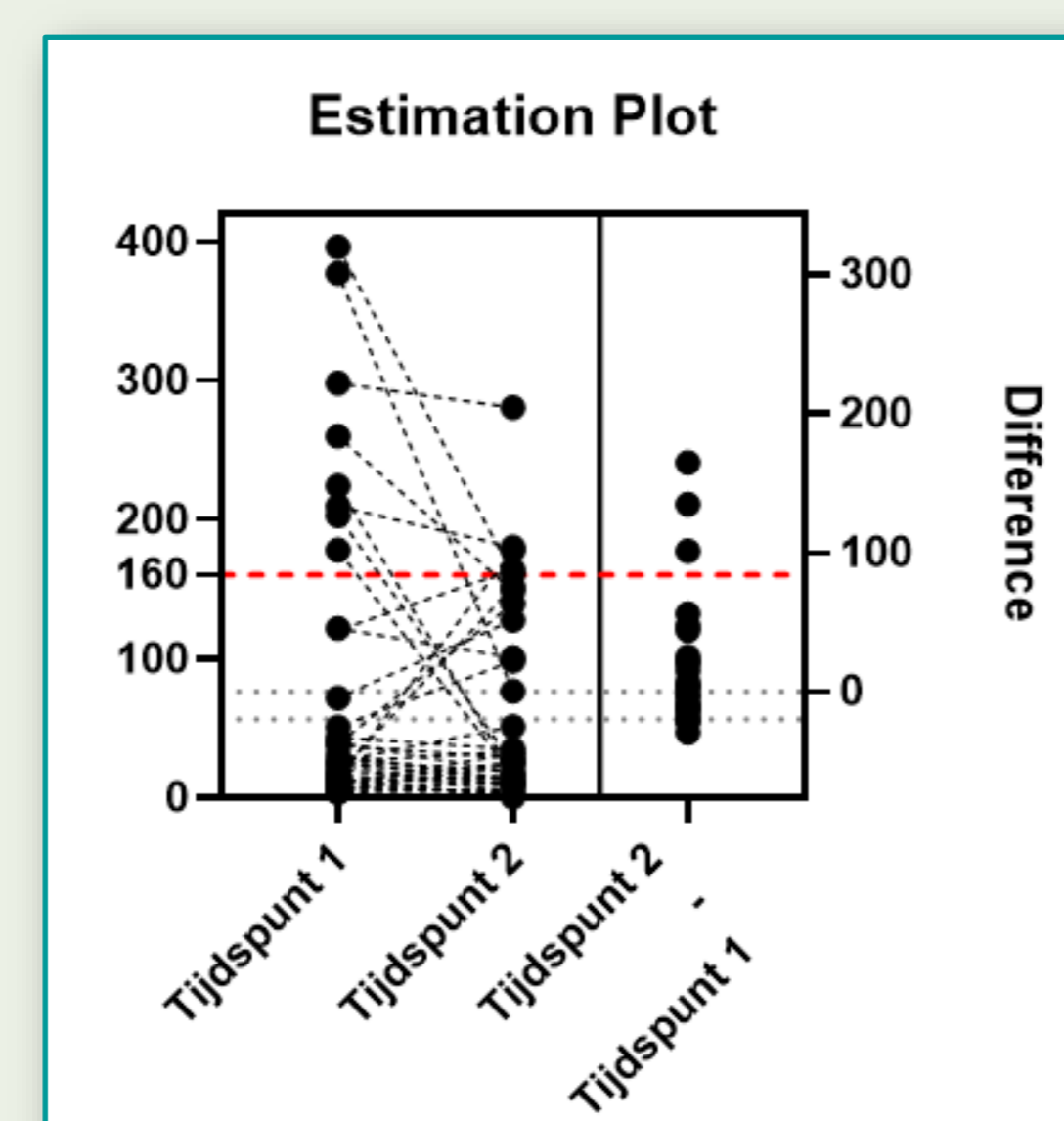
## Resultaten

### Standaardcurve

De absorbanties bij 450 nm van de stalen werden door middel van de standaardcurve omgezet naar de concentratie in  $\mu\text{g/g}$ . Hiervoor zijn standaarden van 10, 30, 100, 300 and 600  $\mu\text{g/g}$  gebruikt, voorgesteld op de x-as. De gecorrigeerde absorbantie werd uitgezet op de y-as. Aan de hand van de vergelijking uit de standaardcurve (Figuur 2) werd voor elk staal de concentratie calprotectine bepaald in  $\mu\text{g/g}$ .



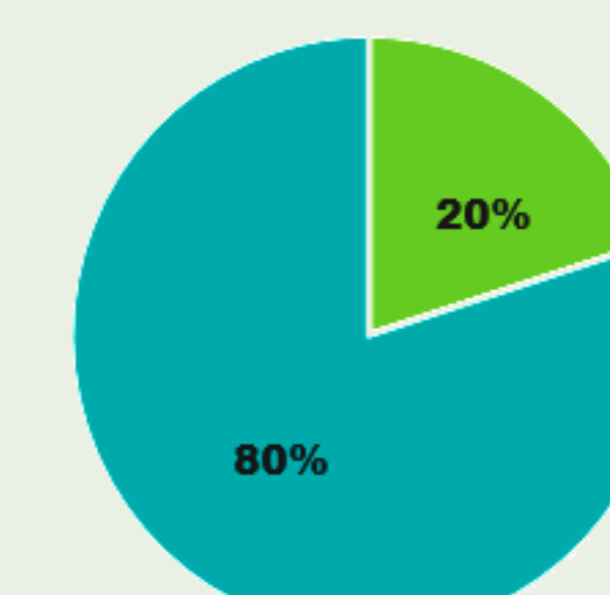
Figuur 2: Standaardcurve ELISA



Figuur 3: Estimation plot van de gepaarde T-test

### T-test

Voor de gegevensanalyse werd een gepaarde T-test uitgevoerd met de software Graphpad Prism 10.2.3. Er werd een P-waarde bekomen van 0,17 met hierbij een Estimation plot (zie Figuur 3). Links valt het gedrag van de koppels te zien, rechts het verschil tussen beide tijds punten. De grijze stippellijnen geven het 95% betrouwbaarheidsinterval weer, de rode stippellijn ligt op de klinische cutoff-waarde van 160  $\mu\text{g/g}$ . Hierop is te zien dat 8 waarden de grens van 160  $\mu\text{g/g}$  passeren na 1 maand, wat overeenkomt met 20% van de deelnemers voorgesteld op Figuur 4 (groen).



Figuur 4

## Conclusie

Bij het uitvoeren van de gepaarde T-test werd een P-waarde van 0,17 bekomen. Doordat de P-waarde groter is dan 0,05, is er geen bewijs voor een significante verandering tussen de tijds punten. In Figuur 3 is te zien dat het verschil tussen beide tijds punten vooral gespreid is rond het nulpunt, wat ondanks de aanwezigheid van enkele uitschieters erop wijst dat de verandering toevallig is. Daarom zijn herhaalde metingen niet noodzakelijk. Bij herhaling van het experiment kan het eventueel nuttig zijn om meerdere tijds punten te meten per deelnemer.

Hoewel er statistisch geen verschil is, valt er bij het evalueren van het klinisch belang te zien dat in 20% van de gevallen de verandering tussen de waarden de cutoff-grens van 160  $\mu\text{g/g}$  passeerde. Deze referentiewaarde van 160  $\mu\text{g/g}$  wordt in de diagnostiek gebruikt voor het beoordelen of de parameter al dan niet verhoogd is. Omwille van deze reden is het mogelijk dat er geen endoscopie wordt uitgevoerd, wat potentieel een ernstig gevolg kan hebben op het stellen van de diagnose van een IBD. Het aantonen van deze groep duidt erop dat het eventueel nodig is om de strategie aan te passen. Dit onderstreept het belang van het interpreteren van het klinisch belang bij de statistische gegevens.

## Referenties

1. Pathirana WG, Chubb SP, Gillett MJ, Vasikaran SD. Faecal Calprotectin. Clin Biochem Rev. 2018 Aug;39(3):77-90. PMID: 30828114; PMCID: PMC6370282.
2. Khaki-Khatibi, Durdi Qujeq, Mehrdad Kashifard, Soheila Moein, Mahmood Maniati, Mostafa Vaghari-Tabari, Calprotectin in inflammatory bowel disease, Clinica Chimica Acta, Volume 510, 2020, Pages 556-565, <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.08.025>.
3. BÜHLMANN Laboratories AG. (2018, October 12). fCAL ELISA Instructions for Use (Version EK-CAL\_IFU\_FDA).
4. D'Haens G, Ferrante M, Vermeire S, Baert F, Noman M, Moortgat L, Geens P, Iwens D, Aerden I, Van Assche G, Van Olmen G, Rutgeerts P. Fecal calprotectin is a surrogate marker for endoscopic lesions in inflammatory bowel disease. 2012 Dec; 18 (12): 2218-24. doi: 10.1002/ibd.22917. PMID:22344983.

## Dankwoord

Graag wil ik mijn stagementoren Chloë Verspecht, Iris Reniers, Jara Wagemans, Geert Huys en labocoördinator Ami De Weerd bedanken.