



UPPSALA  
UNIVERSITET

**Institutionen för medicinsk biokemi och mikrobiologi**

*Biomedicinska analytikerprogrammet*

**Praktisk handledare:** Aleksandra Mandic-Havelka, PhD  
Sjukhuskemist Karolinska Universitetslaboratoriet

# Evaluation of Different Extraction- and Analysis Methods for Calprotectin in Feces

Kocere Kurdé Akgun

Stockholm 2012

## ABSTRACT

**Background** Calprotectin is a protein expressed in the cytoplasm inside the neutrophile granulocytes. During inflammatory bowel disease (IBD), the neutrophile granulocytes are involved in a complex interaction at the inflammatory area where they die and release their content into the intestinal lumen. Therefore, calprotectin in stool is a suitable marker for diagnosis and measurement of the disease-activity in patients with IBD. The most commonly used method to detect calprotectin in stool is ELISA, but the process of manual preparation of stool samples is time-consuming.

**Aim** The objective of the study was to evaluate an extraction method that could replace manual preparation of fecal samples and to compare different methods for measuring Calprotectin in stool using two ELISA-methods from two manufacturers and one rapid-test.

**Methods** For extraction of calprotectin from stool samples we used sample collector tubes from Epitepe Diagnostics and fecal preparation kits from Roche. Two different ELISA-kits for measuring calprotectin concentration in stool were compared. Measurements of calprotectin with rapid-test from Epitepe Diagnostics were also performed and were compared with the two ELISA kits.

**Results** The results indicate a poor correlation between two extraction methods with Sample Collector Tube and Roche preparation kit. The comparison between the two ELISA-kits showed poor correlation. Evaluation of rapid test showed 33% false negative results with a cut-off value at 50 mg/kg.

**Conclusion** Evaluation of products from Epitepe Diagnostics showed poor correlation with the Bühlmann ELISA and an unreliable rapid test. Therefore, none of evaluated products from Epitepe Diagnostics is accurate enough to be used for clinical diagnosis in the laboratory.

---

**Keywords:** Calprotectin, Inflammatory marker, IBD, ELISA, rapid test

## INTRODUKTION

I Sverige beräknas cirka 1,5 miljoner personer lida av kroniska mag-tarmbesvär och bland dessa finns det cirka 55 000 patienter med en inflammatorisk tarmsjukdom.

Inflammatoriska tarmsjukdomar är vanligare i den industrialiserade världen, 6-22 % av befolkningen i industriländer lider av någon typ av kronisk inflammatorisk tarmsjukdom [1]. Cirka 1500 nya personer drabbas varje år av IBD (Inflammatory Bowel Disease) i Sverige. IBD är ett samlingsnamn för flera typer av inflammatoriska tarmsjukdomar som kan drabba människor i olika åldrar. De två mest frekventa sjukdomar är Ulcerös Kolit (UC) och Crohns Sjukdom (CD) [2].

UC är en kronisk tarmsjukdom som kommer i skov, inflammationen är ytlig och sprider sig framförallt i tjocktarmens slemhinnor. Cancerrisken för patienter med UC ökar med åren, därför är det vanligt att man opererar bort tjocktarmen efter 10 år eller mer [3].

CD är en kronisk tarmsjukdom som kan drabba hela mag-tarmkanalen. Inflammationen drabbar alla vägglager i tarmen och leder till utveckling av fistlar och sår i den drabbade regionen i tarmen.

Gemensamt för UC och CD är att de är kroniska med varierande sjukdomsaktivitet och att de drabbar mag-tarmkanalen. Symptom vid IBD är bland annat frekventa diarréer, buksmärtor och viktnedgång. Dessa symptom förekommer även hos patienter med Irritable Bowel Syndrome (IBS). Ett viktigt moment vid utredning av sådana tarmbesvär är att urskilja IBD från IBS för att kunna ge patienterna rätt behandling. För patienter med IBS finns det möjligheter att påverka sjukdomsbilden med hjälp av rådgivning (kost och motion) medan patienter med IBD får antiinflammatorisk behandling [5].

Gastroskopi och koloskopi är två viktiga undersökningar vid misstanke om IBD. Dessa undersökningar utförs även för att utesluta att patienten har IBS. Orsaken för IBS och IBD är okända men studier tyder på att yttre faktorer som t.ex. rökning i samband med

genetiska faktorer kan bidra till utveckling av IBD samtidigt som rubbad tarmmotorik kan vara orsak till IBS [4]. Koloskopi är idag i regel förstahandsalternativet vid utredning av inflammatoriska tarmsjukdomar och är en viktig undersökning för att säkert kunna diagnostisera typen av tarmsjukdom men för patienten i fråga är det smärtsamt, invasivt och kräver förberedelser. Utöver nackdelar som berör patienten vid koloskopiundersökning är själva undersökningen kostsam och kräver en större personalinsats. För att underlätta diagnostiseringen av IBD för både vården och patienten skulle man behöva en markör som är specifik, billig och icke invasiv för patienten. Fekalt kalprotektin är ett protein som uppfyller dessa krav.

Kalprotektin tillhör S100-proteinfamiljen som består av 25 lågmolekylära proteiner. Proteiner som tillhör S100-familjen har molekylvikter i intervallet 10-12 kDa och är i regel mycket stabila. Kalprotektin är ett kalciumbindande protein som består av två proteinsubenheter, S100 A8 och S100 A9, som tillsammans bildar en heterodimer.

Kalprotektin har många funktioner som antiinflammatorisk effekt intracellulärt i den neutrofila granulocyten, modifiering av enzymatiska aktiviteter, reglering av fosforylering av andra proteiner via proteinkinaser och är involverad i upprätthållande av kalciumhomeostas och har även antibakteriella och antifungicida egenskaper [6].

Normalvärde för fekalt kalprotektin i feces är <50mg/kg, gränsvärdet gäller för barn från 4 år och vuxna. Studier har visat att barn yngre än 4 år har högre gränsvärden och nyfödda barn kan ha normalvärden omkring 200-300mg/kg [7].

Kalprotektin utgör ca 60 % av proteininnehållet i den neutrofila granulocyten cytoplasma. Tidigare studier har hittat samband mellan inflammationssjukdomar och halten utsöndrat kalprotektin, bland annat i inflammatoriska tarmsjukdomar, glomerulonefrit, astma och reumatoid artrit [8]. Kalprotektin kan mätas i feces, urin, serum, plasma och synovialvätska i inflammerade leder. Nivåer av kalprotektin i blodet har i flera studier visat sig

korrelera väl med sjukdomsaktiviteten. Hos patienter med Sjögrens syndrom kan Kalprotektin även detekteras i saliv hos de patienter som har inflammation i spottkörtlarna [9]. Inflammationsreaktionen som sker i tarmregionen hos patienter med IBD involverar neutrofila granulocyter som dras till den inflammerade regionen. Neutrofila granulocyter dör efter att ha varit aktiva i den inflammerade regionen och deras innehåll hamnar i avföringen. Därför är fekalt kalprotektin en bättre markör för att följa upp en patient med inflammatorisk tarmsjukdom än kalprotektin i blodet.

För att mäta fekalt kalprotektin används Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA). Det är en sandwich-ELISA där kalprotektin är antigenet i ett så kallat antikropps-antigen-komplex. I denna studie jämförs ELISA-metod från Bühlmann (Schönenbuch, Schweiz) med ELISA-metod från Epitope Diagnostics (San Diego, California, USA), med målet att utreda om den sistnämnda metoden uppfyller kraven för att tas i bruk på Karolinska universitetslaboratoriet i Solna, Stockholm. ELISA-kitet från Bühlmann innefattar manuell extrahering av kalprotektin från feces. Detta är ett tidskrävande moment som omfattar flera steg. Epitope Diagnostics erbjuder så kallade sample collector tube som består av rör med extraktionslösning i. Sample collector tube ska möjliggöra enklare och snabbare upparbetning av fecesproverna.

Syftet med arbetet är att utvärdera en upparbetning av fecesprover med sample collector tube från Epitope Diagnostics jämfört med verksamhetens nuvarande extraktionsmetod från Roche. Vi testar även ett snabbtest från Epitope Diagnostics.

## MATERIAL OCH METODER

Till denna studie samlades 57 fecesprover. Patienterna hade tagit feces proverna på egen hand och skickat dem till laboratoriet i ett speciellt falconrör med sked.

Samtliga prover hade vid tidigare tillfälle analyserats med en ELISA-metod från Bühlmann, som används på laboratoriet, så att det fanns tidigare koncentrationsvärden för kalprotektin för samtliga prover. Till metoden användes 96-hålsplattor med brunnar som innehåller monoklonala antikroppar riktade mot kalprotektin.

Prover med koncentrationsintervallet <30-8000 mg/kg kalprotektin valdes för utvärdering av ELISA-kit från Epitope Diagnostics.

Det fanns två alternativ för upparbetning av feces för att utföra ELISA med kit från Epitope Diagnostics, ett alternativ är att upparbeta fecesprover med medföljande rör med buffertextrakt, så kallade "sample collector tube" som enligt företaget var designade för att samla rätt mängd feces. Detta val av rör skall i praktiken göra upparbetning av provet inför ELISA snabbare och enklare. Det andra alternativet är att upparbeta fecesprover med Roche fecal sample preparation kit (Roche, Sverige), kitet är lämpligt att använda vid preparation av fecesprover för ELISA med kit från Epitope Diagnostics.

Det sistnämnda alternativet för extraktion kräver uppvägning, spädning med rätt mängd extraktionsbuffert, centrifugering och alikvotering innan fecesprovet kan analyseras med en ELISA.

Samtliga metoder utfördes enligt tillverkarnas metodbeskrivningar. Rör från Roche används som "Gold standard" vid jämförelse mellan sample collector tube och Roche fecal sample preparation kit. Analysresultaten från båda preparationer jämförs med tidigare svar erhållna på laboratoriet. Proverna analyseras med ELISA från Epitope Diagnostics.

### **Extraktion av fecesprover med Epitope Diagnostics sample collector tube**

Till detta försök användes 18 prover för att jämföra vilket rör som är lämpligast att använda för extrahering av kalprotektin från fecesprover. Sample collector tube med extraktionsbuffert har korkar i båda ändarna och den ena korken har en spiralformad sticka. Stickan på korken ska stickas ned i avföringen för att fånga upp provet. Provet fastnar i spiralen, korken skruvas sedan på igen så att stickan med provet kommer ner i extraktionsbufferten. Provet skakas och vänds upp- och ner.

### **Extraktion av fecesprover med extraktionsmaterial från Epitope Diagnostics med Roche fecal sample preparation kit**

I detta delmoment ingick 57 prover med olika koncentrationer av kalprotektin mellan cirka 30-1800 mg/kg. Till detta moment användes ett set från Roche bestående av ett rör med fjäder och en liten kopp som skall skruvas till röret. Koppen fylldes med feces och vägdes. Koppen med feces skruvades på botten av röret med fjädern, Assay Buffer tillsattes enligt spädningstabell (Epitope Diagnostics, EDI Quantitative Fecal kalprotektin ELISA). Röret vortexades sedan tills feces löstes upp i extraktionsbufferten. Proverna stod i rumstemperatur i 10 min, sedan centrifugerades rören vid 3000g i 5 min i rumstemperatur. Supernatanten överfördes därefter till ett nytt rör. Provet späddes 1:40 och 1:9 innan analys.

### **ELISA för kvantitativ mätning av humant kalprotektin i feces**

Proverna analyserades i duplikat enligt instruktioner från tillverkaren (Epitope Diagnostics Inc, Quantitative Fecal Calprotectin ELISA). Absorbansen mättes vid 405nm.

### **Kalprotektin snabbtest (Epitope Diagnostics)**

I detta delmoment ingick 26 prover med koncentrationsintervallet 50-100 mg/kg, 200-300 mg/kg, 400-600 mg/kg och enstaka prover med >1000mg/kg, samtliga prover var analyserade med ELISA från Bühlmann.

Snabbtestet bestod av två delar, en extraktionsdel och en avläsningsdel. Feces samlades med en sticka som är fäst i ena korken av röret, extraktionsröret vortexades och vändes upp och ner. Längst ner i avläsningsröret finns monoklonala antikroppar mot kalprotektin.

Extraktionsröret skruvas ihop med avläsningsröret och extraktionslösningen suggs upp till avläsningsdelen. Provet fick stå i 5min innan avläsning. Under denna tid sker en bindning mellan märkta monoklonala antikroppar och kalprotektin från feces provet (antigenet).

Därför migrerar antikropp-antigenkomplexet upp i avläsningsdelen, mot det nedre bandet.

På det nedre bandet som indikerar positivt resultat finns antikroppar mot kalprotektin som binder till kalprotektin i komplexet och ett rött band uppstår som visar att provet innehåller >50µg/g kalprotektin. Det övre är ett så kallat kontrollband som inte innehåller antikroppar mot kalprotektin. Det bandet binder till fria antikroppar mot kalprotektin och ger upphov till en röd färg som visar att testet har fungerat som det ska. Resultat där enbart det övre bandet visas är negativa, vilket betyder att det inte finns kalprotektin i provet eller att provet innehåller en låg nivå (<50mg/kg) kalprotektin. Stickkan avlästes enligt anvisningar i metodbeskrivningen.

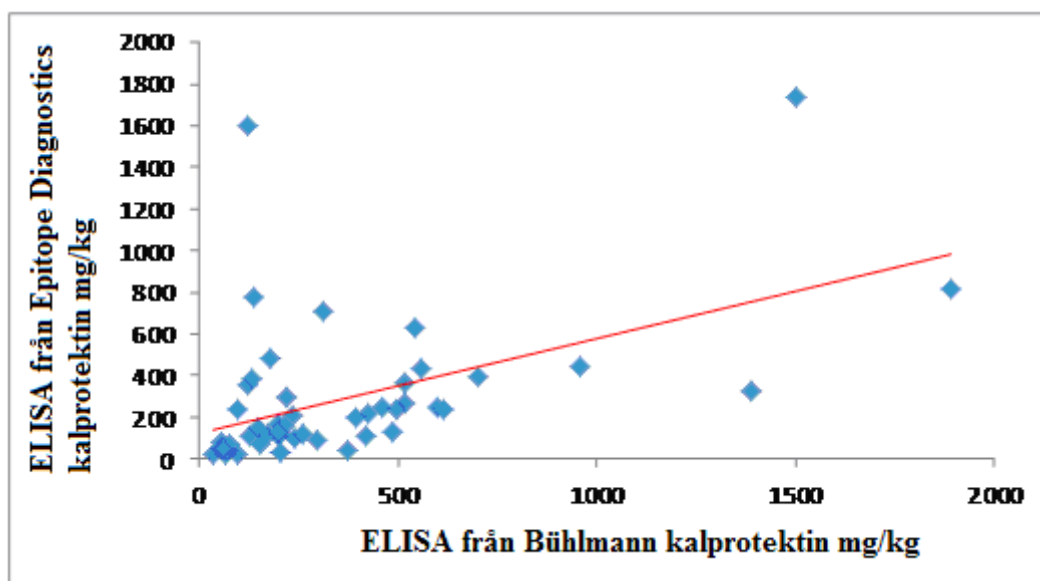




## Jämförelse mellan ELISA-metoder från Bühlmann och Epitope Diagnostics

(med Roche Preparation Kit)

I detta delmoment analyserades proverna med två ELISAMetoder, en från Epitope Diagnostics och en från Bühlmann som idag används på laboratoriet och en från Epitope Diagnostics som skulle utvärderas för eventuell införande i verksamheten. Jämförelsen visar att det inte finns någon korrelation mellan ELISAMetoderna, korrelationskoefficienten var 0,24, se figur 2.



**Figur 2** Jämförelse mellan Bühlmann och Epitope Diagnostics

(fecesprover upparbetades med Roche Preparation Kit). Korrelationskoefficienten mellan de två metoderna var 0,24.

### Utvärdering av snabbtest

I detta delmoment ville vi utvärdera ett snabbtest från Epitope Diagnostics som eventuellt skulle kunna ersätta den nuvarande ELISA-metoden. Resultatet visade att prover med låg kalprotektin koncentration (<50mg/kg) var negativa när de analyserades med snabbtestet.

Vi såg att prover med höga värden, omkring 1000mg/kg kalprotektin visade endast ett svagt positivt band. Vid avläsning av intensitet på banden var det svårt att uppskatta antal band som

visades på avläsningsdelen och olika individer hade olika uppfattningar om antalet synliga band.

Prover med förhöjda värden fick däremot inte det förväntade positiva resultatet förrän de kom upp i koncentration på ca 500mg/kg.

Tillverkaren (Epitope Diagnostics) använder ett cut-off värde på 50 mg/kg. Antalet falskt negativa resultat i det analyserade materialet var 9 av 26 (33 %). Om man i stället använder ett cut-off värde på 100mg/kg skulle 5 av 26 (18,5 %) resultat vara falskt negativa.

## DISKUSSION

I Sverige analyseras cirka 80 000 prover/år av kalprotektin i feces, det är en robust och enkel markör som är lämplig att använda vid IBD-diagnostik. Hittills är kalprotektin mätt i feces den enda markören som används kliniskt för att skilja mellan IBS och IBD. Markören korrelerar väl med fynden från koloskopiundersökningar och den kliniska bilden hos patienter med IBD [10]. I en tidigare studie har man testat att använda vanligt förekommande inflammationsmarkörer för att detektera IBD hos barn. I studien använde man följande markörer: CRP, SR och kalprotektin. Resultatet visade en låg sensitivitet för CRP och SR, 36 % respektive 41 %, medan för F-kalprotektin var sensitiviteten 95 % [11]. Denna studie visar återigen att kalprotektin är överlägset bäst för IBD-diagnostik.

Manuell upparbetning av fecesprover är tidskrävande och fysiskt ansträngande för laboratoriepersonalen. Den innehåller flera delmoment som invägning, spädning, blandning, centrifugering och alikvotering av provet. När laboratoriepersonal utför manuell extrahering är det viktigt att se till att fecesproven löses upp helt i extraktionslösningen. Till detta moment används Vortex-mixer, vilket varken är ergonomiskt eller fysiskt behagligt när 40-50 prover/dag ska mixas med hög skakhastighet. Epitope Diagnostic erbjuder en enklare extrahering med sample collector tube. Dessa rör är specialdesignade för upparbetning av

fecesprover. Fördelen med att använda sample collector tube är att de förenklar manuell extraktion av fecesprover, sparar tid och underlättar laboratoriearbete. Meningen med sample collector tube är att extraktionen ska vara så enkel att den ska kunna göras av patienten som i efterhand ska lämna över provet till laboratoriet. När laboratoriet väl har fått in provet är det färdigextraherat och kan direkt analyseras med ELISA.

Vår uppfattning är att användning av sample collector tube minskar möjligheten att samla rätt mängd feces speciellt om avföringen har lös konsistens. Konsistensen på avföringen spelade stor roll vid provsamlingen i och med att prover med lös konsistens inte fastnar på provstickan [12]. Konsistensen leder till en fråga om standardisering mellan provmängd och förväntad mängd eftersom tillverkarna för sample collector tube inte angivit rekommenderad provmängd i sina instruktioner. Detta medförde en viss förvirring då en del prover fastnade lättare på stickan än andra prover med lösare konsistens.

Hållbarheten för extraherat prov med sample collector tube är 3 dagar i rumstemperatur. I rå feces är kalprotektin hållbar i 4-7 dagar [13].

På grund av stora skillnader i resultat erhållna med de två extraktionsmetoderna kommer Sample collector tube inte vara ett alternativ för extrahering av prover även om laboratoriet skulle kunna vinna tid på att använda kitet.

I dagsläget saknas en nationell kalibrator för kalprotektin, detta kan vara en orsak till den svaga korrelationen mellan de två ELISA-metoderna. Bühlmann och Epitope Diagnostics är inte likvärdiga och det är därför inte lämpligt att byta ut Bühlmann mot Epitope Diagnostics. Skillnader mellan tillverkarnas extraktionslösningar kan också bidra till skillnaden i resultat. En ineffektiv buffert gör att cellerna inte lyserar och halten kalprotektin i provet blir mindre än vad det bör vara. Det är också viktigt att tillverkaren har en standardiserad produktion av kit för att undvika batchvariationer.

Alla tillverkare framställer sina egna antikroppar, antikroppar som binder till en mindre

specifik plats på proteinet kan bidra till en sämre detektion av rätt mängd kalprotektin.

Antikroppar som är ospecifika och binder till närbesläktade proteiner kan också bidra till felaktiga resultat. En mer standardiserad metod behövs för att minska skillnaden mellan kit-tillverkare, detta gäller specifikt ELISA-kit från flera tillverkare med samma cut-off.

Idag tar det ca 1-2 veckor att analysera och lämna ut ett provsvar för kalprotektin med användning av en ELISA som kräver manuell upparbetning av prov. Tidsramen är genomsnittlig och inkluderar provhantering, upparbetning, analysering och sammanställning.

Ett pålitligt snabbtest är därför efterfrågat för att snabbare utesluta patienter med negativa provsvar (<50mg/kg) och analysera enbart de med positivt svar med ELISA metoden. De flesta snabbtester är semikvantitativa och ofta svåra att tolka. I ett idealiskt snabbtest bör det medfölja ett instrument för enhetlig avläsning av proverna, på så sätt uppstår inga delade meningar om hur många band som egentligen syns på avläsningsdelen. Vid hantering av snabbtestet uppstod även en svårighet att fästa provdelen och avläsningsdelen då delarna skulle skruvas ihop. Detta moment kan uppfattas som svår då det kräver en del fysisk kraft.

Det var också svårt att få fecesprover med hård konsistens att lösas upp helt i extraktionslösningen, dessa prover krävde flera minuter av vortex. Bühlmann erbjuder även ett snabbtest med instrument för avläsning av provsticka. En tidigare studie har utvärderat det snabbtestet och drar slutsatsen att snabbtestet är väl användbart för att utesluta att patienten har IBD [14].

Vår uppfattning är att snabbtestet från Epitope Diagnostics inte är pålitligt då det missar 33 % av prover med förhöjda kalprotektin nivåer. Om cut-off värdet ökas till 100mg/kg ökar specificiteten och antalet falskt negativa prover minskar. En ökning av cut-off värde betyder dock inte att snabbtestet är så pass specifikt att det bör tas i bruk.

Bühlmann har erbjudit ELISA-kit sedan år 2004 och med tiden har allt fler laboratorier valt deras kit för mätning av kalprotektin i feces. Karolinska Universitetslaboratoriet kommer att

fortsätta analysera prover med Bühlmann ELISA tills en bättre metod som uppfyller laboratoriets krav finns på marknaden. Den nya metoden ska helst erbjuda snabbare analys och därmed möjliggöra kortare svarstider samt eliminera den manuella upparbetningen av fecesprover vid mätning av kalprotektin.

## ACKNOWLEDGEMENT

Jag vill tacka min praktiska handledare Aleksandra Mandic- Havelka, Sjukhuskemist på Karolinska Universitetslaboratoriet, för det goda handledarskapet och stödet som jag fått under arbetets gång.

## REFERENSER

- [1] Functional bowel disorders and irritable bowel syndrome in Europe Delvaux M. *Aliment Pharmacol Ther.* 2003; 18 (3): 75-9
- [2] Role of fecal calprotectin as a biomarker of intestinal inflammation in inflammatory bowel disease Konikoff R, Denson L-A. *Inflamm Bowel Dis.* 2006; 12 (6):524-34
- [3] Chronic intestinal inflammation: Inflammatory bowel disease and colitis-associated colon cancer Rubin DC, Shaker A, Levin MS. *Front Immunol.* 2012 ;3:107
- [4] Calprotectin calgranulin C, and other members of the S100 protein family in inflammatory bowel disease Manolakis et al. *Dig Dis Sci.* 2011;56 :1601-11
- [5] Irritable bowel syndrome and other gastrointestinal disorders: Evaluating self- medication in an asian community setting Kua CH, Lhode R, Kowalski S, Gwee KA. *Int J Clin Pharm.* 2012 May 3
- [6] Antimicrobial actions of calcium binding leukocyte LI protein (L1) Steinbeck et al. *Lancet.* 1990; 336: 763-65
- [7] Fecal calprotectin levels in healthy children studied with an improved assay Fagerberg et al. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2005; 40: 450-455
- [8] Decrease in serum levels of S100A8/9 (calprotectin) correlate with improvement in total swollen joint count in patients with recent-onset rheumatoid arthritis Andrés L, Mann H, Pecha O, Pleštilová L, Pavelka K, Vencovský J, Senolt L. *Arthritis Res Ther.* 2011 Jul 26; 13(4); 1-9
- [9] Indicators of salivary gland inflammation in primary Sjogren's syndrome Cuida M, Halse AK, Johannessen AC, Tynning T, Jonsson R. *Eur J Oral Sci.*1997; 105 (3):228-33

[10] Faecal calprotectin -- A useful tool in the management of inflammatory bowel disease  
Burri E, Beglinger C.

Swiss Med Wkly. 2012; 142; 1-12 DOI: 10.4414/smw.2012.13557

[11] Colorectal inflammation in well predicted by fecal calprotectin in children with  
gastrointestinal symptoms Fagerberg et al.

J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2005; 40: 450-455

[12] Bowel habits and fecal incontinence in patients with obesity undergoing evaluation for  
weight loss: the importance of stool consistency

Parés D, Vallverdú H, Monroy G, Amigo P, Romagosa C, Toral M, Hermoso J, Saenz-de-Navarrete G.

Dis Colon Rectum. 2012 May; 55(5):599-604

[13] Assessment of the neutrophil dominating protein calprotectin in feces

A methodological study Roseth et al.

Scand J Gastroentero. 1992;27 (9): 792-8

[14] Evaluation of Quantum Blue ® rapid test for fecal calprotectin Wassell J, Wallage M,  
Brewer E.

Ann Clin Biochem. 2012 Jan; 49 (1):55-8