



UPPSALA
UNIVERSITET

Institutionen för Kvinnors och Barns Hälsa

Biomedicinska analytikerprogrammet

Praktisk handledare: Aleksandra Mandic-Havelka, PhD,

Sjukhuskemist Karolinska Universitetslaboratoriet

Evaluation of ELISA and rapid test for the analysis of fecal Calprotectin

Merna Albeer

Examensarbete i Stockholm 2013

ABSTRACT

Background Calprotectin is a protein found in the cytoplasm of neutrophil granulocytes. In the course of inflammatory bowel disease (IBD), calprotectin is released during chronic inflammation in the gut. Activation of neutrophils during the inflammation is followed by activation and secretion of pro-inflammatory molecules such as calprotectin. Calprotectin is stable in stool up to 7 days and can therefore be used as a non-invasive marker for diagnosis, treatment and measurement of the disease activity in patients with IBD. The most common method for analysis of calprotectin concentration is ELISA. This method is time-consuming and many manufactures have therefore developed rapid tests as a faster alternative for quantification of calprotectin in stool.

Aim The aim of the study was to evaluate one ELISA and one rapid test from the same manufacture compare the data with the existing ELISA-method used in the laboratory for routine analysis.

Methods A rapid test (CalFast) and an ELISA method (CalPrest) from Eurospital, were used for analysis of calprotectin in stool. These two methods were compared with known concentrations of calprotectin obtained by the ELISA method from Bühlmann used in the routine work.

Results The results showed poor correlation between the rapid test and the ELISA method. Furthermore, the comparison between the two ELISA-methods showed a poor correlation.

Conclusion Evaluation of the two new methods showed poor correlation with the existing ELISA method from Bühlmann. Evaluation of the rapid test did not show any correlation with the two ELISA methods and the data cannot be trusted. It is difficult to conclude which of the two ELISA methods gives accurate results due to the absence of an international standard.

Keywords: IBD, Calprotectin, Non-invasive marker, ELISA, rapid test

INTRODUKTION

Inflammatory Bowel Disease (IBD) är ett samlingsnamn för inflammatoriska tarmsjukdomar där Ulcerös Colit (UC) och Crohn's disease (CD) är mest förekommande [1]. IBD karakteriseras av kronisk inflammation påträffande i olika delar av magtarmskanalen. Orsaken för IBD är idag okänd men man tror att en kombination av genetiska faktorer och miljöpåverkan leder till en dysfunktion av immunförsvaret som resulterar i en kronisk inflammation.

UC är ett sjukdomstillstånd där kronisk inflammation förehåller sig enbart i slemhinnan och drabbar delar av eller hela kolon (ändtarmen och grovtarmen) och rektum [2]. Inflammationen är skovvis och dess utbredning är begränsad och ytlig. Lika som UC är CD en kronisk inflammatorisk sjukdom som till skillnad från UC drabbar flera lager i tarmväggen. Inflammationen förekommer i hela magtarmkanalen där fistlar och abscesser kan förekomma. Symptomen som är mest förkommande för både UC och CD är diarréer och rektala blödningar samt buksmärtor och viktnedgång. Symptomen är diffusa och kan oftast förknippas med andra tarmsjukdomar [1]. Därför är det viktigt att utreda innan ställd diagnos. En differentialdiagnos som allmän odling i feces och viruskontroll skall först utföras för att utesluta infektioner där tarmbakterier och virus är vanliga. Andra tarmtillstånd som Inflammatory Bowel Syndrome (IBS) bör även uteslutas. Vid misstanke om IBD används invasiva ingrepp för utredning. Ingrepp såsom endoskopi tillsammans med en biopsi och ultraljud utförs [1]. Dessa ingrepp är besvärliga och smärtsamma för patienterna samtidigt som de ej är riskfria. De är dessutom dyra och kräver specialkompetens. Effektiva läkemedel som används idag för behandling av IBD är antiinflammatoriska och immunmodulerande. I behandlingen används oftast en kombination av aminosalicylsyra (5-ASA) och Glukokortokosteroider (GCS). Dessa läkemedel har en antiinflammatorisk och immundämpande effekt vid den kroniska inflammationen som uppstår i tarmväggen. Idag används även nya biologiska läkemedel med antikroppar mot Tumor Necrosis Factor Alfa (TNF Alfa). Antikropparna hämmar effekten av TNF Alfa då den har en roll i inflammationsprocessen vilket leder till att inflammationen hindras.

Prevalensen för IBD är ca.1% idag och är högst i Skandinavien, Norra Europa och Nordamerika. Incidensen för IBD i dessa delar av världen är stabil samtidigt som den börjar öka i Asien. I Sverige drabbas idag både kvinnor och män, oftast i åldrarna 20-40 år . För CD

har man sett en sjukdomstendens redan i tonåren [3]. Incidensen för CD i Sverige är stigande och beräknas ligga på 8 fall per 100 000 /år. Man har sett en trend för insjunkande av barn [3]. En studie på 133 under 16 år i Norra Stockholm visar att incidensen för CD mellan barn har ökat de senaste åtta åren [4]. Incidensen för UC ligger på en stabil nivå med ca.13 nya fall per 100 000 invånare/år i Sverige. Idag har man kunnat konstatera en ökning i insjuknandet av unga individer. Det finns idag ännu ingen optimal markör som kan skilja tillstånden CD och UC från varandra. En sådan markör skulle underlätta diagnosen av tillstånden då symptomen är lika.

Den kroniska inflammationen i tarmen uppstår när det medfödda immunsvaret triggas av i detta fall en okänd faktor. En rekrytering av immunceller bl.a. neutrofila granulocyter sker följt av aktivering samt utsöndring av proinflammatoriska molekyler som cytokiner, kemokiner och DAMPS bl.a. kalprotektin [5]. Det leder till en kronisk inflammation som skadar slemhinnan och en blödning uppstår [6]. Blödningen kan detekteras i feces.

Kalprotektin är ett av proteinerna som utsöndras från tarmen och som kan detekteras i feces. Idag används fekalt kalprotektin som en icke-invasiv markör för analys av inflammation i magtarmkanalen [7]. Den används även som den enda markören för att skilja IBD från IBS. Kalprotektin kan även analyseras i andra kroppsvätskor som blod, urin och cerebrospinalvätska. Många studier har visat att höga värden av kalprotektin i blodet kan detekteras vid autoimmuna sjukdomar såsom reumatoid artrit och cystisk fibros [8].

Gränser för normalvärden för kalprotektin i feces är uppdelade på tre zoner. Ett negativt svar betraktas som <50 mg/kg från 4 år och uppåt. En gråzon är definierad och gäller för värden 50-100 mg/kg. Patienter i gråzonen ska följas upp med läkarkontroll och ny kalprotektin analys. Ett positivt svar innebär att man har inflammationen och man ligger på >100 mg/kg kalprotektin.

Kalprotektin är ett protein som utgör 60 % av proteinerna i cytoplasman hos neutrofila granulocyter och monocyter [5]. Proteinet bildas av en heterodimer av S100A8 och A9 i S100-familjen. Dessa dimerer kan bilda en tetramer struktur. Vid bindning av kalcium aktiveras och stabiliseras proteinet [9].

Fecesprover kan förvaras upp till 7 dagar i rumstemperatur utan att koncentrationen kalprotektin påverkas [10]. Idag utförs cirka 70 000 prover/ år i hela Sverige och cirka 10 000 prover/ år på Karolinska Universitets sjukhus i Solna.

Fekalt kalprotektin analyseras idag på de flesta laboratorier med en Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) metod. På kliniska universitetslaboratoriet på Karolinska sjukhuset används en sandwich-ELISA från tillverkaren Bühlmann, Schönenbuch, Schweiz. Syftet med studien är att jämföra olika metoder för mätning av kalprotektin, två olika metoder från samma tillverkare, ett snabbtest och en ELISA-metod och dels två ELISA metoder från olika tillverkare.

Från samma tillverkare (Eurospital Trieste) jämfördes en sandwich-ELISA, CalPrest och ett snabbtest, CalFast. Calprest är en kvantitativ sandwich-ELISA coatad med polyklonala antikroppar mot kalprotektin. Calfast är ett kvantitativ immunkromatografiskt snabbtest som innehåller både monoklonala och polyklonala antikroppar mot kalprotektin.

I studien kommer vi att jämföra den nuvarande sandwich- ELISA från Bühlmann som används i rutinarbetet på laboratoriet med ELISA metoden CalPrest. Snabbtestet CalFast kommer att testas för att undersöka om metoden kan köpas in och tas i bruk och ersätta nuvarande analyser för mätning av fekalt kalprotektin.

MATERIAL OCH METOD

Studiematerial

I studien användes 78 fecesprover. Proverna valdes slumpmässigt inom koncentrationsintervallet 35-2000 mg/kg. Koncentration Kalprotektin i proverna var känd och erhållna med ELISA-metoden från Bühlmann på laboratoriet. Fecesproverna var uppsamlade från olika vårdavdelningar och vårdcentraler som patienterna hade vänt sig till.

För att undersöka om skillnader i resultat mellan ovannämnda metoder kunde bero på skillnaden i mängd feces som plockas upp med provtagningspinnen vägdes, Stool Collection Device med och utan fecesprov.

Studieupplägg

Jämförelse av korrelationen mellan två metoder utfördes. Första metoden var snabbtestet CalFast från Eurospital, Italien och den andra var en ELISA- metod Calprest från samma tillverkare. Proverna utfördes i duplikat på CalPrest för dubbelprovsprecision och utvärdering av ELISA-metoden. Jämförelse av korrelation mellan ELISA-metoden från Bühlmann som används redan idag och CalPrest utfördes. Resultatet jämfördes med korrelationsanalys. Enligt tillverkaren (Eurospital) har metoden CalPrest en cut-off på >50 mg/kg. Specifiteten

beräknas enligt följande: antalet friska prover genom summan av antalet sant negativa och falsk positiva prover. Sensitiviten beräknas enligt följande: antalet sjuka prover genom summan av antalet sant positiva och falsk negativa prover.

Extraktion av fecesprover för analys med snabbtestet CalFast

För denna procedur användes alla 78 prover. Stool collection device bestod av en bägare samt en pinne bestående av tre urgröpningar¹. I bägaren fanns det även extraktionsbuffert. För feces med normal konsistens vreds pinnen bort från bägaren och doppades i feces. Pinnen roterades i feces tills urgröpningarna fylldes. Överflödet togs bort genom att stryka pinnen mot fecesburken. Sedan vreds pinnen tillbaka på bägaren. För feces med lös konsistens pipetterades 60 µL feces och andades med extraktionsbufferten. Pinnen vreds tillbaka på bägaren. Alla bägare innehållande feces vortexades mellan 30-60 sekunder och placerades på en skak-apparat under 20 minuter. Detta utfördes för att lösa upp feces i extraktionsbufferten. Sedan centrifugerades bägarna under 5 min i 3000 g-tal. Extraktionerna späddes 50 gånger före analys.

Analys med Calfast

Kassetterna markerades med motsvarande provnummer och 100 µL av de extraherade fecesproverna pipetterades ner i brunnen på ett varsitt kasset. Därefter fick antikropparna i kassetten reagera med kalprotectin i provet under 20 minuter. Under tiden uppstartades apparaten som analysen utfördes på. Apparaten var kopplad till en dator med tillhörande program för avläsning av signalen i kassetterna. Resultaten avlästes efter 20 minuter.

Feces extraktion för ELISA Calprest i extraktionsapparaten SoniC

Cirka 100 mg feces togs upp från varje prov och placerades i botten på centrifugrören. Extraktionsbufferten och rören placerades i extraktionsroboten SoniC. Proverna bearbetades stegvis av extraktionsroboten. Först avlästes etiketten på rören för identifiering och sedan vägdes mängden prov i respektive rör. Mängden extraktionsbuffert som tillsattes justerades efter mängden feces i rören. Sedan homogeniserades proverna med ultraljud och centrifugerades. Proverna alikoverades och supernatanten pipetterades upp till kapillärröret. Proverna förvarades vid -20°C.

¹ http://www.calprotectintest.com/english/device_for_stool_collection.html

ELISA Calprest

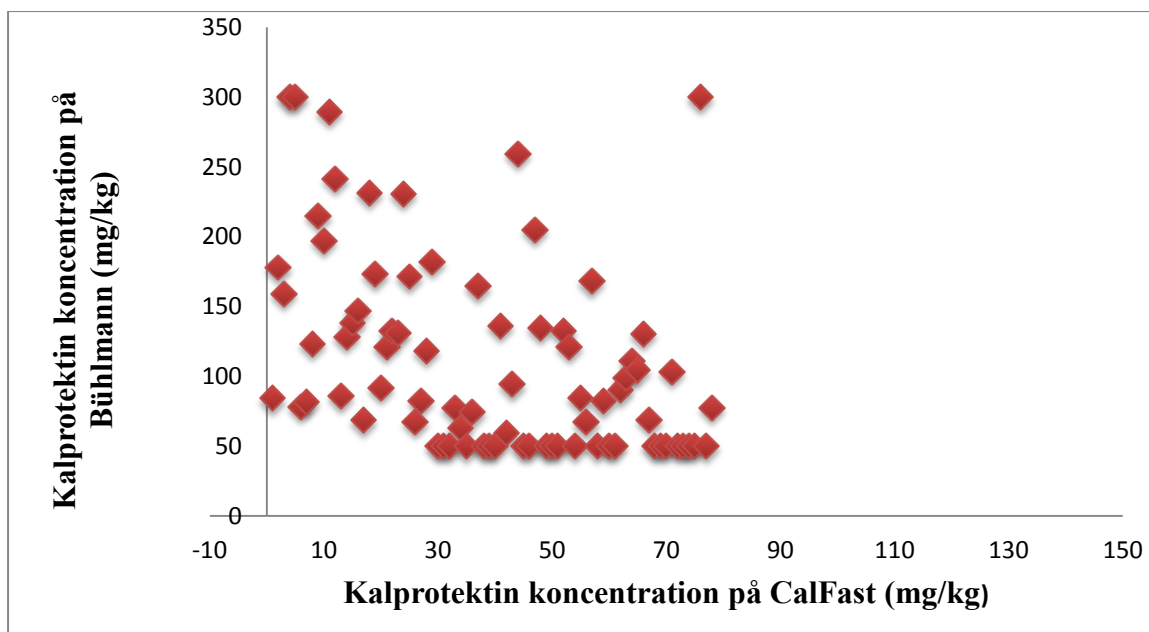
Proverna tinades upp och späddes 1:50 med spädningsbuffert till en slutvolym på 1 mL i nya märkta ependorfrör. Om proverna hade hög koncentration späddes provet 1:100 till en slutvolym på 1mL. Till den coatade ELISA-plattan tillsattes 100 µL av standardlösningen i 6 koncentrationer, kontroller och patientprover. Plattan täcktes över med lock och inkuberades i rumtemperatur i 45 minuter. Sedan användes tvättbufferten för tvätt av alla brunnar genom att tillsätta 200 µL till varje brunn. Tvättproceduren upprepades tre gånger. Efter tvättproceduren tillsattes 100 µL konjugat lösning till varje brunn och plattan inkuberades i rumstemperatur i 45 minuter. Efter inkuberingen användes tvättbufferten för tvätt av alla brunnar genom att tillsätta 200 µL till varje brunn. Tvättproceduren upprepades tre gånger. Sedan tillsattes 100 µL av substratet och plattan inkuberades mörkt i rumstemperatur i 30 minuter. Efter inkuberingen avlästes absorbansen i en spektrofotometer i våglängden 450 nm.

RESULTAT

Utvädering av snabbtest CalFast

Resultat erhållna med CalFast jämfördes med resultat analyserade med ELISA metoden från Bühlmann. Mätintervallet i CalFast är enligt tillverkare (Eurospital) 50- 300 mg/kg och cut-off värdet ligger på 70 mg/kg. Den uppmätta koncentrationen av kalprotektin i proverna uppvisade stor skillnad mellan metoderna. Värden erhållna med CalFast och ELISA.

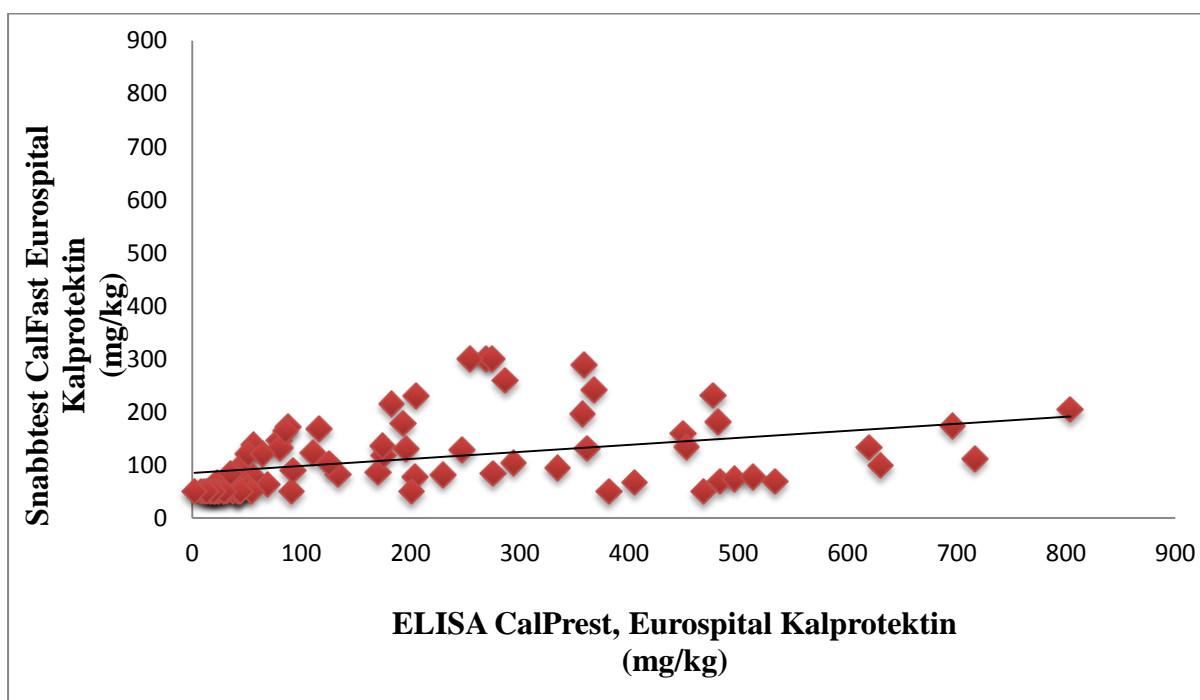
Bühlmann kunde skilja med upp till 16 gånger. Positiva prover med kalprotektin koncentration > 100 mg/kg på Bühlmann blev negativa vid analys med CalFast Och CalFast metoden missade 31 % av de prover som var positiva och hade en hög koncentrationer > 500 mg/kg. Det fanns ingen korrelation mellan provmetoderna, $R^2 = 0,1841$ (Figur1).Mängden prov som togs upp med olika provtagnings set varierade mellan 50 mg - 140 mg. Enligt tillverkaren har snabbtestet CalFast specificitet ligga på 90,2 % och sensitivitet på 90 %. Under studien visar det sig att metoden har en specificitet på 92 % och en sensitivitet på 78 %.



Figur 1. Jämförelse mellan ELISA (Bühlmann)- och CalFast (snabbmetod) en korrelationskoefficient på 0,1841.

Jämförelse mellan CalFast och CalPrest

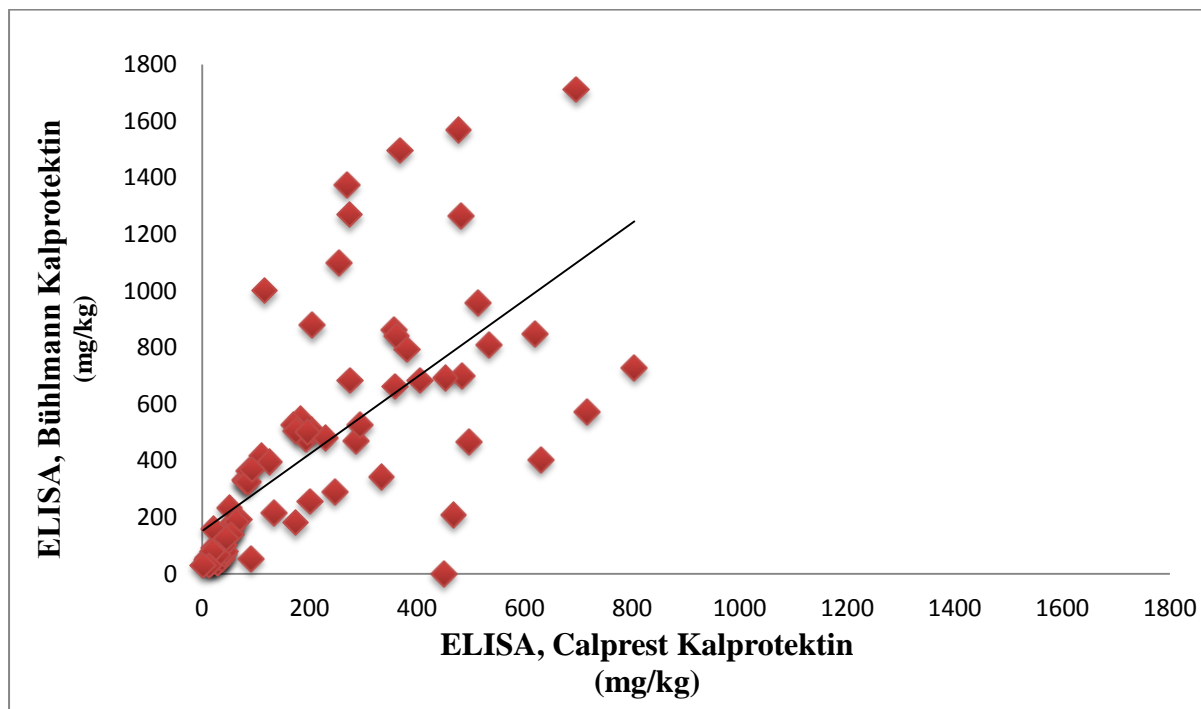
Alla fecesprover analyserade med både CalFast och CalPrest. Korrelationskoefficienten mellan de två metoderna 0,1328. Skillnaden mellan metoderna kunde vara stor, vissa värden kunde skilja upp till 7 gånger. Generellt var resultaten från ELISA metoden högre än resultat erhållna med CalFast (se figur 2).



Figur 2. Jämförelsen mellan CalFast och CalPrest med en korrelationskoefficient på 0,1328.

Jämförelse mellan CalPrest och Bühlmann

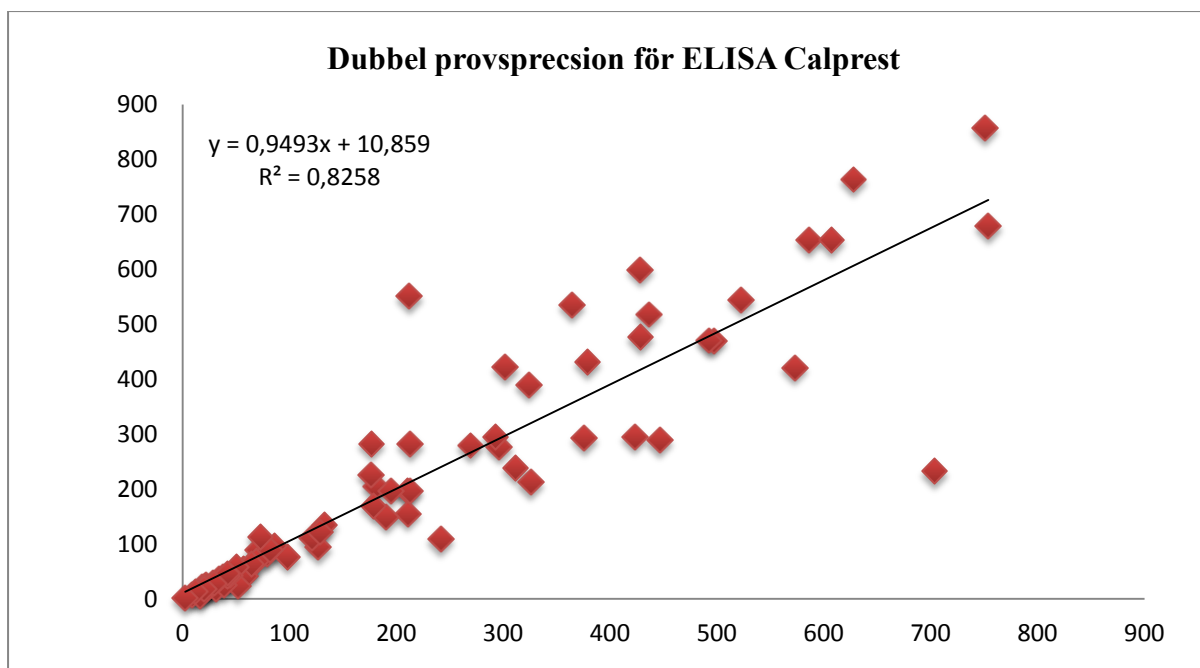
I denna del av studien jämfördes alla 78 prover som tidigare analyserats med metoden från Bühlmann med CalPrest. Korrelationskoefficienten var 0,147 (Fig 3). Värden erhållna med de olika metoderna kunde skiljas med upp till två gånger och generellt var resultaten från CalPrest ca två gånger lägre än resultaten erhållna med Bühlmanns metod.



Figur 3. Jämförelse mellan Bühlmann ELISA och CalPrest med en korrelationskoefficient på 0,4498.

Utvärdering av CalPrest

För utvärdering av precisionen av ELISA metoden CalPrest kördes 78 prover i duplikat. Resultat visar en bra korrelation på 0,8258 (Fig. 4).



Figur 4. Korrelation mellan prover analyserade i duplikat.

DISKUSSION

Kalprotektin är den enda biokemiska markören för diagnos och uppföljning av IBD idag. Detta kunde styrkas i flera studier, bl.a en studie på 77 CD patienter, baserad på mätning av kalprotektin, C-reaktivt protein och laktoferrin tillsammans med endoskopi [11]. Kalprotektin visades vara den bästa icke-invasiva markören för att skilja på hur sjukdomsaktiviteten var hos patienter med CD. Sjukdomsaktiviteten bedöms endoskopiskt genom en så kallad Simple Endoscopic Score for CD (SES-CD). I en annan studie testades 173 vuxna CD patienter för att bevisa korrelationen av kalprotektin med CRP [12]. Kalprotektin korrelerade bäst med endoskopi för diagnos av IBD.

Det rekommenderade cut-off värdet för vuxna och barn från 4 år är 50 mg/kg med en gråzon mellan 50-100 mg/kg [13]. Barn yngre än 4 år och nyfödda har högre kalprotektin koncentrationer i feces. Nyligen utfördes en studie på 69 nyfödda barn där de visar att nyfödda har en normal kalprotektin koncentration upp till 350 mg/kg [14]. Metoden är därför opålitlig, Eftersom den ger falsk negativa resultat på nyfödda barn. De höga kalprotektin värden som nyfödda har kommer ej att kunna utvisas på ett snabbtest som t.ex. CalFast.

Kalprotektin analyseras oftast med ELISA metoder från olika tillverkare. Analysen är tidskrävande och svarstiderna är oftast 1-2 veckor långa. Vi har utvärderat en snabbtest som

skulle kunna komplettera ELISA metoden och användas för screening och för att svara ut negativa resultat.

Utvärdering av snabbtestet CalFast visade att uppsamling av feces med CalFast var opålitlig. Flera moment var osäkra och svåra att standardisera. Enligt tillverkaren (Eurospital) ska 100 mg feces fastna på den medföljande provtagningsutrustningen vid provtagning. Vägning av flera stool collection device visar en skillnad i mängden uppsamlad prov. Provmängden varierade mellan 50 och 140 mg/kg vilket påverkar koncentrationen av kalprotektin i extrakten. Även konsistensen på fecesprovet påverkade provuppsamlingen och extraktionen eftersom prover med lös konsistens var omöjliga att samla med CalFast

Extrahering av fecesprover inkluderar användning av en vortex i höghastighet. Detta medför fysiska skador för personalen. Enligt tillverkaren ska metoden ta upp till 20 minuter att utföra. Under studien visar det sig att det tar ca. 3 timmar per kit om 20 prover från uppsamling till analys.

Mätintervallet för analys av kalprotektin med CalFast ligger på 50- 300 mg/kg. Detta leder till att värden utanför detta intervall är oläsbara. Många IBD- patienter har över 300 mg/kg i kalprotektin. Med CalFast är det därför inte möjligt att diagnosticera hur sjuka patienterna är eftersom låga mätvärden ligger utanför det mätbara området. Generellt var värden erhållna med CalFast 12 gånger lägre än koncentration uppmätt med Bühlmann.

Vid jämförelse av CalFast och CalPrest metoderna visades att det inte fanns någon korrelationen mellan dessa två metoder som kommer från samma tillverkare. Värden erhållna med CalFast var sju gånger lägre än värden analyserade med CalPrest.

Mätintervallet för CalPrest metoden är 15-500 mg/kg. Vid kalprotektin koncentrationer >500 mg/kg måste provet spädas med högre spädning och analyseras igen, vilket ökar osäkerheten i mätningen. Värden erhållna med CalPrest visar sig vara två gånger lägre än värden analyserade med metod från Bühlmann. Korrelationen mellan CalPrest och Bühlmann var dålig. Korrelationen påverkas av saknaden av en pålitlig och internationell standard.

Vi utvärderade CalPrest genom dubbelprovsprecision. Dubbelprovsprecision är hög med en korrelationskoefficient på 0,9493. Till skillnad från CalFast och CalPrest har Bühlmann ett betydligt större mätintervall, mellan 30-1800 mg/kg vilket innebär att färre prover behöver spädas och analyseras om.

Metoden Bühlmann innehåller endast monoklonala antikroppar mot kalprotektin till skillnad mot CalPrest som baseras på polyklonala antikroppar. Eftersom polyklonala antikroppar

binder flera epitoper på antikroppen har metoden CalPrest en högre sensitivitet och mindre specifitet i jämförelse med Bühlmann. En metod med polyklonala antikroppar är gynnsam då man kan lyckas fånga upp många epitoper mot ett antigen dock kan risken av bindning av oönskade epitoper förekomma. P.g.a. den lägre specifiteten med CalPrest hade metoden fler falsk negativa resultat i jämförelse med Bühlmann. I avsaknad av en internationell standard är det svårt att säga vilken av metoderna är den optimala metoden med korrekta resultat. De flesta metoder på marknaden har ett cut-off värde på 50 mg/kg men uppvisar stora skillnader i mätvärde när de jämfördes. Metoderna skulle behöva standardiseras mot samma standard, men det finns idag ingen bra standard. En standard skulle kunna utvecklas genom att låta alla som använder sig av mätning av kalprotektin enas. Man skulle kunna utveckla ett gemensamt bolag för exempelvis de skandinaviska länderna.

ELISA metoden är tidskrävande och skulle behöva ersättas med en snabbare analysmetod[15]. Dessutom skulle ett pålitligt, kvantitativt snabbtest vara av stort värde för primärvården. Eftersom det inte finns någon internationell standard är det svårt att dra någon slutsats med denna studie. Därför är det ingen bra idé att försöka ersätta den nuvarande metoden,

ACKNOWLEDGEMENT

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

REFERENSER

- [1] Vilela et al. Evaluation of inflammatory activity in Crohn's disease and ulcerative colitis
World J Gastroenterol. 2012 Mar 7; 18 (9): 872-81
- [2] Farrell RJ, Peppercorn MA. Ulcerative colitis.
JPGN Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition Publish
Lancet. 2002 Jan 26;359(9303):331-40.
- [3] Lapidus A B. Still increase of IBD—Still not clear why.
Lakartidningen. 2009 Nov 4-12;106(45):2980-2.
- [4] Malmborg et al. Increasing incidence of paediatric inflammatory bowel disease in
northern Stockholm County 2002-2007.
JPGN Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition Publish.
DOI 10.1097/MPG.0b013e31828f21b4
- [5] DALE et al. Purification and Partial Characterization of a Highly Immunogenic Human
Leukocyte Protein, the L1 Antigen.
Eur J Biochem. 1983 Jul 15;134(1):1-6.
- [6] D Foell, H Wittkowski, J Roth. Monitoring disease activity by stool analyses: from occult
blood to molecular markers of intestinal inflammation and damage.
Gut. 2009 Jun;58(6):859-68
- [7] Fagerberg et al. Fecal Calprotectin Levels in Healthy Children Studied With an Improved
Assay.
J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2003 Oct;37(4):468-72
- [8] Bunn et al. Fecal Calprotectin: Validation as a Noninvasive Measure of Bowel
Inflammation in Childhood Inflammatory Bowel Disease.
J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2001 Jul;33(1):14-22

[9] Korndörfer IP, Brueckner F, Skerra A. The Crystal Structure of the Human (S100A8/S100A9)₂ Heterotetramer, Calprotectin, Illustrates how Conformational Changes of Interacting α -Helices Can Determine Specific Association of Two EF-hand Proteins. J Mol Biol. 2007 Jul 27;370(5):887-98

[10] Bunn et al. Fecal Calprotectin as a Measure of Disease Activity in Childhood Inflammatory Bowel Disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2001 Feb;32(2):171-7

[11] Sipponen et al. Crohn's Disease Activity Assessed by Fecal Calprotectin and Lactoferrin: Correlation with Crohn's Disease Activity Index and Endoscopic Findings. Inflamm Bowel Dis. 2008 Jan;14(1):40-6

[12] Schoepfer et al. Fecal Calprotectin Correlates More Closely With the Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease (SES-CD) than CRP, Blood Leukocytes, and the CDAI. Am J Gastroenterol. 2010 Jan;105(1):162-9

[13] Fagerberg et al. Fecal Calprotectin Levels in Healthy Children Studied With an Improved Assay. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2003 Oct;37(4):468-72

[14] Campetto et al. High faecal calprotectin concentrations in newborn infants. Laboratoriet nummer 6 2011 Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 2004 Jul;89(4):F353-5

[15] M H Aleksandra. Jakten på den perfekta markören. Laboratoriet Nr 6 2011

