

“La calprotectina come marcatore di infiammazione intestinale: confronto di cinque metodi”

15/01/2016 – 30/04/2016

La Calprotectina è un eterodimero legante il calcio e costituisce il 60% delle proteine presenti nel citosol di granulociti neutrofili, monociti e cheratinociti; si trova aumentata nel sangue e nei liquidi extracellulari, in molte condizioni patologiche quali artrite reumatoide, malattie infiammatorie intestinali, infezioni virali e batteriche, tumori. Nel caso di disturbi infiammatori dell'intestino viene secreta in eccesso e rilasciata nelle feci in misura proporzionale alla migrazione dei neutrofili attraverso la barriera intestinale e, di conseguenza, alla gravità dell'infiammazione.

Solo una piccola percentuale di pazienti affetti da disturbi addominali soffre di un problema di natura organica. La determinazione della calprotectina permette una distinzione tra disturbi intestinali organici e funzionali e un aumento dei livelli di calprotectina fecale (CF) è stato associato alla presenza di malattie infiammatorie intestinali (IBD). In questi casi livelli elevati di calprotectina sono da considerarsi valori predittivi migliori di altri marcatori di infiammazione tipici, quali PCR e VES.

Scopo dello studio è confrontare le prestazioni del test DiaSorin LIAISON Calprotectin (CLIA) su strumentazione LIAISON (A) con i seguenti test disponibili sul mercato:

Thermo Scientific - Phadia, EliA Calprotectin (FEIA) su strumentazione IMMUNOCAP 250 (B),

Eurospital, Calprest (ELISA) (C),

Tecnogenetics - ImmunDiagnostik, Phical Calprotectin ELISA) (D),

Meridian - Buhlmann, Calprotectin (ELISA) (E).

Obiettivo secondario è il confronto dei livelli di CF in pazienti con e senza diagnosi di IBD.

Per la prima parte dello studio, sono stati raccolti 39 campioni di feci provenienti da una serie consecutiva di pazienti afferenti all' S.C. Laboratorio Analisi dell'A.O. Ordine Mauriziano di Torino, inviati dal medico curante con richiesta di dosaggio della CF. I campioni di feci sono stati aliquotati a fresco, congelati a -20°C e successivamente analizzati con i 5 metodi.

Nella seconda parte dello studio sono stati raccolti altri 24 campioni di feci provenienti da pazienti con IBD seguiti dalla S.C. di Gastroenterologia dell'A.O. Ordine Mauriziano di Torino. I campioni sono stati aliquotati a fresco, congelati a -20°C e analizzati con i 5 metodi. Tutti i metodi prevedono una fase preanalitica manuale di estrazione della CF dal campione con dispositivi dedicati.

Il metodo A è quantitativo automatizzato in chemiluminescenza, il metodo B è quantitativo automatizzato in fluorescenza, i metodi C, D, ed E sono ELISA quantitativi in micropiastra con l'utilizzo di anticorpi policlonali (metodo C) o monoclonali (metodi D ed E).

Per i test eseguiti su strumentazione automatica LIAISON e IMMUNOCAP 250 sono stati effettuati studi di precisione strumentale (su 5 campioni), di precisione sulle estrazioni (su 5 campioni) e di variabilità su campioni sequenziali (su 6 pazienti, ognuno dei quali ha fornito 3 campioni in 3 giorni sequenziali).

RISULTATI:

Le analisi statistiche sono state effettuate su un totale di 63 campioni e su un sottogruppo di 24 campioni di pazienti con IBD.

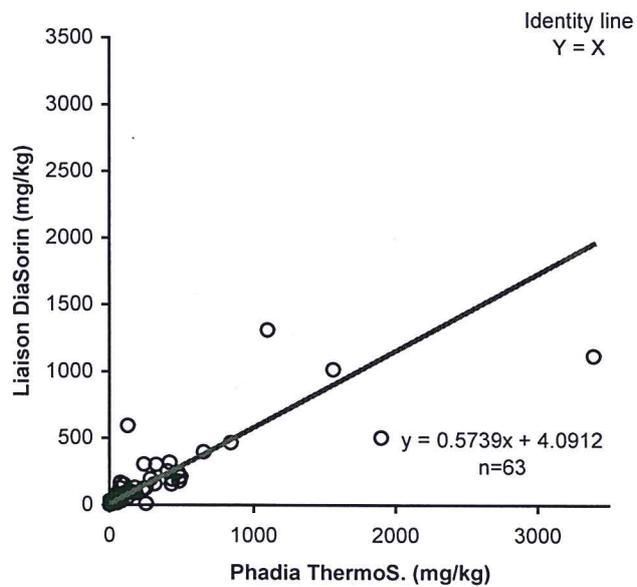
Nelle tabelle sottostanti sono riassunti le rette di Passing&Bablok e i coefficienti di Spearman relativi al confronto metodi, sia sul totale dei campioni analizzati sia sul sottogruppo di pazienti caratterizzati da IBD.

| n = 63 | ThermoS. Phadia | Tecnogen. Immund. | Eurospital |
|-----------------------------|---|---|--|
| Diasorin Liaison (y) | $y = 0.574x + 4.091$ $r = 0.893$ $p < 0.0001$ | $y = 0.349x - 1.053$ $r = 0.922$ $p < 0.0001$ | $y = 1.981x - 24.801$ $r = 0.912$ $p < 0.0001$ |

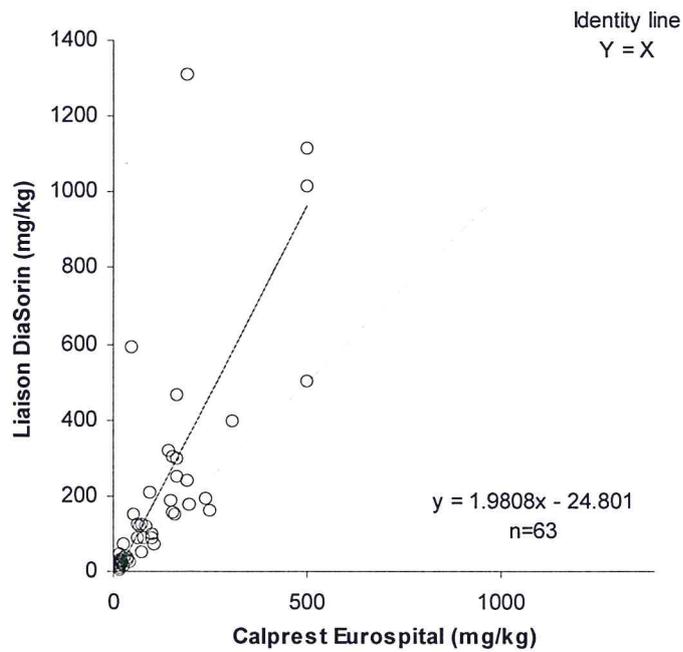
| n = 24 | ThermoS. Phadia | Tecnogen. Immund. | Eurospital |
|-----------------------------|--|---|--|
| Diasorin Liaison (y) | $y = 0.584x + 10.228$ $r = 0.866$ $p < 0.0001$ | $y = 0.486x - 8.282$ $r = 0.872$ $p < 0.0001$ | $y = 2.105x - 47.445$ $r = 0.763$ $p < 0.0001$ |

Per quanto riguarda il confronto con il metodo E, non è stato possibile effettuare un'analisi di correlazione utilizzando i risultati ottenuti nelle prime due sedute analitiche, poiché molto differenti rispetto a quelli ottenuti sia con A che con gli altri 3 metodi. In seguito all'intervento dello specialista di prodotto Buhlmann (metodo E) è emerso che la temperatura ambiente del laboratorio non era ottimale e che era quindi necessario riscaldare ulteriormente i reattivi; inoltre i lavaggi sono stati eseguiti utilizzando una spruzzetta, anziché il dispensatore ripetitivo. Con questi accorgimenti l'ultima seduta analitica su 13 campioni di pazienti con IBD ha dato risultati confrontabili e, di conseguenza, abbiamo eseguito un'ulteriore analisi statistica solo su questi campioni (la retta di P&B è riportata di seguito).

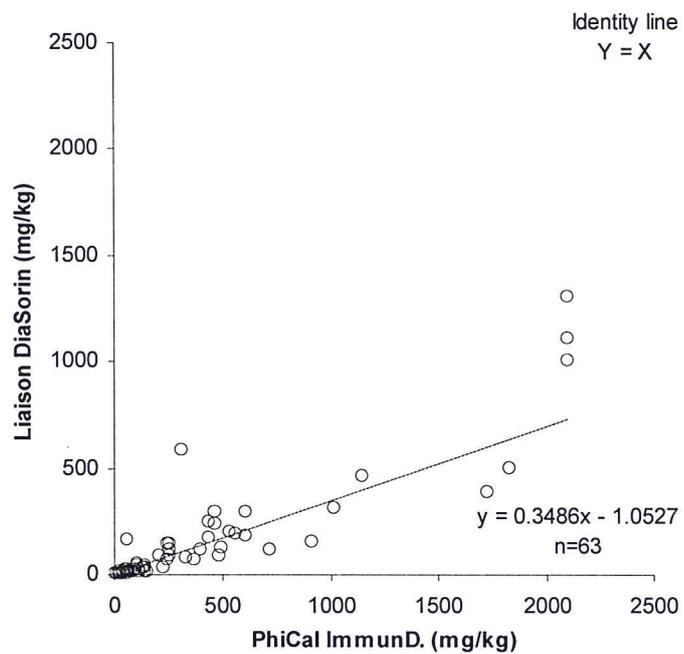
Retta di P&B metodo A vs metodo B



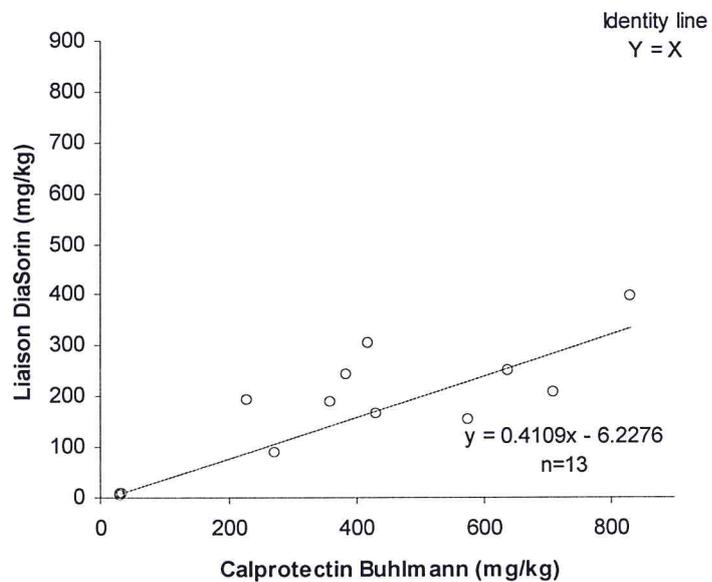
Retta di P&B metodo A vs metodo C



Retta di P&B metodo A vs metodo D



Retta di P&B metodo A vs metodo E

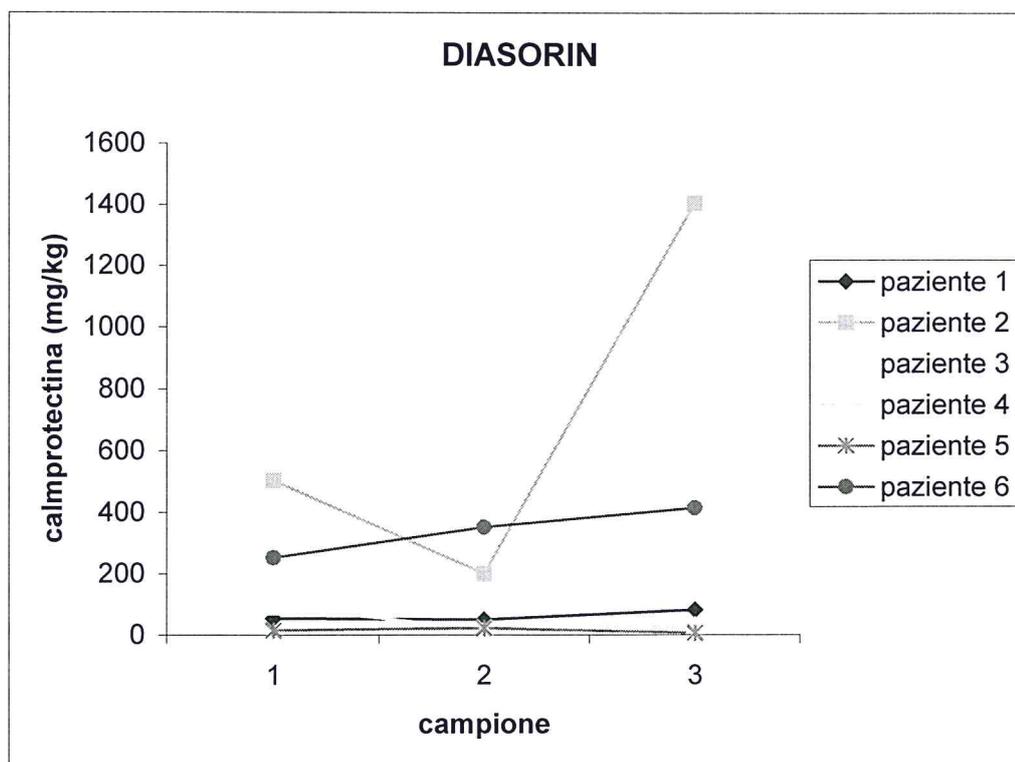


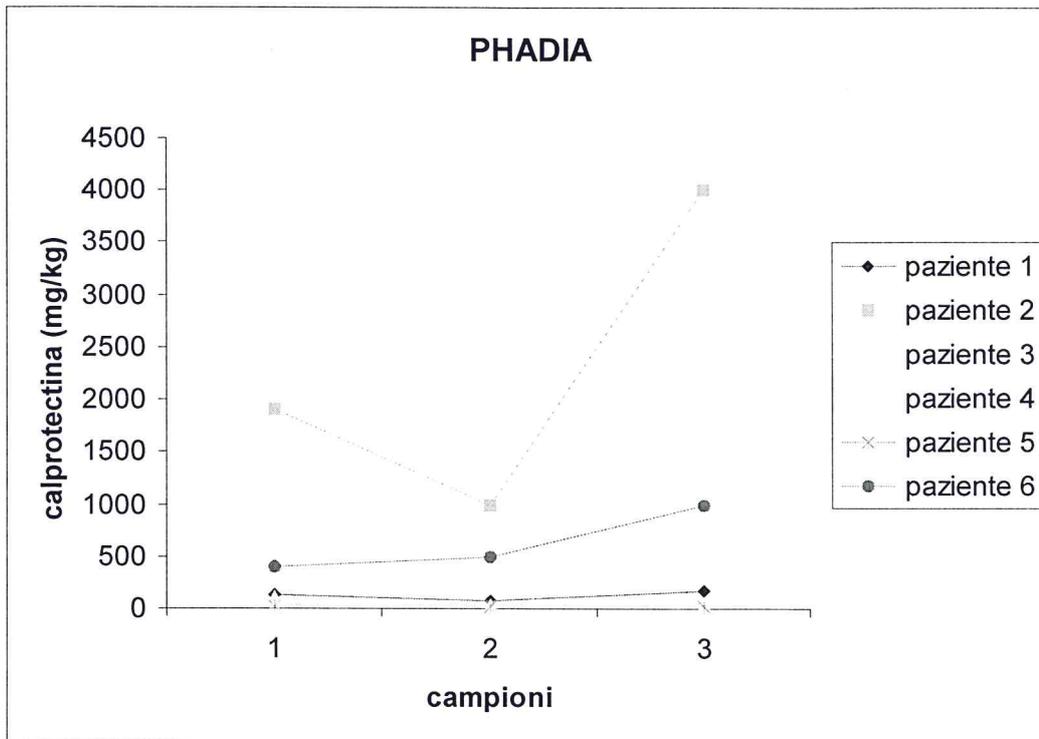
Su cinque campioni è stata eseguita una prova di precisione intra-saggio sulle strumentazioni LIASON e IMMUNOCAP 250. I campioni sono stati estratti come prescritto dalle rispettive metodiche e sono stati testati 10 volte nella stessa seduta dai rispettivi strumenti. I coefficienti di variazione (CV) medi espressi in percentuale sono riportati nella tabella sottostante.

Per quanto riguarda la prova di precisione sulle estrazioni, 5 campioni di feci a vari livelli di calprotectina fecale sono stati estratti 10 volte dal medesimo operatore come prescritto dalle rispettive metodiche e dosati sui rispettivi strumenti. I CV % medi ottenuti sono anch'essi riportati nella tabella a seguire.

| | DIASORIN CV % medio (10 misurazioni per campione) | PHADIA CV % medio (10 misurazioni per campione) |
|---|--|--|
| Precisione strumentale (5 campioni) | 4.8 | 3.4 |
| Precisione sulle estrazioni (5 campioni) | 18.2 | 14.2 |

Infine in 6 pazienti è stato misurato, con entrambi gli strumenti e come prescritto dalle rispettive metodiche, il livello di calprotectina fecale su 3 campioni raccolti in tre giorni consecutivi: l'andamento dei livelli di calprotectina fecale è il medesimo con entrambi i metodi, come è possibile vedere nei grafici sottostanti.





I livelli di calprotectina fecale in pazienti con IBD attiva risultano nettamente maggiori, con tutti i metodi testati, rispetto ai livelli di calprotectina fecale in pazienti con IBD in remissione o con altre patologie.

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti con i 5 metodi presentano una scarsa concordanza ma una buona correlazione, risulta evidente la necessità di una standardizzazione. Le prestazioni di entrambi i test su strumentazione automatica e le rispettive metodiche di estrazione sono risultate buone. Nonostante le differenze tra i metodi testati, il cut-off fornito dalle ditte è il medesimo; è fondamentale, quindi, nel monitoraggio del paziente, utilizzare lo stesso metodo di misura della calprotectina fecale.

Il progetto è stato realizzato con il contributo della Fondazione Scientifica Mauriziana ONLUS

Il prestatore d'opera
(dr.ssa Cristina Guiotto)

Il Responsabile Scientifico del progetto
(dr. Marco Migliardi)