



Pre-analytische evaluatie van calprotectine bepaling in bloed bij Reumatoïde Artritis

Marnix Mylemans

ASO Chemie

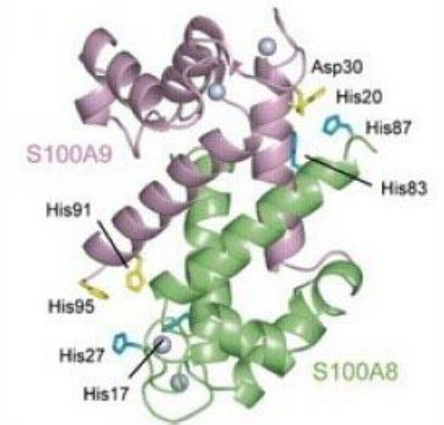
OLVZ Aalst

Inhoud

- Inleiding calprotectine
 - biologische functies
 - rol als biomarker bij RA
- CAT-vraagstelling
- Voorstelling project
- To do's

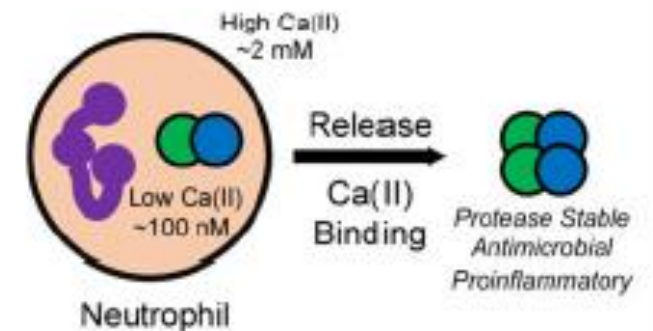
Calprotectine

- Heterodimeer van de Ca^{2+} -bindende eiwitten S100A8/S100A9 (MRP8/14, calgranulin A/B)
- Typisch in neutrofielen, mono/macrofagen
 - 50% van totaal cytosolisch eiwitgehalte in neutro's
- Ook homodimeren/heterotetrameren/oligomeren
 - Heterodimeer: intracellulair
 - Heterotetrameer: extracellulair



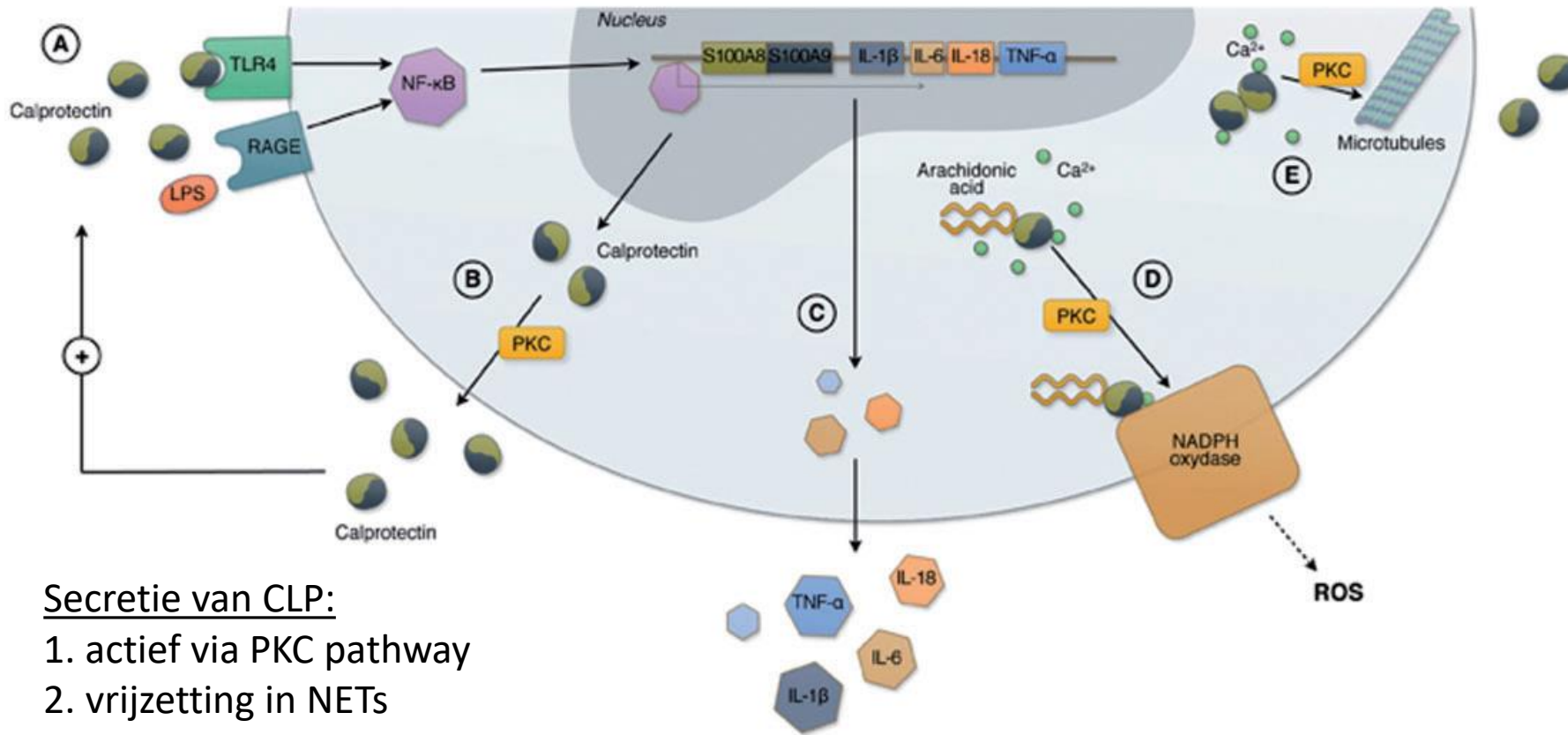
Structure of S100A8/A9 heterodimer

Korndörfer et al. J Mol Biol. 2007;370(5):887-898



Stephan et al. Am J Chem Soc. 2018;140(50):17444-17455

Intracellulaire functies van CLP



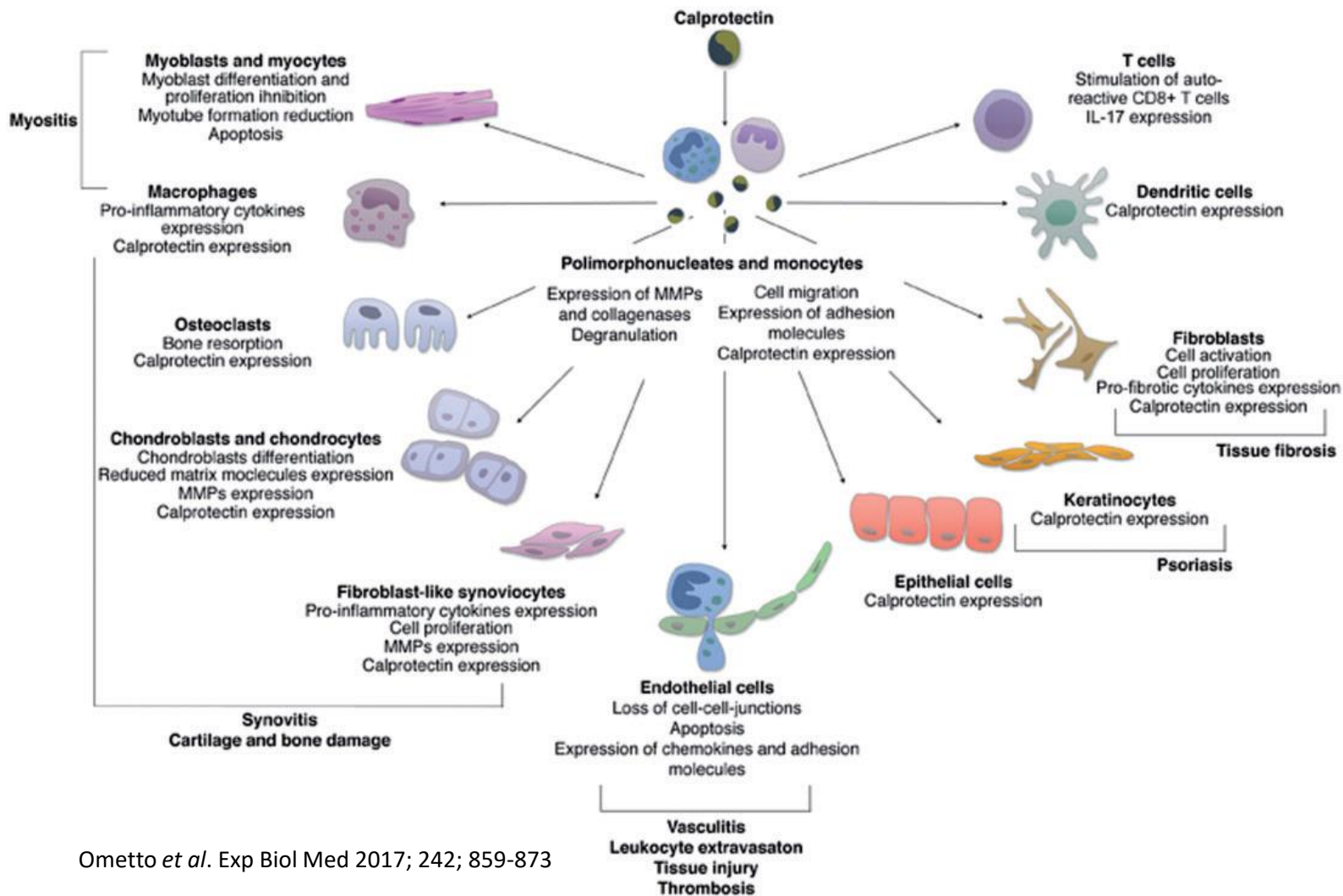
Secretie van CLP:

1. actief via PKC pathway
2. vrijzetting in NETs
3. lekage uit necrotische cellen

Belangrijkste functies:

- Cytoskelet regulatie
- Leukocyt migratie en chemotaxis
- Amplificatie van het inflammatoir proces
- Rechtstreeks antibacterieel effect door chelatie zink en mangaan

Extracellulaire functies van CLP

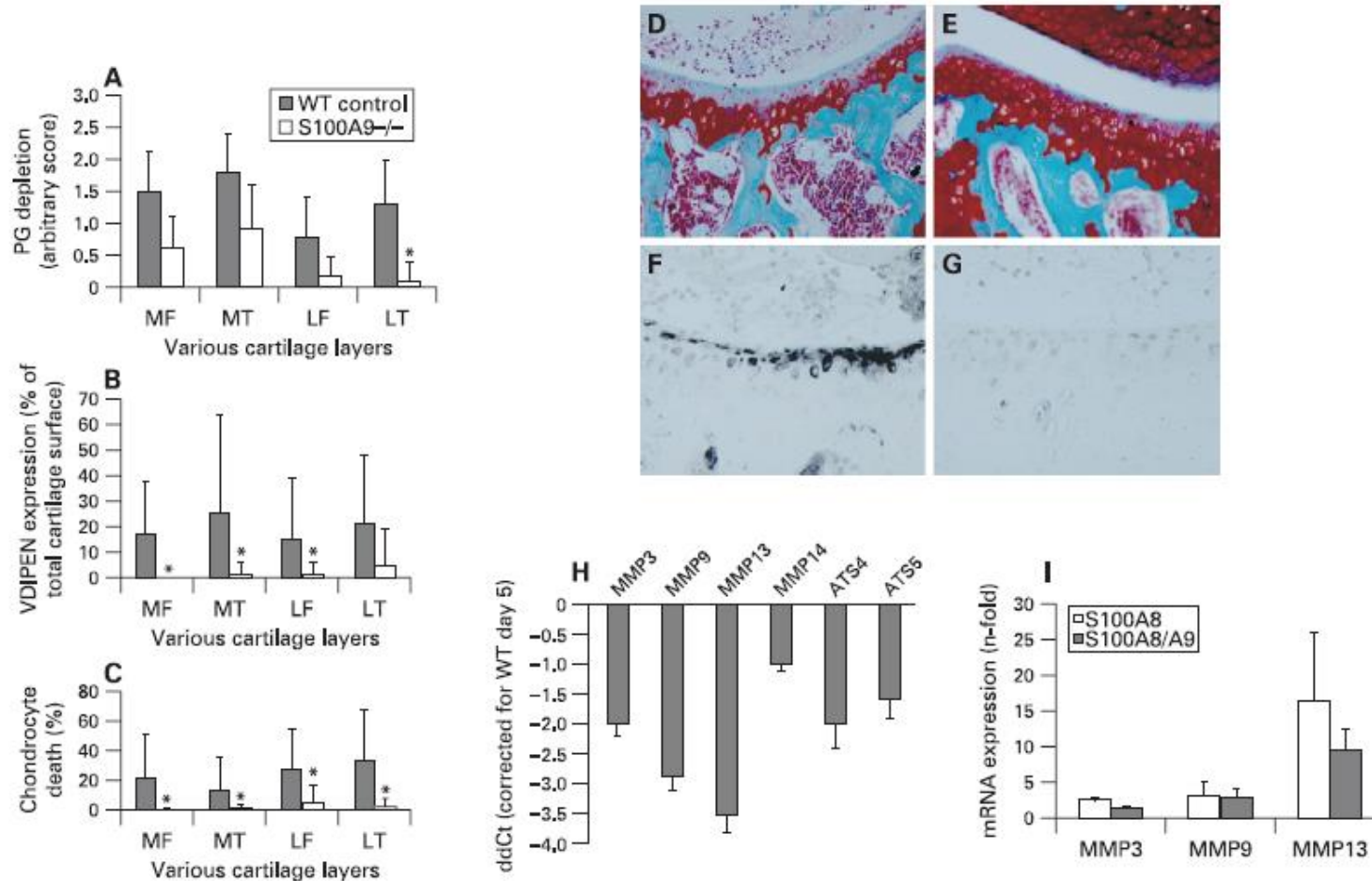


- CLP productie vindt plaats door neutrofielen in ontstoken gewricht
 \leftrightarrow CRP < lever o.i.v. IL-6 tgv systemisch inflammatoire activiteit

- CLP in serum/plasma correleert goed met concentraties in synoviaal vocht en lijkt dus een goed surrogaat voor de inflammatie in het gewricht.

Hammer *et al.* Clin Exp Rheumatol 1995; 13: 59-64

CLP medieert gewrichtsschade in een RA-muismodel



CLP KO-muis:

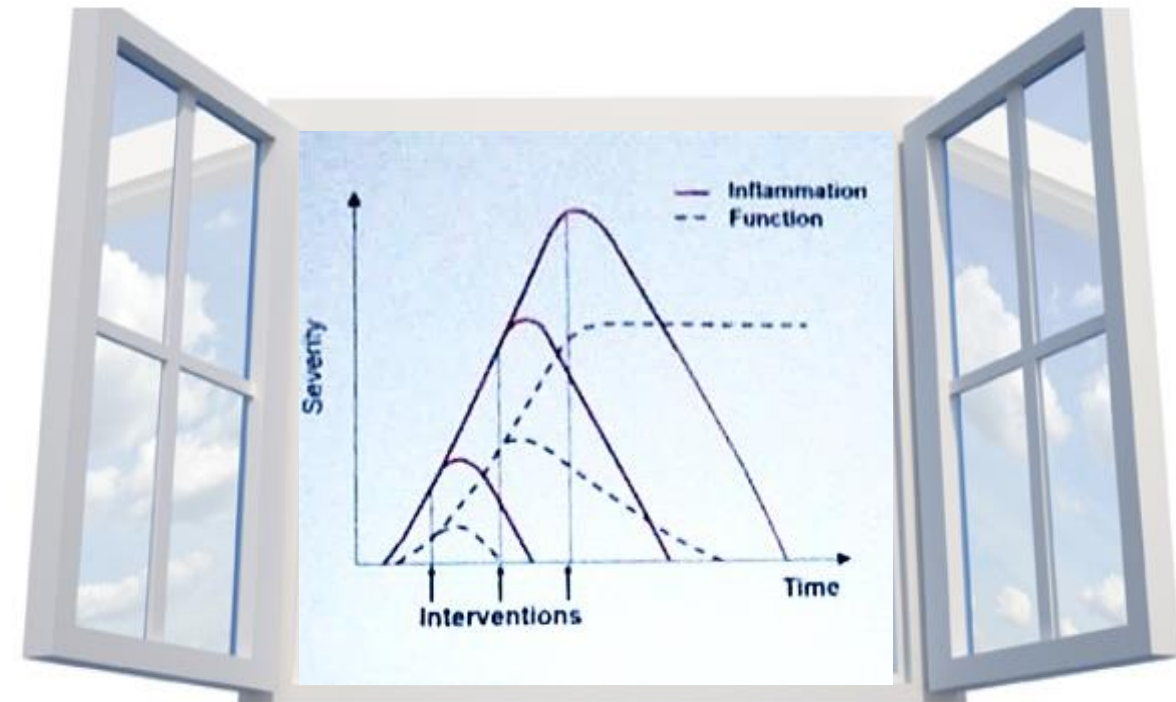
- minder proteoglycaan depletie
- minder MMP-gemedieerde degradatie
- quasi geen kraakbeen necrose
- significant lagere expressie van MMP3/9/13

CLP als biomarker bij RA

Kenmerken goede biomarker in context RA

1. Vroege diagnose
2. Prognostische indicator → Pt'n met hoog risico op ernstigere vormen van RA identificeren

Window of opportunity bij RA



Aanpassing ACR/EULAR criteria met oog op vroegtijdige diagnose

ACR 1987

1. Morning stiffness
2. Arthritis of 3 or more joint areas
3. Arthritis of hand joints
4. Symmetric arthritis
5. Rheumatoid nodules
6. Serum rheumatoid factor
7. Radiographic changes

≥ 4/7=RA

ACR/EULAR 2010

Classification criteria for RA (score-based algorithm: add score of categories A–D; a score of ≥6/10 is needed for classification of a patient as having definite RA)‡

A. Joint involvement§	
1 large joint¶	0
2–10 large joints	1
1–3 small joints (with or without involvement of large joints)#	2
4–10 small joints (with or without involvement of large joints)	3
>10 joints (at least 1 small joint)**	5
B. Serology (at least 1 test result is needed for classification)††	
Negative RF <i>and</i> negative ACPA	0
Low-positive RF <i>or</i> low-positive ACPA	2
High-positive RF <i>or</i> high-positive ACPA	3
C. Acute-phase reactants (at least 1 test result is needed for classification)‡‡	
Normal CRP <i>and</i> normal ESR	0
Abnormal CRP <i>or</i> abnormal ESR	1
D. Duration of symptoms§§	
<6 weeks	0
≥6 weeks	1

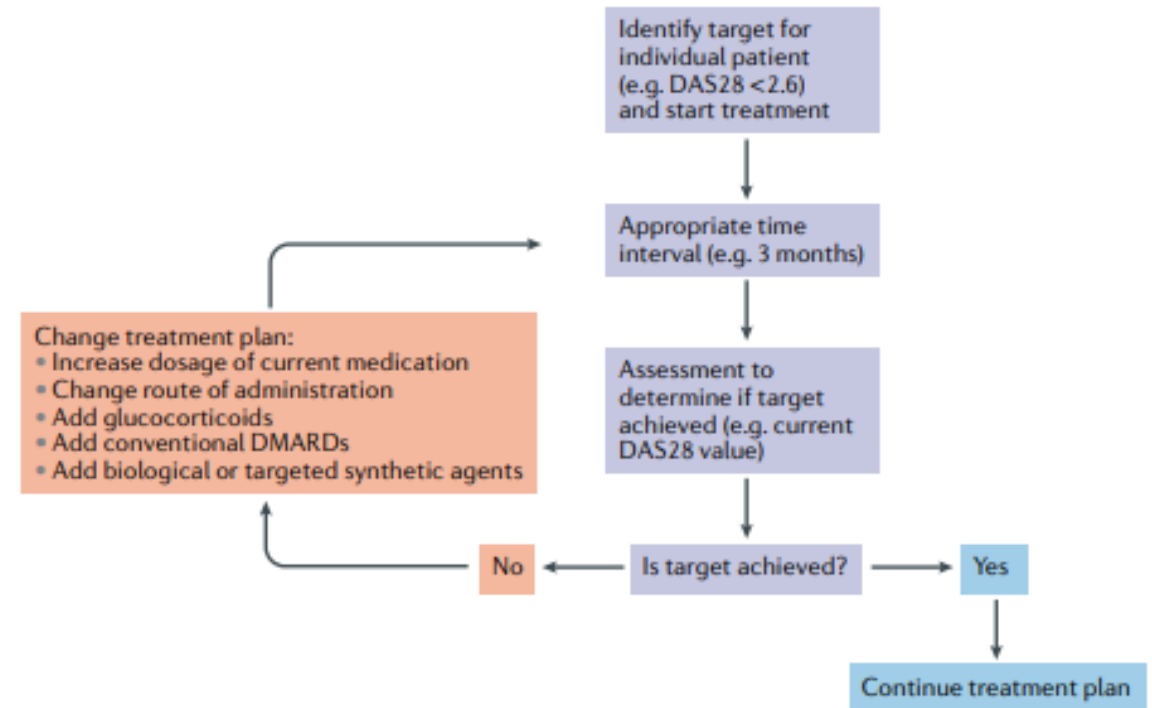
≥ 6/10=RA

CLP als biomarker bij RA

Kenmerken goede biomarker in context RA

1. Vroege diagnose
2. Prognostische indicator → Pt'n met hoog risico op ernstigere vormen van RA identificeren
3. Accuraat ziekteactiviteit weerspiegelen → effect van behandeling opvolgen
4. Respons op behandeling inschatten → therapiekeuze sturen

Treat-to-target strategie bij RA



van Vollenhoven. Nat Rev Rheumatol. 2019; 15:180-186

CLP als biomarker bij RA

- CRP, ESR of RF zijn negatief bij presentatie in 35-45% *
→ Talrijke studies tonen aan dat CLP correleert met ziekteactiviteit (DAS-28)
- CRP is niet bruikbaar bij patiënten behandeld met IL-6 inhibitoren **
→ CLP voor opvolging inflammatie/detectie van infectie
- Nauwkeurige inschatting van ziekteactiviteit is cruciaal voor treat-to-target strategie om best mogelijke outcome te bekomen

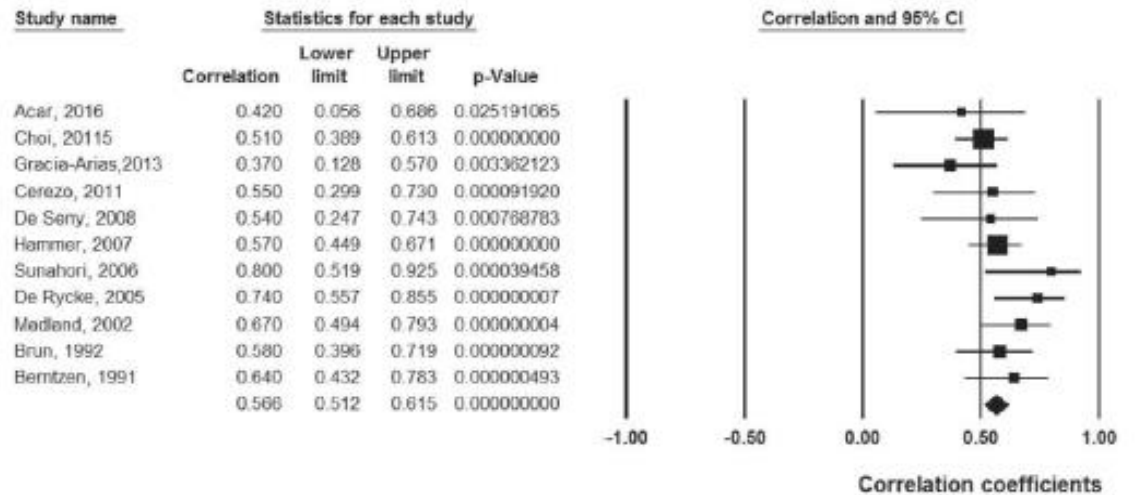
*Sokka et al. *J Rheumatol.* 2009;36(7):1387-1390

**Jarlborg et al. *Arthritis Research & Therapy.* 2020

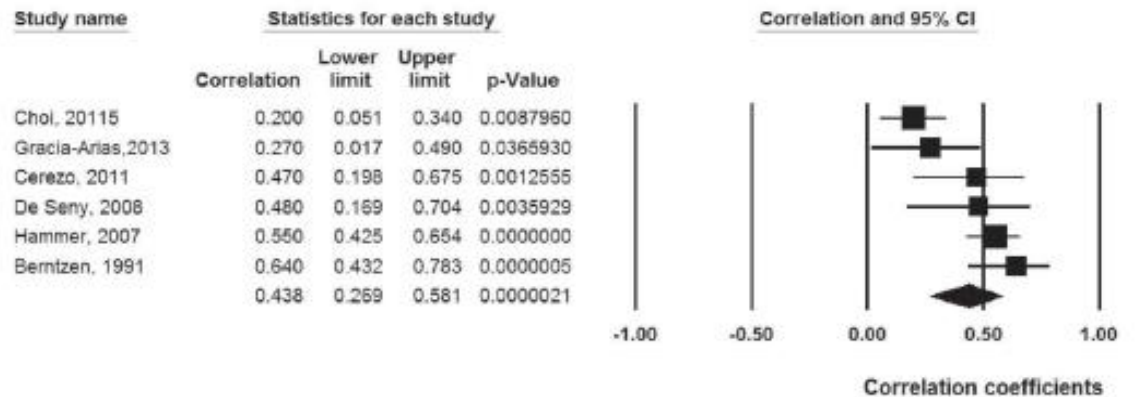
CLP als biomarker bij RA

- CLP correleert met biochemische en klinische markers van ziekteactiviteit

a. CRP



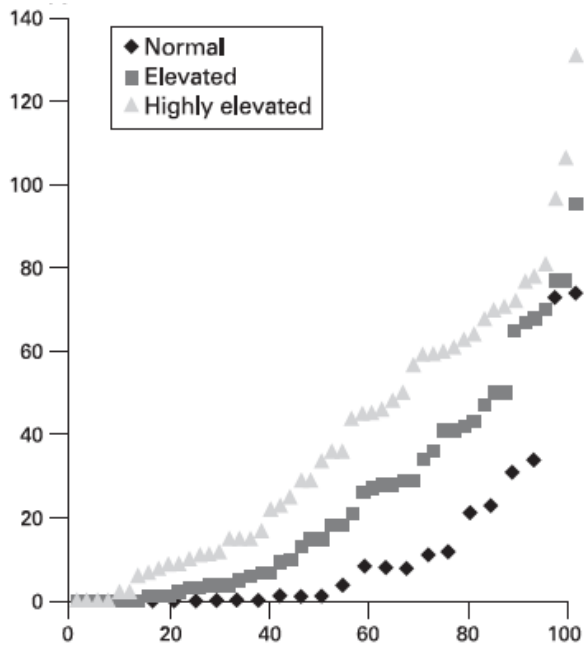
b. DAS28



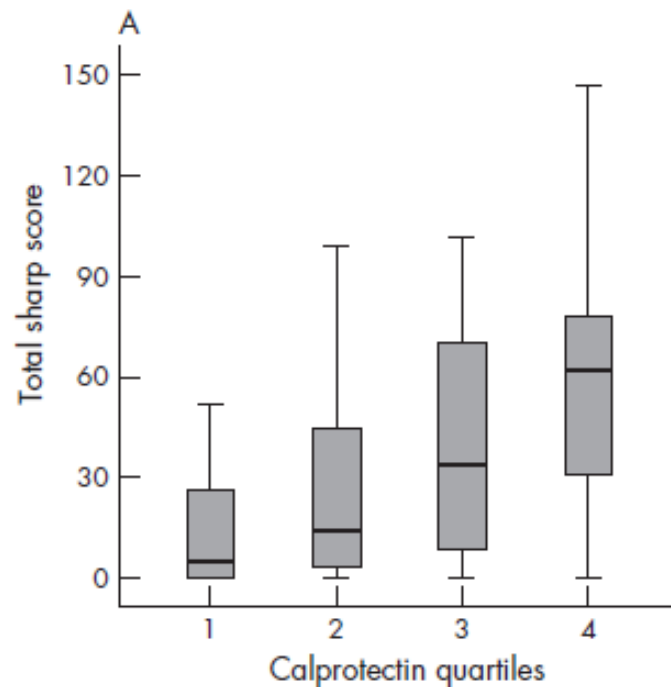
- Significant hogere serum CLP bij RA t.o.v. controle
- Significant hoger synoviaal CLP t.o.v. controle
- Significante correlatie tussen CLP en CRP/DAS28

CLP als biomarker bij RA

- CLP correleert met radiologische/echografische markers van ziekteactiviteit



Hammer *et al.* Ann Rheum Dis. 2010;2(69):150-154



Hammer *et al.* Ann Rheum Dis. 2007 ;66:1093–109

Table 4 Correlation between ultrasonographic B mode scores and serum calprotectin levels in RA patients.

US B-Mode	Serum calprotectin levels (µg/dL)		ANOVA	
	Range	Mean ± SD	F	p
Grade 0	75.600–75.600	75.600 ± 0.0	8.050	<0.001*
Grade 1	66.400–171.400	133.481 ± 35.289		
Grade 2	135.500–372.500	225.000 ± 75.632		
Grade 3	139.200–374.600	245.575 ± 98.214		

ANOVA = analysis of variance; RA = rheumatoid arthritis; SD = standard deviation; US = ultrasound.
* highly significant p value.

Table 5 Correlation between ultrasonographic power Doppler scores and serum calprotectin levels in rheumatoid arthritis patients.

US power Doppler	Serum calprotectin (µg/dL)		ANOVA	
	Range	Mean ± SD	F	p
No	66.400–195.200	130.018 ± 38.187	17.779	<0.001*
Grade 1	135.400–372.500	186.038 ± 62.215		
Grade 2	147.100–338.000	250.427 ± 63.884		
Grade 3	253.200–374.600	328.367 ± 65.668		

ANOVA = analysis of variance; SD = standard deviation; US = ultrasound.
* highly significant p value.

Mansour *et al.* J Med Ultrasound. 2017;25(1):40-46

CLP als biomarker bij RA

- CLP is accurater dan CRP bij laag inflammatoire activiteit en correleert met subklinische ziekteactiviteit bij RA in klinische remissie

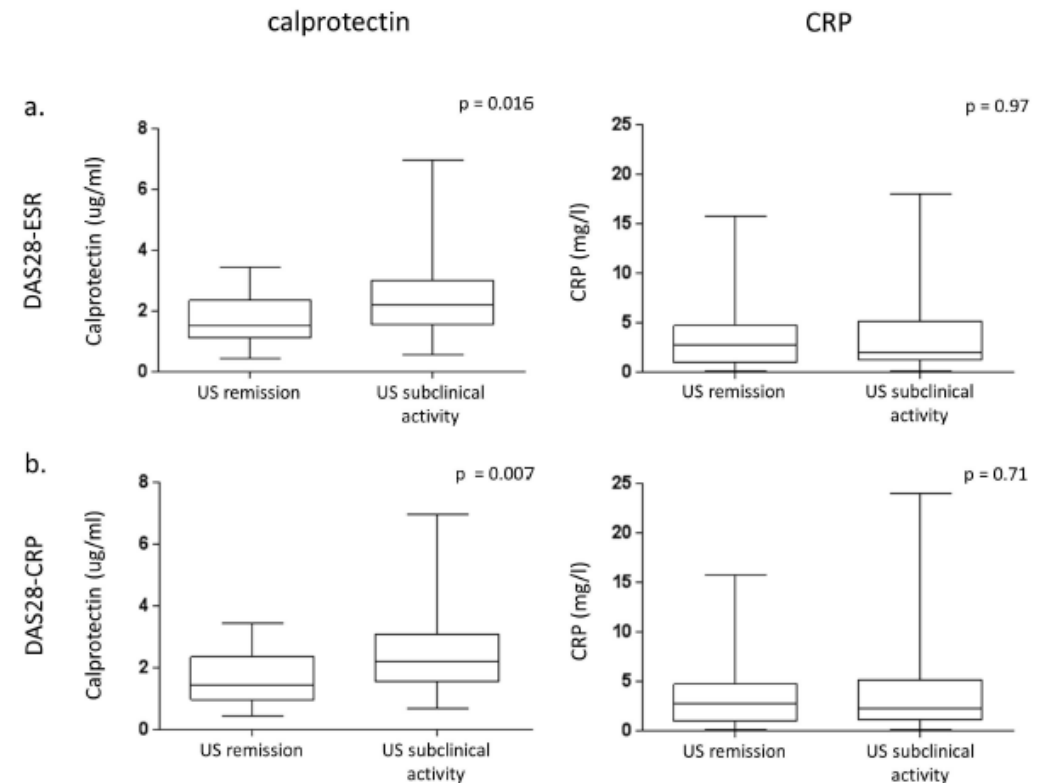
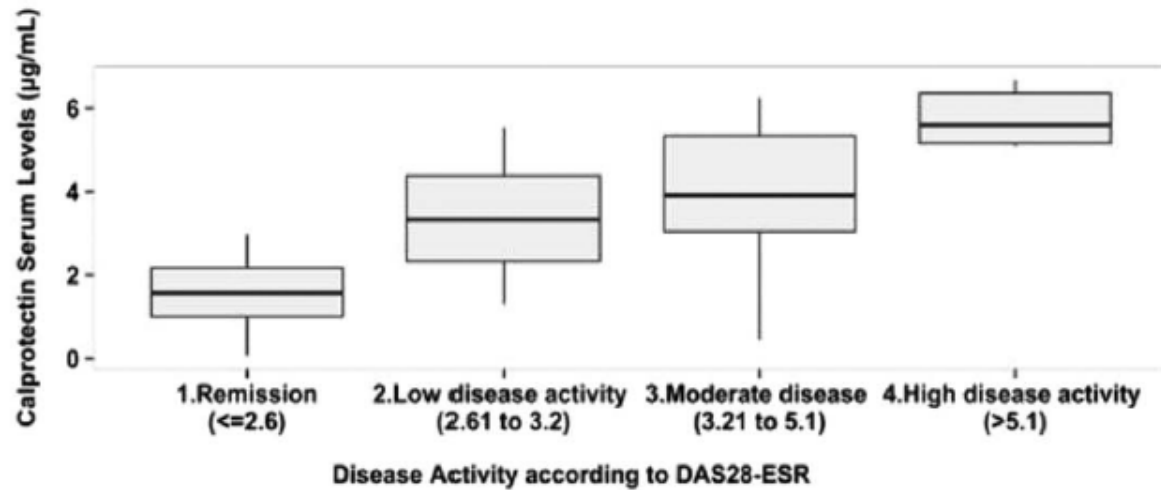


Table 2. Calprotectin, CRP, and ESR according to composite activity indices in RA patients in remission and with LDA*

	DAS28-ESR		CDAI		SDAI	
	Remission (≤ 2.6) (n = 17)	LDA (2.61-3.2) (n = 30)	Remission (≤ 2.8) (n = 11)	LDA (2.81-10) (n = 35)	Remission (≤ 3.3) (n = 13)	LDA (3.31-11) (n = 34)
Calprotectin, $\mu\text{g/ml}$	1.56 (0.7-2.9)†	3.33 (1.3-5.5)	1.68 (0.2-2.9)‡	2.24 (0.07-5.5)	1.80 (0.2-3.9)‡	2.39 (0.07-5.5)
CRP, mg/dl	0.1 (0.02-1.1)	0.01 (0.1-1.4)	0.05 (0.02-0.6)	0.20 (0.01-1.5)	0.05 (0.01-0.6)‡	0.19 (0.02-1.5)
ESR, mm/hour	10 (2-24)†	19 (7-43)	13 (7-24)	13 (2-43)	16 (7-43)	13 (2-36)

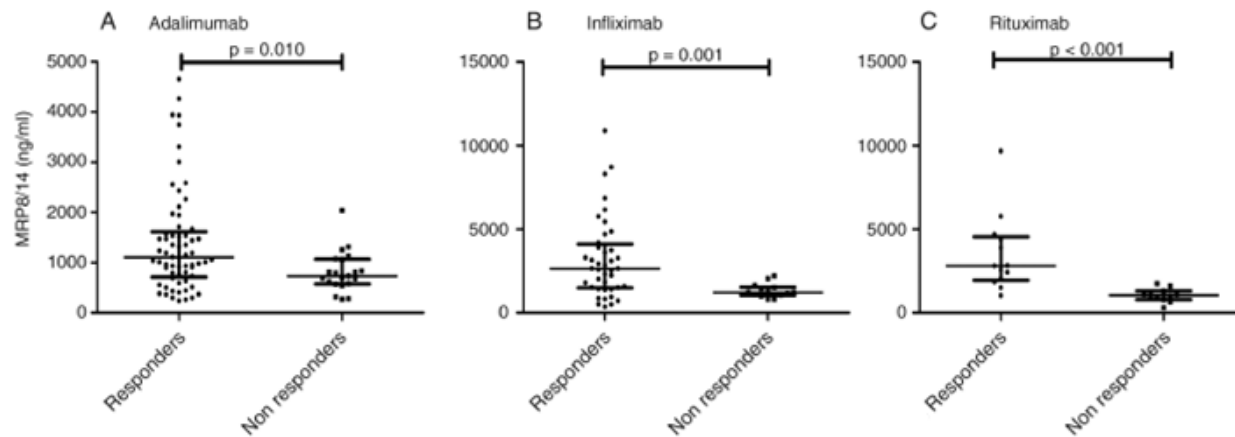
* Values are the median (range). CRP = C-reactive protein; ESR = erythrocyte sedimentation rate; RA = rheumatoid arthritis; LDA = low disease activity; DAS28 = Disease Activity Score in 28 joints; CDAI = Clinical Disease Activity Index; SDAI = Simplified Disease Activity Index.

† $P < 0.0005$, lower than Bonferroni critical value.

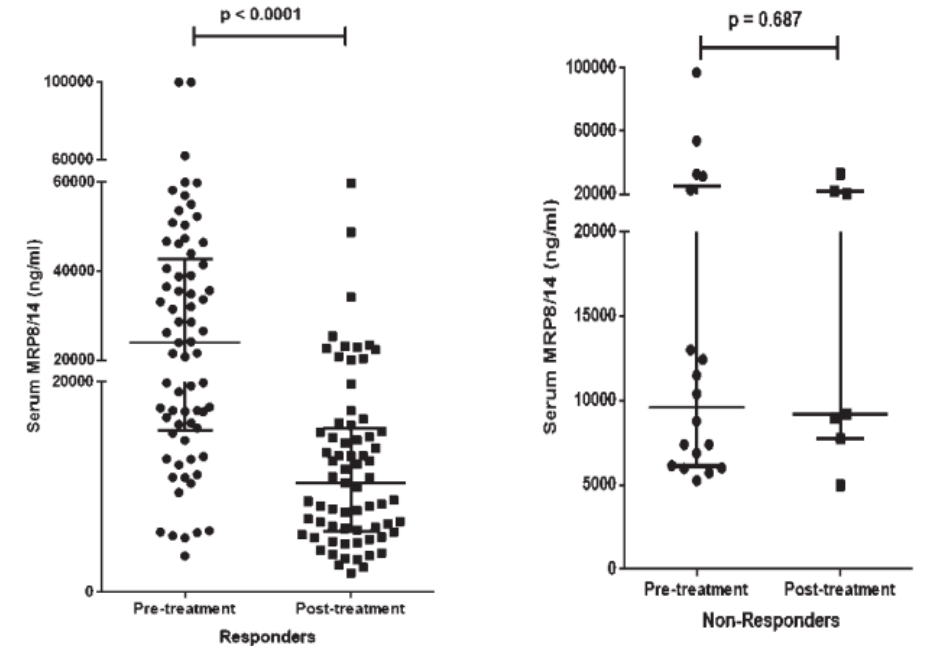
‡ $P < 0.05$.

CLP als biomarker bij RA

- CLP voorspelt respons op biologicals en conventionele DMARDs...



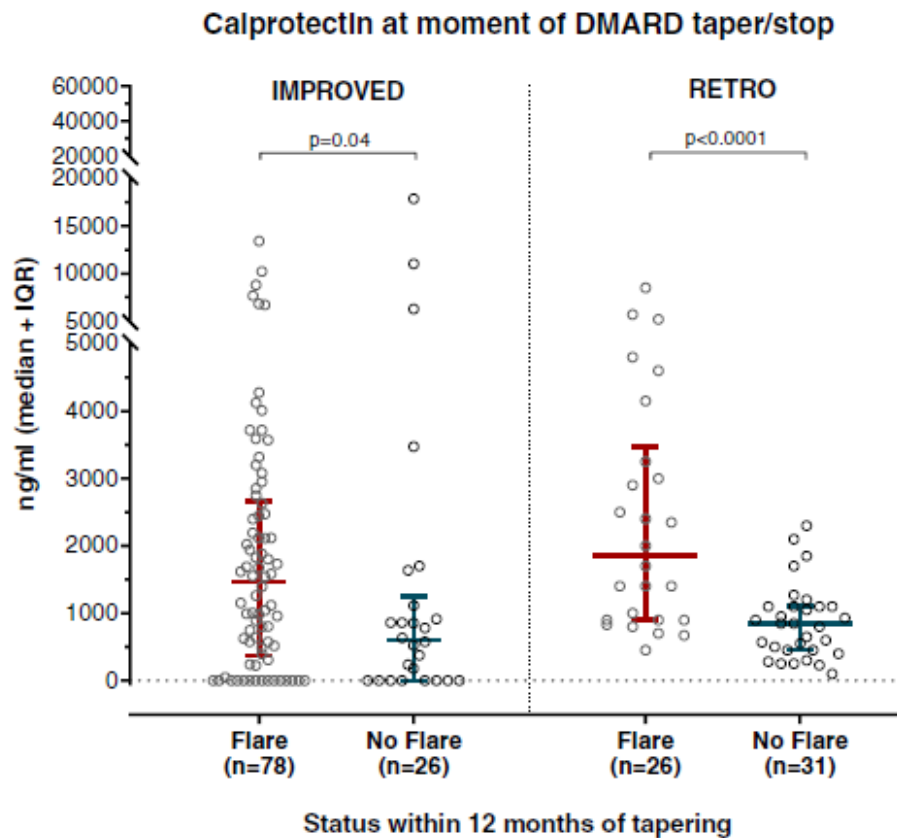
Choi et al. Ann Rheum Dis. 2015;74(3):499-505



Patro et al. J Rheumatol. 2016; 43(4):731-737

CLP als biomarker bij RA

... en voorspelt hervал/opflakking tijdens of na stop behandeling



→ *Potentieel nut voor CLP als biomarker, met name in therapiemonitoring en follow-up van medicatie-vrije remissie*

Huidige probleemstelling

- Veel studies naar klinisch nut van CLP bij RA, doch grote inter-study variabiliteit ~ analytische en pre-analytische factoren
 - → maakt vergelijking van resultaten tussen studies moeilijker
- Pre-analytische variabelen van CLP-bepaling in serum/plasma weinig bestudeerd

Vraagstelling

Wat is de impact van pre-analytische variabelen op de bepaling van calprotectine in serum/plasma?

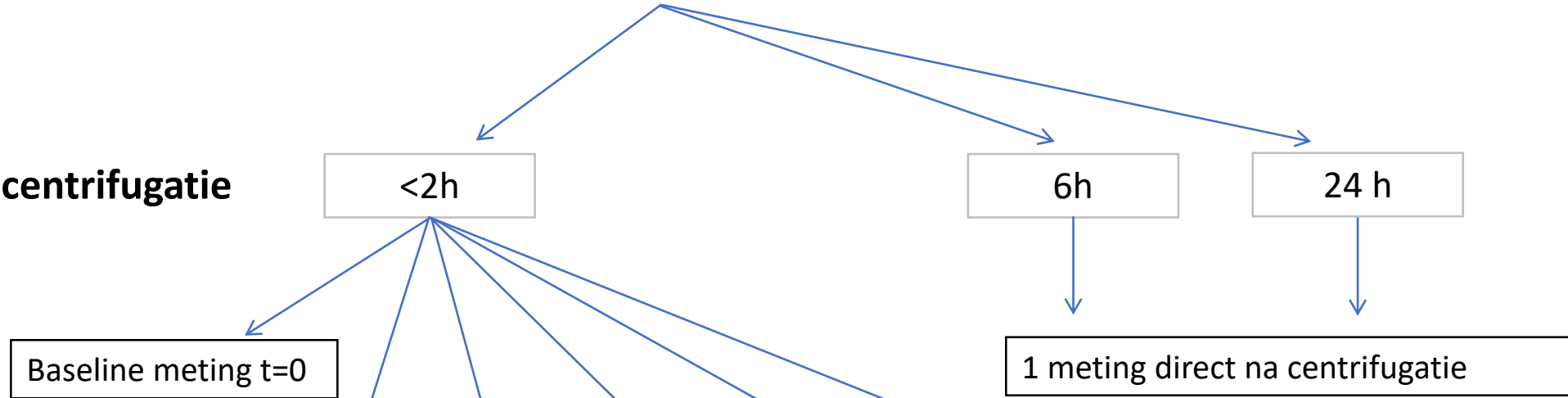
Projectvoorstelling

- Studiepopulatie
 - 10 gezonde vrijwilligers
 - 25-63 jaar
 - M/V = 4/6
 - CRP < 5mg/L
- Pre-analytische variabelen
 - Staaltype
 - Tijd tot centrifugatie
 - Bewaringstemperatuur
 - Bewaringstijd

Staaltype



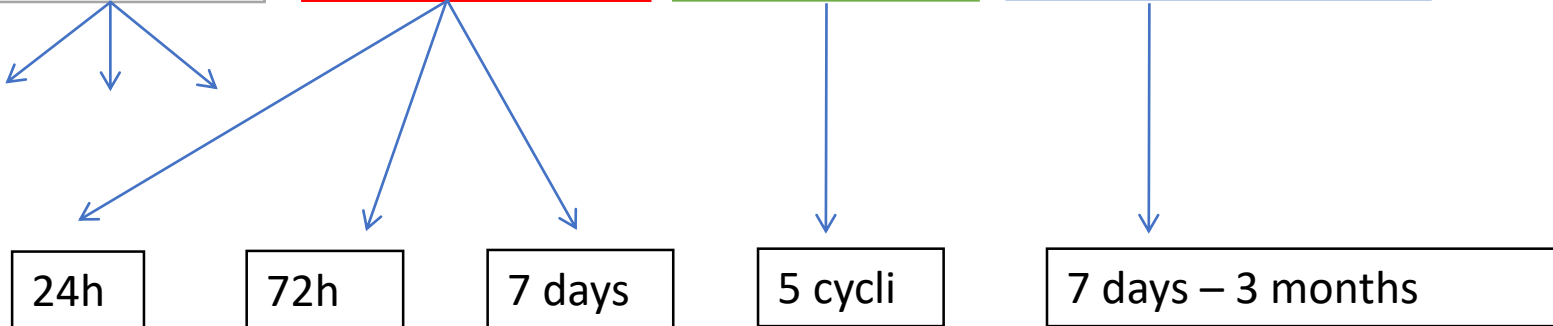
Tijd tot centrifugatie



Bewaarconditie



Bewaringstermijn



Projectvoorstelling

- Studiepopulatie

- 10 gezonde vrijwilligers
 - 25-63 jaar
 - M/V = 4/6
 - CRP < 5mg/L

- Pre-analytische variabelen

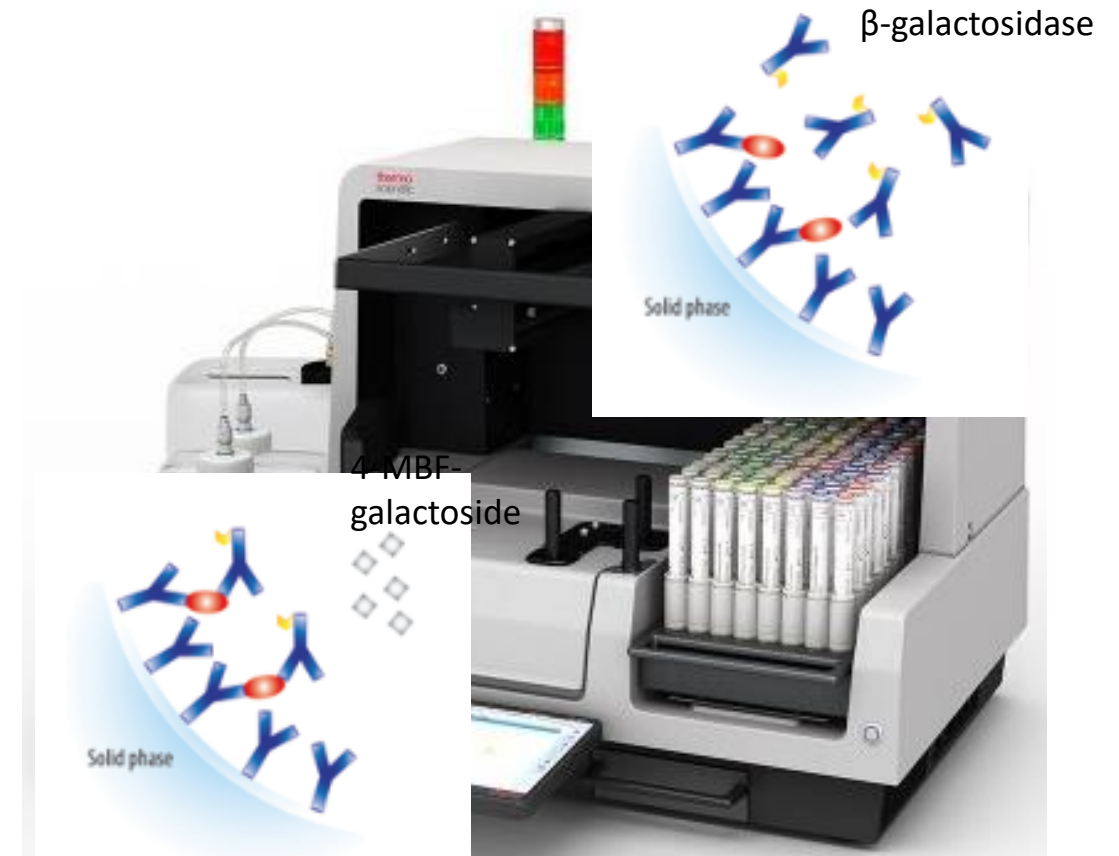
- Staaltype
- Tijd tot centrifugatie
- Bewaringstemperatuur
- Bewaringstijd

- Assay

- EliA Calprotectin 2 (serum/plasma protocol)
- Phadia 200
 - Imprecisie

EliA Calprotectin 2 assay on Phadia 200

- FEIA: fluoro-enzyme-immunoassay
- Sandwich principe
- Monoclonale antilichamen: zeer specifiek voor het heterodimeer
- Fluorescentie door 4-methylumbelliferyl



Resultaten

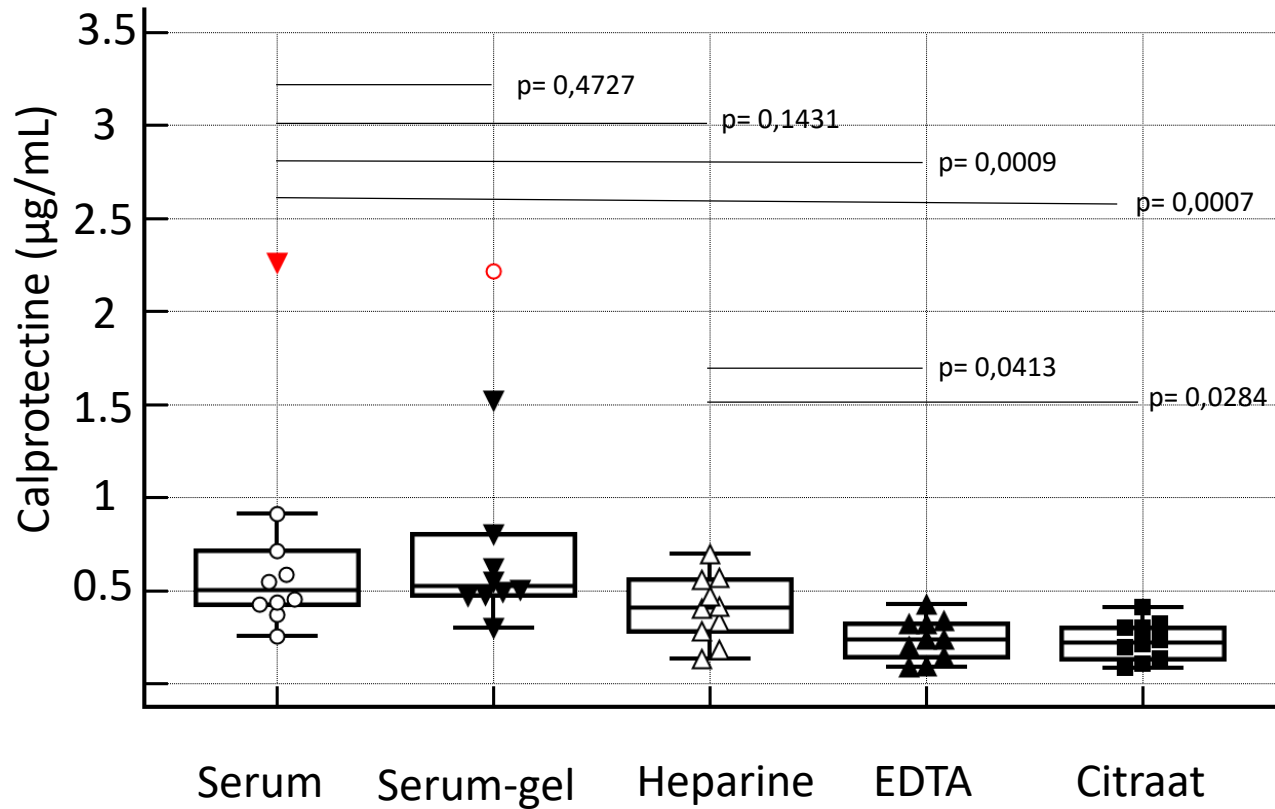
Verificatie van imprecisie t.o.v. Phadia 250 toont vergelijkbare CV%

Calprotectin	Patient pools			Thermo Fisher iQC	
	high	medium	low	iQC pos	iQC neg
Mean ($\mu\text{g/mL}$)	0.936	0.329	0.069	0.960	0.112
SD ($\mu\text{g/mL}$)	0.050	0.017	0.007	0.044	0.011
CV (%)	5.40	5.29	10.81	4.56	10.16

Geen significant verschil t.o.v. eerdere bepaalde CV% van 9.2% op Phadia 250 (F-test: $p = 0,326$)

Op basis van deze bepalingen werd beslist om de analytische acceptatie limieten om klinisch relevante afwijkingen te definiëren op +/- 20% te nemen ($2*CV_a$)

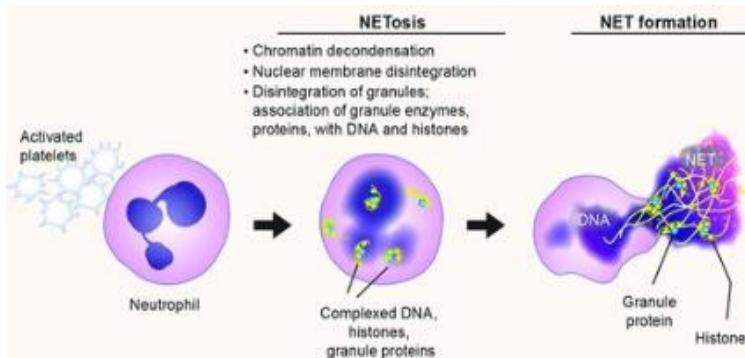
Baseline calprotectine waarden zijn hoger in serum tubes.



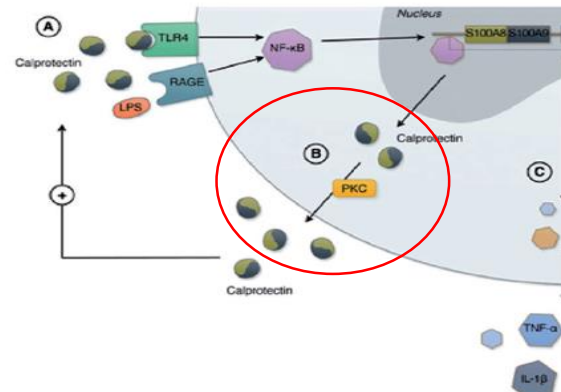
- Centrifugatie <2u
- Outliers gedetecteerd in serum maar niet in plasma
- CLP-meting in heparine
 - Niet significant lager dan serum
 - Significant hoger dan EDTA/citraat

Mogelijke verklaring voor verschillen in CLP tussen staaltypes?

- In vitro release van CLP



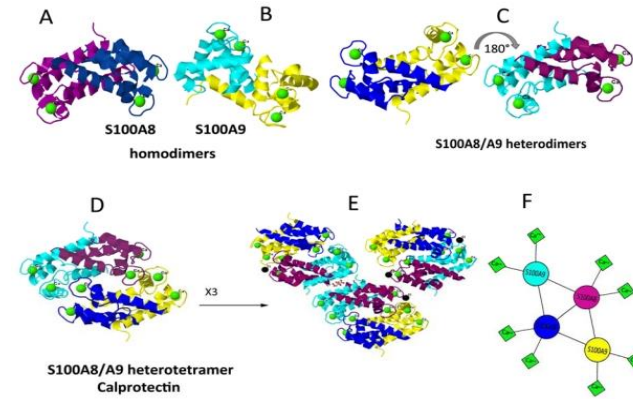
Guo et al. *Front Immunol.* 2019; 10:2204



Ometto et al. *Exp Biol Med.* 2017; 242: 859-873

- In vitro verandering van CLP conformatie o.i.v. Ca^{2+}

→ meer epitopen vrij voor binding in FEIA



Vogl et al. *Int J Mol Sci.* 2012:2893-2917

- Hypothese in serum en heparine: Ca^{2+} aanwezig → heterotetrameer → dubbel fluorescentie signaal
- in EDTA/citraat: Ca^{2+} afwezig → heterodimeer

Conclusies

1. Toekomstige studies naar klinische waarde van CLP dienen het gebruikte staaltype te specificeren en hiermee rekening te houden bij het bepalen van referentiewaarden/cut-offs.

Reproduceerbaarheid van CLP meting in EDTA-plasma is hoger dan in serum

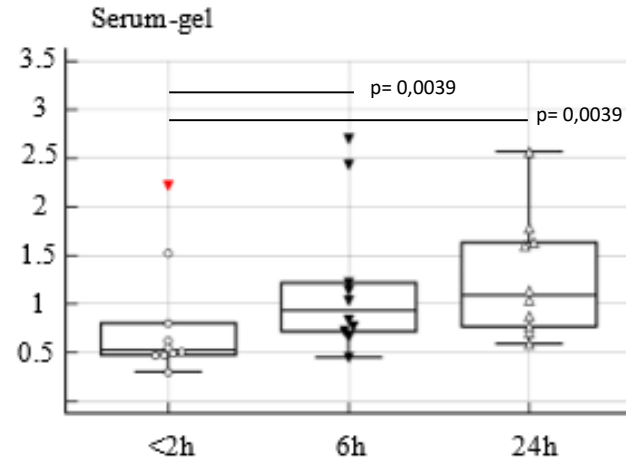
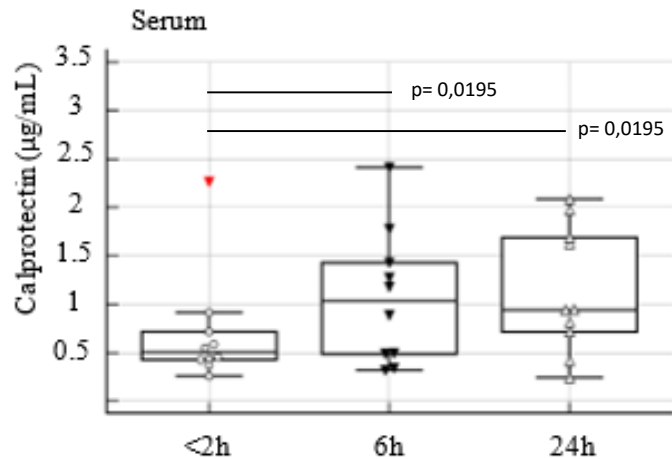
- Vergelijking van gezonde controles (n=10) met voorgaande studie (n=20)

	serum		EDTA	
Calprotectin (µg/mL)	CCLM 2019	CAT	CCLM 2019	CAT
min	0,309	0,257	0,051	0,090
max	1,426	0,910	0,456	0,336
median	0,900	0,456	0,176	0,235
95th percentile	1,146	0,832	0,437	0,385
	p = 0,0058		p = 0,5093	

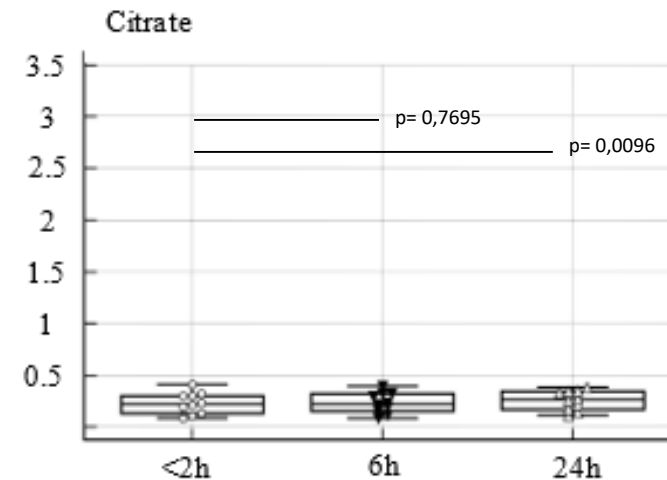
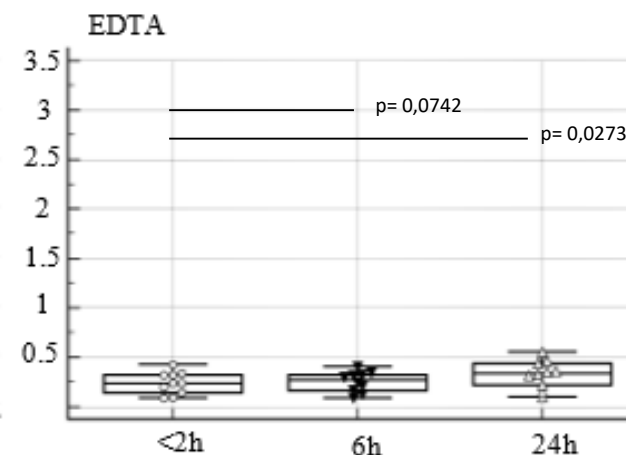
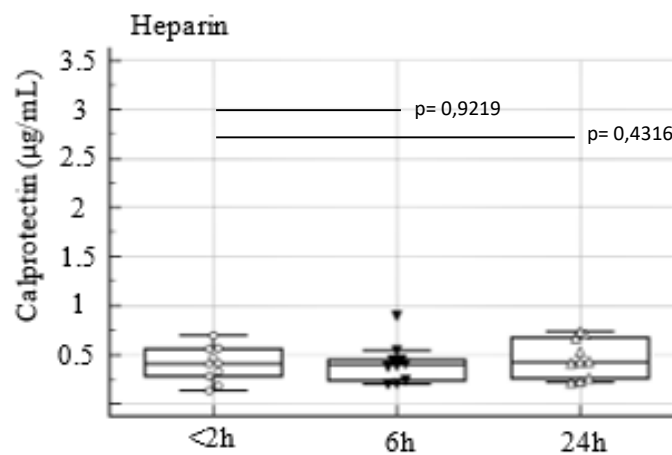
Conclusies

1. Toekomstige studies naar klinische waarde van CLP dienen het gebruikte staaltype te specificeren en hiermee rekening te houden bij het bepalen van referentiewaarden/cut-offs.
2. Het meten van CLP in plasma i.p.v. serum zou mogelijks kunnen bijdragen tot meer harmonisatie tussen studies (betere reproduceerbaarheid)

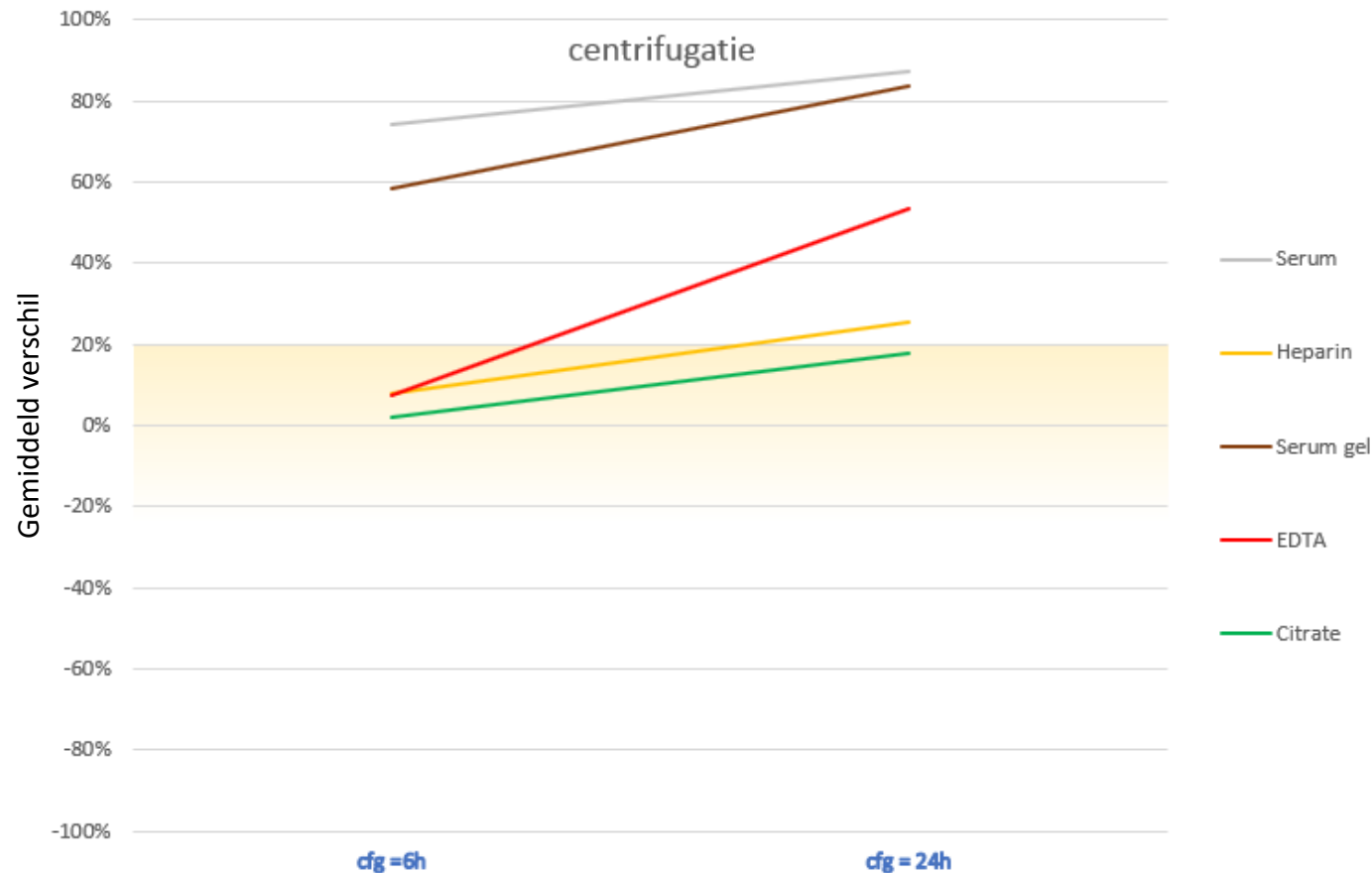
Calprotectine bepaling in plasmatubes is stabiel bij centrifugatie binnen de 6u



- CLP $\uparrow\uparrow$ in serum tubes bij centrifugatie na 6u
- CLP stabiel tot 6u in plasmatubes
- In citraat stabiel tot 24u



Calprotectine bepaling in plasmatubes is stabiel bij centrifugatie binnen de 6u



Significante stijging van CLP concentraties in serum tubes bij centrifugeren na 6u t.o.v. <2u

Gemiddeld verschil t.o.v. baseline waarde van ca. 60-80%

Verklaring voor stijgende serum CLP-waarde bij uitgestelde centrifugatie

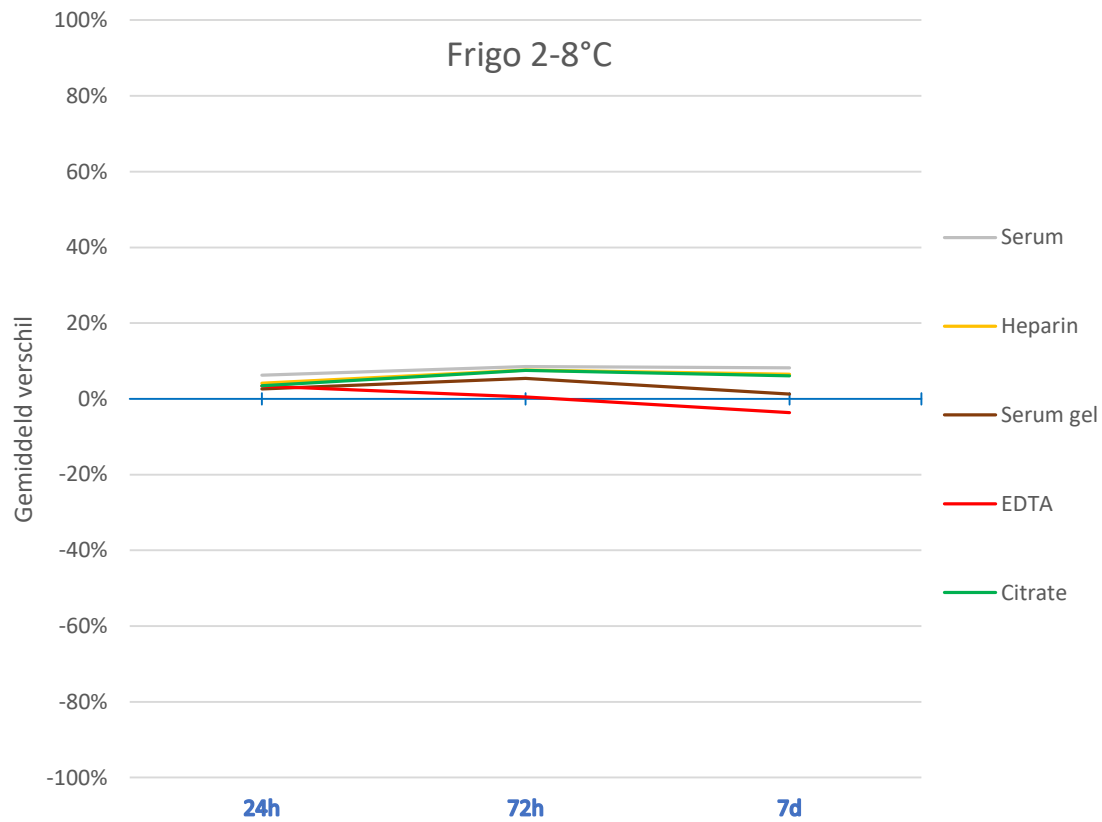
- Toename van in vitro release effect tgv langere contactduur tussen cellen en serum
- Gebruik van plasmatubes maakt onmiddellijke centrifugatie mogelijk en dus minimalisatie van een in vitro release effect
- CLSI guideline GP44: “pre-centrifugatie tijd van 24-48u”
 - Geldt niet voor serum stalen! Centrifugatie dient binnen 2u te gebeuren
 - Voor plasma tubes is er meer tijd (6u)

Conclusies

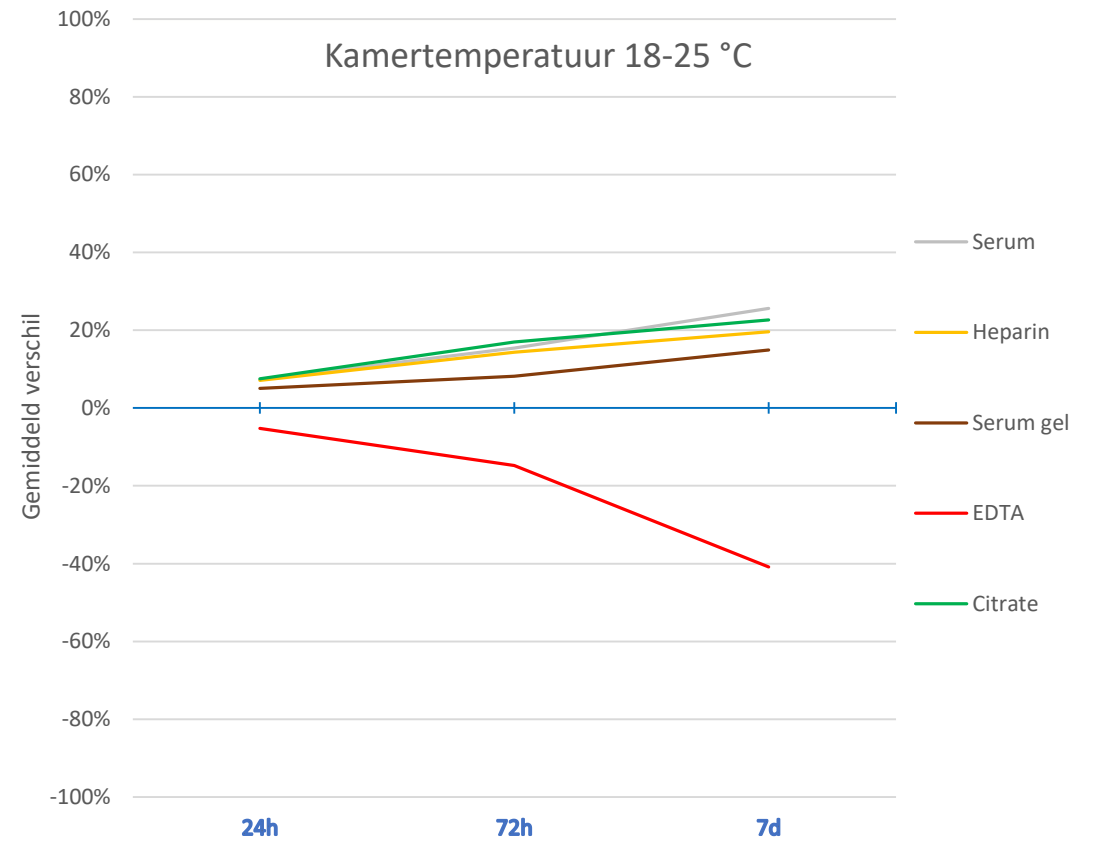
1. Toekomstige studies naar klinische waarde van CLP dienen het gebruikte staaltype te specificeren en hiermee rekening te houden bij het bepalen van referentiewaarden/cut-offs.
2. Het meten van CLP in plasma i.p.v. serum zou kunnen bijdragen tot meer harmonisatie tussen studies (betere reproduceerbaarheid)
3. Impact van uitgestelde centrifugatie op de calprotectine concentratie is kleiner in plasmatubes, waardoor ze meer geschikt zijn voor gebruik in bvb. huisartsen setting

Effect van bewaartermijn en temperatuur

CLP is stabiel in alle staaltypes tot 7 dagen

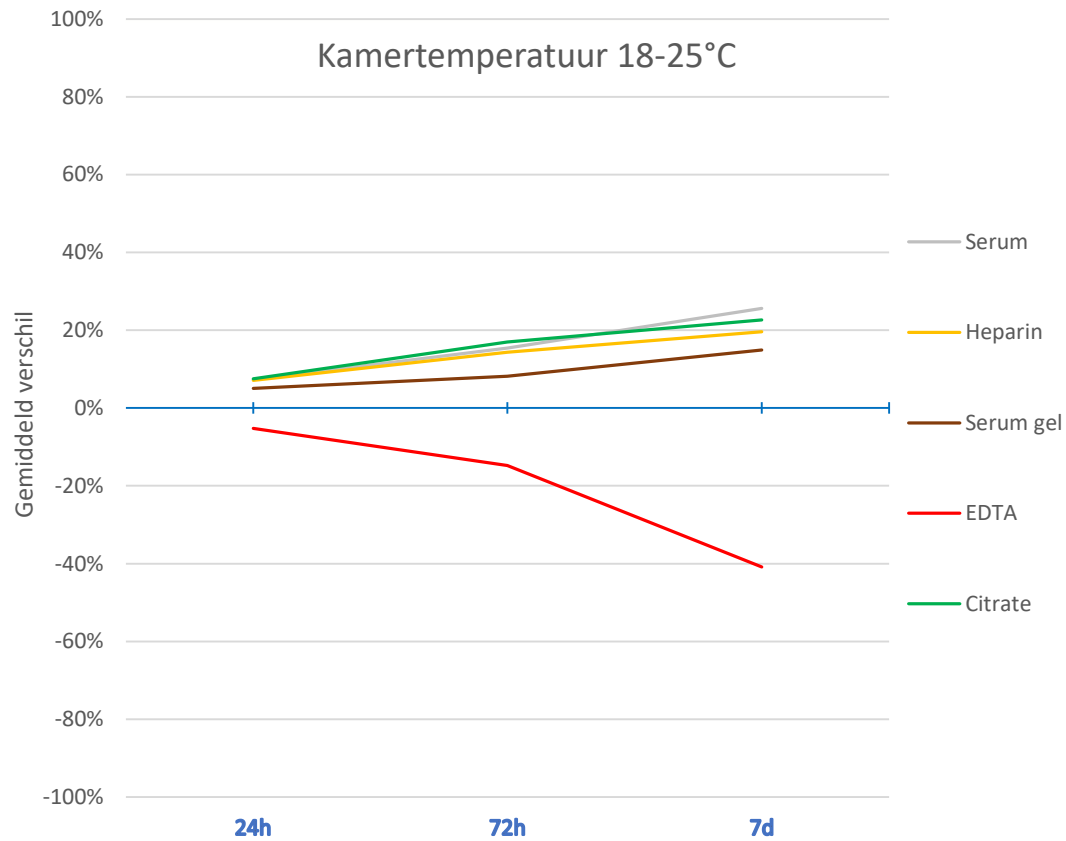


CLP is stabiel in alle staaltypes tot 72u

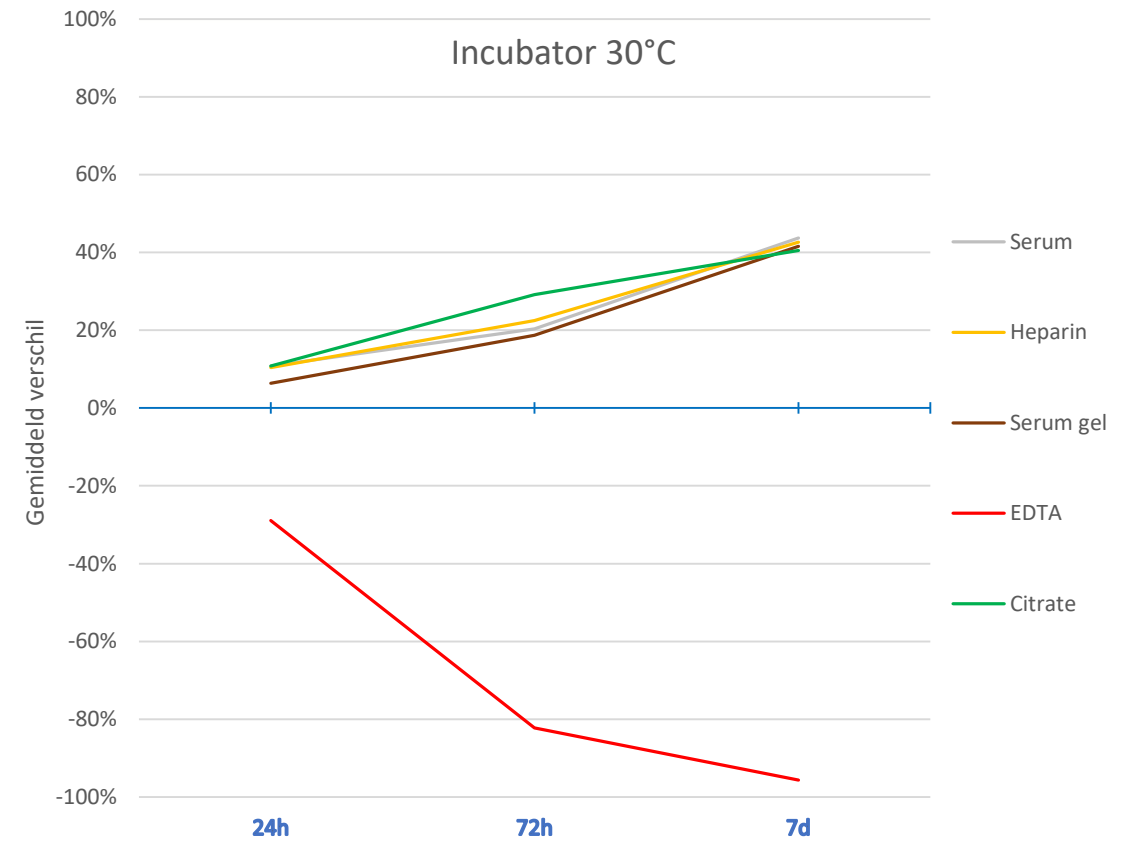


Effect van bewaartermijn en temperatuur

CLP is stabiel in alle staaltes tot 72u

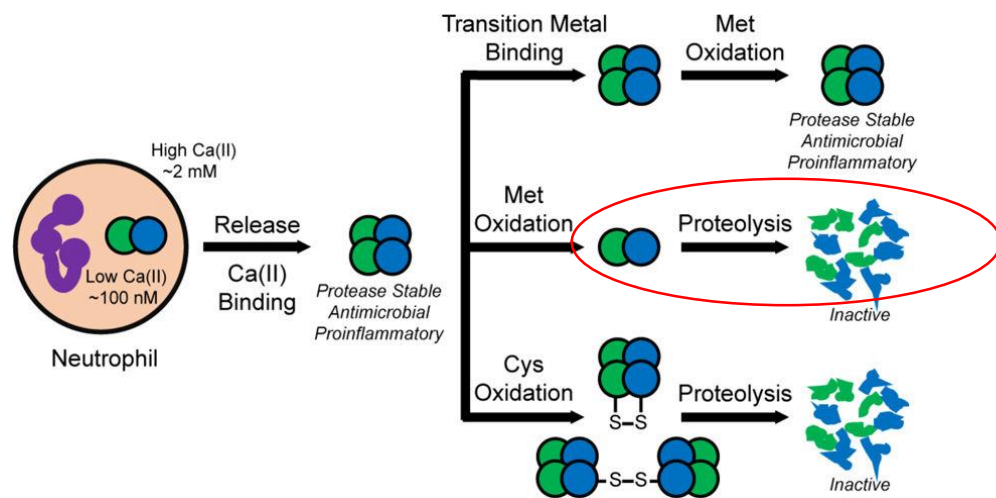


CLP is stabiel in alle staaltes tot 24u m.u.v. EDTA



Stijgende/dalende trend van CLP in de tijd?

- Stijgende trends voor serum, heparine en citraat
 - Oorzaak??? → ~ conformatieveranderingen dimeer ↔ tetrameer in de tijd waarbij hogere temperatuur faciliterende rol speelt
- Sterke daling voor EDTA (meest uitgesproken op 30°C)



Quid citraat?? → schijnbaar een stabiliserend effect op CLP heterodimeer!

Conclusies

1. Toekomstige studies naar klinische waarde van CLP dienen het gebruikte staaltype te specificeren en hiermee rekening te houden bij het bepalen van referentiewaarden/cut-offs.
2. Het meten van CLP in plasma i.p.v. serum zou kunnen bijdragen tot meer harmonisatie tussen studies (betere reproduceerbaarheid)
3. Impact van uitgestelde centrifugatie is kleiner in plasmatubes en daardoor meer geschikt voor gebruik in bvb. huisartsen setting
4. CLP is na centrifugatie <2h in alle staaltypes stabiel gedurende minstens 7 dagen, indien koel (2-8°C) bewaard. Op kamertemperatuur en 30°C treedt sneller instabiliteit op.

To do's

- Dataset uitbreiden met 5 RA-patiënten
 - Zelfde observaties t.o.v. controles?
- Western blotting ter confirmatie van conformationele hypothese
- Meta-analyse van de huidige literatuur met nadruk op pre-analytische variabelen

Vragen?