

# CAT

## Critically Appraised Topic

### Calprotectine bepaling in faeces voor diagnose en opvolging van inflammatoire darmziekten

Author: Delphine Labaere  
Supervisor: Dr. Annick Smismans  
Date: 24/04/2012

#### CLINICAL BOTTOM LINE

---

Calprotectine is een proteïne afkomstig uit neutrofielen, waarvan de vrijstelling in faeces verhoogd is bij inflammatie in de darm. Hierdoor kan het mogelijk worden gebruikt voor diagnose en opvolging van patiënten met inflammatory bowel disease (IBD).

Calprotectine overstijgt de diagnostische waarde van andere serologische en faecale merkers bij IBD, is stabiel, reproduceerbaar en snel te meten. Volgens de meest recente meta-analyse bedraagt bij volwassenen in de tweedelijnszorg de positieve en negatieve predictieve waarde en de positieve en negatieve likelihood ratio respectievelijk 91%, 97%, 20 en 0.05. Calprotectine zou vooral zeer nuttig kunnen zijn om IBD te onderscheiden van irritable bowel syndrome (IBS). Bij afwezigheid van alarmsymptomen kan een normaal calprotectine de diagnose van IBD met relatief grote zekerheid uitsluiten, bij een verhoogde waarde dient een endoscopie uitgevoerd te worden. Deze strategie zou naar schatting 67 % coloscopies kunnen vermijden. De negatieve predictieve waarde bedraagt bij kinderen slechts 85 %, waardoor in deze populatie calprotectine minder bruikbaar is als ruling-out test.

Calprotectine correleert met de graad van inflammatie, maar er bestaat een grote variabiliteit tussen de verschillende studies. Waarschijnlijk houdt dit verband met de heterogene lokalisatie van de letsels. De voorspellende waarde van calprotectine voor het doormaken van een opstoot binnen het jaar is slechts matig, met een positieve en negatieve likelihood ratio van respectievelijk 2.81 en 0.31. Uit preliminaire data van patiënten behandeld met TNF-alfa-inhibitoren bleek calprotectine bij deze patiënten wel goed te correleren met remissie en dit reeds vroeg na start van de behandeling. Verder onderzoek is echter nodig om te bepalen of calprotectine een meerwaarde kan vormen voor opvolging van IBD, en welke cut-off hierbij moet worden gehanteerd.

Er zijn verschillende nieuwe calprotectine testkits beschikbaar met kwalitatieve en praktische voordelen ten opzichte van de oorspronkelijk gebruikte ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Binnen het Imeldaziekenhuis werd om deze reden een studie opgezet ter vergelijking van 8 calprotectine kits.

#### CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO

---

De ziekte van Crohn en colitis ulcerosa zijn inflammatoire aandoeningen van de darm die relatief frequent voorkomen in Westerse gebieden zoals Noord-Europa en de VS. In deze landen bedraagt de prevalentie momenteel 120 tot 200 per 100 000 inwoners voor colitis ulcerosa, en 50 tot 200 per 100 000 voor de ziekte van Crohn. [7] Beide ziektes worden veroorzaakt door inflammatie in de darm, maar de onderliggende pathogenetische mechanismen blijven grotendeels onopgehelderd. De ziekte van Crohn wordt gekenmerkt door discontinue, transmurale inflammatoire letsels van de darmwand, die kunnen voorkomen over het hele gastro-intestinale stelsel, meest frequent ter hoogte van het ileum en colon. Bij colitis ulcerosa gaat het om continue letsels, beperkt tot de darmmucosa en enkel voorkomend in het colon. [39]

Inflammatoire darmziekten beginnen gewoonlijk op jongvolwassen leeftijd en blijven gedurende het hele verdere leven aanwezig. [7] De klinische presentatie bij aanvang van de aandoening varieert van abdominale klachten zoals pijn, diarree en rectaal bloedverlies, tot algemene symptomen zoals koorts, vermagering en vermoeidheid. [1] Veel van deze symptomen kunnen echter ook voorkomen bij tal van andere aandoeningen zoals bijvoorbeeld gastro-intestinale infecties, prikkelbare darmsyndroom, etc. De gouden standaard voor het bevestigen of uitsluiten van een inflammatoire darmziekte is momenteel de ileocoloscopie met histopathologisch onderzoek van biopsies. [2] Gezien het belastende karakter van dit onderzoek en het relatief hoge aantal patiënten waarbij men de ziekte wenst uit te sluiten, is men op zoek naar eenvoudigere en minder invasieve testen, zoals biochemische merkers in plasma of faeces. Zo zou men het aantal overbodige coloscopies kunnen verminderen, wat voordelen zou opleveren qua tijd, kosten en comfort voor de patiënt. Bovendien kennen inflammatoire darmziekten een moeilijk te voorspellen wisselend verloop met opstoten en periodes van remissie. Een Crohn- of colitis ulcerosa-opstoot wordt vaak pas klinisch duidelijk wanneer de inflammatie in de darm reeds vrij ernstig is. [5] Ook hier zou het voordelen kunnen bieden wanneer men, door het bepalen van een merker in plasma of faeces, een opflakking van ziekte-activiteit vroeger zou kunnen detecteren en de behandeling tijdig zou kunnen aanpassen.

Verskillende biochemische merkers in bloed en faeces voor diagnose en opvolging van inflammatoire darmziekten werden de laatste decennia onderzocht.

CRP (C-reactief proteïne) is een acuut fase proteïne dat reeds zeer lang wordt bepaald in plasma als ontstekingsparameter. De resultaten qua sensitiviteit en specificiteit voor IBD zijn variabel in verschillende studies. Niet elke patiënt met een inflammatoire darmziekte vertoont een verhoogd CRP, en dit is vooral het geval bij colitis ulcerosa. [8] Dit laatste kan mogelijks worden verklaard doordat de letsels in de darm zich bij colitis ulcerosa beperken tot de mucosa (in tegenstelling tot de transmurale inflammatie bij de ziekte van Crohn). Bovendien komt een verhoogd CRP in zeer veel andere pathologische condities voor en is de merker dus weinig specifiek. [8]

Sinds een tiental jaar wordt het bepalen in faeces van granulocyt-geassocieerde proteïnen, zoals lactoferrine en calprotectine, bestudeerd als mogelijke test voor inflammatoire darmziekten. De meeste aandacht gaat uit naar calprotectine, een calcium- en zinkbindend proteïne dat 60% uitmaakt van het eiwit in het cytosol van humane neutrofielen [8, 12]. Bij intestinale inflammatie komt dit eiwit in verhoogde mate vrij in de darm. [12] Een gestegen calprotectine concentratie in faeces zou dus kunnen wijzen op aanwezigheid van de ziekte van Crohn of colitis ulcerosa.

Calprotectine kan worden gemeten met een ELISA techniek, door verschillende firma's ter beschikking gesteld. Tevens werden sneltesten ontwikkeld die nuttig zouden kunnen zijn voor laboratoria met een kleiner aantal testaanvragen. Recent bracht de firma Phadia ook een geautomatiseerde Elia fluorescentie immuno-assay voor calprotectine op de markt.

De dienst gastro-enterologie van het AZ Imelda is vragende partij voor het invoeren van de calprotectine test in ons laboratorium. In deze Critical Appraised Topic zal vooreerst door middel van literatuurstudie worden bestudeerd wat momenteel de evidentie is voor het gebruik van de calprotectinebepaling in de diagnostiek en opvolging van inflammatoire darmziekten. Verder zullen verschillende commerciële systemen voor het bepalen van calprotectine worden uitgetest met klinische stalen van patiënten uit ons ziekenhuis. Aan de hand hiervan zal worden besloten welke test in ons laboratorium zal worden geïmplementeerd.

## QUESTION(S)

---

- 1) *Is calprotectine een goede test voor diagnose van inflammatoire darmziekten?*
- 2) *Is calprotectine een goede test voor monitoring van ziekte-activiteit bij inflammatoire darmziekten?*
- 3) *Wat is voor ons laboratorium de meest geschikte testkit voor bepaling van calprotectine? Praktische vergelijking van 8 testen.*

## SEARCH TERMS

---

- 1) *MeSH Database (PubMed): MeSH terms: "Leukocyte LI Antigen Complex", "Inflammatory Bowel Disease", "Point-of-care Systems"*
- 2) *UpToDate Online version 19.3 (2012): "Inflammatory Bowel Disease"*

## RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

---

### 1) *Guidelines and Recommendations*

[1] Bernstein CN, Fried M, Krabshuis JH et al. World Gastroenterology Organization practice guidelines for the diagnosis and management of IBD in 2010. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 16: 112-124.

[2] IBD Working Group of the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. Inflammatory Bowel Disease in Children and Adolescents: Recommendations for Diagnosis – The Porto Criteria. *J Ped Gastroenterol and Nutr* 2005; 41: 1-7.

### 2) *Systematic Reviews and Meta-analyses*

[3] Van Roon AC. Diagnostic precision of fecal calprotectin for IBD and colorectal malignancy. *Am J Gastroenterol* 2007;102: 803-813

[4] Gisbert JP, McNicholl AG. Questions and answers on the role of faecal calprotectin as a biological marker in inflammatory bowel disease. *Dig Liver Dis* 2009; 41: 56-66

[5] Van Rheenen PF, Van de Vijfer E, Fidler V. Faecal calprotectin for screening of patients with suspected inflammatory bowel disease: diagnostic meta-analysis. *BMJ* 2010; 341: c3369. Doi: 10.1136/bmj.c3369

[6] Mao R, Ying-lian X, Gao X et al. Fecal calprotectin in predicting relapse of inflammatory bowel diseases: a meta-analysis of prospective studies. *Inflamm Bowel Dis* 2012; Doi: 10.1002/ibd.2286

### 3) *Reviews*

[7] Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik Ph, Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterol* 2011; 140: 1785-1794.

[8] Dubinsky MC. Serologic and laboratory markers in prediction of the disease course in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 2604-2608.

[9] NHS Value of calprotectin in screening out irritable bowel syndrome. Evidence Review. January 2010.

[10] Lewis JD. The utility of biomarkers in the diagnosis and therapy of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2011; 140: 1817-1826.

[11] Konikoff MR, Denson LA. Role of faecal calprotectin as a biomarker of intestinal inflammation in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 524-534.

### 4) *Original articles*

[12] Roseth AG, Fagerhol MK, Aadland E, Schjonsby H. Assessment of the neutrophil dominating protein calprotectin in faeces. A methodologic study. *Scand J Gastroenterol* 1992; 27: 793-798.

[13] Dolwani S, Metzner M, Wassell J, Yong a, Hawthorne AB. Diagnostic accuracy of faecal calprotectin estimation in prediction of abnormal small bowel radiology. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20: 615-621.

- [14] Poullis A. Bowel inflammation as measured by fecal calprotectin: a link between lifestyle factors and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers and Prev* 2004; 13: 279-284.
- [15] Husebye E, Ton H, John B. Biological variability of fecal calprotectin in patients referred for colonoscopy without colonic inflammation or neoplasm. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 2683-2687.
- [16] Tibble JA, Sigthorsson G, Foster R, Scott D et al. High prevalence of NSAID enteropathy was shown by a simple faecal test. *Gut* 1999; 45: 362-366.
- [17] Poullis A, Foster R, Mendall MA. Proton pump inhibitors are associated with elevation of faecal calprotectin and may affect specificity. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15: 573-574
- [18] Malickova K. Calprotectin levels in patients with idiopathic inflammatory bowel disease, comparison of two commercial tests. *Mikrobiologie Immunologie* 2008; 14: 32-39.
- [19] Carroccio A, Iacono G, Cotton M et al. Diagnostic accuracy of fecal calprotectin assay in distinguishing organic causes of chronic diarrhea from irritable bowel syndrome: a prospective study in adults and children. *Clin Chem* 2003; 46: 861-867.
- [20] D'Inca R, Dal Pont E, Di Leo V et al. Calprotectin and lactoferrin in the assessment of intestinal inflammation and organic disease. *Intern J of Colorect Dis* 2007; 22: 429-437.
- [21] Schröder O, Naumann M, Shastri Y, Povse N & Stein J. Prospective evaluation of faecal neutrophil-derived proteins in identifying intestinal inflammation: combination of parameters does not improve diagnostic accuracy of calprotectin. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 26: 1035-1042
- [22] Wassell J, Wallage M, Brewer E. Evaluation of the Quantum Blue rapid test for faecal calprotectin *Ann Clin Biochem* 2011; 1-4
- [23] Sipponen T, Savilahti E, Kolho KL 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; 14: 40-46.
- [24] Hanai H, Takeuchi K, Iida T et al. Relationship between fecal calprotectin, intestinal inflammation and peripheral blood neutrophils in patients with active ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 1438-1443.
- [25] Sipponen T, Karkkainen P, Savilahti E et al. Correlation of faecal calprotectin and lactoferrin with an endoscopic score for Crohn's disease and histological findings. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 28: 1221-1229.
- [26] Fagerberg UL, Lööf L, Lindholm J, Hansson LO, Finkel Y. Fecal calprotectin: a quantitative marker of colonic inflammation in children with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007; 45: 414-420
- [27] Roseth AG, Aadland E, Jahnsen J et al. Assessment of disease activity in ulcerative colitis by fecal calprotectin, a novel granulocyte marker protein. *Digestion* 1997; 58: 176-180.
- [28] Jones J, Loftus EV, Pannaccione R et al. Relationships between disease activity and serum and fecal biomarkers in patients with Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008; 6: 1218-1224.
- [29] Sipponen T, Savilanti E, Karkkainen P et al. Fecal calprotectin, lactoferrin and endoscopic disease activity in monitoring anti-TNF-alfa therapy for Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 1392-1398.
- [30] Schoepfer AM, Beglinger C, Straumann A et al. Ulcerative colitis: correlation of the Rachmilewitz endoscopic activity index with fecal calprotectin, clinical utility, C-reactive protein, and blood leukocytes. *Inflamm Bowel Dis* 2009; 15: 1851-1858.
- [31] Schoepfer AM, Beglinger C, Straumann A 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; 105: 162-169.
- [32] De Vos M, Dewit G, D'Hane G et al. Fast and sharp decrease in calprotectin predicts remission by infliximab in anti-TNF naïve patients with ulcerative colitis. *J Crohns Colitis* 2011; doi 10.1016/j.crohns

[33] Roseth AG, Aadland E, Grzyb K. Normalization of faecal calprotectin: a predictor of mucosal healing in patients with inflammatory bowel disease. *Scand Journ Gastroenterol* 2004; 39:1017-20

[34] Sipponen T, Björkesten CF, Färkkilä M, Nuutinen H, Savilahti E, Kolho KL. Faecal calprotectin and lactoferrin are reliable surrogate markers of endoscopic response during Crohn's disease treatment. *Scand J Gastroenterol* 2010; 45: 325-31.

[35] Björkesten CF, Nieminen U, Turunen U, Arkkila P, Sipponen T, Färkkilä M. Surrogate markers and clinical indices, alone or combined, as indicators for endoscopic remission in anti-TNF-treated luminal Crohn's disease.

[36] Bremner A, Roked S, Robinson R, Phillips I, Beattie M. Faecal calprotectin in children with chronic gastrointestinal symptoms. *Acta Paediatr* 2005; 94: 1855-1858.

[37] Dolwani S, Metzner M, Wassell JJ, Yong A, Hawthorne AB. Diagnostic accuracy of faecal calprotectin estimation in prediction of abnormal small bowel radiology. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20: 615-621.

[38] Dolci A, Panteghini M. Comparative study of a new quantitative rapid test with an established ELISA method for faecal calprotectin. *Clin Chim Acta* 2011, doi: 10.1016/j.cca.2011.09.030

5) *Reference Works, Handbooks and Databases*

[39] UpToDate Online version 19.3 (2012). Definition of and risk factors for inflammatory bowel disease.

6) *Posters, "grey literature", presentations*

[40] Claeys L, Moortgat L, Baert F, Vanpoucke H. Faecal calprotectin: Validation of a laboratory marker for intestinal inflammation. 2009

## APPRAISAL

---

### I. Is calprotectine een goede test voor diagnose van inflammatoire darmziekten?

#### A. Analytische performantie

##### A.1. Pre-analytisch:

##### a) *Stabiliteit en bewaarcondities:*

Calprotectine is stabiel gedurende 7 dagen op kamertemperatuur. [12] Dit maakt het mogelijk om de patiënt thuis het staal te laten collecteren en laat eventuele vertraging in transport toe. Na extraheren kan het extract diepgevroren worden bewaard. Men zou het faecesstaal zelf ook kunnen invriezen en pas later de extractie uitvoeren (na ontdooien). De firma Calpro maakt in de bijsluiter van hun kit echter melding van hogere waarden in deze stalen, door het vrijkomen van calprotectine uit de neutrofielen bij invriezen, hoewel wij hierover geen literatuurgegevens teruggevonden hebben.

##### b) *Distributie van calprotectine in faeces:*

In een studie van Roseth et al. werd onderzocht of calprotectine homogeen verdeeld is over de faeces. Men bepaalde hiervoor de calprotectineconcentratie in 3 willekeurige kleine aliquots (5g) van elk faecesstaal (n = 48), en vergeleek deze met de concentratie die men bekam na homogeniseren van de volledige stoelgang. De correlatiecoëfficiënt varieerde tussen 0.90 en 0.95 [12] In een andere studie vond men geen significante verschillen in calprotectinewaarde wanneer men metingen deed op materiaal

afkomstig van 10 verschillende plaatsen in hetzelfde faecesstaal [13]. We kunnen dus willekeurig een kleine hoeveelheid stoelgang nemen om calprotectine op te bepalen en hoeven de faeces niet eerst te homogeniseren.

c) *Faecale matrix:*

De consistentie van de faeces heeft mogelijks een effect op de test. We kunnen aannemen dat in vloeibare faeces calprotectine meer verdund zal zijn en dus een lagere concentratie zal hebben. In een studie van Poullis bij een random populatie (zonder IBD) tussen 50 en 70 jaar werd gezien dat calprotectine in harde stoelgang significant hoger was dan bij zachte of vloeibare stoelgang, al bleef de gemiddelde concentratie onder de 50 µg/g. [14]

Men dient resultaten van vloeibare stalen dus met voorzichtigheid te interpreteren en hierbij vooral bedacht te zijn op vals negatieve resultaten.

d) *Normale range en biologische variabiliteit:*

Bij studies die faecaal calprotectine bij gezonde vrijwilligers zijn nagegaan, was de mediane concentratie gelijkaardig bij volwassenen en kinderen, namelijk tussen 9,3 en 58 µg/g bij volwassenen en tussen 11 en 49 µg/g bij kinderen. [9] De range rond deze medianen was in sommige studies echter vrij groot. [tabel 1] Zeer jonge baby's zouden een veel hoger calprotectine in faeces vertonen (150 – 278 µg/g), maar dit is een populatie waarin er momenteel geen indicaties zijn om de test uit te voeren. [9]

Tabel 1: Concentratie calprotectin in faeces bij gezonde personen [9]

No. of studies	No. of healthy controls	Age	Medians (µg/g)	Limits of ranges (µg/g)
14	9-320	Adults	9.3-58	4-897
7	15-77	Children	11-49	6-176
6	11-69	Infants (1-12 weeks)	150-278	22-2880

Over de intra-individuele variabiliteit zijn enkele kleine studies terug te vinden. Bij Poullis et al. werd bij 22 random personen zonder IBD een tweede staal gevraagd na 10 tot 14 dagen. De correlatie met de calprotectinewaarde in het eerste staal was hierbij zeer goed ( $R = 0.98$ ). [14] Huseby et al. onderzochten de dag-tot-dag variabiliteit bij 14 personen die wel darmklachten hadden maar geen intestinale inflammatie of maligniteit op coloscopie. Een subgroep van de patiënten (36%) had stabiele lage calprotectineconcentraties die steeds onder de cut-off van 50 µg/g bleven. 64% vertoonde echter labiele concentraties met een gemiddelde waarde hoger dan 70 µg/g (dus boven de cut-off van 50 µg/g) en een grote standaarddeviatie van 52 µg/g (coëfficiënt of variation (CV) 74%). [15]

e) *Interferentie:*

Medicatie en dieet:

Er zijn geen dieet restricties noodzakelijk alvorens staalcollectie.

Inname van bepaalde medicatie kan interfereren met de test. Zo werden vals positieve calprotectine-waardes gerapporteerd bij patiënten die niet-steroïdale anti-inflammatoire medicatie (NSAID's) innamen.

[36, 37] Een verhoogd calprotectine bij deze patiënten was in een studie van Tibble [16] echter hoofdzakelijk gecorreleerd met de aanwezigheid van door NSAID's veroorzaakte enteropathie. Het betreft dus waarschijnlijk geen pure interferentie van de medicatie met de test, maar eerder het induceren van inflammatie in de darm met een verhoogd faecaal calprotectine tot gevolg.

Tevens werd in 1 studie melding gemaakt van significant verhoogde calprotectine waardes bij patiënten die protonpompinhibitoren (PPI's) innamen (gemiddeld 78.16 µg/g vs 30.9µg/g,  $p < 0.0001$ ). Bij de personen zonder PPI-inname was er geen correlatie tussen calprotectine en het voorkomen van dyspepsie-symptomen, zodat de auteurs concludeerden dat het effect waarschijnlijk inderdaad toe te schrijven is aan het medicatie-gebruik en niet aan de aanwezigheid van gastro-intestinale pathologie. [17]

Bloedverlies:

Aangezien calprotectine als inflammatoir eiwit ook kan voorkomen in plasma, kan bloedverlies theoretisch gezien een verhoogd calprotectine in faeces veroorzaken. Zo schatte men dat een bloedverlies van 50-100 ml per dag calprotectine concentraties in faeces van 25-30 µg/g zou kunnen veroorzaken, en dat voor een stijging tot 175 µg/g een bloedverlies van 300 ml/dag zou nodig zijn. [9] Er zijn geen studies die dit mogelijke effect van gastro-intestinaal bloedverlies op de bepaling van faecaal calprotectine in de praktijk hebben bestudeerd. Meerdere auteurs hebben patiënten met bloedverlies niet geëxcludeerd, en hun resultaten wat betreft diagnostische performantie waren niet verschillend van studies waarbij dit wel gebeurde. [5]

Verder is rectaal bloedverlies in de eerste plaats een alarmsymptoom waarbij sowieso een coloscopie dient te worden uitgevoerd ter uitsluiting van een maligniteit. [39] In deze gevallen is het dan ook niet aangewezen om eerst faecaal calprotectine te bepalen alvorens te beslissen tot coloscopie.

### Conclusie

Calprotectine heeft een goede stabiliteit bij kamertemperatuur, wat bewaring en transport vergemakkelijkt. Slechts een kleine hoeveelheid materiaal is nodig, en het al dan niet homogeniseren van de faeces vóór het aliquoteren heeft geen invloed op de testperformantie. Inname van NSAID of protonpompinhibitoren en aanwezigheid van bloed in faeces kunnen vals positieve resultaten geven, terwijl waterige faeces een oorzaak kan zijn van vals negatieve resultaten.

### **A.2. Analytisch:**

In alle grote studies die tot nu toe zijn verschenen in verband met calprotectine, werd de analyse uitgevoerd met een ELISA-test. Gezien ELISA een vrij arbeidsintensieve procedure is en men de stalen in batch dient te analyseren, werden door een aantal firma's sneltesten voor calprotectine op de markt gebracht, gebaseerd op het principe van immunochromatografie. Recent ontwikkelde de firma Phadia een Elia testkit voor calprotectine, die kan gerund worden op hun toestel Immunocap. Wanneer we in ons ziekenhuis calprotectinebepaling zouden aanbieden, moeten we dus een keuze maken uit deze verschillende testkits, die hieronder worden besproken. In bijlage 4 staan de verschillende kits opgelijst met hun analytische kenmerken. In bijlage 1 en 2 wordt per kit een overzicht gegeven van respectievelijk de tijdsduur en de kostprijs van de analyse.

## ELISA

De ELISA's waren de eerste tests die beschikbaar waren om calprotectine te meten. Hierdoor zijn vrijwel alle literatuurgegevens die we ter beschikking hebben over de performantie van calprotectine, verkregen door middel van een ELISA methode, meestal Calprest (in de USA verkrijgbaar als PhiCal).

De Enzyme Linked Immunosorbent Assay is een immunologisch test waarbij wells gecoat worden met antistoffen ('capture antibody') tegen de te meten stof. Na incubatie met het staal en wegwassen van de overmaat antigen, wordt een tweede enzyme-gemerkte antistof toegevoegd ('detection antibody') die gaat binden op de antigen-antistof complexen. Na toevoeging van een substraat wordt door middel van een fotometer de vorming van het gekleurd eindproduct gemeten, wat correleert met de enzyme-activiteit en dus concentratie van de te meten parameter. Bij elke run dienen calibratoren en interne kwaliteitscontroles meegenomen te worden.

Voor alle kits dient vooraf een extractieprocedure te worden uitgevoerd. Vroeger diende hiervoor faeces te worden afgewogen waarna een extractiebuffer wordt toegevoegd. Momenteel bieden alle firma's een extractiedevice aan waarbij dit afwegen niet meer nodig is. In de bijsluiters van de Calprolab wordt vermeld dat de extractie op zichzelf een imprecisie van 8.7% vertoont. Verder zijn hierover noch in de andere bijsluiters, noch in de literatuur gegevens beschikbaar.

De 4 kits die in deze CAT worden besproken, volgen allen bovenstaand werkingsprincipe maar verschillen in de gebruikte antistoffen. Calprest en Calpro maken voor zowel 'capture' als 'detection' antibody gebruik van polyclonale antistoffen, terwijl bij Bühlmann en Calprolab als 'capture antibody' monoclonale antistoffen worden gebruikt. Monoclonale antistoffen worden op gecontroleerde wijze geproduceerd door een kloon cellen en bieden theoretisch gezien het voordeel specifiek te binden aan het gewenste molecuul.

Verder verschillen de kits qua meetbereik. Een hoger meetbereik is vooral interessant voor follow-up van gekende IBD-patiënten, waarbij een kwantitatieve bepaling ook bij hogere waardes wenselijk is. De intra-run precisie is goed (<10%) en is vergelijkbaar bij de verschillende testkits. De in de bijsluiters aangeraden dublobepalingen zijn dus mogelijks overbodig, wat kostenbesparend zou zijn. De inter-run precisie is bij alle kits lager dan 15%. We moeten hierbij wel de bemerking maken dat deze resultaten vooral afkomstig zijn uit de bijsluiters van de firma. In de literatuur is in weinig studies informatie over de analytische performantie terug te vinden. Enkel voor de Bühlmann en Eurospital kit zijn literatuurgegevens beschikbaar over de precisie. De resultaten zijn vergelijkbaar met de gegevens van de firma, waaruit we kunnen besluiten dat de testen robuust zijn. [14, 18, 19, 20, 47, bijlage 1]

Een groot nadeel van ELISA is het feit dat de procedure arbeidsintensief en tijdsrovend is. [bijlage 1] Er is in ons labo geen toestel beschikbaar waarmee we de test volledige automatisch kunnen uitvoeren. De stalen dienen best in batch te worden geanalyseerd, zeker gezien bij elke run 8 calibratoren en controles dienen te worden meegenomen. Voor een centrum met een relatief beperkt aantal testaanvragen zou dit leiden tot een lange turn-around-time.

ELISA is dus een kwantitatieve techniek met goede precisie, een groot tot zeer groot meetbereik



(afhankelijk van de kit) en uitgebreide literatuurgegevens. Praktisch gezien is het echter een omslachtige en tijdsroevende test die minder geschikt is voor kleinere aantallen testaanvragen.

### Immunochromatografie

Vanwege de bovenvermelde nadelen van ELISA, werden door een aantal firma's sneltesten ontwikkeld. Deze zijn gebaseerd op immunochromatografie. In de 'sampling pad' zijn gemerkte antistoffen aanwezig, die bij aanbrengen van het staal binden op het aanwezige calprotectine. Na migratie door de teststrip binden de calprotectine – antistof complexen op een 2<sup>e</sup> antistof ter hoogte van de testlijn. De overmaat gemerkte antistof migreert verder en bindt ter hoogte van de controlelijn aan een anti-muizen-IgG antistof. De testlijn wordt ofwel visueel afgelezen (Certest sneltest) ofwel door een Quantum Blue Reader die aan de hand van een dip in reflectie ter hoogte van de testlijn een kwantitatief resultaat genereert (Bühlmann en Eurospital). Het verschijnen van een lijn ter hoogte van de controlelijn fungeert als kwaliteitscontrole op het correct verlopen van de test.

Vooraf dient ook voor deze testen een extractie te gebeuren zoals bij de ELISA.

De uitvoering van de test is eenvoudig en snel (resultaat mogelijk binnen de 30 min). Er kan staal per staal worden gewerkt zodat de turn-around-time beperkt wordt en de testen geschikt zijn voor kleine centra met een beperkt aantal testaanvragen.

De sneltesten hebben echter wel een minder goede precisie dan de ELISA (intra-run CV tot 25%). Het meetbereik is over het algemeen lager zodat er vaker moet worden verdund. Verder geeft de Certest met visuele aflezing vooreerst slechts een semi-kwantitatief resultaat (<50 µg/g, 50-200 µg/g of >200µg/g), wat vooral voor follow-up niet ideaal is. Daarnaast is de aflezing ook vrij subjectief, wat het resultaat analist-afhankelijk maakt.

Bovendien is er voorlopig slechts beperkte literatuur rond deze testen. Twee kleine studies (n = 47-67) die de Bühlmann Quantum Blue vergeleken met een ELISA kit, bekwamen correlatiecoëfficiënten van 0.85 [38] en 0.56 [22]. De diagnostische overeenkomst tussen beide testen bedroeg in beide studies ongeveer 90%.

Deze testen zijn dus sneller en gemakkelijker uit te voeren, maar het is nog onvoldoende aangetoond dat zij goed correleren met de ELISA-testen en/of een even goede performantie hebben.

### Elia

De Elia test voor calprotectine is zeer recent op de markt gebracht door de firma Phadia. Net zoals bij de ELISA, wordt bij deze test het te meten antigen gebonden aan met monoclonale antistoffen gecoatete wells, waarna een tweede enzym-gemerkte antistof wordt toegevoegd. Na incubatie met het substraat, ontstaat een fluorescent eindproduct. Aan de hand van meting van de fluorescentie wordt zo de concentratie antigen bepaald. De extractie verloopt op dezelfde wijze als bij de ELISA.

Deze test biedt qua analytische kenmerken dezelfde voordelen als de ELISA (kwantitatief, precies, zeer hoog meetbereik, controlemateriaal beschikbaar).

Een belangrijk bijkomend voordeel is de volledige automatisatie op een toestel (Immunocap) dat reeds in ons labo aanwezig is, en waar we goede ervaringen mee hebben.

Deze testkit is echter volledig nieuw en wordt momenteel nog in geen enkel laboratorium in routine gebruik. Er is dus nog weinig ervaring met de test. Bovendien betekent dit dat er geen literatuur beschikbaar is over de performantie. De test kan dus pas geïmplementeerd worden na uitgebreide klinische validatie of indien goede correlatie wordt gevonden met de ELISA-kit.

**Conclusie:**

De oorspronkelijke ELISA-testkits zijn robuust en ruim uitgetest in vele studies. De procedure is echter tijdsrovend en omslachtig en vooral geschikt voor het analyseren van grote aantallen stalen in batch. De nieuwe sneltesten op basis van immunochromatografie en de Elia testkit hebben deze laatste nadelen niet. Of deze testen een even goede performantie hebben als de oorspronkelijke ELISA, moet echter nog worden aangetoond.

**B. Diagnostische performantie**

Gezien in individuele studies betreffende de diagnostische waarde van calprotectine een relatief beperkt aantal patiënten werd geïncludeerd, bespreken we hier de tot nu toe verschenen meta-analyses. Er zijn tot op heden 3 meta-analyses gepubliceerd die de diagnostische waarde van calprotectine voor IBD hebben geëvalueerd. Een overzicht wordt weergegeven in tabel 2. Zie bijlage 3 voor statistische definities.

*Tabel 2 : Diagnostische performantie van calprotectine : samenvatting van gepubliceerde meta-analyses*

Ref.	Aantal studies	Leeftijdsgroep	Aantal patiënten	Patiënten groep	Sens.	Spec.	PPV	NPV	LR +	LR-
[3]	30	Volwassenen +Kinderen	5983	IBD/IBS of vrijwilligers	95	91	/	/	/	/
[4]	16	Volwassenen +Kinderen	754	IBD/IBS	80	76	/	/	/	/
[4]	14	Volwassenen +Kinderen	2475	organisch/functioneel	83	84	/	/	/	/
[5]	6	Volwassenen	670	IBD/no IBD	93	96	91	97	20	0,05
[5]	7	Kinderen	371	IBD/noIBD	92	76	86	85	5	0,1

De eerste meta-analyse van von Roon et al. [3], includeerde alle studies (n=30) gepubliceerd tot 2006, en bekam hierbij een sensitiviteit en specificiteit van respectievelijk 95 % (95 % CI 93-97 %) en 91 % (95 % CI 86-91 %). Er werden echter studies geïncludeerd (n=23) waarbij de controle populatie enkel bestond uit gezonde vrijwilligers. Door dergelijke resultaten, met gekend zieken aan de ene kant van het spectrum en gezonde personen aan de andere kant, kan de diagnostische performantie worden overschat. Bovendien werden de resultaten van kinderen en volwassenen samen genomen en verschilden de studies onderling significant. [3]

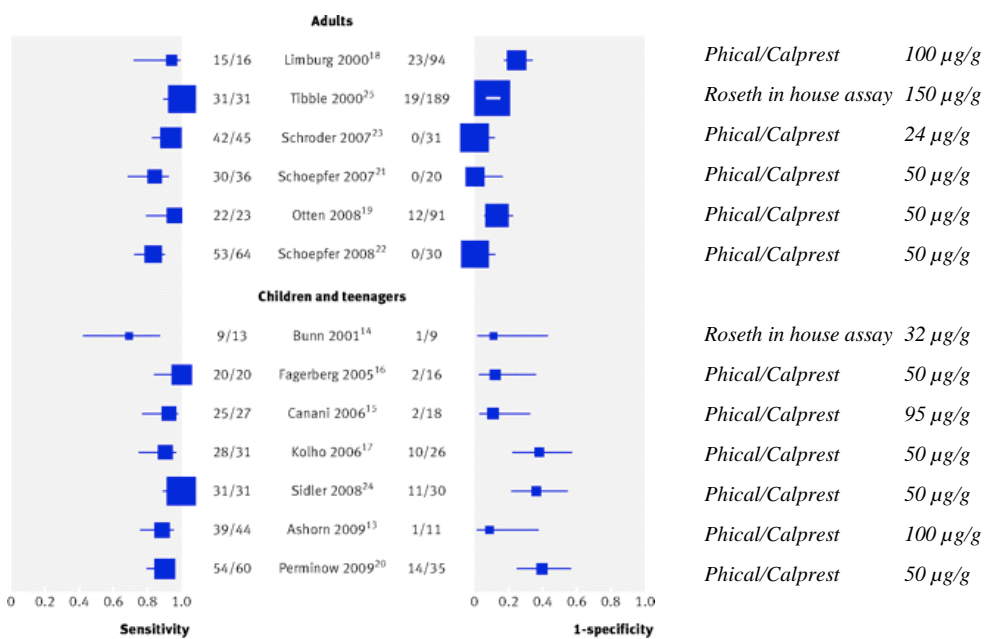
Een tweede meta-analyse van Gisbert et al. [4] verdeelde de studies in twee groepen: enerzijds studies die gingen over IBD versus IBS, anderzijds studies die zicht richtten op functionele versus organische darmaandoeningen. In de eerste groep (IBD/IBS) werd een totaal van 754 patiënten uit 16 studies verzameld, waaruit een sensitiviteit en specificiteit van respectievelijk 80 (95 % CI 77-82%) en 76 % (95

% CI 72-79 %) werd bekomen. In de tweede groep (organisch/functioneel) werden een totaal van 2475 patiënten uit 14 studies gegroepeerd en dit resulteerde in een sensitiviteit en specificiteit van respectievelijk 83 (95 % CI : 81-84 %) en 84 % (95 % CI : 82-85%). Ook in deze meta-analyse werden in beide groepen data van volwassenen en kinderen samen genomen. [4]

De meest recente meta-analyse van van Rheenen et al. [5] includeerde enkel data van publicaties waarbij calprotectine prospectief werd bepaald in patiënten klinisch verdacht voor IBD. Op basis van endoscopie met histopathologische verificatie als gouden standaard, werden de sensitiviteit, specificiteit, predictieve waarden en likelihood ratios bepaald. Deze meta-analyse omvatte 13 studies, waarvan 6 bij volwassenen (in totaal 670 patiënten) en 7 bij kinderen en tieners (in totaal 371 patiënten).

Bij de volwassenen bedroegen de gepoolde sensitiviteit en specificiteit respectievelijk 93 % (95 % CI : 85-97 %) en 96 %, (95 % CI 79-99 %). Bij kinderen bekwam men een vergelijkbare sensitiviteit van 92 % (95 % CI : 84-96 %) en een beduidend minder goede specificiteit van 76% (95 % CI : 62-86 %). In figuur 1 is een Forest plot van de individuele studies weergegeven, met aanduiding van de gebruikte ELISA-test en cut-off waarde.

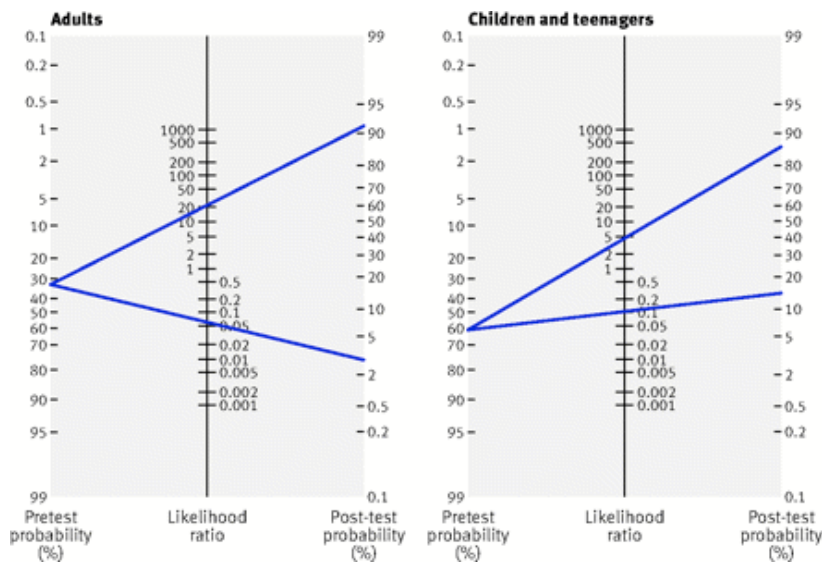
Figuur 1: Forest plots van sensitiviteit en 1-specificiteit van calprotectine in het onderscheiden van IBD van non-IBD [5]



Op basis van de gepoolde sensitiviteit en specificiteit werd de gemiddelde negatieve en positieve likelihood ratio berekend voor volwassenen en kinderen. De positieve en negatieve likelihood ratio bij volwassenen bedroegen respectievelijk 20 en 0.05, terwijl in kinderen deze beperkt waren tot respectievelijk 5 en 0.1. Waarschijnlijk zijn de likelihood ratios in kinderen lager doordat in deze leeftijdsgroep IBS slechts zeer zelden voorkomt terwijl calprotectine net deze pathologie zeer goed kan onderscheiden van IBD .

De auteurs stelden een Fagan plot op (figuur 2), waarbij de predictieve waarden kunnen afgelezen worden naargelang de verwachte prevalentie, dit in de veronderstelling dat de likelihood ratios niet wijzigen. Met een pretest probabilliteit van IBD bij volwassenen van 32 %, een cijfer dat men kan verwachten op een gastro-enterologie afdeling bedroegen de positieve (PPV) en negatieve (NPV) predictieve waarde respectievelijk 91% en 97%. Bij kinderen waren PPV en NPV lager, namelijk respectievelijk 86% en 85%, en dit bij een pretest probabilliteit van 60%.

Figuur 2: Fagan plot: weergave van de post-test probabiteit na een postieve calprotectinetest (bovenste lijn) en een negatieve calprotectinetest (onderste lijn) [5]



De PPV bedraagt 91%, wat betekent dat 9% van de positieveresultaten 'vals positief zijn'. In het artikel van van Rheenen wordt een overzicht gegeven van mogelijke oorzaken van een dergelijk vals verhoogd calprotectine, die in de literatuur werden gerapporteerd. (tabel 3) Tal van aandoeningen die gepaard gaan met intestinale inflammatie kunnen, niet onverwacht, een verhoogd calprotectine tot gevolg hebben. Ook maligniteiten en de inname van bepaalde medicatie (zie 'I.A.e. Interferentie') kunnen een positief resultaat geven.

Tabel 3 : Andere oorzaken van positief calprotectine dan IBD [5]

Infecties:	Andere gastrointestinale aandoeningen:	Medicatie:
<ul style="list-style-type: none"> <li>Giardia lamblia</li> <li>Bacteriële dysenterie</li> <li>Virale gastroenteritis</li> <li>Helicobacter pylori gastritis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Gastroesophagale reflux</li> <li>Mucoviscidose</li> <li>Coeliakie</li> <li>Diverticulitis</li> <li>Protein-lossing enteropathie</li> <li>Colorectaal adenoom</li> <li>Juvenile polyposis</li> <li>Autoimmuun enteropathie</li> <li>Microscopische colitis</li> <li>Levercirrose</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>NSAID</li> <li>Proton pomp inhibitoren</li> <li>Voedselallergie</li> </ul>
<p>Maligniteiten:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Colorectaal carcinoom</li> <li>Maagcancinoom</li> <li>Intestinaal lymfoom</li> </ul>		

Meerdere auteurs hebben calprotectine vergeleken met andere inflammatoire merkers. Een overzicht wordt weergegeven in een evidence review van de NHS uit 2010. [9] Bij vergelijking met merkers in het plasma (CRP, ESR, ASCA, p-ANCA) vertoonde calprotectine steeds een beduidend betere performantie voor het identificeren van patiënten met IBD. Tevens hebben sommige studies calprotectine vergeleken met de faecale concentratie van andere 'neutrophil-derived-proteins', zoals lactoferrine, PMN-elastase, myeloperoxidase, enz. Calprotectine scoorde ook hier het beste, al had bij bepaalde auteurs lactoferrine of PNM-elastase een gelijkaardige performantie. [9]

In een studie van Schröder uit 2007 werd onderzocht of de combinatie van calprotectine met andere faecale merkers (lactoferrine en PMN-elastase) een bijkomende winst in performantie zou opleveren ten op zichte van calprotectine alleen. Dit was echter niet het geval: calprotectine bleek van de drie de

beste performantie te hebben en sensitiviteit, specificiteit, NPV en PPV konden niet worden verbeterd door een combinatie met één van de twee andere testen. [21]

Conclusie :

De hoge negatieve en positieve predictieve waarde van respectievelijk 97 en 91 % beschreven in de recente meta-analyse van van Rheenen [5], maken het theoretisch mogelijk om bij volwassen patiënten klinisch verdacht voor IBD, de aandoening accuraat te differentiëren van functioneel darmlijden, en het aantal onnodige doorverwijzingen voor endoscopie zo te beperken. Ondanks de strikte selectiecriteria was er een relatieve heterogeniteit van de gepoolde data en moeten deze met enige voorzichtigheid geïnterpreteerd te worden. Opmerkelijk was ook de grote variatie aan gebruikte cut-off waarden binnen de geïnccludeerde studies, zelfs indien de dezelfde testkit werd gebruikt. Bovendien gelden deze cijfers enkel bij een hoge pre-testprobabiliteit, zodat de implicaties van eventueel gebruik in de eerstelijnszorg nog niet duidelijk zijn.

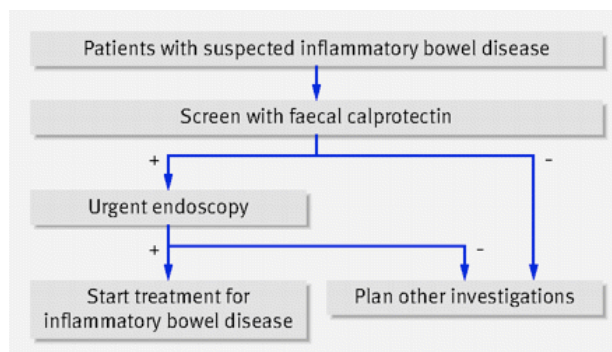
Bij kinderen zijn NPV en PPV beduidend lager en is de diagnostische waarde nog onzeker.

C. Klinisch en organisatorisch impact

In de bovenvermelde meta-analyse van Van Rheenen wordt voorgesteld bij patiënten met vermoeden van IBD eerst te testen voor calprotectine alvorens over te gaan tot coloscopie (figuur 3). [5] Gezien het risico op het missen van andere ernstige pathologie (zoals maligniteiten), dient het gebruik van dit algoritme best te worden beperkt tot patiënten jonger dan 50 jaar zonder volgende alarmsymptomen [39]:

- familiale antecedenten van coloncarcinoom,
- rectaal bloedverlies,
- anemie,
- gewichtsverlies,
- elektrolytenstoornissen
- nachtelijke of progressieve abdominale pijn

*Figuur 3 : Algoritme voor het gebruik van calprotectine voor de diagnostiek van IBD [5]*



In een volwassen populatie met klinisch vermoeden van IBD (met hierin een geschatte prevalentie van 33%) zou men op deze manier 67% minder endoscopies moeten uitvoeren. moeten uitvoeren wanneer men eerst zou testen voor calprotectine, zoals voorgesteld in bovenstaand schema. [5]

Voor deze patiënten zou dus een invasief en onaangenaam onderzoek kunnen worden vermeden. Bovendien betekent een vermindering in het aantal coloscopieën een besparing wat betreft tijd en kosten (zie punt D).

Dit gaat echter wel ten koste van 2% patiënten met IBD die verkeerdelijk geen coloscopie ondergaan vanwege een vals negatief calprotectine, en waarbij de diagnose dus te laat wordt gesteld.

Ook zal 3% nog een coloscopie ondergaan terwijl ze eigenlijk geen IBD hebben (vals positief calprotectine). In dit laatste geval betekent dit echter niet steeds een onnodig endoscopische onderzoek. Bij deze patiënten met verhoogd calprotectine zal immers een aanzienlijk aantal een andere gastro-intestinale aandoening blijken te hebben waarvoor toch een coloscopie nodig was (tabel 3). Deze aandoening speelt vermoedelijk dan ook een rol in de verhoogde calprotectine-waarde.

Voorzichtigheid blijft uiteindelijk toch geboden wanneer men beslist bij patiënten met negatief calprotectine geen endoscopie uit te voeren, gezien men op die manier mogelijks andere belangrijke pathologie (zoals maligniteit) kan missen.

Volgens de huidige richtlijnen worden inflammatoire merkers zoals calprotectine nog niet aangeraden in de routine. De World Gastroenterology Organization beveelt in zijn richtlijnen in 2010 nog steeds een coloscopie met biopsies aan als diagnostische middel bij elke patiënt met vermoeden van IBD. Men vermeldt calprotectine wel als mogelijke hulp bij de diagnose in landen waar coloscopie minder vlot beschikbaar is, en dit vooral omwille van zijn capaciteit om een inflammatoire darmziekte uit te sluiten (en niet als diagnostische test). [1, 2] Ook vermeldt men de mogelijkheid van het gebruik in opvolging van gekende patiënten, waarbij een verhoogd calprotectine een alarmsignaal is voor toegenomen ziekte-activiteit. [1]

#### D. Kosteneffectiviteit

Calprotectine meten in faeces is een dure analyse. In bijlage 2 is een schatting gemaakt van de totale kostprijs bij bepaling met de verschillende testkits. De prijs per test varieert tussen 30 en 50 euro, afhankelijk van de gebruikte methode, en is niet RIZIV-terugbetaald.

Een ileocoloscopie kost volgens geconventioneerd tarief 163,24 euro, waarvan 154,56 euro wordt terugbetaald aan de patiënt.

Wanneer men zoals in punt C. wordt voorgesteld, 67% minder coloscopieën zou moeten uitvoeren, en de calprotectinebepaling ongeveer 40 euro zou kosten, zou de gemiddelde kostprijs per patiënt met vermoeden van IBD verminderen van 163,24 euro naar 93,79 euro, wanneer men eerst calprotectine zou bepalen. Gezien geen terugbetaling voor calprotectine door het Riziv, stijgt de gemiddelde kostprijs voor de patiënt echter van 8,68 naar 42,86 euro. Voor het Riziv volgt dan weer een besparing van 154,56 euro naar 51,00 euro per patiënt.

In vergelijking met een coloscopie zou de test dus een besparing kunnen opleveren, hoewel de patiënt zelf meer zal moeten betalen zolang geen terugbetaling voorzien is.

## 2. Is calprotectine een goede test voor monitoring van ziekte-activiteit bij inflammatoire darmziekten?

### A. Analytische performantie

Voor pre-analytische en analytische factoren verwijzen we naar deel I.A.

### B. Diagnostische performantie

#### **Correlatie met ziekteactiviteit:**

In meerdere studies heeft men bij gekende IBD-patiënten de associatie bestudeerd tussen de calprotectinewaarde in faeces en de aanwezigheid van actieve inflammatoire letsels bij coloscopie. Een overzicht van deze studies en hun resultaten is terug te vinden in tabel 3, gebaseerd op een review van Lewis uit 2011. [10]

Tabel 3: Correlatie met ziekteactiviteits-score en diagnostische performantie voor opsporen van actieve ziekte: overzicht van gepubliceerde studies (naar Lewis 2011 [10]).

Ref.	Populatie	Aantal patiënten	Ziekte-activiteits score	R	Cut-off (µg/g)	Sens	Spec	PPV	NPV
[23]	CD	106 22 ileal	CDEIS	0.73 0.31	200	70%	92%	94%	61%
[20]	CD	31	SES-CD	0.48	80	81%	80%	95%	
[20]	CU	67	Mayo	0.51	80	78%	70%	90%	
[24]	CU	31	Matt's index	0.81					
[25]	CD	21 ileal 66 (ileo)colonic	SES-CD	0.32 0.64					
[26]	CD +UC	39	Saverymuttu	0.52					
[27]	CU	62	Mayo	0.57					
[28]	CD	50 ileal 38 colonic 65 ileocolonic	SES-CD	0.21 0.72 0.45					
[29]	CD	30	CDEIS	0.83					
[30]	CU	134	Rachmilewitz index	0.83	50 100	93% 86%	71% 88%	91% 96%	81% 65%
[13]	CD	140	CDEIS	0.75	70	89%	72%	88%	76%

CD: Crohn's disease, CU: colitis ulcerosa, CDEIS: Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity, SES-CD: Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease

De correlatiecoëfficiënt tussen calprotectine en de ziekteactiviteit op endoscopie (beoordeeld aan de hand van een gestandaardiseerd scoresysteem) varieerde tussen 0.48 en 0.83. Opmerkelijk zijn de resultaten bij ziekte van Crohn met enkel ileale aantasting: in de studies die deze patiëntengroep afzonderlijk analyseerden, vond men slechts een geringe tot zelfs afwezige correlatie tussen calprotectine en de ziekteactiviteit. Sipponen et al toonden overigens aan dat bij patiënten met actieve doch strikt ileale ziekte de gemiddelde calprotectinewaarde veel lager was (180 µg/g) dan bij patiënten met actieve inflammatie van het colon of van colon + ileum. (gemiddelde calprotectine respectievelijk

1383 en 549 µg/g). [23] Mogelijks veroorzaakt louter ileale inflammatie dus onvoldoende stijging van calprotectine in faeces om aan de hand van deze merker accuraat de ziekteactiviteit te kunnen meten.

In een aantal studies berekende men met welke performantie calprotectine actieve ziekte kon detecteren. De sensitiviteit lag tussen 70 en 93%, specificiteit tussen 70 en 92%, PPV tussen 88 en 96% en NPV tussen 61 en 81 %. De variabiliteit in deze resultaten kan deels verklaard worden door de verschillen in cut-off: deze varieerde in de verschillende studies tussen 50 en 200 µg/g faeces. Verder gebruikten de studies diverse scoresystemen en werd 'actieve ziekte' op verschillende manieren gedefinieerd. Bovendien verschillen de studiepopulaties sterk qua samenstelling in leeftijd, therapie, ernst en lokalisatie van de ziekte, etc.

In de review van Lewis worden ook enkele studies vermeld waarin naast calprotectine ook lactoferrine en CRP werd bepaald. CRP, de klassiek gebruikte ontstekingsparameter, vertoonde telkens een duidelijk slechtere correlatie en sensitiviteit/specificiteit dan calprotectine. Voor lactoferrine werden vergelijkbare resultaten bekomen als voor calprotectine. [10]

Conclusie:

Calprotectine correleert matig tot goed met de ernst van de inflammatoire letsels bij endoscopisch onderzoek. Het zou dus gebruikt kunnen worden voor het detecteren van ziekte-activiteit in de opvolging van IBD-patiënten. Ook hier is echter nog geen duidelijkheid over de geschikte cut-off. Mogelijks spelen - behalve de ernst van de inflammatie - nog andere factoren een rol, zoals reeds aangetoond voor lokalisatie van de letsels bij de ziekte van Crohn. Grotere studies met analyse van verschillende subgroepen zouden hier meer duidelijkheid in kunnen brengen.

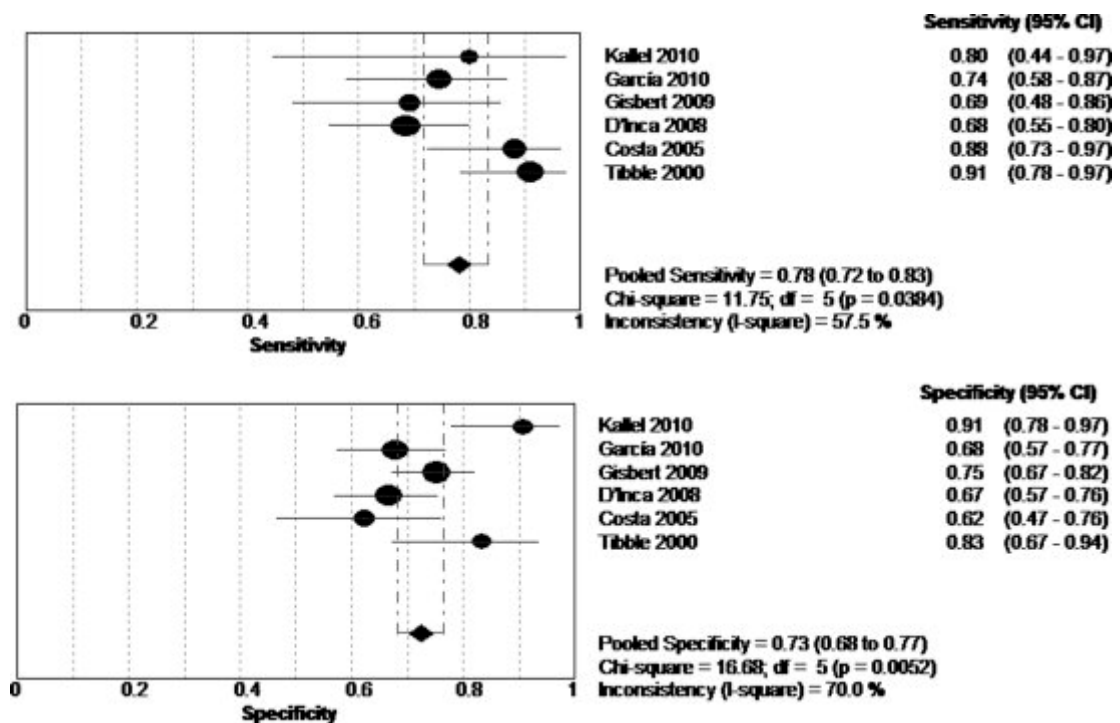
**Voorspellen van een opstoot:**

Gezien het beperkt aantal geïncludeerde patiënten in de individuele studies werd ook voor dit item beroep gedaan op een recent verschenen meta-analyse. Deze werd in 2012 gepubliceerd door Mao et al. [6], en omvat 6 prospectieve studies bij volwassenen. In alle studies werd calprotectine gemeten bij patiënten met gekende IBD, waarna de patiënten gedurende 1 jaar werden opgevolgd. Eén studie includeerde enkel patiënten met ziekte van Crohn, terwijl bij de andere 5 studies alle IBD-patiënten (zowel ziekte van Crohn als colitis ulcerosa) werden geïncludeerd. In totaal omvatte de meta-analyse 672 patiënten, 318 met colitis ulcerosa en 354 met ziekte van Crohn. In alle studies werd de Calprest/Phical test gebruikt, behalve bij Roseth et al., die gebruik maakten van een in-house ELISA-methode. De diagnose van relapse werd gesteld op basis van klinische criteria.

De Forest plots met de gepoolde sensitiviteit en specificiteit worden weergegeven in figuur 4. In tabel 4 wordt een overzicht gegeven van de gepoolde performantie resultaten voor de verschillende patiëntengroepen.



Figuur 4 : Forest plots van de gepoolde sensitiviteit en specificiteit van calprotectine voor het voorspellen van relapse in IBD patiënten [6]



Tabel 4 : gepoolde data omtrent de diagnostische performantie van calprotectine in het voorspellen van IBD-relapse [6]

	IBD	UC	CD	CD involving colon *
<b>Sensitiviteit (95% CI)</b>	0.78 (0.72-0.83)	0.77 (0.67-0.85)	0.75 (0.64-0.84)	0.76 (0.59-0.88)
<b>Specificiteit (95% CI)</b>	0.73 (0.68-0.77)	0.71 (0.64-0.77)	0.71 (0.64-0.76)	0.77 (0.69-0.83)
<b>LR+ (95% CI)</b>	2.81 (2.09-3.78)	2.47 (1.92-3.19)	2.37 (1.56-3.61)	3.26 (1.78-5.95)
<b>LR- (95% CI)</b>	0.31 (0.2-0.47)	0.36 (0.24-0.54)	0.41 (0.27-0.61)	0.34 (0.19-0.60)

UC: ulcerative colitis, CD: Crohn's disease, \* : colonic/ileocolonic disease

De gepoolde sensitiviteit en specificiteit voor de totale patiëntengroep waren respectievelijk 0.78 en 0.73, met een positieve en negatieve likelihood ratio van respectievelijk 2.8 en 0.31. Dit laatste betekent dat een patiënt die een opstoot zal doormaken 2.8 maal meer kans heeft op een verhoogd calprotectine en 3.2 (1/0.31) maal minder kans op een laag calprotectine in vergelijking met een patiënt die in remissie zal blijven. Deze data vallen buiten de criteria die voor een positieve en negatieve likelihood ratio als diagnostisch waardevol beschouwd worden, namelijk respectievelijk  $\geq 10$  en  $\leq 0.1$ .

Indien een onderverdeling van de data gemaakt werd voor colitis ulcerosa en ziekte van Crohn afzonderlijk, was de diagnostische performantie niet significant verschillend. In een subgroep van 196 Crohn-patiënten met ziekte-activiteit ter hoogte van het colon (al dan niet in combinatie met het ileum) was de performantie iets beter dan in de totale Crohn-groep, met een sensitiviteit, specificiteit, positieve en negatieve likelihood ratio van respectievelijk 0.76, 0.77, 3.26 en 0.34. Ook hier is er dus het vermoeden dat de performantie voor Crohn met strikt ileale aantasting minder goed is.

Er was een significante statistische heterogeniteit tussen de verschillende studies, waarschijnlijk door de verschillende klinische criteria om een opstoot of remissie te definiëren.

Conclusie:

Gekende IBD-patiënten in remissie met een hoog calprotectine hebben meer kans op herval dan patiënten met een laag calprotectine. De huidige gegevens wijzen er echter op dat het vermogen van calprotectine om een opstoot te voorspellen bij volwassen IBD-patiënten onvoldoende is. Verdere prospectieve studies zijn nodig, waarbij naast klinische ziekte-activiteit ook endoscopische criteria dienen opgenomen te worden om éénduidig remissie/relaps te definiëren.

**Evalueren van het effect van therapie:**

Volledige mucosale genezing wordt meer en meer de therapeutische doelstelling bij de behandeling van IBD-patiënten. [32] Gezien het verband tussen calprotectine en endoscopisch waargenomen ziekte-activiteit, zou deze merker dus kunnen dienen om op een niet-invasieve manier het effect van de therapie te beoordelen en zo nodig de behandeling aan te passen.

Nog niet veel studies hebben de bruikbaarheid van de merker in de praktijk in deze setting uitgetest.

Roseth et al. [33] evalueerden in 2004 als eerste het gebruik van calprotectine in faeces voor het evalueren van de respons op (medicamenteuze) therapie bij patiënten met IBD. Men onderzocht 45 medicamenteus (5-ASA, azathioprine, methotrexaat of infliximab) behandelde patiënten met een laag calprotectine (<50 mg/dl). Bij 44 onder hen kon men inderdaad ook endoscopisch en histologisch volledige mucosale genezing vaststellen. Voor 18 patiënten waren ook gegevens beschikbaar over de calprotectine waarde tijdens een voorafgaande periode van actieve ziekte. Allen hadden op dat moment een duidelijk verhoogd calprotectine. Bij 1 patiënt voerde men meerdere seriële metingen uit, waarbij calprotectine correleerde met de klinische, endoscopische en histologische genezing. In deze studie werden echter geen patiënten geïncludeerd waarbij de behandeling níet resulteerde in (endoscopische) remissie en kon dus geen uitspraak worden gedaan over de gevoeligheid van calprotectine voor het detecteren van persisterende ziekte. [33]

De afgelopen jaren verschenen enkele studies die zich richtten op het opvolgen van patiënten onder TNF-alfa-inhibitoren (infliximab) aan de hand van calprotectine.

Sipponen et al. vonden in een beperkte studie dat 5 patiënten met volledige mucosale genezing na therapie met anti-TNF therapie een significante daling vertoonden van calprotectine, terwijl dit bij 3 non-responders niet het geval was. Over de patiënten met een onvolledige respons werden geen resultaten gegeven. [34]

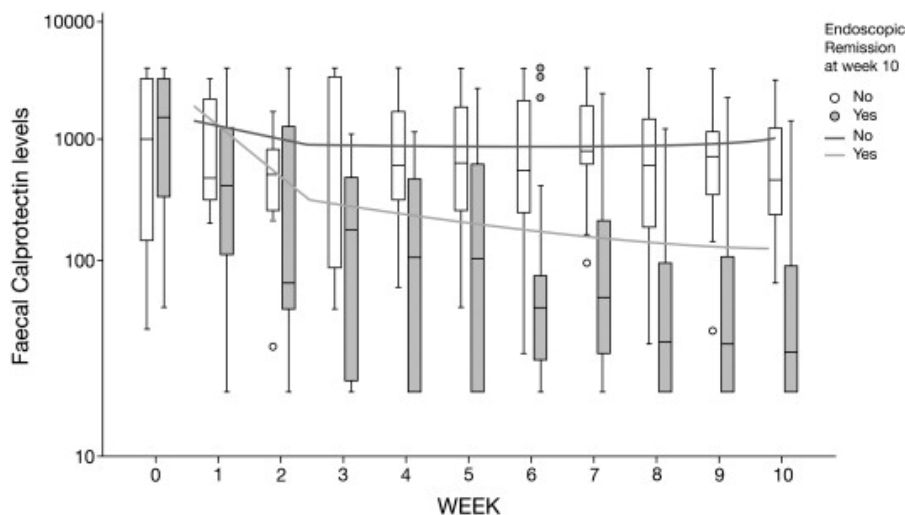
Bij Björkstén et al. voerde men 210 endoscopies uit bij 64 Crohn-patiënten in opvolging onder anti-TNF-alfa. Men vergeleek de endoscopische SES-CD (Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease) score met de concentratie calprotectine in faeces op hetzelfde ogenblik. Men bewaam een sensitiviteit en specificiteit voor het bepalen van remissie (SES-CD 2 of lager) van respectievelijk 81% en 74% met een cut-off van 100 µg/g (oppervlakte onder de ROC-curve 0,854). Over de evolutie van calprotectine tijdens de behandeling waren geen gegevens beschikbaar. [35]

In een recente Belgische multicentrische studie van De Vos et al. includeerde men 53 patiënten met actieve colitis ulcerosa bij wie behandeling met anti-TNF werd opgestart. Wekelijks werd calprotectine gemeten en na 10 weken werd aan de hand van endoscopie bepaald of er remissie was opgetreden. Men zag een goede correlatie tussen calprotectine op 10 weken en het optreden van endoscopische

remissie op dat moment (oppervlakte onder de ROC-curve 0,91). De optimale cut-off werd niet bepaald. [32]

Bij de patiënten bij wie infliximab endoscopische remissie veroorzaakte, zag men reeds op twee weken een duidelijke daling in het gemiddelde calprotectine ( $p < 0,01$ ), terwijl dit niet het geval was bij de non-responders. (zie figuur 3) Wanneer men een calprotectine  $< 50 \mu\text{g/g}$  of een daling van minstens 80 % na 2 weken therapie als criterum nam, waren sensitiviteit en specificiteit voor het voorspellen van endoscopische remissie na 10 weken echter slechts matig, namelijk respectievelijk 67% en 54%. [32]

*Figuur 3: evolutie van calprotectine na inductie met infliximab, in functie van het al dan niet optreden van endoscopische remissie na 10 weken. [32]*



**Conclusie:**

Op basis van de bovenstaande studies kan worden gesteld dat calprotectine tijdens de medicamenteuze behandeling van IBD-patiënten correleert met het al dan niet optreden van endoscopische remissie. Bij patiënten die goed reageren op therapie, ziet men al vroeg een daling in calprotectine. Ook hier is het nog niet duidelijk welke cut-off waarde moet worden gebruikt. Verder onderzoek is nodig om te bepalen of opvolging aan de hand van calprotectine bruikbaar is in de klinische praktijk en hoe dit dan precies moet gebeuren.

**C. Klinisch en organisatorisch impact**

Gezien de correlatie met ziekte-activiteit, zou de calprotectine bepaling in faeces bij gekende IBD-patiënten kunnen gebruikt worden voor opvolging.

Zo zou het mogelijk zijn om vroeger een opstoot te detecteren (alvoren klinische symptomen ontstaan) zodat de medicamenteuze behandeling sneller kan worden aangepast.

Door deze opvolging te doen aan de hand van calprotectine, zou men in de patiëntengroep met gekende IBD het aantal coloscopieën fors kunnen beperken, wat de reeds besproken voordelen oplevert qua tijd, kosten en comfort voor de patiënt. Verder onderzoek is echter nog nodig om te bepalen of opvolging aan de hand van calprotectine een meerwaarde zou kunnen betekenen en hoe dit dan precies moet gebeuren.

#### D. Kosteneffectiviteit

Ook hier kunnen we gelijkaardige kostenoverwegingen maken als voor diagnostiek. We kunnen hier echter wel moeilijker inschatten hoeveel coloscopies er minder zullen worden gedaan wanneer men calprotectine zou gaan meten. Snellere en betere therapie-aanpassingen zouden mogelijks wel kunnen leiden tot een vermindering in kosten voor opnames en invasievere procedures.

### **3. Wat is voor ons laboratorium het meest geschikte testkit voor bepaling van calprotectine? Praktische vergelijking van 8 testen.**

Om een goede keuze te kunnen maken uit de beschikbare testkits, werd in samenwerking met de dienst gastro-enterologie een klinische studie met patiëntenstalen uitgevoerd. Hieronder wordt het studieprotocol kort samengevat.

#### Studiepopulatie:

Volwassen patiënten bij wie een coloscopie zal worden uitgevoerd om een van volgende indicaties:

- Opvolging van gekende IBD
- Klinisch vermoeden van IBD

#### Methodologie:

Het eerste stoelgangstaal van de darmvoorbereiding wordt bijgehouden op het dagziekenhuis. Alvorens het uitvoeren van de coloscopie beslist de gastro-enteroloog aan de hand van de indicatie of de patiënt geïncludeerd kan worden, waarna informed consent wordt afgenomen. De gastro-enteroloog voert vervolgens de endoscopie uit en noteert of al dan niet inflammatoire letsels aanwezig zijn. De graad van eventuele aanwezige inflammatie wordt gescoord volgens de SES-CD (Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease) voor patiënten met ziekte van Crohn, en de Mayo score voor patiënten met colitis ulcerosa. Tevens worden bij alle patiënten biopsies genomen, waarvan het histopathologisch resultaat achteraf via het medisch dossier beschikbaar is. De stalen worden naar het centraal laboratorium gebracht, waar calprotectine wordt bepaald aan de hand van de 8 verschillende testkits (zie bijlage 1).

#### Analyse:

Voor de patiënten met vermoeden van een nieuwe diagnose, zullen parameters als sensitiviteit, specificiteit, PPV en NPV worden berekend. Voor de patiënten met gekende IBD zal de correlatie met de endoscopische scores worden berekend. Verder zal de correlatie tussen de verschillende testen onderling worden bekeken. Gezien de studie nog volop lopende is, kunnen momenteel nog geen resultaten worden voorgelegd.

## DECISIONS

---

Calprotectine heeft voor de diagnostiek van IBD bij volwassenen een bewezen goede performantie, Mogelijks is er ook een rol in opvolging, maar het is nog niet duidelijk in welke gevallen en op welke manier de parameter in deze setting kan worden gebruikt. Verder onderzoek is hiervoor in elk geval nodig.

Op basis van bovenstaande gegevens wordt besloten deze parameter in de routine te implementeren. Naargelang de resultaten van de praktische vergelijking van de verschillende kits, zal worden beslist welke test in ons laboratorium zal worden uitgevoerd. In afwachting hiervan worden de stalen voorlopig opgestuurd naar het Heilig Hart Roeselare, waar calprotectine reeds in routine wordt bepaald aan de hand van de Bühlmann Quantum Blue sneltest. Momenteel worden dan ook de cut-off waardes gerapporteerd die het H. Hart hanteert (<50 µg/g: negatief, 50-200 µg/g: grijze zone, > 200 µg/g: positief). Deze waardes zullen bij onze praktisch validatie worden geherevalueerd en eventueel aangepast.

Verder zal het nodig zijn de literatuur van nabij op te volgen, gezien momenteel zeer regelmatig nieuwe studies omtrent het onderwerp verschijnen. Ook in ons ziekenhuis wordt momenteel een nieuwe studie opgezet door de dienst gastro-enterologie omtrent opvolging van IBD-patiënten onder anti-TNF therapie, waar het laboratorium actief zal aan meewerken.

## TO DO/ACTIONS

---

- 1) Praktische vergelijking tussen de testkits verderzetten aan de hand van volgende klinische stalen
- 2) Implementatie van de test in de routine: aanpassen van aanvraagbon, labogids, documenten klaarmaken voor kwaliteitssysteem (validatiedossier, procedure,...), opleiding MLT's, etc.
- 3) Resultaten herwerken naar wetenschappelijk artikel voor publicatie.

## ATTACHMENTS

### Bijlage 1: Tijdsduur van de verschillende testen

	ELISA (alle kits)	Eurospital Calfast	Bühlmann Quantum Blue	Certest	Elia Phadia
Tijd extractie/staal	15 min	30 min	15 min	2 min	15 min
<i>waarvan hands-on-time</i>	10 min	10 min	10 min	2 min	10 min
Tijd analyse/run	4u	15 min	15 min	12 min	3u
<i>waarvan hands-on-time</i>	3u	2 min	2 min	2 min	15 min
Tijd analyse/staal	30 min (8st/run)	15 min (1st/run)	15 min (1st/run)	12 min (1st/run)	45 min (4st/run)
<i>waarvan hands-on-time</i>	22 min	2min	2min	2 min	4 min
Totale tijd/staal	45 min	45 min	30 min	12 min	1u
<i>waarvan hands-on-time</i>	32 min	12 min	12 min	4 min	14 min

### Bijlage 2: Kostenberekening voor de verschillende testkits

	ELISA Calpro	ELISA Calprolab	ELISA Bühlmann	ELISA Calprest	Bühlmann Quantum Blue	Eurospital Calfast	Certest	Elia Phadia
Reagenskost /test	€34.54 (run 8st) €25.91 (run 16st)	€34.54 (run 8st) €25.91 (run 16st)	€35.00 (run 8 st) €26.25 (run 16 st)	€ 37.81 (run 8 st) € 28.36 (run 16 st)	€ 28.60	€ 27.20	€ 15.00	€30.25
Extractiedevice	€ 2.06	€ 2.06	€ 2.66	€ 3.00	€ 2.66	Incl.	Incl.	€ 3.00
Controle- materiaal	Incl	Incl	Incl	Incl	€10.89 +€57.20	/	/	€ 12.67 +€60.50
Personeelskost /test	€10	€10	€10	€10	€13.33	€13.33	€4.00	€ 10.00
Eenmalige investeringen (toestellen)	/	/	/	/	€ 2655	€ 5452	/	/
<b>Totaal /staal</b>	<b>€ 37.97- 46.60</b>	<b>€ 37.97 - 46.60</b>	<b>€38.91- 47.66</b>	<b>€41.36- 50.81</b>	<b>€45.65 (excl. controles)</b>	<b>€42.71</b>	<b>€19</b>	<b>€43.25 (excl. controles)</b>

Bijlage 3: Statistische definities (naar [9]):

**Sensitiviteit:** percentage van de zieken dat correct wordt geïdentificeerd door een positieve test  
 $= a / (a+c)$

**Specificiteit :** percentage van de gezonden dat correct wordt geïdentificeerd door een negatieve test  
 $= d / (b+d)$

**Positieve predictieve waarde (PPV):** probabiteit dat een persoon met een positieve test de ziekte heeft:  
 $= a / (a+b)$

**Negatieve predictieve waarde (NPV):** probabiteit dat een persoon met een negatieve test de ziekte niet heeft  
 $= d / (c+d)$

		Condition		
		Positive	Negative	
Test outcome	Positive	a True positive	b False positive	Positive predictive value
	Negative	c False negative	d True negative	Negative predictive value
		Sensitivity	Specificity	

**Positieve likelihood ratio (LR+):** geeft aan hoeveel waarschijnlijker een positief testresultaat is bij patiënten met de ziekte dan bij personen zonder de ziekte  
 $= \text{sensitiviteit} / (1 - \text{specificiteit})$

**Negatieve likelihood ratio (LR-):** geeft aan hoeveel minder waarschijnlijk een negatief testresultaat is bij patiënten met de ziekte dan bij personen zonder de ziekte  
 $= (1 - \text{sensitiviteit}) / \text{specificiteit}$

**Odds:** aantal patiënten met de ziekte / aantal patiënten zonder de ziekte

**Odds ratio:** odds met een positieve test / odds met een negatieve test

Bijlage 4: Overzicht van de calprotectine testkits en hun analytische kenmerken

	<b>ELISA Calpro</b>	<b>ELISA Calprolab</b>	<b>ELISA Bühlmann</b>	<b>ELISA Calprest</b>	<b>Bühlmann Quantum Blue</b>	<b>Eurospital Calfast</b>	<b>Certest</b>	<b>Elia Phadia</b>
Meetbereik (µg/g)	15-500	25 -2500	10-600 (low range) 30-1800 (high range)	15-500	30- 300 (low range) 100-1800 (high range)	15-300	50-200	15-3000
CV intra-run (range)	6.1-8.7% [F] (60-1157 µg/g)	3.6-6.7 % [F] (28.7-1966 µg/g)	2.6-6.7% [F] (37.7-1246 µg/g)	2.7-4.0% [F] (0.151-0.744 OD)	15.5-24.1% [F] (47.8-917 µg/g)	8.4-14.7% [F] (72.2-201 µg/g)		2.8-4.5 [F]
CV inter-run (range)	4.3-4.6 % [F] (50-1297 µg/g)	6-13% [F] (32.1-1977 µg/g)	3.24-9.87% [18, 40] 6.6-12.8% [F] (18-1764 µg/g)	1.9-6% [14, 19, 20] 0.88-7.14% [F] (62.5-507 µg/g)		3.4-14.1% [F] (90.2-197.3 µg/g)		5.3-5.8 [F]
CV extractie (range)		8.7% (130 -1357µg/g) [F]	<10% [18]	7-14.8% [14, 19, 20]				
Lineariteit (% recovery bij verdunning)		100-107% [F]	82-105% [F]		84-125% [F]	< 115% [F]		
CE labelling	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja

[F] = gegevens uit bijsluiter firma