

Analytische en klinische evaluatie van de bepaling van calprotectine in feces

A.M.C.P. JOOSEN¹, M.B. KOK², I.J.M. van der LINDEN^{1,3}, Z. BOZKURT¹, H. BROOS¹, J. van PELT²,
M. van HEERDE⁴ en M.J.M. de GROOT¹

In de huidige studie zijn vier methodes voor de bepaling van calprotectine in feces geëvalueerd in twee laboratoria. Bij de extractie van calprotectine uit feces is het met name van belang een monster te nemen met een bekend en reproduceerbaar gewicht. Het extract moet direct geanalyseerd worden of anders worden ingevroren voor analyse. Het extract is 5 dagen stabiel bij -20 °C. De Phadia EliA meet lagere calprotectine concentraties ten opzichte van de Bühlmann ELISA. Tussen de Phadia EliA en de CAL0100 en CALP0170 ELISA's waren er geen significante verschillen. Desondanks blijken bij alle methodevergelijkingen verschillen te zijn in classificatie van patiënten (uitslag positief of negatief). Discrepante waarden liggen alle dichtbij de gebruikelijke klinische beslissgrens van 50 mg/kg. Op basis van de concordantie, positief en negatief voorspellende waarde en de kliniek (symptomen, histologisch onderzoek) blijken de Phadia EliA en de Bühlmann ELISA de patiëntengroepen met en zonder IBD het beste uit elkaar te halen. Op basis van gebruikersgemak verdient Phadia EliA de voorkeur.

Trefwoorden: calprotectine; evaluatie; assay; IBD

Calprotectine is een calcium- en zinkbindend eiwit van 36 kD dat antimicrobiële eigenschappen bezit. Het behoort tot de S-100-eiwitten, die met name aanwezig zijn in neutrofiele en monocyttaire cellen (1). Calprotectine kan in zowel bloed als feces worden gemeten. In de literatuur wordt de concentratie calprotectine in feces als een waardevolle, niet-invasieve eerste screeningsparameter beschreven voor patiënten met buikklachten ter differentiatie tussen inflammatoire darmziekten (inflammatory bowel disease, IBD), zoals colitis ulcerosa en Morbus Crohn, en prikkelbaar darmsyndroom (irritable bowel syndrome, IBS) (2). Bij IBD is de calprotectine concentratie in feces verhoogd, terwijl deze normaal is bij patiënten met IBS (3, 4). Dit kan worden verklaard

Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium, Amphia Ziekenhuis, Breda¹; Laboratorium Klinische Chemie, Hematologie en Immunologie, Medisch Centrum Alkmaar, Alkmaar²; Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium en Trombosedienst, Franciscus Ziekenhuis, Roosendaal³; Afdeling Interne Geneeskunde, Amphia Ziekenhuis, Breda⁴

Correspondentie: dr. ir. A.M.C.P. Joosen, Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium, Amphia Ziekenhuis, Postbus 90158, 4800 RK Breda
E-mail: ajoosen1@amphia.nl

doordat meer granulocyten in het darmepitheel van deze patiënten aanwezig zijn en door een verhoogde permeabiliteit van de darm mucosa, waardoor granulocyten en monocyten in toenemende mate naar de plaats van ontsteking in het darmlumen migreren (1). De hoogte van de concentratie calprotectine in feces is een maat voor de ernst van de darmontsteking bij IBD. Door het meten van de calprotectine concentratie in feces kan er onderscheid worden gemaakt tussen een actief en niet-actief ziekteproces. Verder kan het ontstekingsproces op basis van de concentratie calprotectine in feces worden vervolgd (5, 6).

Voor screening bij buikklachten wordt een klinische beslissgrens van 50 mg/kg (4, 7) gebruikt. Hierbij is calprotectine een sensitieve marker voor inflammatie, maar worden ook verhoogde calprotectine concentraties gevonden in feces van patiënten met coloncarcinoom (3) en bij bacteriële infecties van het maag-darmkanaal (1, 3, 8). In de praktijk wordt calprotectine in feces vooral bepaald bij patiënten met buikklachten en chronische diarree met een laag risico op ernstig darmlijden. Deze groep patiënten zou, afhankelijk van klinische symptomen, een endoscopie bespaard kunnen blijven bij een calprotectine concentratie onder de beslissgrens. Endoscopie is een invasieve techniek en bij een groot deel van de patiënten die een endoscopie ondergaan, wordt geen IBD aangetoond (3). Screening met behulp van de bepaling van calprotectine zou het aantal onnodige endoscopieën en het daarmee gepaard gaande ongemak voor de patiënt en de kosten drastisch kunnen verlagen.

Calprotectine kan worden bepaald met een enzymelinked immunoassay (ELISA), point-of-care testing (POCT) en, zeer recent, met de EliA techniek (ThermoFisher Scientific, Nieuwegein, Nederland). De POCT methode (9, 10) biedt een oplossing voor de lange doorlooptijd, maar aangezien de fecesopwerking hierbij direct voor analyse in de kliniek of op het laboratorium moet worden uitgevoerd, is deze minder geschikt voor grote aantallen. De ELISA is een meer geschikte methode voor grote aantallen, maar is arbeidsintensief, waardoor de kosten hoog uitvallen. Deze kosten lopen verder op wanneer er geen volle 96-wells plaat kan worden ingezet. Dit heeft tot gevolg dat de calprotectine bepaling vaak batchgewijs wordt uitgevoerd, wat tot langere doorlooptijden leidt. De Phadia EliA techniek is een fluorescence enzyme immunoassay (FEIA). Het is de eerste geautomatiseerde calprotectine bepaling en kan daardoor met een kortere doorlooptijd worden uitgevoerd. Bij alle methoden is echter de monstervoorbereiding het meest tijdrovende gedeelte.

In de huidige studie zijn vier methodes voor de bepaling van calprotectine geëvalueerd in twee laboratoria: twee ELISA's van CALPRO AS (Lysaker, Noorwegen), de CAL0100 en de CALP0170, en de Phadia EliA test van ThermoFisher Scientific (Nieuwegein, Nederland) in het Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium van het Amphia Ziekenhuis in Breda en de ELISA van Bühlmann (Alere, Tilburg, Nederland) en Phadia EliA van ThermoFisher Scientific in het Laboratorium voor Klinische Chemie, Hematologie en Immunologie van het Medisch Centrum Alkmaar.

Bij de analyse van calprotectine in feces speelt de pre-analyse een essentiële rol. Feces is van nature inhomogeen en vooral de tussen-dag variatie in calprotectine concentratie is groot (11, 12), er kan variatie in extractie zijn en calprotectine kan vrij komen uit granulocyten en monocyten waardoor de bewaartermijn en -temperatuur van belang zijn. De monstervoorbewerking en stabiliteit van fecesmonsters en hun extract is daarom ook geëvalueerd. Post-analytisch zijn de verkregen resultaten vergeleken met de klinische diagnose danwel de resultaten van de endoscopie en/of histologie.

Materiaal en methoden

Studie opzet

De methodevergelijking, zowel analytisch als klinisch, is onafhankelijk van elkaar uitgevoerd in de twee laboratoria. In het Amphia Ziekenhuis zijn de CAL0100, CALP0170 en Phadia EliA vergeleken (n=40), in het Medisch Centrum Alkmaar (MCA) de Bühlmann ELISA en de Phadia EliA (n=58). De resultaten van de Phadia EliA zijn gecombineerd, waardoor deze groep groter is dan de andere groepen. In beide laboratoria zijn fecesmonsters met calprotectine concentraties over het gehele meetbereik van de verschillende methoden (zie 'Analyse') geselecteerd op basis van de uitslag van de verzendbepaling.

De pre-analytische condities zijn bepaald in het Amphia Ziekenhuis met de Phadia EliA nadat voor deze methode werd gekozen.

Extractie

In het Amphia zijn de fecesmonsters ingevroren bij -20 °C. Voorafgaand aan extractie en analyse zijn de monsters overnacht ontdooid bij 4 °C en gehomogeniseerd met een spatel. In het MCA zijn de fecesmonsters niet gehomogeniseerd en vers geëxtraheerd. Beide voorbereidingen leidden tot vergelijkbare calprotectine concentraties in de verschillende patiëntengroepen (data niet afzonderlijk weergegeven).

De feces is opgewerkt met de faecal sample preparation kit (Roche Diagnostics, Woerden, Nederland) volgens de instructies van de fabrikant. Voor iedere analysemethode is de extractie buffer van de bijbehorende kit gebruikt. Het supernatant is gealiquoteerd en bij -20 °C ingevroren.

De extractie met behulp van de Roche faecal sample preparation kit is vergeleken met de extractie met behulp van de Phadia EliA faecal sample preparation kit (Phadia, Uppsala, Zweden) in 31 monsters. De

monsters zijn in duplo gemeten met de Phadia EliA, waarbij de duplo's direct na elkaar (monster 1 methode A – monster 1 methode B; 2A-2B, etc.) zijn opgebracht om het effect van analysetijd minimaal te houden.

Houdbaarheid

De bewaarconditie werd getest door de fecesmonsters na ontdooien ofwel een tweede keer in te vriezen (-20 °C, 4-8 weken, vries-dooi-vries-dooi cyclus, n=17) ofwel in de koelkast te bewaren (4 °C, 1-2 weken, vries-dooi-koel cyclus n=14). Daarna werd opnieuw geëxtraheerd en geanalyseerd, en werd het resultaat vergeleken met het originele resultaat (vries-dooi cyclus). Daarnaast werd het extract van 3 monsters, met lage, midden en hoge calprotectine concentratie, ingevroren (-20 °C) in aliquots. Op 5 achtereenvolgende dagen werd van ieder niveau een aliquot per dag in duplo gemeten. Alle monsters zijn gemeten met de Phadia EliA methode.

Reproduceerbaarheid en herhaalbaarheid

De reproduceerbaarheid (between-run) is bepaald op vier achtereenvolgende dagen. Voor de herhaalbaarheid (within-run) zijn extracten vijfmaal in dezelfde run gemeten. Voor de selectie van de monsters is uitgegaan van de waarde verkregen in het externe laboratorium. Ook de controles van iedere methode zijn meegenomen.

CAL0100 ELISA en CALP0170 ELISA

De wells zijn gecoat met polyklonale (CAL0100) danwel monoklonale (CALP0170) antistoffen tegen calprotectine. Het conjugaat bevat bij beide ELISA's alkalisch fosfatase gelabelde polyklonale antistoffen tegen calprotectine. Het meetbereik van CAL0100 en de CALP0170 is respectievelijk 39-1250 mg/kg en 25-2500 mg/kg. De totale analysetijd is 2 uur.

Bühlmann ELISA

De wells zijn gecoat met monoklonale antistoffen tegen calprotectine. Het detectie-antilichaam is geconjugeerd met horseradish peroxidase (HRP). Er wordt gebruik gemaakt van verschillende kalibraties met een meetbereik van 10-600 mg/kg of 30-1800 mg/kg. In deze studie is in eerste instantie gebruik gemaakt van het lagere meetbereik. Bij zeer hoge waardes is gemeten met het protocol met een hoger meetbereik. De totale analysetijd is 4 uur.

Phadia EliA

De wells zijn gecoat met monoklonale antistoffen tegen calprotectine. Als conjugaat worden enzymgelabelde monoklonale antistoffen tegen calprotectine gebruikt. Het meetbereik is 15-3000 mg/kg. De Immunocap 250 (Phadia, Uppsala, Zweden) verdunt (1: 100) en pipetteert de fecesextracten. De totale assay duurt 2 uur.

Klinische evaluatie

Voor de klinische evaluatie zijn patiëntmonsters genomen, waarvoor een calprotectine werd aangevraagd. Deze patiënten presenterden zich met buik-

klachten bij de arts. De diagnose is gesteld op basis van anamnese, klachten, endoscopie en histologie (13). De calprotectine concentraties van IBD patiënten, patiënten zonder IBD en patiënten met een ontsteking van de darm anders dan IBD zijn vergeleken. Bij 'patiënten zonder IBD' bleken de buikklachten aan een andere oorzaak dan IBD te liggen en werd geen ontsteking van de darm gezien tijdens endoscopie. Patiënten die reeds onder behandeling waren bij de arts zijn niet in de klinische evaluatie meegenomen.

Statistiek

Rekening houdend met de inhomogene samenstelling van de feces en het extract van de feces was de gewenste variatie coëfficiënt (VC) voor reproduceerbaarheid en herhaalbaarheid <15%.

Methoden zijn vergeleken aan de hand van Passing-Bablok regressie-analyse. De detectiegrens verschilt per methode. De werkelijke waarde onder deze grens is onbekend. Daarom werden resultaten onder de detectiegrenzen vervangen door de waarde van de detectiegrens van de gebruikte methode. Statische analyses zijn uitgevoerd met en zonder de resultaten onder de detectiegrens. Beide gaven dezelfde uitkomst, behalve wanneer gepaarde resultaten sterk van elkaar afweken (d.w.z. met methode 1 onder de detectiegrens en met methode 2 ver boven de klinische beslissingsgrens). In dat geval werd de Passing-Bablok regressielijn zonder de resultaten onder de detectiegrens beter. Aan de ene kant introduceren punten onder de detectiegrens variatie in de afhankelijke parameter, maar niet de onafhankelijke, waardoor het betrouwbaarheidsinterval vals vergroot kan worden. Echter als deze punten niet worden meegenomen, wordt de methodevergelijking beter voorgesteld dan in werkelijkheid het geval is. Aangezien beide statistische analyses tot dezelfde conclusies leidden, presenteren we de minst mooie regressielijn dus inclusief de resultaten onder de detectiegrens.

Voor de statistische verwerking is gebruik gemaakt van Excel en EP Evaluator (EP8).

Resultaten

Extractie

Tijdens de feces opwerking is de hoeveelheid gealiquoteerde feces gewogen. Het gemiddelde gewicht met de Faecal Extracion Device (Roche) was 95,4 mg met een variatie coëfficiënt (VC) van 6,6% (n=12). Het gemiddelde gewicht met de Phadia stool monsterbuis was 14,9 mg met een VC van 3,5%.

Gebruik van de Roche extraction monsterbuis of de Phadia stool monsterbuis gaf vergelijkbare resultaten (slope 0,95 (CI 0,86 – 1,05); intercept 8,9 (CI -0,4 – 20,3), n=31; data niet afzonderlijk weergegeven).

Houdbaarheid

De calprotectine concentratie was niet significant verschillend, (slope 0,95 (CI 0,66 – 1,09); intercept 5,6 (CI -14,9 – 25,7), n=17), wanneer fecesmonsters (niet-geëxtraheerd) voor een tweede keer werden ingevroren en ontdooid na 4-8 weken (range 45-1930 mg/kg) vergeleken met de origineel gemeten concentratie na een keer invriezen en ontdooien (range 27-2385 mg/kg).

In fecesmonsters (niet-geëxtraheerd) die na ontdooien 1-2 weken bij 4°C werden bewaard, daalde (slope 0,78 (CI 0,72 – 0,96); intercept -5,2 (CI -32,4 – 1,4), n=14) de calprotectine concentratie (range 15-1597 mg/kg) vergeleken met de concentratie gemeten direct na ontdooien (range 27-2077 mg/kg).

Invriezen van het extract liet over 5 dagen nauwelijks verloop in de calprotectine concentratie zien op 3 niveaus (gemiddelde, VC%: 62 mg/kg, 8,5%; 116 mg/kg, 4,2%; 249 mg/kg, 6,0%).

Reproduceerbaarheid en herhaalbaarheid

De CAL0100 ELISA, de Phadia EliA en de Bühlmann ELISA hebben een VC <15% voor reproduceerbaarheid en herhaalbaarheid voor fecesmonsters van patiënten en/of de meegeleverde controles (tabel 1).

Met de CALP0170 ELISA was de VC voor de reproduceerbaarheid van fecesmonsters onder de gestelde grens van 15%, maar waren de VC's van de controles groter dan de toegestane 15% (tabel 1). De VC's voor

Tabel 1. Reproduceerbaarheid en herhaalbaarheid van de verschillende methoden voor de meting van calprotectine¹

Methode	Herkomst	Reproduceerbaarheid		Herhaalbaarheid	
		Gemiddeld (mg/kg)	VC (%)	Gemiddeld (mg/kg)	VC (%)
CAL0100 ELISA	patiënt	<39	– ²	80	1,9
	patiënt	156	7,6	286	4,1
	controle	178	1,9		
CALP0170 ELISA	patiënt	44	13,6	45	26,6
	patiënt	204	11,5	228	16,6
	controle low	93	16,0		
	controle high	542	23,5		
Phadia EliA	patiënt	62	8,5	61	6,2
	patiënt	249	6,0	132	14,3
	controle	223	4,2		
Bühlmann ELISA	controle low	39	6,0	43	4,5
	controle high	139	7,0	161	2,1

¹ Voor de reproduceerbaarheid- en herhaalbaarheidstesten zijn onderling verschillende patiëntenmonsters gebruikt.

² Niet berekend. Lage concentratie bepaald in externe laboratorium bleek onder de detectiegrens van de methode.

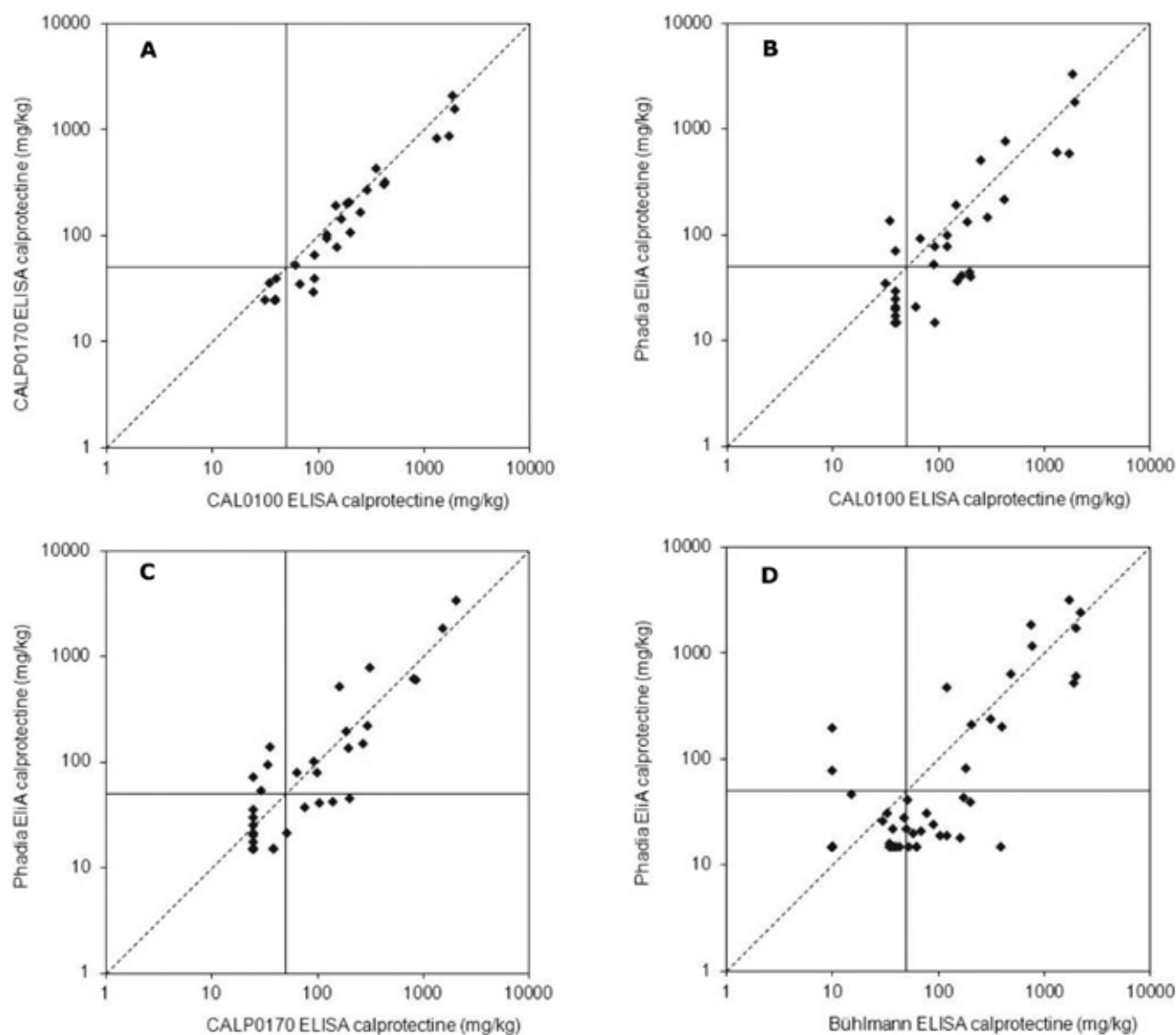
de herhaalbaarheid van de fecesmonsters waren in de CALP0170 ELISA ook hoger dan 15%.

Methodevergelijk

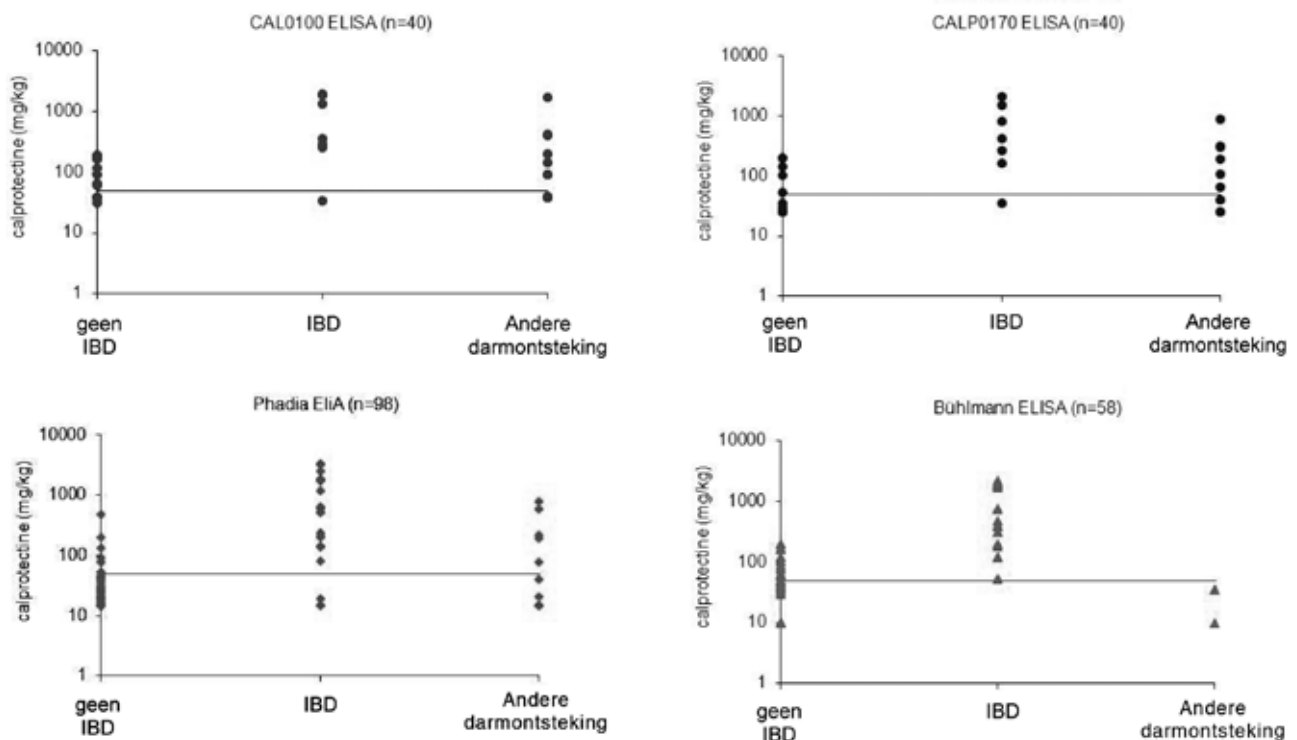
Figuur 1 toont de helling en het intercept van de verschillende methodevergelijkingen volgens Passing-Bablok. De CAL0100 ELISA meet hogere concentraties calprotectine in vergelijking met de CALP0170 ELISA, de Phadia EliA meet lagere concentraties ten opzichte van de Bühlmann ELISA. Tussen de Phadia EliA en de CAL0100 en CALP0170 ELISA's waren er geen significante verschillen (figuur 1). Desondanks blijken bij alle methodevergelijkingen verschillen te zijn in classificatie (uitslag positief of negatief). Discrepante waarden liggen alle dichtbij de gebruikelijke klinische beslisgrens van 50 mg/kg (figuur 1). Hierbij valt met name de discrepantie tussen de Phadia EliA en de Bühlmann ELISA op, waarbij de Bühlmann ELISA vaker een positieve uitslag geeft dan de Phadia EliA.

Klinische evaluatie

Bij alle methodes was er enige overlap in calprotectine concentraties tussen de patiënten die specifiek IBD bleken te hebben en patiënten die dit niet hadden. Ook was er enige overlap tussen patiënten die in het algemeen een ontsteking (IBD of anders dan IBD) hadden en patiënten waarbij klinisch geen ontsteking werd aangetoond (figuur 2). Het percentage patiënten dat op basis van de calprotectine uitslag correct werd geklassificeerd (terecht positief of negatief voor IBD, klinische beslisgrens 50 mg/kg) was 83% voor de Phadia EliA, tegenover 58%, 67% en 79% voor respectievelijk de CAL0100, CALP0170 en Bühlmann ELISA's (tabel 2). De negatief voorspellende waarde voor IBD was vergelijkbaar tussen de methoden. De positief voorspellende waarden voor IBD waren het hoogst bij Bühlmann ELISA en de Phadia EliA (tabel 2).



Figuur 1. Methodevergelijking. Passing-Bablok regressie-analyse, slope en intercept met 95% betrouwbaarheidsinterval: A (n=40), slope 0,80 (0,71 ; 0,99), intercept -6,0 (-13,5 ; -2,6); B (n=39), slope 0,88 (0,52 ; 1,68), intercept -19,2 (-50,4 ; -3,4); C (n=39), slope 1,05 (0,73 ; 1,61), intercept -11,2 (-25,3 ; -1,7); D (n=58), slope 0,38 (0,24 ; 0,72), intercept 11,2 (7,5 ; 12,6). Data zijn in de grafieken weergegeven op een logaritmische schaal, voor regressie-analyse zijn absolute getallen gebruikt. Gestippelde lijn is $x=y$, doorgetrokken lijn is de klinische beslisgrens van 50 mg/kg.



Figuur 2. Klinische evaluatie voor de verschillende methoden bij patiënten zonder IBD, IBD patiënten en patiënten met een ontsteking van de darm anders dan IBD. Data zijn weergegeven op een logaritmische schaal. Doorgetrokken lijn is de klinische beslissingsgrens van 50 mg/kg.

Tabel 2. Klinische evaluatie van calprotectine gemeten met verschillende assays als screeningsmarker: concordantie, positief voorspellende waarde voor darmontsteking of IBD bij positieve testuitslag (PVW) en negatief voorspellende waarde voor geen darmontsteking of IBD bij negatieve testuitslag (NVW)

Methode	Ontsteking ¹			IBD ²		
	concordantie	PVW	NVW	Concordantie	PVW	NVW
CAL0100 ELISA (n=40)	69%	65%	75%	58%	30%	94%
CALP0170 ELISA (n=40)	72%	71%	74%	67%	35%	95%
Phadia EliA (n=98)	83%	77%	88%	83%	60%	95%
Bühlmann ELISA (n=58)	75%	58%	96%	79%	58%	100%

¹ Ontsteking is IBD of een ontsteking van de darm anders dan IBD

² Patiënten met een ontsteking van de darm anders dan IBD zijn geclassificeerd als 'IBD negatief'

Discussie

Calprotectine in feces is in diverse studies een geschikte parameter gebleken voor (i) het onderscheid tussen IBD en IBS, (ii) het onderscheid tussen actief en niet-actief ziekte proces, (iii) het vervolgen van het ontstekingsproces en (iv) het aantonen van de mate van ontsteking bij IBD (2, 3, 6). Voor de introductie van deze bepaling op het laboratorium zijn vier methoden met elkaar vergeleken en zijn de pre-analytische condities bepaald met de methode die op basis van de evaluatie is ingevoerd (Phadia EliA).

Pre-analyse

Bij de extractie van calprotectine uit feces is het met name van belang een monster te nemen met een bekend en reproduceerbaar gewicht. De plaats in de ontlasting waar het monster genomen wordt, lijkt weinig effect te hebben op het resultaat (11). Hierbij is het wel belangrijk duidelijk aanwezige vezelresten te vermijden, aangezien deze ruimte innemen en

tot een vals negatief resultaat kunnen leiden. Voor het bemonsteren blijkt er geen statistisch verschil te zijn tussen het vullen van een cupje met daarin ongeveer 100 mg feces of het in de feces prikken van een staafje waaraan een kleine hoeveelheid feces blijft zitten. De laatste is het meest gebruiksvriendelijk.

Uit een eerdere studie blijkt dat calprotectine in feces stabiel is wanneer feces 1 dag bij kamertemperatuur of 2 dagen bij 4°C wordt bewaard (11). Vanwege de batchgewijze uitvoering van de test was een houdbaarheid van minimaal een week gewenst. Uit onze studie blijkt dat invriezen van de feces na één vries-dooi cyclus voor 4-8 weken geen effect heeft op het resultaat. Bewaren van feces in de koelkast na de oorspronkelijke vries-dooi cyclus zorgde voor een afname van 42% in de calprotectine concentratie. Het extract kan 5 dagen bewaard worden bij -20 °C, wat een voordeel is als batches zo groot zijn dat extractie en analyse niet op een dag kunnen worden uitgevoerd.

Analyse

Ten opzichte van de andere methoden valt de minder goede VC voor de reproduceerbaarheid en herhaalbaarheid van de CALP0170 ELISA op (VC's > 15 %). Mogelijk zou dit verklaard kunnen worden door een inhomogene coating van de microtiterplaat.

Ongeacht de gebruikte methode wordt in de literatuur een klinische beslisgrens van 50 mg/kg aangehouden (4, 7). De absolute waarden vertonen rondom deze grens van 50 mg/kg enige spreiding, waardoor patiëntenmonsters met de ene methode positief en met de andere methode negatief kunnen uitvallen. Analytisch gezien kan dit komen doordat de assays verschillende antilichamen gebruiken. De CAL0100 ELISA maakt gebruik van twee polyclonale antilichamen specifiek voor calprotectine. De CALP0170 ELISA maakt gebruik van één monoclonaal antilichaam en één polyclonaal antilichaam specifiek voor calprotectine. De Phadia EliA en de Bühlmann ELISA maken gebruik van twee monoclonale antilichamen specifiek voor calprotectine. Echter, de monstervoorbewerking heeft mogelijk een groter effect op de uitslag dan de kenmerken van de assay. Vertraging van analyse na extractie kan de resultaten beïnvloeden aangezien het extract verloopt bij kamertemperatuur (uitslag tot -30% in 3 uur, data niet weergegeven). Hierbij moeten we opmerken dat de juistheid niet te bepalen is omdat een gouden standaard voor het meten van calprotectine ontbreekt.

Klinische evaluatie

De diagnostische waarde van de calprotectine uitslag om te discrimineren tussen IBD en IBS is getest in een klinische evaluatie. Op basis van de concordantie, positief voorspellende waarde en de negatief voorspellende waarde blijken de Phadia EliA en de Bühlmann ELISA het beste onderscheid te maken tussen patiënten met en zonder IBD (klinische beslisgrens 50 mg/kg). In de praktijk beschouwt de arts resultaten tussen 50 en 100 mg/kg als grijs gebied waarbij op basis van de klachten of een herhaalde meting wel of niet een endoscopie volgt. De Bühlmann ELISA geeft een grijs gebied van 50-200 mg/kg aan in de bijsluiters. Ditzelfde geldt voor patiënten met een negatieve uitslag waarbij klachten blijven bestaan. Uitgebreidere studies zijn nodig om het grijze gebied rondom de beslisgrens vast te stellen.

Conclusie

Op basis van de reproduceerbaarheid, de herhaalbaarheid, maar vooral de klinische evaluatie en het gebruikersgemak, is de Phadia EliA methode voor het bepalen van calprotectine in feces in zowel in het Amphia Ziekenhuis als in het Medisch Centrum Alkmaar ingevoerd. In het Amphia Ziekenhuis worden de fecesmonsters bij aankomst ingevroren bij -20 °C. Voor de extractie wordt de Phadia EliA stool extraction monsterbuis gebruikt. Extractie en analyse vindt eenmaal in de week plaats op dezelfde dag. In het Medisch Centrum Alkmaar worden fecesmonsters direct na binnenkomst geëxtraheerd en dezelfde dag geanalyseerd. Voorafgaand aan de extractie is het van belang een monster te nemen met een bekend en reproduceerbaar gewicht en duidelijk aanwezige vezelresten te vermijden. Indien nodig kan het extract 5 dagen bewaard worden bij -20 °C.

Referenties

1. Johné B, Fagerhol MK, Lyberg T, Prydz H, Brandtzaeg P, Naess-Andersen CG, et al. Functional and clinical aspects of the myelomonocyte protein calprotectin. *Mol Pathol*. 1997; 50: 113-23.
2. Ayling RM. New faecal tests in gastroenterology. *Ann Clin Biochem*. 2012; 49: 44-54.
3. van Rheenen PF, van de Vijver E, Fidler V. Faecal calprotectin for screening of patients with suspected inflammatory bowel disease: diagnostic meta-analysis. *BMJ*. 2010; 341: c3369.
4. von Roon AC, Karamountzos L, Purkayastha S, Reese, GE, Darzi AW, Teare JP, et al. Diagnostic precision of fecal calprotectin for inflammatory bowel disease and colorectal malignancy. *Am J Gastroenterol*. 2007; 102: 803-13.
5. Wagner M, Peterson CGB, Ridefelt P, Sangfelt P, Carlson M. Fecal markers of inflammation used as surrogate markers for treatment outcome in relapsing inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2008; 14: 5584-9.
6. Foell D, Wittkowski H, Roth J. Monitoring disease activity by stool analyses: from occult blood to molecular markers of intestinal inflammation and damage. *Gut*. 2009; 58: 859-68.
7. Kristinsson J, Roseth A, Fagerhol MK, Aadland E, Schjonsby H, Bormer OP, et al. Fecal calprotectin concentration in patients with colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 1998; 41: 316-21.
8. van den Bergh FAJTM, Kolkman JJ, Russel MGVM, Vlaskamp RTJ, Vermes I. Calprotectine: een fecale marker voor diagnostiek en follow-up bij patiënten met chronische inflammatoire darmafwijkingen. *Ned Tijdschr Geneesk*. 2003; 147: 2360-5.
9. Wassell J, Wallage M, Brewer E. Evaluation of the Quantum Blue rapid test for faecal calprotectin. *Ann Clin Biochem*. 2012; 49: 55-8.
10. Coorevits L, Baert FJ, Vanpucke HJM. Faecal calprotectin: comparative study of the Quantum Blue rapid test and an established ELISA method. *Clin Chem Lab Med*. 2013; 51: 825-31.
11. Roseth AG, Fagerhol MK, Aadland E, Schjonsby H. Assessment of the neutrophil dominating protein calprotectin in feces. A methodologic study. *Scand J Gastroenterol*. 1992; 27: 793-8.
12. Husebye E, Ton H, Johné B. Biological variability of fecal calprotectin in patients referred for colonoscopy without colonic inflammation or neoplasm. *Am J Gastroenterol*. 2001; 96: 2683-7.
13. CBO: Richtlijn diagnostiek en behandeling van inflammatoire darmziekten bij volwassenen. 2008.

Summary

Joosen AMCP, Kok MB, van der Linden IJM, Bozkurt Z, Broos H, van Pelt J, van Heerde M, de Groot MJM. Analytical and clinical evaluation of faecal calprotectin. *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk*. 2013; 38: 196-201.

Four calprotectin methods were evaluated in two laboratories. When extracting calprotectin from faeces it is most important to take a sample of known and reproducible weight. The extract should be analysed immediately or otherwise frozen prior to analysis. The extract is stable for 5 days at -20 °C. The Phadia EliA results in lower calprotectin concentrations than the Bühlmann ELISA. There were no statistically significant differences between the Phadia EliA and the CAL0100 and CALP0170 ELISA's. Yet, all methods show differences in classifying patients (positive or negative result). All discordant results are close to the clinical cutoff of 50 mg/kg. Based on concordant results, positive and negative predictive value, clinical symptoms and histology, the Phadia EliA and Bühlmann ELISA discriminate best between patients with and without IBD. Based on ease of use, the Phadia EliA is preferred above Bühlmann ELISA.

Keywords: calprotectin, evaluation, assay, IBD