

Stanovení kalprotektinu ve stolici

J. Prošková, E. Karásková

Úvod

Na konci minulého roku jsme na podnět dětské kliniky naší nemocnice zavedli vyšetření kalprotektinu ve stolici. Požadavek pro zavedení tohoto vyšetření vznikl na základě Doporučení pracovní skupiny dětské gastroenterologie a výživy ČPS pro diagnostiku a léčbu nespecifických střevních zánětů u dětí, které bylo vydáno v září 2012. Ve zmíněném doporučení se uvádí, že kalprotektin ve stolici je velmi citlivým prediktorem přítomnosti střevního zánětu. Jde o senzitivnější marker než používané vyšetření CRP a FW. Vyšetření kalprotektinu je neinvazivní, jednoduché, časově i finančně nenáročné, proto je přínosné zejména u malých dětí. Zvýšená hodnota kalprotektinu musí být dle doporučení zohledněna při extraintestinálních projevech nespecifických střevních zánětů a měla by hrát důležitou roli v indikaci provedení endoskopie, resp. urychlit její provedení. Svou roli má kalprotektin i při sledování účinnosti léčby.

Kalprotektin je cytosolový protein o molekulární hmotnosti 36,5 kDa, který se uvolňuje z leukocytů po jejich aktivaci nebo lýze. Váže kalcium a má antimikrobiální aktivitu, tvoří ho především monocyty a neutrofilové. Je rezistentní vůči enzymatické degradaci, lze jej tedy stanovit v sekretech. Jeho koncentrace koreluje s množstvím leukocytů vyloučených do střevního lumen. Umožňuje tak odhadovat stupeň leukocytární infiltrace střevní sliznice.

Nespecifickými střevními záněty (IBD) označujeme skupinu chronických onemocnění postihujících především trávicí ústrojí. Do této skupiny patří především Crohnova nemoc a ulcerózní kolitida. Pro časté mimostřevní projevy se v posledních letech díváme na IBD spíše jako na systémové onemocnění organismu než jako na izolované zánětlivé střevní onemocnění.

Crohnova nemoc (CN) je granulomatózní transmurální zánět postihující kteroukoliv část trávicího ústrojí, segmentálně nebo plurisegmentálně. Onemocnění probíhá chronicky s obdobími zhoršení- relapsy, a obdobími zklidnění, remisí. Pro onemocnění není dosud známa kauzální léčba, je medikamentózně i chirurgicky nevléčitelné. Ulcerózní kolitida (UC) je hemoragicko-katarální zánět sliznice tlustého střeva, který postihuje vždy rektum

a šíří se kontinuálně na část nebo celé tlusté střevo. Průběh je charakterizován opět relapsy a remisemi. Není známa kauzální léčba, medikamentózně UC vyléčit nelze, až chirurgická léčba (proktokolektomie) vede k definitivnímu odstranění nemoci. V dětském věku se také častěji vyskytuje idiopatická proktokolitida (IC). Je popisována až u 30 % dětských pacientů, zatímco její incidence u dospělých pacientů je 5–9 %. Jedná se o zánětlivé onemocnění tlustého střeva, které nesplňuje kritéria CN a UC.

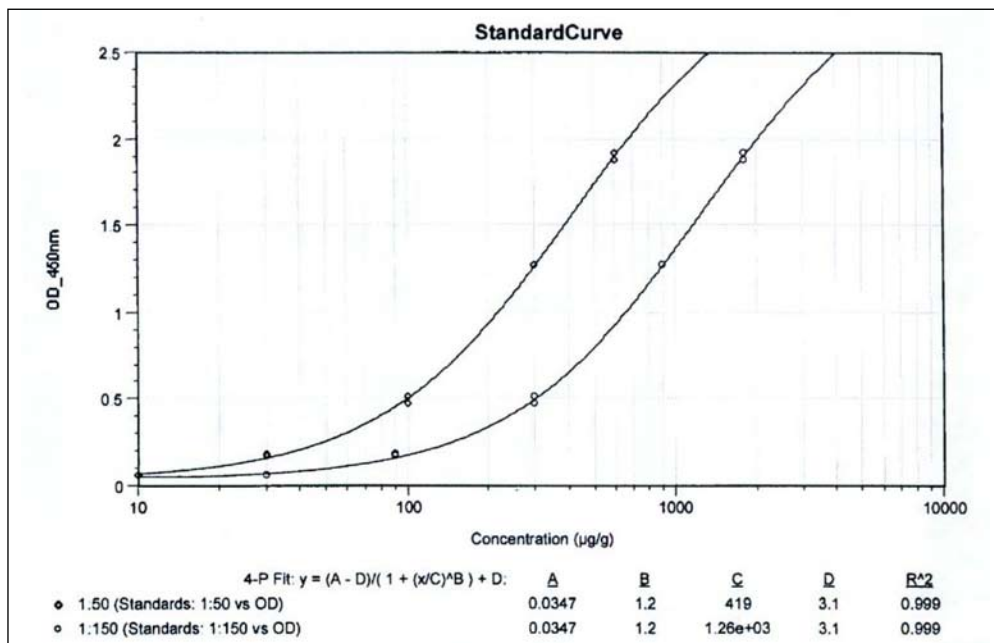
Metody stanovení

Ke stanovení kalprotektinu lze použít řadu komerčně vyráběných testů. Nabízí se kvalitativní rychlé imunochromatické testy. Pro kvantitativní stanovení jsou dostupné soupravy ELISA a také rychlé testy na principu sendvičové imunoanalýzy na testovacích kazetkách. Metody ELISA i rychlé „kazetkové testy“ umožňují selektivní stanovení kalprotektinu díky reakci kalprotektinu s vysoce specifickou protilátkou, kterou je potažena mikrotitrační destička nebo testovací membrána. Vzniká sendvičový komplex - navázaná protilátka na pevné fázi - antigen - protilátka značená enzymem. Přidaný substrát umožní spuštění enzymové reakce a následuje změření absorbance produktu, která je přímo úměrná množství kalprotektinu ve vzorku. Stanovení ELISA je finančně výhodné při dostatečném počtu vzorků. Testy na kazetkách jsou dražší, ale lékař má velmi rychle k dispozici výsledek, lze je provádět i v režimu statim.

Metodika

Vzorky stolice byly odebrány do speciálních plastových zkumavek s extrakčním puřem „Quick-Prep“ firmy Schebo. Tento odběrový systém zaručuje odběr přesného množství vzorku a také slouží k samotné extrakci vzorku. Ke stanovení kalprotektinu jsme použili soupravu Calprotectin ELISA (Bühlmann, Bazilej, Švýcarsko), ve které je použita vysoce specifická monoklonální protilátka proti kalprotektinu. Vyšetření bylo provedeno pomocí plně automatizovaného přístroje Evolis. Jde o přístroj firmy BioRad, který vykonává kompletní zpracování vzorků, tedy ředění, rozplnění vzorků i reagencií, inkubaci, promývací procesy, transport destiček, fotometrické měření a vyhodnocení dat. Pro vzorky s koncentrací kalprotektinu do 600 µg/g stolice lze použít ředění 1:50 a pracovní rozsah je potom 10-600 µg/g. Vzorky s vyšší koncentrací se ředí v poměru 1:150 a měřicí rozsah je 30-1800 µg/g. Příklad kalibračních křivek pro obě ředění viz. obr. 1.

Pro rozlišení organických a funkčních onemocnění je v použitém kitu doporučován klinický cut-off 50 µg/g stolice. Je-li koncentrace kalprotektinu vyšší



Obr. 1 Kalibrační závislost absorbance (450 nm) na koncentraci kalprotektinu ($\mu\text{g/g}$)

než 200 $\mu\text{g/g}$, pacienti mají podstoupit další vyšetření (endoskopii či jiné testy). Hladiny kalprotektinu u dospělých i u dětí ve věku 4-17 let bez ohledu na pohlaví jsou srovnatelné, u novorozenců jsou ale výrazně vyšší.

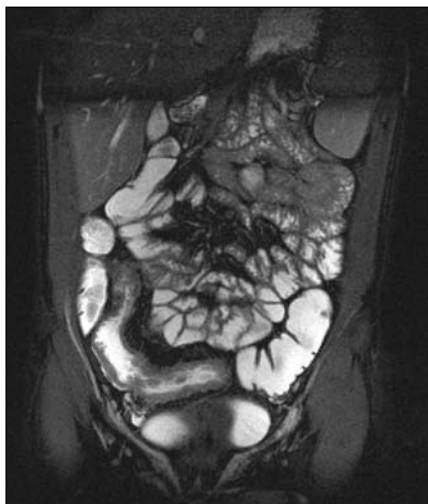
Výsledky

Od prosince 2012 do června 2013 jsme vyšetřili 40 dětských pacientů ve věku 6-18 let (medián = 10), kteří již navštěvují gastroenterologickou ambulanci anebo přišli poprvé na dětskou kliniku pro opakovaně bolesti břicha. Medián změřených hodnot fekálního kalprotektinu v našem malém souboru byl 134 (12– 1280) $\mu\text{g/g}$. U devíti pacientů byla potvrzena Crohnova choroba (medián 394 (66 – 1280) $\mu\text{g/g}$) a u dvou ulcerózní kolitida. Pacienti s již prokázaným nespecifickým střevním zánětem měli ve většině případů hodnoty nad 600 $\mu\text{g/g}$. Vyšetření fekálního kalprotektinu pomohlo k urychlení stanovení diagnózy a při rozhodování lékařů o tom, zda provést kolonoskopii.

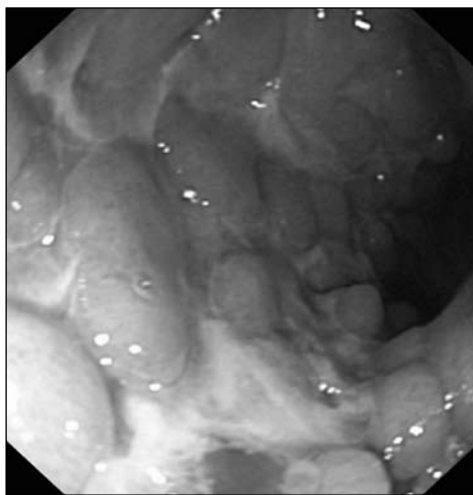
Kazuistika

Mezi vyšetřenými pacienty byl i 16letý chlapec s anamnézou 3 měsíce trvajících bolestí břicha, průjmů, subfebrilií a váhového úbytku 5 kg. Osobní i rodinná anamnéza byla bez výraznějších pozoruhodností. Dosud nebyl vážněji nemocen. Neprodělal žádný vážnější úraz, nebyl dosud hos-

pitalizován. Po přijetí chlapce na dětskou kliniku byla provedena základní biochemická vyšetření krve a krevní obraz. Byla zjištěna zvýšená hladina C-reaktivního proteinu (25 mg/L), pokles hladiny hemoglobinu (105 g/L). Byl proveden také odběr stolice pro vyšetření fekálního kalprotektinu, jehož hladina byla vysoká (nad 600 $\mu\text{g/g}$). Kultivační vyšetření stolice bylo negativní, odběr stolice na parazitologické vyšetření rovněž neprokázalo patologii. Vzhledem k anamnestickým údajům (průjmy, váhový úbytek), vysoké hladině fekálního kalprotektinu a chronické sideropenické anemii bylo vysloveno podezření na probíhající nespecifický střevní zánět. Byla provedena nejprve ultrasonografie břišní dutiny s nálezem rozšířené stěny terminálního ilea, céka a colon ascendens. Magnetická rezonanční enterografie suspekci na onemocnění potvrdila (obr. 2). Následně bylo provedeno endoskopické vyšetření trávicího traktu, které potvrdilo výrazné zánětlivé změny terminálního ilea s plazivými ulceracemi (obr. 3) a dále postižení céka lehkého stupně ve formě vícečetných aft na sliznici. Endoskopický nález na ostatních segmentech tračníku byl normální. Histologické vyšetření z odebraných vzorků sliznice terminálního ilea a céka prokázalo intenzivní lymfoplazmocelulární zánětlivé směny. Gastrokopické vyšetření bylo bez patologie.



Obr. 2 MR enterografie: lumen terminálního ilea má nepravidelnou šíři, v aborálním úseku je zřetelně zúžen. Stěna terminálního ilea je rozšířená, kontury jsou nerovné. Ostatní kličky tenkého střeva mají stěnu jemnou. Zachycená část céka má rovněž stěnu jemnou.



Obr. 3 Endoskopický nále v terminálním ileu s plavivými ulceracemi (reliéf „dlažebních kostek“)

Po stanovení diagnózy Crohnovy choroby s postižením terminálního ilea a céka byla zahájena léčba, kterou chlapec toleruje. Klinicky je v současné době bez potíží.

Závěr

Kalprotektin ve stolici se zdá být dle našich prvních zkušeností i údajů v literatuře dobrým markerem střevních zánětlivých onemocnění. Na gastroenterologické ambulanci dětské kliniky FN Olomouc

dispenzarizují v současné době 85 dětí s nespecifickým střevním zánětem. Ročně je diagnostikováno asi 20 nových případů. Zavedení vyšetření fekálního kalprotektinu by mělo lékařům pomoci při stanovení diagnózy IBD, hodnocení průběhu choroby, monitorování efektu léčby a pravděpodobně i k predikci relapsů onemocnění. Normalizace fekálního kalprotektinu se zdá být přesvědčivým indikátorem hojení střevní sliznice.

V dohledné době plánujeme přejít na rychlé kvantitativní testy pro dosažení rychlejší doby odezvy laboratoře, zejména pro detekci suspektních relapsů onemocnění.

Literatura

1. Lukáš K. a spol. Idiopatické střevní záněty. Diagnostika a léčba pro praxi. Triton, Praha, 2.vydání, 1999.
2. Ehrmann J, Konečný M. Diagnostika a léčba idiopatických střevních zánětů. Medicína pro praxi 2011; 10: 435–437.
3. Lukáš M. Idiopatické střevní záněty a biologická léčba. Postgrad Med 2009: 704–720.
4. Doporučení Pracovní skupiny dětské gastroenterologie a výživy ČPS pro diagnostiku a léčbu nespecifických střevních zánětů u dětí, Česko-Slovenská pediatrie 67, 2012
5. Kolho KL, Alfthan H, Hämäläinen E. Effect of bowel cleansing for colonoscopy on fecal calprotectin levels in pediatric patients. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. 2012;55(6):751–753.
6. Fagerhol MK Calprotectin, a faecal marker of organic gastrointestinal abnormality. Lancet. 2000; 356: 1783-4
7. Konikoff MR and Denson LA Role of fecal calprotectin as a biomarker of intestinal inflammation in inflammatory bowel disease. Inflammatory Bowel Diseases. 2006;12(6): 524-34
8. Fagerberg UL et al. Colorectal inflammation is well predicted by fecal calprotectin in children with gastrointestinal symptoms. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2005; 40: 450-5
9. D'Haens G., Ferrante M., Vermeire S. et al.: Fecal calprotectin is a surrogate marker for endoscopic lesions in inflammatory bowel disease. Inflammatory Bowel Diseases. 18: 2218–2224
10. Bunn SK, Bisset WM, Main MJC, Golden BE Fecal calprotectin as a measure of disease activity in childhood inflammatory bowel disease. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. 2001;32(2):171–177.

11. Bunn SK, Bisset WM, Main MJC, Gray ES, Olson S, Golden BE. Fecal calprotectin: validation as a noninvasive measure of bowel inflammation in childhood inflammatory bowel disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2001;33(1):14–22.
12. Canani RB, Terrin G, Rapacciuolo L, et al. Faecal calprotectin as reliable non-invasive marker to assess the severity of mucosal inflammation in children with inflammatory bowel disease. *Digestive and Liver Disease*. 2008;40(7):547–553.
13. Diamanti A, Colistro F, Basso MS, et al. Clinical role of calprotectin assay in determining histological relapses in children affected by inflammatory bowel diseases. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2008;14(9):1229–1235.
14. Canani RB, Rapacciuolo L, Romano MT, et al. Diagnostic value of faecal calprotectin in paediatric gastroenterology clinical practice. *Digestive and Liver Disease*. 2004;36(7):467–470.
15. Henderson P, Casey A, Lawrence SJ, et al. The diagnostic accuracy of fecal calprotectin during the investigation of suspected pediatric inflammatory bowel disease. *The American Journal of Gastroenterology*. 2012;107(6):941–949.
16. Turner D, Mack D, Leleiko N, et al. Severe pediatric ulcerative colitis: a prospective multicenter study of outcomes and predictors of response. *Gastroenterology*. 2010;138(7):2282–2291.
17. Turner D, Otley AR, Mack D, et al. Development, validation, and evaluation of a pediatric ulcerative colitis activity index: a prospective multicenter study. *Gastroenterology*. 2007;133(2):423–432.
18. Ho GT, Lee HM, Brydon G, et al. Fecal calprotectin predicts the clinical course of acute severe ulcerative colitis. *American Journal of Gastroenterology*. 2009;104(3):673–678.