Ocena stężenia kalprotektyny kałowej w próbkach pacjentów z zakażeniem *Clostridium difficile*

Assessment of fecal calprotectin concentration in samples from patients with *Clostridium difficile* infection.

Dorota Wultańska¹, Piotr Obuch-Woszczatyński¹, Michał Piotrowski¹, Hanna Pituch¹

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej,
Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

Celem pracy była ocena stężenia kalprotektyny w anonimizowanych, resztkowych pięćdziesięciu ośmiu próbkach kału, w których wykryto markery *Clostridium difficile* oraz ustalenie związku między stężeniem kalprotektyny a typem genetycznym (PCR-rybotypem (RT)) *C. difficile*. Z próbek wyhodowano 47 toksynotwórczych szczepów *C. difficile*, które zakwalifikowano, stosując metodę PCR-rybotypowanie, do następujących pięciu PCR-rybotypów (RT): RT027 (n=39), RT020 (n=4), RT176 (n=4), RT001 (n=1) i RT017 (n=1). Stężenie kalprotektyny w resztkowych próbkach kału było w zakresie od 199,7-1137,1 µg/g kału (wartości >150), co wskazywało na toczący się proces zapalny. Stwierdzono wysokie stężenie kalprotektyny w próbkach kału, natomiast nie wykazano statystycznie istotnych związków między wysokim stężeniem kalprotektyny a PCR-rybotypem *C. difficile* (p >0,05).

Słowa kluczowe: kalprotektyna, zakażenie *Clostridium difficile*, PCR-rybotyp

ABSTRACT

Introduction: *Clostridium difficile* infection (CDI) can cause of nosocomial diarrhoea and intestinal inflammation. Fecal calprotectin (fc) is a sensitive marker of intestinal inflammation, found to be associated with enteric bacterial infections as *C. difficile* infection (CDI).

Materials and Methods: We evaluated faecal calprotectin (fc) levels using a Ridascreen® Calprotectin test (R-Biopharm AG) in faecal samples of CDI positive patients diagnosed by C. Diff Quik Chek Complete (TechLab; Blacksburg, VA, USA and Alere; Waltham, MA, USA) test. Statistical analysis was performed for correlation of fc levels with infection with different *C. difficile* PCR-ribotypes (RTs). The study involved two groups of faecal

samples: 58 samples with glutamate dehydrogenase (GDH) plus TOX A/B positive and second group were 17 samples from healthy adults without diarrhoea and GDH/TOX A/B negative. All samples (n=75) were plated on CLO selective agar (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) to grow a *C. difficile* strain. RTs was defined using specific primers.

Results: From 75 stool samples, 47 strains of *C. difficile* were cultured only from diarrheal patients. In 58 diarrhoeic stool samples, the range of calprotectin concentrations were 199.7-1137.15 µg/g (>150µg/g, elevated concentration), which indicates on inflammatory process. *C. difficile* strains belonged to the following RTs: RT 027 (n=39), RT 020 (n=4), RT 176 (n=2), RT 001 (n=1) and RT 017 (n=1). In the 17 samples from the healthy adults, the range of calprotectin concentrations was 12.1-25.3 µg/g stool (FC normal concentration <50 µg/g) and exclude intestinal inflammation. From none of these samples, the *C. difficile* strain was not cultured.

Conclusions: The study found a differentiated level of calprotectin in the gastrointestinal tract in patients with CDI. There were no statistically significant differences in the concentration of calprotectin between patients infected with RT027 and different PCR ribotypes than RT027 ($p > 0.05$). However, it should be emphasized that these tests carried out on a small number of samples. Examination of relationship between level of calprotectin and genetic type of *C. difficile* causing CDI requires further investigation.

Key words: calprotectin, *Clostridium difficile* infection (CDI), PCR- ribotype

WSTĘP

Clostridium difficile Gram-dodatnia beztlenowa laseczka, stanowi współcześnie najczęstszy czynnik etiologiczny biegunek szpitalnych. Zakażenie *C. difficile* (CDI) może przyjąć postać łagodnej, średniej lub ciężkiej biegunki, ale może rozwinąć się w rzekomobłoniaste zapalenie okrężnicy, a w najgorszym przypadku *megacolon toxicum* (3). Chorobotwórczość *C. difficile* związana jest z działaniem dwóch toksyn: toksyny A (enterotoksyny) i toksyny B (cytotoksyny) (4). Szczepy tzw. hiperwirulentne należące do PCR-rybotypu (RT) 027 posiadają geny trzeciej toksyny, tj. toksyny binarnej (CDT) (10). Szczepy RT027 spowodowały wiele ognisk epidemicznych w Ameryce Północnej i wielu krajach europejskich, w tym również w Polsce (10, 14). Do głównych czynników ryzyka rozwoju zakażenia *C. difficile* należy antybiotykoterapia, długa hospitalizacja oraz starszy wiek pacjenta (≥ 65 lat). Inne czynniki to między innymi stosowanie leków immunosupresyjnych i przeciwnowotworowych, inhibitorów pompy protonowej, zabiegi chirurgiczne w obrębie jamy brzusznej, przewlekłe schorzenia przewodu pokarmowego oraz terapia nowymi fluorochinolonami (6). Fluorochinolony (FQ) mogą być przyczyną selekcji wysoko opornych na FQ szczepów *C. difficile*, które wywołują biegunki epidemiczne w wielu krajach (9). Cechą charakterystyczną w przypadku zakażenia *C. difficile* (CDI) jest uszkodzenie komórek nabłonka okrężnicy i wytworzenie ostrej reakcji zapalnej. Jednym z biomarkerów stanu zapalnego jelit jest kalprotektyna (7, 11). Kalprotektyna jest białkiem o wielkości około 36 kDa, występującym w postaci dimeru. Badania in vitro wykazały, że kalprotektyna ma

działanie bakteriostatyczne i powoduje sekwestrację jonów magnezu i cynku (8). Celem pracy była ocena stężenia kałowej kalprotektyny u pacjentów z zakażeniem *C. difficile* oraz ustalenie czy istnieje związek między wysokim stężeniem FC a typem genetycznym (PCR-rybotypem (RT) *C. difficile*).

MATERIAŁ I METODY

Material. Materiałem do badań było pięćdziesiąt osiem anonimizowanych, losowo wybranych reszkowych próbek kału pochodzących od pacjentów z zakażeniem *C. difficile* (lata 2014-2016). Pozostałości próbek były przechowywane w stanie zamrożenia aż do czasu wykonania testu w kierunku kalprotektyny. Próbkę została uznana wcześniej jako dodatnie na podstawie wykrycia dehydrogenazy glutaminianowej (GDH) i toksyn A/B wytwarzanych przez *C. difficile* z zastosowaniem testu C. Diff Quik Chek Complete (TechLab; Blacksburg, VA, USA and Alere; Waltham, MA, USA). Grupę odniesienia w przypadku oceny stężenia kalprotektyny stanowiło 17 próbek kału pochodzących od zdrowych osób dorosłych, które zadeklarowały udział w badaniu.

Izolacja szczepów *C. difficile* z próbek kału. Reszkowe próbki kału były systematycznie posiewane na podłoże selektywne CLO, zawierające Columbia agar z krwią baranią (5%) oraz cykloserynę, cefoksytynę i amfoterycynę B (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) w celu wyhodowania szczepu. Posiewy inkubowano w warunkach beztlenowych w temperaturze 37°C przez 48 godz. Identyfikację *C. difficile* prowadzono na podstawie charakterystycznej morfologii kolonii, zielono-żółtej fluorescencji w świetle lampy Wood'a (długość fali 366 nm), swoistego zapachu p-krezolu i wyniku uzyskanego w barwieniu preparatów metodą Grama. Wyhodowane szczepy *C. difficile* poddano dalszym badaniom określając ich toksynotwórczość, stosując metody opisane wcześniej (10).

Określenie PCR-rybotypu szczepów *C. difficile*. PCR-rybotyp (RT) szczepu *C. difficile* określono w Pracowni Beztlenowców, w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, stosując metodę PCR-rybotypowanie. Umożliwia ona wykrywanie różnic w regionie DNA o wysokiej zmienności, położonym między genami kodującymi podjednostki 16S rRNA i 23S rRNA (16S-23S rRNA-intergenic region spacer). Do PCR-rybotypowania użyto pary starterów 16S (sekwencja 5'-GTG CGG CTG GAT CAC CTC CT-3') i 23S (sekwencja 5'-CCCTGCACCCT-TAATAACTTGACC-3') (2).

Do mieszaniny reakcyjnej dodawano 20 µl próbki DNA badanego szczepu. Końcowa objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 100 µl. Amplifikację przeprowadzano w termocyklerze BIO-RAD PTC-100™. Reakcję PCR-rybotypowania przeprowadzano zgodnie z następującym profilem: wstępna denaturacja 6 min. w 94°C; 35 cykli złożonych z denaturacji 1 min w 94°C, przyłączania starterów 1 min w 57°C i wydłużania nici 1 min. w 72°C; końcowe wydłużanie nici 7 min. w 72°C. Produkt amplifikacji wykrywano metodą elektroforezy w 3% żelu agarozowym zawierającym bromek etydyny w środowisku buforu TBE przy 100 V przez 4 godz. Żele fotografowano przy pomocy zestawu do dokumentacji Kodak Digital Science EDAS 120 i porównywano uzyskane wzory prążków ze szczepami wzorcowymi *C. difficile* kolekcji Cardiff-ECDC przechowywanej w banku szczepów.

Oznaczenie stężenia kalprotektyny w próbkach kału. Resztkowe próbki kału przechowywano w stanie zamrożenia w temperaturze -20°C aż do czasu wykonania badania w kierunku kalprotektyny. Rozmrożone próbki badano z zastosowaniem testu immunoenzymatycznego Ridascreen® Calprotectin firmy R-Biopharm AG. Test wykonano zgodnie z instrukcją producenta. W skrócie: do 100 mg próbki kału dodawano 5 ml buforu ekstrakcyjnego i poddawano homogenizacji przez około 30 sekund (w zależności od konsystencji), a następnie wirowano przez 10 minut, przy prędkości 3000 g. Otrzymany nadsącz próbek kału rozcieńczono 50 krotnie i po 100 μl przenoszono do studzienek reakcyjnych. Do kolejnych studzienek dodawano 100 μl kontroli ujemnej, po 100 μl 5 standardów, 100 μl kontroli dodatniej i 100 μl kontroli słabo dodatniej. Przykrytą płytkę inkubowano 60 min. w temperaturze pokojowej. Po inkubacji każdą studzienkę reakcyjną przepłukiwano 5-krotnie buforem płuczącym, a następnie dodawano koniugat i ponownie przez 60 min. inkubowano w temperaturze pokojowej. Po Zakończeniu inkubacji każdą studzienkę reakcyjną przepłukiwano 5-krotnie buforem płuczającym, dodawano substrat i przykrytą płytkę inkubowano w ciemni w temp. pokojowej przez 15 minut. Po wyznaczonym czasie reakcja była zatrzymywana przez dodanie odczynnika STOP. Analizę fotometryczną wykonywano przy długości fali 450 nm i fali odniesienia o długości 620 nm w spektrofotometrze firmy BIO-RAD PR 3100. Stężenia kalprotektyny odczytywano z krzywej standardowej, wykreślonej zgodnie z zaleceniami producenta, dla każdej serii próbek.

Analiza statystyczna. Uzyskane wyniki poddano analizie z wykorzystaniem arkusza kalkulacyjnego Microsoft Excel oraz programu Statistica 13 (StatSoft Polska). Zależność stężenia kalprotektyny od PCR-rybotypu (RT) *C. difficile* ustalono na podstawie testu t-studenta. Istotność statystyczną ustalono na poziomie $p < 0,05$.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Z badanych, anonimizowanych, pięćdziesięciu ośmiu resztkowych próbek kału, w których wykryto antygen GDH i toksyny A/B *C. difficile* wyhodowano 47 toksynotwórczych szczepów *C. difficile*. Z jedenastu próbek nie wyhodowano szczepów *C. difficile*. W przypadku grupy kontrolnej (stanowiącej grupę odniesienia do oceny kalprotektyny) nie wyhodowano szczepów *C. difficile*. Wśród wyhodowanych szczepów rozróżniono pięć PCR-rybotypów: RT027 (n=39), RT020 (n=4), RT176 (n=2), RT001 (n=1) i RT017 (n=1). W pięćdziesięciu ośmiu próbkach kału ustalono stężenie kalprotektyny w zakresie od 199,7 $\mu\text{g/g}$ do 1137,1 $\mu\text{g/g}$ kału, co wskazywało na toczący się proces zapalny ($>150 \mu\text{g/g}$ kału). W badaniach ustalono następujące stężenia kalprotektyny w kale pacjentów zakażonych szczepami należącymi do różnych PCR-rybotypów *C. difficile*: RT027 w zakresie od 199,7 $\mu\text{g/g}$ do 1137,1 $\mu\text{g/g}$, RT020 w zakresie od 521,1 $\mu\text{g/g}$ do 1061,4 $\mu\text{g/g}$, RT176 w zakresie od 389,0 $\mu\text{g/g}$ do 1119,4 $\mu\text{g/g}$, RT001 stężenie 1066,4 $\mu\text{g/g}$, RT017 stężenie 963,6 $\mu\text{g/g}$ (Ryc. 1). W grupie kontrolnej, którą stanowiło 17 próbek kału pochodzących od osób zdrowych zakres stężenia kalprotektyny wyniósł 12,1-25,3 $\mu\text{g/g}$ kału, co wykluczyło proces zapalny w jelicie grubym (wartość $<50 \mu\text{g/g}$ kału).

Wyniki naszych badań wykazały zróżnicowany poziom stężenia kalprotektyny w przewodzie pokarmowym u osób z zakażeniem *C. difficile*, przy czym najniższe z tych stężeń było 4-krotnie wyższe niż górna granica przyjęta dla osób zdrowych (50 $\mu\text{g/g}$ kału). W badaniach innych autorów stężenia kałowej kalprotektyny były istotnie wyższe u pacjentów z CDI, niż u osób, u których przyczyna biegunki była inna, oraz u osób zdrowych (1, 5, 7, 13, 15).

Ryc. 1. Stężenia kalprotektyny w próbkach kału pacjentów, z których wyhodowano rybotyp 027 i inne rybotypy *Clostridium difficile*.

Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w zakresie stężenia kalprotektyny w reszkowych próbkach kału, z których wyhodowano szczepy należące do RT027 *C. difficile* w porównaniu do stężenia kalprotektyny w próbkach, w których wykryto szczep *C. difficile* o innym PCR-rybotypie ($p > 0,05$) (Ryc. 2). Wyniki te są podobne do wyników opublikowanych przez Swale i wsp. (13), którzy stwierdzili, że stężenie kalprotektyny

w próbkach kału chorych, od których wyhodowano szczepy RT027 (48%), nie różniło się statycznie od stężenia kalprotektyny, gdzie czynnikiem był inny PCR-rybotyp. Peretz i wsp. (8) zbadali próbki kału od 29 pacjentów z CDI w wieku od 17 do 95 lat. Siedem izolatów (24,1%) *C. difficile* zidentyfikowali jako rybotyp 027, a średni poziom kalprotektyny dla tych próbek kału wyniósł 811,9 $\mu\text{g/g}$ i był znacząco wyższy w porównaniu do pacjentów CDI z innymi PCR-rybotypami *C. difficile*. U tych chorych średni poziom kalprotektyny wyniósł 178,6 $\mu\text{g/g}$. Autorzy stwierdzili znaczący związek między wysokim stężeniem kalprotektyny a występowaniem RT027 *C. difficile*.

Ryc. 2. Porównanie stężeń kalprotektyny w próbkach kału pacjentów, z których wyhodowano RT 027 i inne PCR-rybotypy *Clostridium difficile*.

W naszym przypadku badanie zależności między poziomem stężenia kalprotektyny kałowej a typem genetycznym *C. difficile* (PCR-rybotyp) przeprowadzono na niewielkiej liczbie próbek kału. Wskazana jest zatem kontynuacja badań. Należałoby też wykluczyć inne czynniki towarzyszące, które mogą powodować stan zapalny jelit (11).

PIŚMIENNICTWO

1. Barbut F, Gouot C, Lapidus N i inni. Faecal lactoferrin and calprotectin in patients with *Clostridium difficile* infection: a case-control study. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2017; 36: 2423-30.
2. Bidet P, Lalande V, Salauze B i inni. Comparison of PCR-ribotyping, arbitrarily primed PCR, and pulsed-field gel electrophoresis for typing *Clostridium difficile*. J Clin Microbiol 2000; 38: 2484-7.

3. Borriello SP, Wilcox MH. *Clostridium difficile* infections of the gut: the unanswered questions. J Antimicrob Chemother 1998; 41 Suppl C: 67-9.
4. Darkoh C, Turnwald BP, Koo HL i inni. Colonic immunopathogenesis of *Clostridium difficile* infections. Clin Vaccine Immunol 2014; 21: 509-17.
5. Gallo A, Vallone C, Sabatelli L i inni. Fecal calprotectin in management of *Clostridium difficile* infection: a longitudinal study. Scand J Gastroenterol 2017; 24: 1-6.
6. Gordon D, Young LR, Reddy S i wsp. Incidence of *Clostridium difficile* infection in patients receiving high-risk antibiotics with or without a proton pump inhibitor. J Hosp Infect. 2016; 92: 173-7.
7. Kim J, Kim H, Oh HJ i inni. Fecal calprotectin level reflects the severity of *Clostridium difficile* infection. Ann Lab Med 2017; 37: 53-7.
8. Peretz A, Tkhawkho L, Pastukh N i inni. Correlation between fecal calprotectin levels, disease severity and the hypervirulent ribotype 027 strain in patients with *Clostridium difficile* infection. BMC Infect Dis 2016; 16: 309.
9. Pituch H, van Leeuwen W, Maquelin K i inni. Toxin profiles and resistances to macrolides and newer fluoroquinolones as epidemicity determinants of clinical isolates of *Clostridium difficile* from Warsaw, Poland. J Clin Microbiol 2007; 1607-10.
10. Pituch H, Obuch-Woszczatyński P, Lachowicz D i inni. Hospital-based *Clostridium difficile* infection surveillance reveals high proportions of PCR ribotypes 027 and 176 in different areas of Poland, 2011 to 2013. Euro Surveill 2015; 20 (38).
11. Popiel KY, Gheorghe R, Eastmond J i inni. Usefulness of adjunctive fecal calprotectin and serum procalcitonin in individuals positive for *Clostridium difficile* toxin gene by PCR assay. J Clin Microbiol 2015; 53: 3667-9.
12. Shastri YM, Bergis D, Povse N i inni. Prospective multicenter study evaluating fecal calprotectin in adult acute bacterial diarrhea. Am J Med 2008; 121: 1099-106.
13. Swale A, Miyajima F, Roberts P i inni. Calprotectin and lactoferrin faecal levels in patients with *Clostridium difficile* infection (CDI): a prospective cohort study. PLoS One 2014; 9: e106118.
14. Valiente E, Cairns MD, Wren BW. The *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 lineage: a pathogen on the move. Clin Microbiol Infect 2014; 20: 396-404.
15. Whitehead SJ, Shipman KE, Cooper M i inni. Is there any value in measuring faecal calprotectin in *Clostridium difficile* positive faecal samples? J Med Microbiol 2014; 63: 590-3.

Otrzymano: 11 X 2018 r.

Adres autora: 02-004 Warszawa, ul. T. Chałubińskiego 5, Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej WUM w Warszawie.