



Gyulladásos bélbetegségek klinikai laboratóriumi vonatkozásai

Szalay Balázs

Semmelweis Egyetem, Laboratóriumi Medicina Intézet

Kötelező szinten tartó tanfolyam, 2016.05.17

Előadás felépítése

- 1. Általános laboratóriumi vizsgálatok**
- 2. Speciális laboratóriumi vizsgálatok**
- 3. Gyógyszerszint mérés és gyógyszer-elleni antitest meghatározás (saját kutatási eredmények)**

Általános megfontolások

- **Gyulladásos bélbetegségek (IBD-Inflammatory bowel disease) diagnózisa elsősorban nem laboratóriumi vizsgálatokon alapul (klinikai, endoszkópos, szövettani, radiológiai és mikrobiológiai)**
- **Laboratóriumi tesztek a differenciáldiagnózisban (hasmenés, véres széklet, hasi fájdalom, colitis), a Crohn-betegség (CD) és a colitis ulcerosa (UC) elkülönítésében és prognózis becslésben fontosak.**

1.

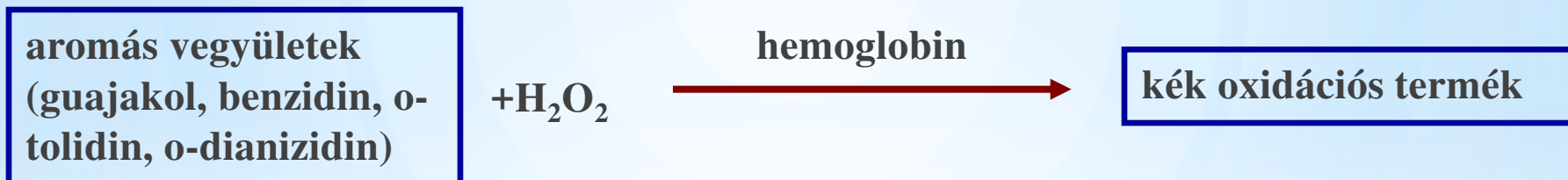
Általános laboratóriumi vizsgálatok

A széklet bakteriológiai és parazitológiai vizsgálata

- Clostridium difficile
- E. Coli
- Campylobacter jejuni
- Salmonella
- Shigella
- Entamoeba histolytica
- Giardia lamblia
- Mycobacterium tuberculosis

Okkult vérzés kimutatása (<10 ml/nap)

- a.) peroxidáz alapú reakció:



nem specifikus: peroxid tartalmú torma, retek, véres hús, vaskészítmények ál-pozitív reakciót adnak

- b.) immun alapú globin kimutatás: humán hemoglobinra specifikus, de felső gasztrointesztinális vérzés kimutatása nem lehetséges

Okkult vérzés kimutatása (<10 ml/nap)

- **c.) hemoglobin/haptoglobin komplex (Ridascreen®)**

-A Hb/Hp komplex nagyon ellenálló a savak és a fehérjebontó enzimek hatásával szemben így a székletben sokáig jelen van

-A bélben magasabban elhelyezkedő vérzés is nagy érzékenységgel kimutatható

-Specifikusabb, mint a hagyományos peroxidáz alapú reakciók

A betegség aktivitását jelző laboratóriumi paraméterek

- **hsCRP (nagy érzékenységű)**
- **süllyedés**
- **thrombocyta- és leukocytaszám**

Eur J Clin Invest. 1982 Aug;12(4):351-9.

Serum levels of C-reactive protein in Crohn's disease and ulcerative colitis.

Fagan EA, Dyck RF, Maton PN, Hodgson HJ, Chadwick VS, Petrie A, Pepys MB.

- **A CRP szintje Crohn-betegség és colitis ulcerosa esetében is magasabb.**
- **Crohn-betegségben ugyanakkor szignifikánsan magasabb, mint colitis ulcerosában.**
- **A CRP szoros összefüggésben lehet a Crohn-betegség klinikai és kórszövettani mutatóival a remisszió, a relapszus és a terápiás válasz tekintetében.**
- **A süllyedés szintén magasabb volt Crohn-betegségben, de nem mutatott összefüggést a betegség aktivitásával.**

Correlation of C-reactive protein with clinical, endoscopic, histologic, and radiographic activity in inflammatory bowel disease.

Solem CA¹, Loftus EV Jr, Tremaine WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ.

- **IBD-ben a CRP-emelkedés összefüggésben állhat:**
 - a betegség klinikai aktivitásával;
 - az endoszkópia során látott gyulladásos aktivitással;
 - a szövettani vizsgálat során igazolt súlyos gyulladásos aktivitással Crohn-betegségben;
 - a gyulladás mértékének megítélésére használt számos biomarkerrel;
- **Ugyanakkor nincs összefüggésben a gyulladásos bélbetegség radiológiai aktivitásával!**

C-reactive protein: a predictive factor and marker of inflammation in inflammatory bowel disease. Results from a prospective population-based study.

[Henriksen M¹](#), [Jahnsen J](#), [Lygren J](#), [Stray N](#), [Sauar J](#), [Vatn MH](#), [Moum B](#); [IBSEN Study Group](#).

- **A CRP-mérés segíthet az IBD diagnosztikájában, ugyanakkor a diagnózis idején a CRP sok esetben a normál tartományban van!**
- **Crohn-betegség esetén magasabb CRP-szinteket mértek, mint colitis ulcerosában.**
- **Colitis ulcerosában a diagnózis idején mért CRP szintje összefüggésben áll a betegség kiterjedtségével.**
- **Crohn-betegségben összefüggést találtak a diagnózis idején mért CRP-szint és a sebészeti rizikó között (ileális lokalizáció esetén).**

Biomarkers of Inflammatory Bowel Disease: From Classical Laboratory Tools to Personalized Medicine.

Viennois E¹, Zhao Y, Merlin D.

- **A gyulladás mértékének és az alapbetegség aktivitásának megítélésére használható biomarkerek:**
 - CRP
 - Székletben azonosítható biomarkerek:
 - Lactoferrin
 - Calprotectin
 - S100A12
 - Lipocalin-2
- **CD/UC elkülönítésére használt biomarkerek:**
 - pANCA
 - ASCA
 - pANCA/ASCA arány

Jövő: Lokális vagy keringő mikroRNS-ek azonosítása?

2.

Speciális laboratóriumi vizsgálatok

Lactoferrin (lactotransferrin)

- A lactoferrin a transferrin fehérjecsaldjába tartozó glikoprotein
- Olyan vaskötő fehérje, amelyet a legtöbb nyálkahártyamembrán szekretál, így megtalálható a nyálban, a könnyben és az anyatejben, továbbá a szérumban, valamint bizonyos neutrofil granulomokban
- Az akut gyulladásos immunválaszban is részt vesz és antibakteriális, antivirális és antifungális hatása is van
- Az emésztőrendszeret érintő gyulladás esetén a nyálkahártyát infiltráló leukocyták miatt megnő a lactoferrin koncentrációja a székletben
- A lactoferrin 7 napig nem bomlik le a székletben, és hagyományos ELISA módszerrel kimutatható

Diagnostic accuracy of fecal lactoferrin for inflammatory bowel disease: a meta-analysis.

Wang Y¹, Pei F², Wang X¹, Sun Z¹, Hu C¹, Dou H³.

szűrő módszer a gyulladássos bélbetegségek és a funkcionális kórképek elkülönítésében.

- **Az IBD diagnosztikában első vonalbeli módszer lehet a nem-invazív vizsgáló módszerek közül.**
- **A szenzitivitása és a specificitása magasabb colitis ulcerosa esetén (spec.: 100%, sens.: 82%), mint Crohn-betegségben (spec.: 100%, sens.: 75%).**
- **Nem helyettesítheti a colonoscopiát és a képalkotó vizsgálatokat, hiszen az előbbi vizsgálat szövettani mintavételre az utóbbi pedig az IBD szövődményeinek kimutatásában nélkülözhetetlen.**

Calprotectin

- az S100 fehérjecsaládba tartozó kalcium-, cink- és mangán-kötő fehérje
- A neutrofil granulociták és a monociták termelik
- Antibakteriális és antifungális hatással bír
- A széklet calprotectin szintjének emelkedését találjuk az alábbi megbetegedésekben:
 - gyulladós bélbetegség
 - ulcus
 - enterocolitis necrotisans
 - intestinális cisztás fibrózis
 - colorectális tumor
 - coeliakia
- NSAID kezelésben is megnő a szintje

S100A12

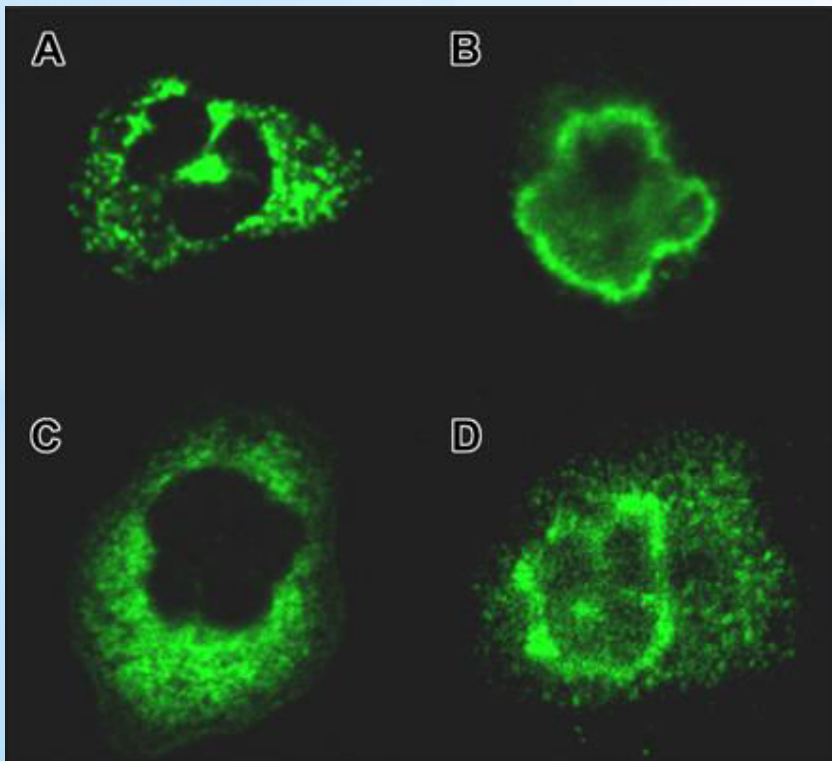
- Szintén az S100 fehérjecsaládba tartozó kalcium kötő fehérje
- A neutrofil granulociták termelik
- kalcium-dependens intracelluláris jelátviteli folyamatokban vesz részt

Lipocalin-2

- Más néven neutrofil-gelatináz asszociált lipocalin (NGAL)
- neutrofil granulociták által termelt antibakteriális hatású kalcium kötő fehérje
- Elsősorban a vesében, prosztatában, tüdőben és a GI traktusban szekretálódik
- akut vesekárosodás biomarkere, de gyulladásokban is emelkedik a szintje

Szerológiai tesztek I.

- antineutrophil citoplazmatikus antitest (ANCA)



A = c-ANCA

antigén: proteináz-3, PR-3
(wegener granulomatosis)

B = p-ANCA

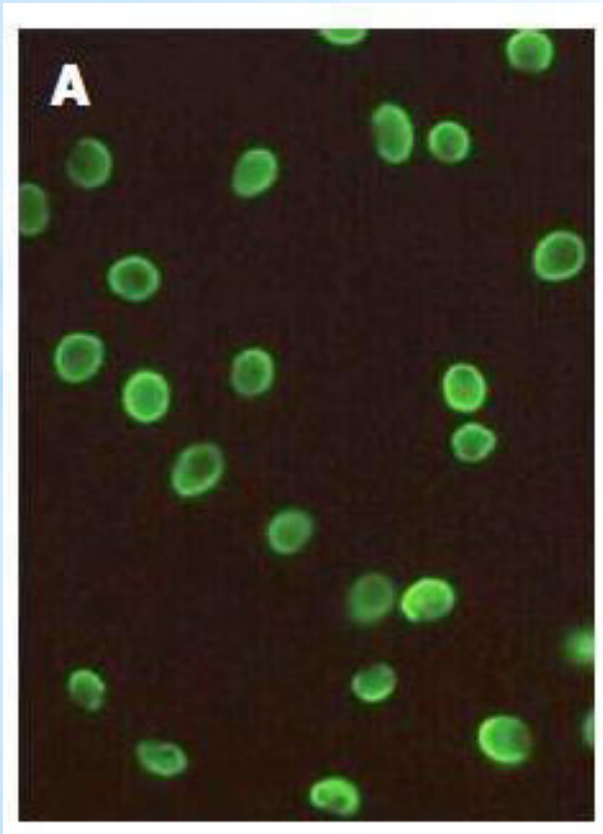
antigén: myeloperoxidáz, MPO
(Churg Strauss szindróma, **IBD**)

C/D = atípusos-ANCA (x-ANCA)

antigén: laktoferrin elasztáz stb.
(**IBD**, RA)

Szerológiai tesztek II.

- anti-Saccharomyces cerevisiae antitestek (ASCA) IgG, IgA



Antigén = élesztőgomba
sejtfalában található mannán
fehérje

ASCA pozitívítás:

-Crohn-betegség

-colitis ulcerosa

-egyéb colitis

-Bechet-kór

Szerológiai tesztek III.

- **anti-OMP C**

antigén = *Eschericia coli* külső membránjában található porin C

- **anti-Cbir1**

antigén = bakteriális flagellin

- **anti-glikán antitestek** (anti-laminaribioside carbohydrate antitest [**ALCA**]), anti-chitobioside carbohydrate antitest [**ACCA**]), anti-mannobioside carbohydrate antitest [**AMCA**])

Szerológiai tesztek IV.

- **PAb (Pancreatic autoantibodies)**
antigén = pancreas acinus sejt
- **GAB (goblet cell autoantibodies)**
antigén = intesztinális kehelysejt

Szerológiai tesztek V.

- kombinációban kell vizsgálni

TABLE 3. Prevalence of individual serological markers in patients with IBD, non-IBD GIT disorders and healthy individuals (15,19,26, 27,29,33,55-59).

Antibody	Immunoglobulin class	Prevalence (%)			
		CD	UC	other GIT disorders	Healthy
ASCA	IgA and/or IgG	29–71	0–29	0–23 (37.9)*	0–16
ACCA	IgA	8–25	5–7	3–20	0.5–12
ALCA	IgG	17.7–27	3–8	9	2
AMCA	IgG	12–28	7	8	9
Anti-L	IgA	11–26	3–7	23	1–10
Anti-C	IgA	10–25	2–10	11	2–12
Anti-OmpC	IgA	24–55	2–24	5–11	5–20
Anti-I2	IgA	38–60	2–10	19	5–15
Anti-Cbir1	IgG	50–56	<6	14	8
PAB	IgA and IgG	26–39	0–22.7	0–11.5 (22.3)*	0–8
GAB	IgA and IgG	1.4–33	15.4–46.6	0–9.3	0
pANCA	IgG	2–38	24–85	8	0–8

* prevalence in active celiac disease. CD - Crohn's disease; UC - ulcerative colitis; ASCA - Anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies; ACCA - antichitobioside carbohydrate antibodies; ALCA - antilaminaribioside carbohydrate antibodies; AMCA - anti-mannobioside carbohydrate antibodies; Anti-L - anti-laminarin antibodies; Anti-C - anti-chitin antibodies; Anti-OmpC - antibody to outer membrane porin C; Anti-I2 - antibody to *Pseudomonas fluorescens* - associated sequence I2; Anti-Cbir1 - antibody to bacterial flagellin; PAB - antibodies against exocrine pancreas; GAB - antibodies to goblet cells; pANCA - anti-neutrophil cytoplasmic antibodies.

Biomarkers of Inflammatory Bowel Disease: From Classical Laboratory Tools to Personalized Medicine.

Viennois E¹, Zhao Y, Merlin D.

TABLE 1. Current Biomarkers

Biomarker Name	Distinguish CD Versus UC (Yes/No)	Specificity for IBD (Yes/No)	Sensitivity (Low/High)	Predictive Potential (Yes/No)	References
pANCAs	Yes	Yes	Low	Yes	7,9,10
ASCAs	Yes	Yes	Low	Yes	7,9,10
CRP	No	No	High for CD, low for UC	Yes	11–13
Fecal Calprotectin	No	Yes	High	Yes	14–18
Fecal Lactoferrin	No	Yes	High	Yes	15,18,19
S100A12	No	No	High	No	20–22
Lipocalin-2	No	No	High	No	23–26

3.

**Gyógyszorszint mérés és
gyógyszer-elleni antitest
meghatározás (saját
kutatási eredmények)**

Háttér

- A TNF- α terápia hatékonysága számos tényező függvénye
- A betegség rövidebb fennállása esetén jobb volt a biológiai terápiára adott klinikai válasz
- Izolált colon érintettség, korábbi műtét hiánya, a fiatal életkor és a dohányzásmentesség jobb válaszkészséget prognosztizált
- A kezdeti magas CRP szint (≥ 8 mg/L) összefüggött a 26. héten megfigyelhető corticosteroid-mentes klinikai remisszióval (infliximab, IFX kezelés mellett)

Háttér

- **A terápiás gyógyszer szint mérés (TDM, therapeutic drug monitoring) a biológiai kezelésben részesült betegeknél egyre szélesebb körben figyelhető meg**
- **A klinikai remisszió nagyobb valószínűséggel fordul elő azoknál a Crohn-betegeknél akiknél 14 infúziót követően magas völgykonzentrációt mértek**
- **Azok a Crohn-betegek akik elvesztették a válaszkészségüket szignifikánsan alacsonyabb IFX völgykonzentrációval, valamint emelkedett AIA (anti-infliximab antitest) szintekkel rendelkeztek**

Maser EA. Clin Gastroenterol Hepatol. 2006

Steenholdt C. Scand J Gastroenterol. 2011

Bevezetés

- **Betegek:**
 - TNF- α gátló terápiában korábban nem részesült
 - az elmúlt 12 hónapban nem, de korábban TNF- α gátló kezelés alatt állt
- **Értékelés: 0., 2., 6., 14., 30. és 54. hét**

Bevezetés

- **gyógyszorszint**
(infiximab, $\mu\text{g/mL}$)
- **gyógyszer-elleni**
antitest (anti-
infiximab, ng/mL)

**ELISA módszer (Lisa
Tracker, Theradiag,
Franciaország)**



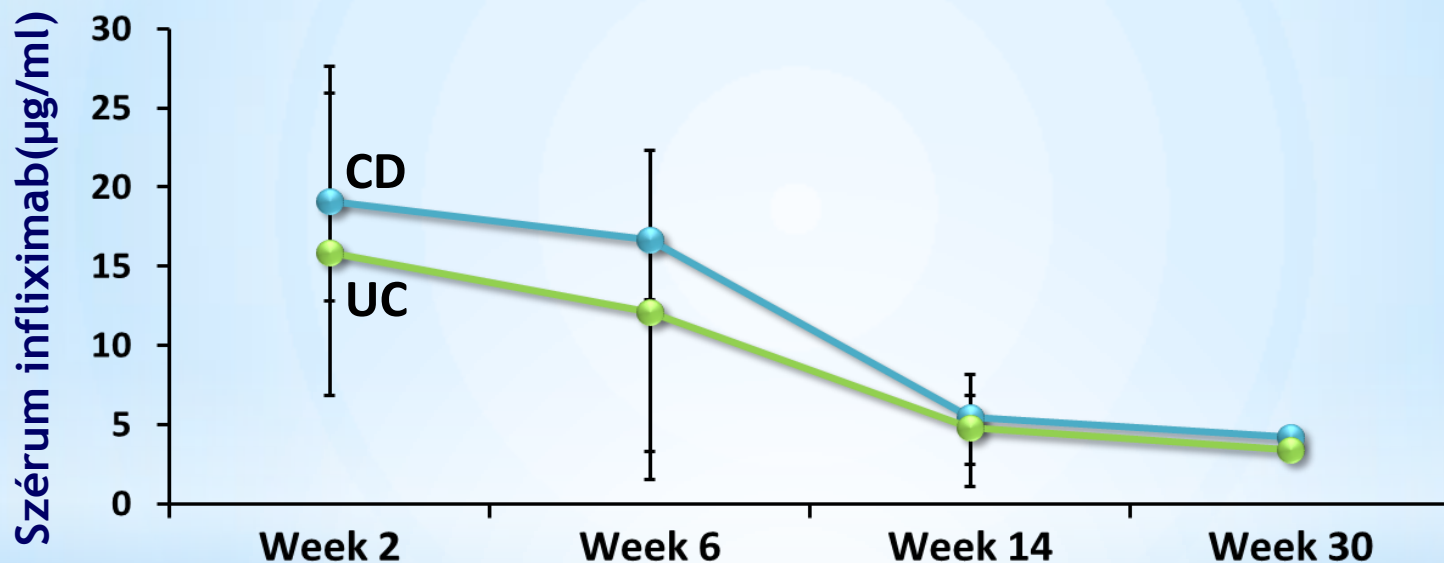
Beteg adatok

	Crohn betegség (CD) (N = 184)	Colitis ulcerosa (UC) (N= 107)
Férfi/Nő	82 / 102	62/45
Betegség kezdete, medián (IQT)	23 (19-34) év	28 (22-39) év
Időtartam, medián (IQT)	5 (2-11) év	4 (2-11) év
Alap aktivitás, medián (IQT)	CDAI: 321 (301-352) n=145 PDAI: 10 (6-11) n=56	MAYO: 9 (7-11) n=107 pMAYO: 7 (6-9) n=107
Lokalizáció (L1/L2/L3/L4/all L4)	16.8%/32.4%/ 49.1%/1.7%/7.9%	-
Colitis kiterjedtsége (E1/E2/E3)	-	8.4% / 32.7% / 51.1%
Klinikai viselkedés (B1/B2/B3)	58.7% / 21.2% / 20.1%	-
Perianális érintettség	35.0%	-
Korábbi sebészi beavatkozás	22.5%	-

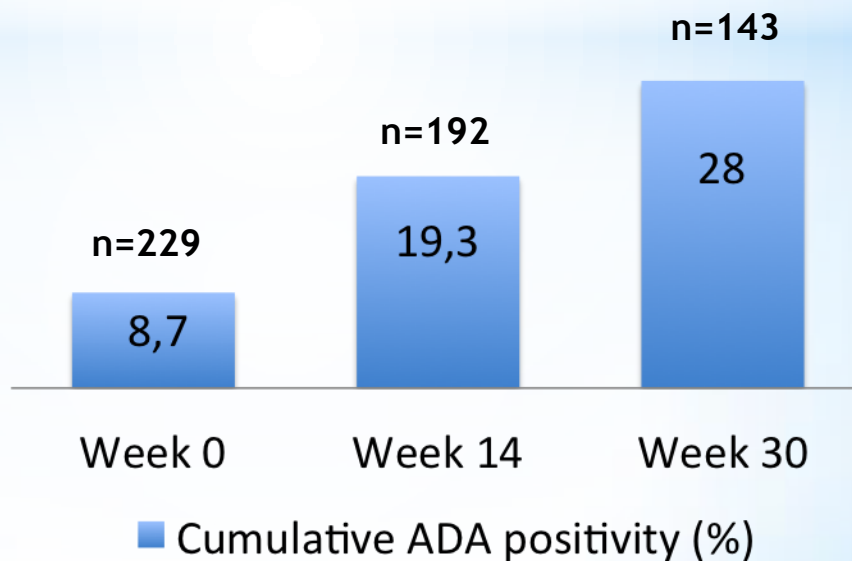
Korábbi és jelenlegi anti-inflammatorikus és immunmoduláns gyógyszerek

	CD (N = 184)	UC (N = 107)
Korábbi gyógyszerek		
5 aminoszalicilsav (5ASA)	84.6%	92.3%
Szteroid	81.0%	90.9%
Azathioprin (AZA)	87.4%	74.5%
Ciklosporin (CSA)	-	7.3%
TNF- α blokkoló	24.5%	14.0%
Jelenlegi gyógyszerek		
Szteroid	44.2%	66.4%
AZA	60.3%	51.4%

Infliximab völgykoncentráció és infliximab-elleni antitest szint



Összesített gyógyszer-elleni antitest szintek IBD-ben:



ADA = gyógyszer-elleni antitest

Gyógyszer-elleni antitest

	Alap állapot	14. hét	30. hét
IBD	20/229 (8,7%)	37/192 (19,3%)	40/143 (28,0%)
<i>Korábbi TNFα-gátló kezelés nélkül</i>	7/182 (3,8%)	25/155 (16,1%)	28/116 (24,1%)
<i>Korábbi TNFα-gátló kezeléssel</i>	13/47 (27,7%)	12/37 (32,4%)	12/27 (44,4%)

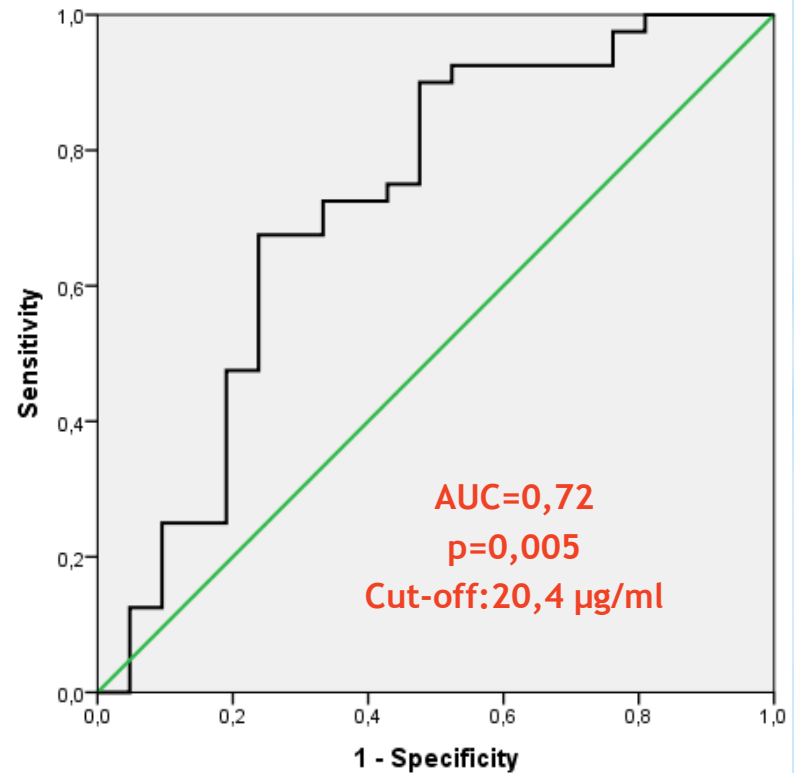
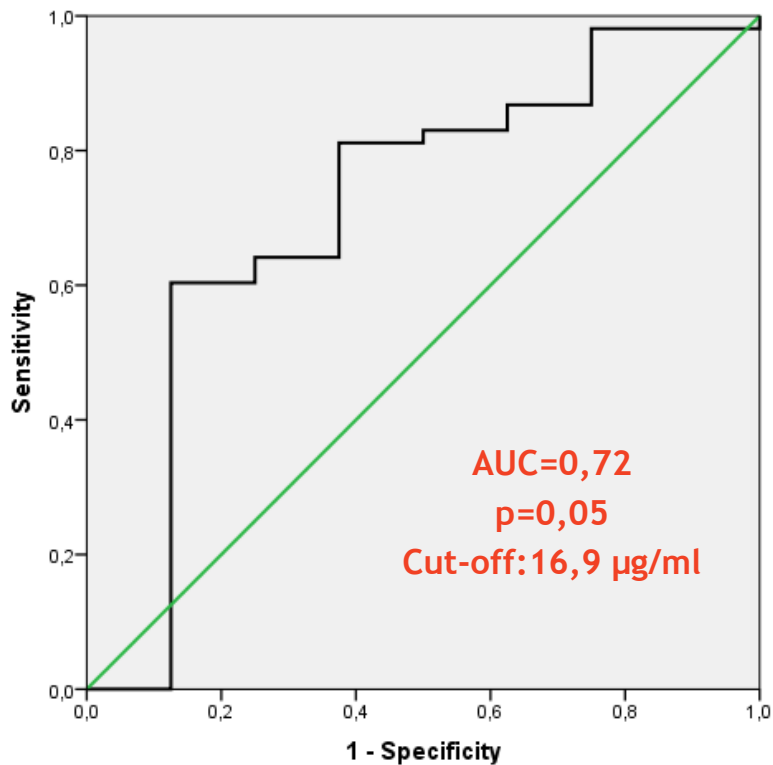
	Alap állapot	14. hét	30. hét
CD	13/142 (9,2%)	19/112 (17,0%)	21/82 (25,6%)
<i>Korábbi TNFα-gátló kezelés nélkül *</i>	5/110 (4,5%)	12/89 (13,5%)	14/67 (20,9%)
<i>Korábbi TNFα-gátló kezeléssel</i>	8/32 (25,0%)	7/23 (30,4%)	7/15 (46,7%)
UC	7/87 (8,0%)	18/80 (22,5%)	19/61 (31,1%)
<i>Korábbi TNFα-gátló kezelés nélkül *</i>	2/72 (2,8%)	13/66 (19,7%)	14/49 (28,6%)
<i>Korábbi TNFα-gátló kezeléssel</i>	5/15 (33,3%)	5/14 (32,4%)	5/12 (41,7%)

*** egyidejű AZA kezelés a TNF α -gátló naiv betegekben megakadályozta a korai gyógyszer-elleni antitest képződést (14. hét AZA-val: 11.2% vs. AZA nélkül 24.6%, p= 0.012), de ez a hatás a 30. hétre elveszett (29.8% vs. 21.2% ns).**

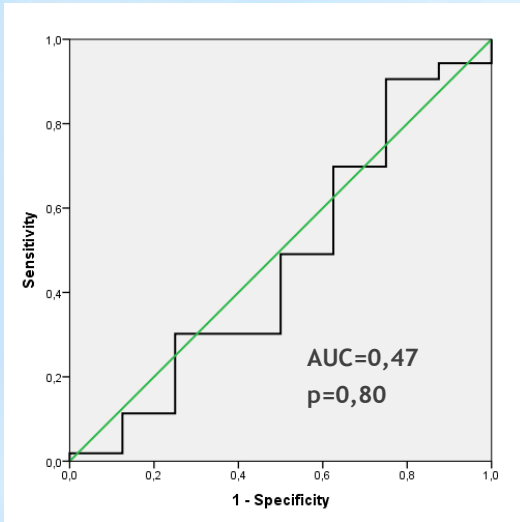
A 14. heti terápiás hatékonyság előre jelzése a 2. héten mért völgykoncentrációból Crohn-betegségben

Klinikai válasz a 14. héten

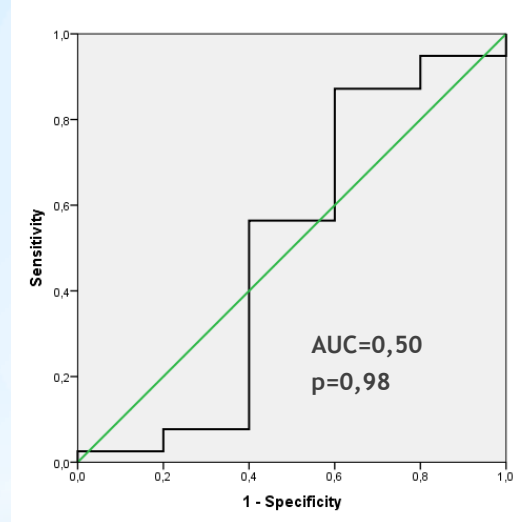
Klinikai remisszió a 14. héten



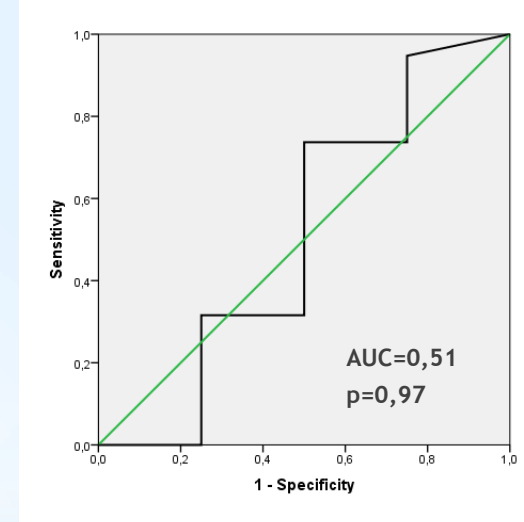
A 14., 30. és 54. heti terápiás hatékonyság előre jelzése a 6. héten mért völgykoncentrációból Crohn-betegségben



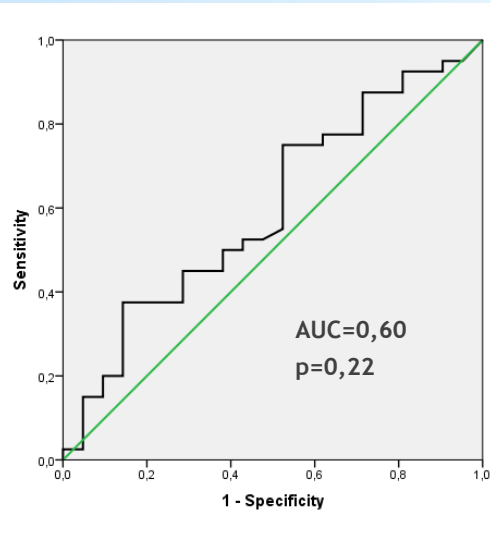
Klinikai válasz a 14. héten



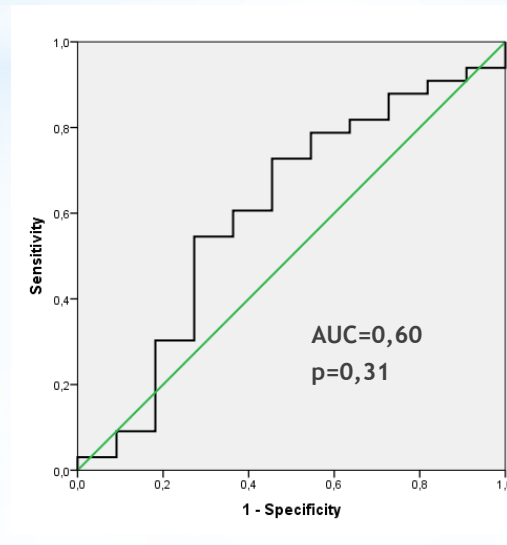
Klinikai válasz a 30. héten



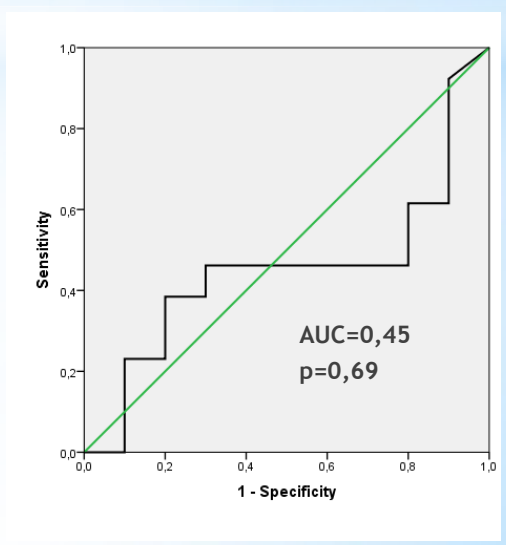
Klinikai válasz a 54. héten



Klinikai remisszió a 14. héten



Klinikai remisszió a 30. héten



Klinikai remisszió a 54. héten

A 14. heti klinikai remisszió előrejelzői Crohn-betegségben

$p=0,002$

$p<0,001$

37,3%

62,0%

68,8%

32,6%

Previous anti-TNF + Previous anti-TNF -

Normal CRP at week 14 +

Normal CRP at week 14 -

14 +

14 -

$p=0,04$

48,5%

66,9%

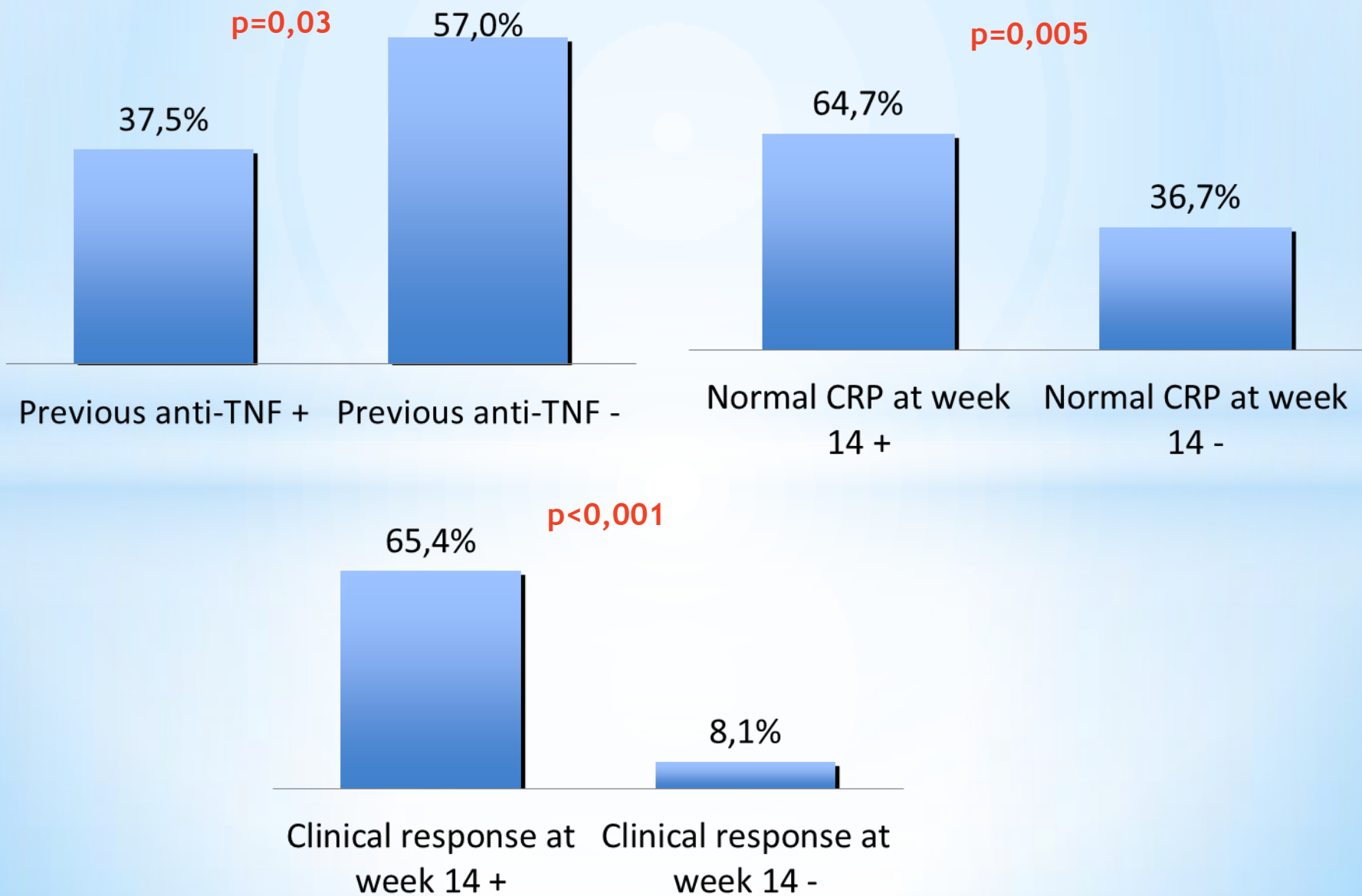
ADA =

gyógyszer-elleni antitest

ADA +

ADA -

A 30. heti klinikai remisszió előrejelzői Crohn-betegségben



A 54. heti klinikai remisszió előrejelzői Crohn-betegségben

$p=0,004$

20,8%

54,5%

Previous anti-TNF +

Previous anti-TNF -

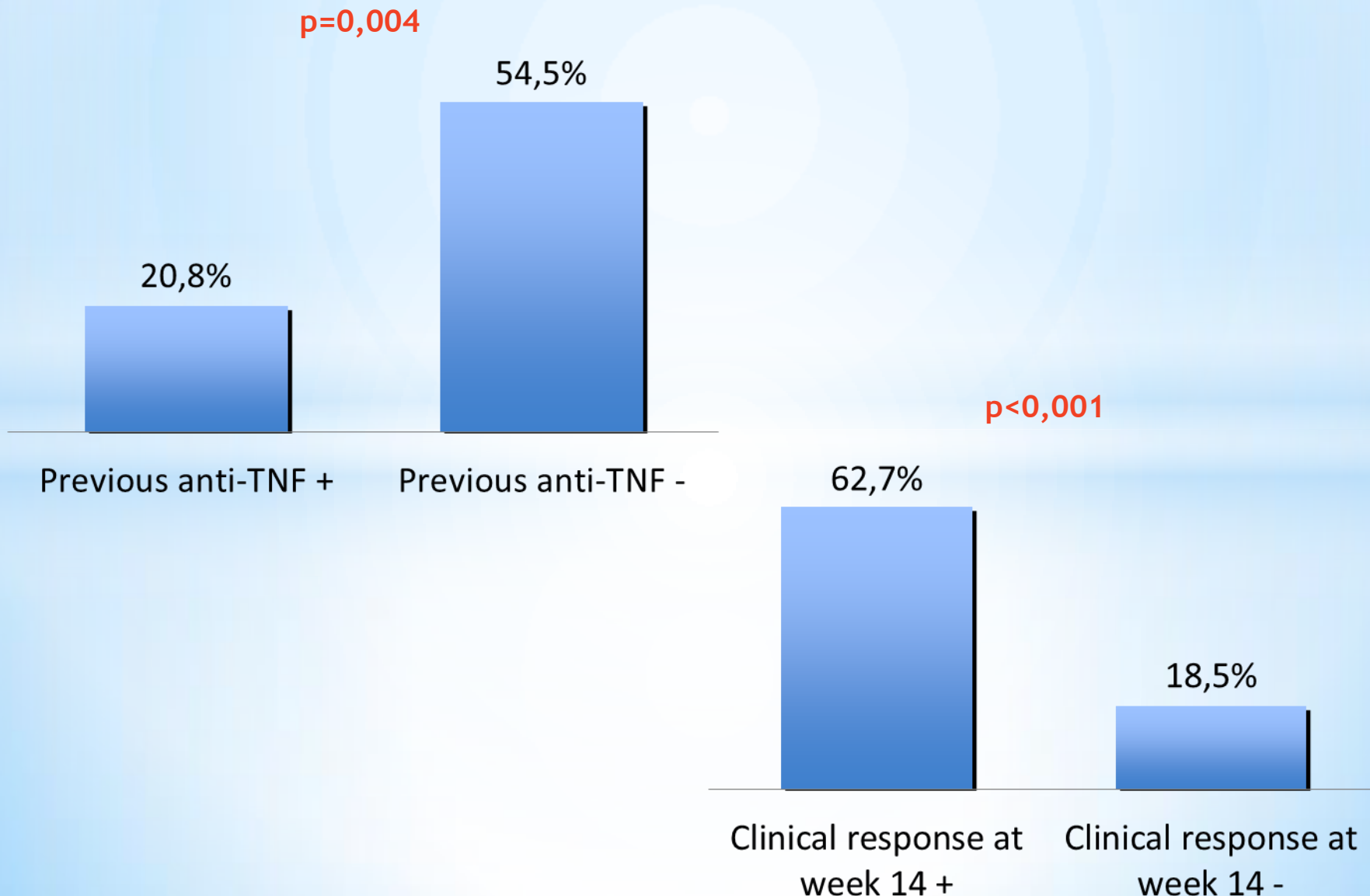
$p<0,001$

62,7%

18,5%

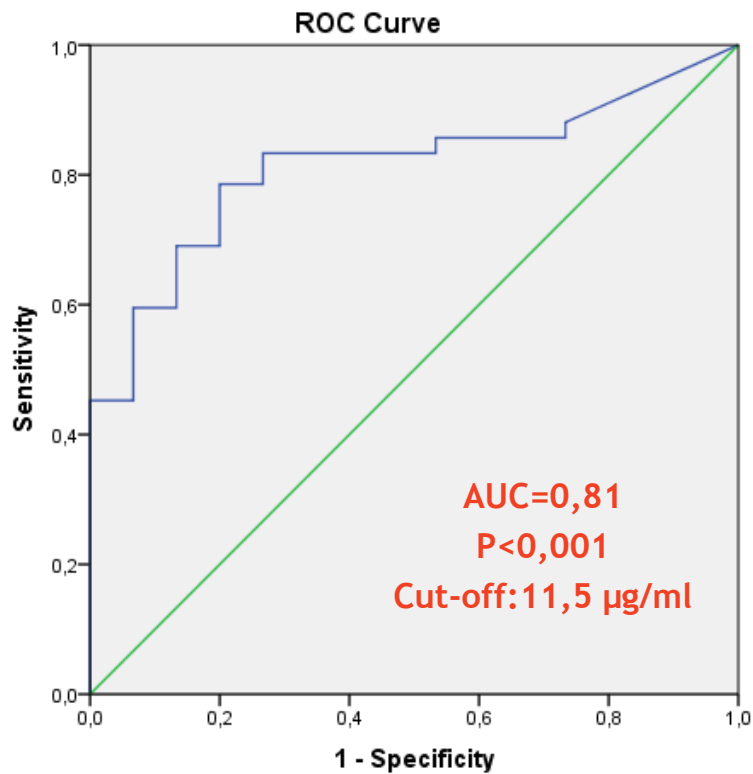
Clinical response at
week 14 +

Clinical response at
week 14 -



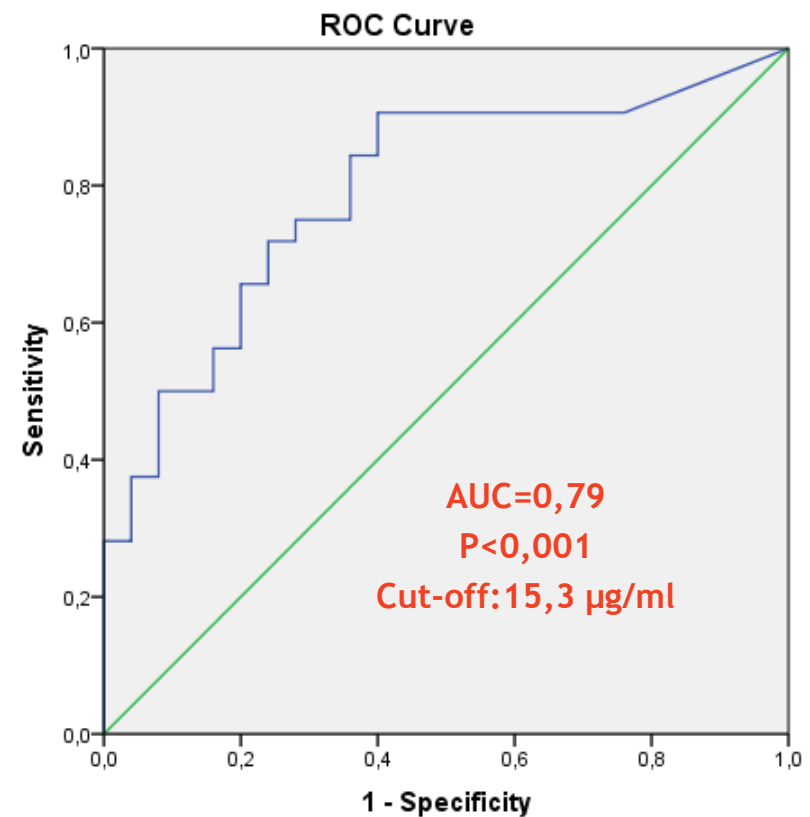
A 14. heti terápiás hatékonyság előre jelzése a 2. héten mért völgykoncentrációból colitis ulcerosában

Klinikai válasz a 14. héten



Diagonal segments are produced by ties.

Klinikai remisszió a 14. héten

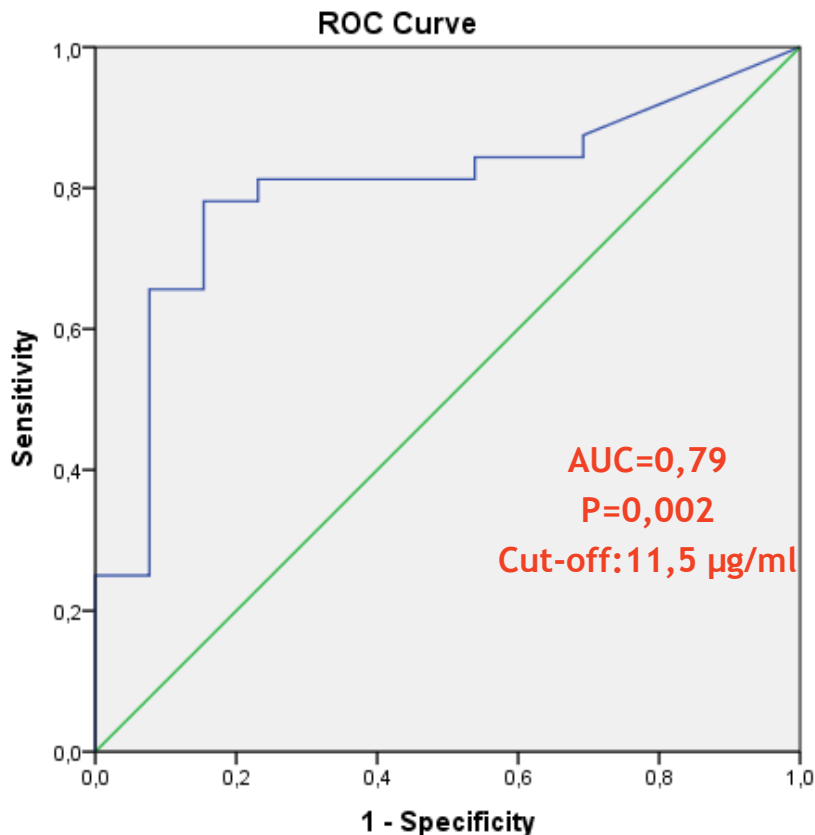


Diagonal segments are produced by ties.

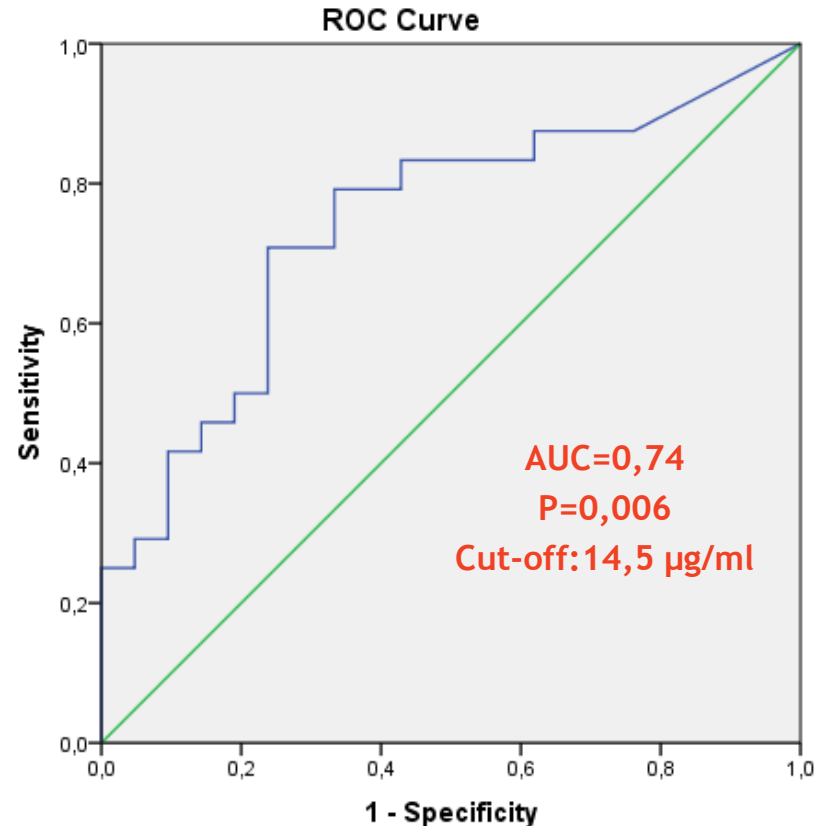
A 30. heti terápiás hatékonyság előre jelzése a 2. héten mért völgykoncentrációból colitis ulcerosában

Klinikai válasz a 30. héten

Klinikai remisszió a 30. héten

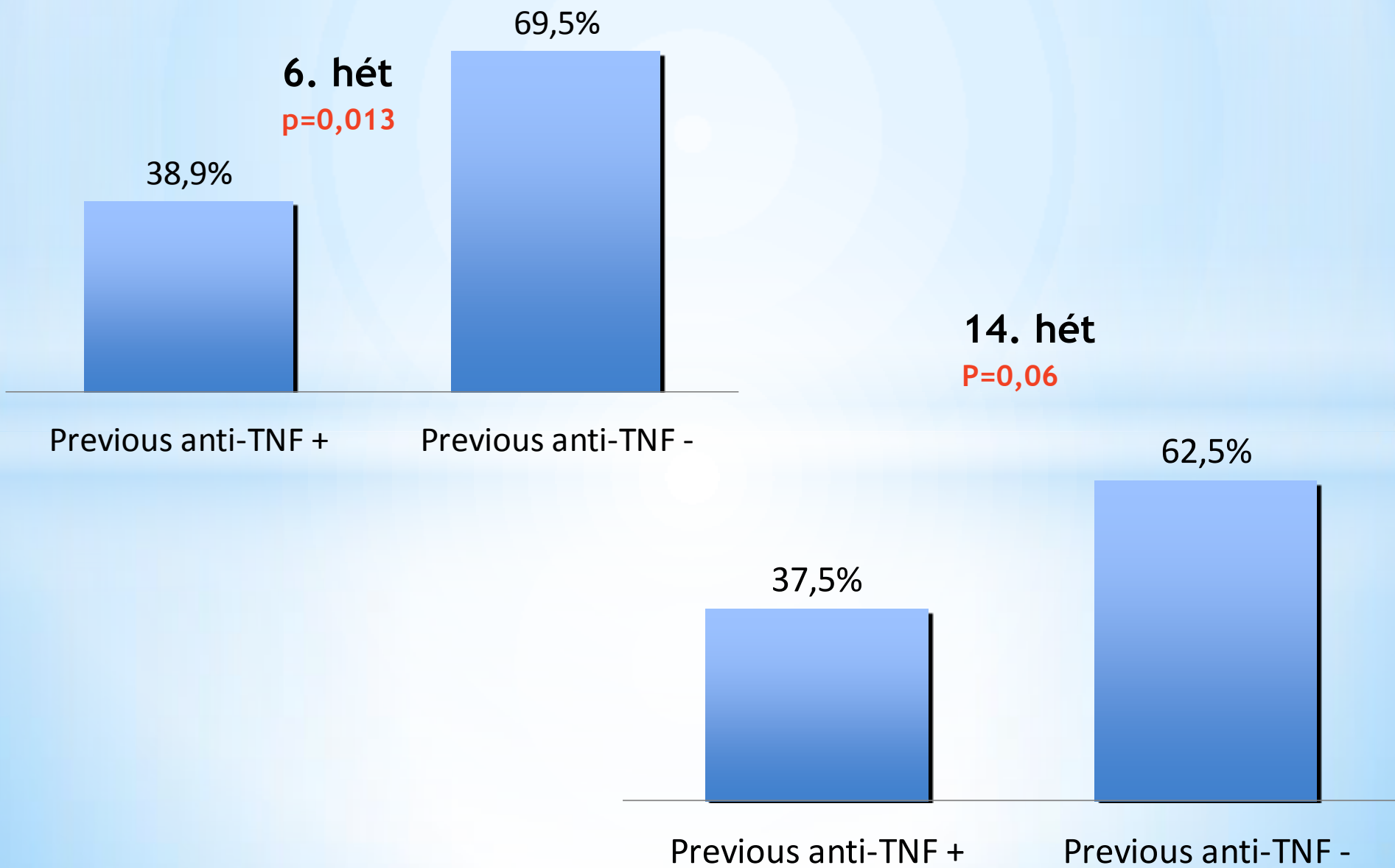


Diagonal segments are produced by ties.

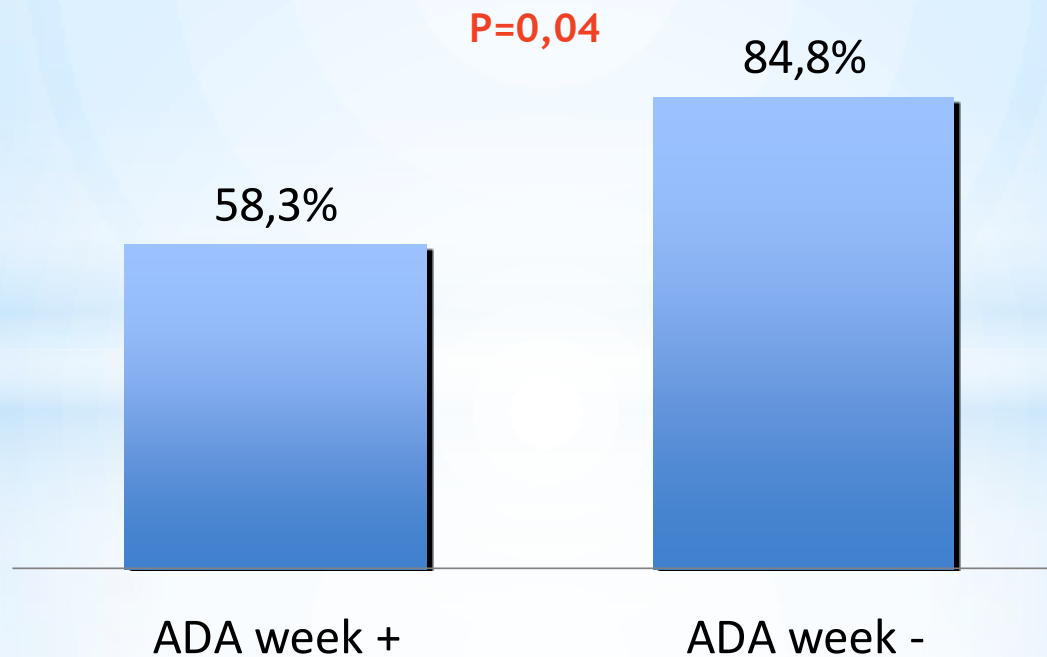


Diagonal segments are produced by ties.

A 6. és a 14. heti klinikai remisszió előrejelzői colitis ulcerosában



A 30. heti klinikai válasz előrejelzői colitis ulcerosában



A klinikai remisszióban hasonló tendencia volt megfigyelhető

Konklúzió

- **A 2. héten mért völgykoncentráció CD-ben kizárólag a rövid távú klinikai kimenetellel volt összefüggésben, UC-ban pedig a rövid és a közepes távú kimenetellel is**
- **CD-ben a közepes távú klinikai kimenetelt előre jelezte: a 14. heti magas gyógyszer-elleni antitest szint, a korai klinikai válasz és a remisszió, a 14. heti normális CRP szint és a korábbi TNF- α kezelés**
- **A korábbi TNF- α kezelés befolyásolta a klinikai hatékonyságot CD-ben és UC-ban**

Döntési algoritmus TNF- α gátló kezelés eredménytelensége esetén

Eredménytelen TNF- α gátló kezelés

Gyógyszerszint mérés és gyógyszer elleni antitest (ADA) meghatározás

alacsony
gyógyszerszint
ADA -

Dózis emelés
vagy
gyakoribb
adagolás

alacsony
gyógyszerszint
ADA +

terápiás
gyógyszerszint
ADA +

Váltás másik TNF- α gátlóra

terápiás
gyógyszerszint
ADA -

Váltás más típusú
biológiai terápiára
(anti IL-6
tocilizumab, anti
CD20 rituximab)

Köszönöm a figyelmet !