

## КВАНТИТАТИВНО ОДРЕДУВАЊЕ НА КАЛПРОТЕКТИН ВО АСЦИТ КАЈ ПАЦИЕНТИ СО СПОНТАН БАКТЕРИСКИ ПЕРИТОНИТИС

Фана Личоска-Јосифовиќ<sup>1</sup>, Мери Трајковска<sup>1</sup>, Калина Гривчева-Старделова<sup>1</sup>, Викторија Чалоска-Ивановска<sup>1</sup>, Розалинда Попова-Јовановска<sup>1</sup>, Лидија Петковска<sup>2</sup>, Емилија Петровска<sup>3</sup>, Сефедин Биљали<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Универзитетската клиника за гастроентерохепатологија, Скопје, Република Северна Македонија

<sup>2</sup> Универзитетската клиника за токсикологија, Скопје, Република Северна Македонија

<sup>3</sup> Институтот за клиничка биохемија, Скопје, Република Северна Македонија

**Цитирање:** Личоска-Јосифовиќ Ф, Трајковска М, Гривчева-Старделова К, Чалоска-Ивановска В, Попова-Јовановска Р, Петковска Л, Петровска Е, Биљали С. Квантитативно одредување на калпротектин во асцит кај пациенти со спонтан бактериски перитонитис. Арх Ј Здравје 2020;12(1):23-32

**Клучни зборови:** калпротектин, спонтан бактериски перитонитис, црnodробна цирроза

**\*Кореспонденција:** Фана Личоска-Јосифовиќ, Универзитетската клиника за гастроентерохепатологија, Скопје; Република Северна Македонија  
e-mail: fanili71@yahoo.com

**Примено:** 9-ное-2019; **Ревидирано:** 28-дек-2019; **Прифатено:** 30-дек-2019; **Објавено:** 15-јан-2020

**Печатарски права:** © 2020 Фана Личоска-Јосифовиќ. Оваа статија е со отворен пристап дистрибуирана под условите на некалоризирана лиценца, која овозможува неограничена употреба, дистрибуција и репродукција на било кој медиум, доколку се цитираат оригиналните(ите) автор(и) и изворот.

**Конкурентски интереси:** Авторот изјавува дека нема конкурентски интереси.

### Извадок

Спонтаниот бактериски перитонитис (СБП) кај пациентите со црnodробна цирроза е новонастаната, спонтанна бактерииска инфекција на стерилна асцитна течност, во отсуство на интраабдоминални извори на инфекција или малигнитет. Најсензитивен показател за поставување на дијагноза е бројот на полиморфнонуклеарни клетки (ПМНК) >250 во 1 мл асцитна течност (рочно микроскопско или автоматизирано пребројување) и/или кога во микробиолошката култура биде изолиран еден бактериски вид. Цел на трудот е да се одреди концентрацијата на калпротектин во асцит кај пациентите со СБП и не-СБП, да се споредат просечните вредности на Turcotte-Pugh II и MELD скорот кај пациентите со СБП и не-СБП и просечните вредности на С-реактивниот протеин во серум и во асцит во испитуваните групи. Материјали и методи. Во оваа проспективно-аналитичко-опсервациона пилот студија беа вклучени 30 пациенти со црnodробна цирроза и асцит, поделени во две групи, СБП и не-СБП. Квантитативното мерење на калпротектин во асцит се вршеше со тестот Quantum Blue Calprotectin Ascites (LF-ASC25). Тестот е дизајниран за селективно мерење на антигенот на калпротектинот (MRP8/14) со директен сендвич имуносеј. Примероците од асцитот се разредуваа со Chase Buffer во однос 1:5 и по 12 минути инкубација на собна температура, интензитетот на сигналот на линијата за тестирање и контролната линија се мереа квантитативно со BÜHLMANN Quantum Blue®Reader. Собраните податоци се обработија со помош на статистичкиот програм SPSS 25 за Windows. Резултати. Во нашата студија просечната вредност на калпротектин кај пациентите со СБП изнесуваше 1.4 µg/mL. Најниската вредност на калпротектин во испитуваната група беше регистрирана кај еден пациент со вредност од 0.61 µg/mL, додека највисока вредност од 1.81 µg/mL кај четири пациенти. Резултатите покажаа повисоки вредности на калпротектин во асцит кај пациентите со алкохолна болест на црниот дроб во споредба со останатите етиологии. Рефракторен асцит се регистрира кај 60.0% од испитаниците, а само кај еден пациент (6.7%) се регистрира Klebsiella pneumoniae во микробиолошката анализа на асцитот. Според Child-Turcotte-Pugh II класификација сите пациенти од испитуваната група беа класа C, додека просечната вредност на MELD скорот изнесуваше 29.8±6.14. Разликата помеѓу просечните вредности на С-реактивниот протеин во серум и во асцит кај пациентите со СБП беше статистички сигнификантна во споредба со не-СБП. Заклучок. Квантитативното одредување на калпротектинот во асцит со тестот Quantum Blue Calprotectin Ascites (LF-ASC25) може да се користи како алтернатива на полиморфнонуклеарните клетки (ПМНК) во асцит. СБП се јавува кај пациенти со сериозна црnodробна дисфункција пресметана според Child-Turcotte-Pugh II скорот и MELD скорот. Вредноста на С-реактивниот протеин во серум и во асцит кај пациентите со СБП немаше високи вредности, но сепак беше утврдена сигнификантна разлика во споредба со пациентите со не-СБП.

### CLINICAL SCIENCE

## QUANTITATIVE DETERMINATION OF CALPROTECTIN IN ASCITES IN PATIENTS WITH SPONTANEOUS BACTERIAL PERITONITIS

Fana Lichoska-Josifovikj<sup>1</sup>, Meri Trajkovska<sup>1</sup>, Kalina Grivceva-Stardelova<sup>1</sup>, Viktoria Caloska-Ivanovska<sup>1</sup>, Rozalinda Popova-Jovanovska<sup>1</sup>, Lidija Petkovska<sup>2</sup>, Emilija Petrovska<sup>3</sup>, Sefedin Biljali<sup>3</sup>

<sup>1</sup> University Clinic of Gastroenterohepatology, Medical Faculty, Skopje, Republic of North Macedonia

<sup>2</sup> University Clinic of Toxicology, Medical Faculty, Skopje, Republic of North Macedonia

<sup>3</sup> Institute of Clinical Biochemistry, Medical Faculty, Skopje, Republic of North Macedonia

### Abstract

**Citation:** Kochubovski M, Petrova A, Kostova A, Chibisheva E, Karadzovski Z. Health risk assessment of drinking water in correlation with water-related diseases. Arch Pub Health 2020; 12 (1): 23-32 (Macedonian)

**Key words:** drinking water, health risk assessment, safety, water related diseases

**\*Correspondence:** Mihail Kochubovski-Institute of Public Health in Republic of Republic of North Macedonia. E-mail: kocubov58@gmail.com

**Received:** 15-Jun-2019; **Revised:** 7-Sep-2019;

**Accepted:** 28-Dec-2019; **Published:** 15-Jan-2020

**Copyright:** © 2020. Mihail Kochubovski. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited.

**Competing Interests:** The author has declared that no competing interests

Spontaneous bacterial peritonitis (SBP) in patients with liver cirrhosis is a newly developed, spontaneous bacterial infection of sterile ascites fluid, in the absence of intraabdominal sources of infection or malignancy. The most sensitive indicator of diagnosis is when the polymorphonuclear cell count (PMNC) is >250 in 1 ml ascites fluid (manual microscopic or automated counting) and/or when a bacterial strain is isolated in microbiological culture. The objectives of our pilot study were to determine the concentration of calprotectin in ascites in patients with SBP and non-SBP with BÜHLMANN Quantum Blue®Reader, whether there was a significant difference between the average values of Turcotte-Pugh II and MELD score and to determine average values for CRP serum and ascites in the studied groups. Materials and methods. This prospective analytical observational pilot study included 30 patients with liver cirrhosis and ascites, divided into two groups, SBP and non-SBP. The quantitative measurement of calprotectin in ascites was performed with the Quantum Blue Calprotectin Ascites (LF-ASC25) test. The test is designed to selectively measure calprotectin antigen (MRP8/14) with direct sandwich immunoassay. The ascites samples were diluted with Chase Buffer 1:5 and after 12 minutes incubation at room temperature, the test line signal intensity and the control line were quantitated with BÜHLMANN Quantum Blue®Reader. The collected data were processed using the SPSS 25 statistical software for Windows. Results. In our study the average value of calprotectin in patients with SBP was 1.4 µg/mL. The lowest value of calprotectin in the study group was recorded in one patient at 0.61 µg/mL, while the highest value was 1.81 µg/mL in four patients. The results showed higher values of calprotectin in ascites in patients with alcoholic liver disease compared to other etiologies. Refractive ascites was reported in 60.0% of the subjects and only one patient (6.7%) was reported with Klebsiella pneumoniae in the microbiological analysis of ascites. According to the Child-Turcotte-Pugh II classification, all patients in the study group were class C, while the mean MELD score was 29.8±6.14. The difference between the average values of CRP in serum and ascites in patients with SBP was statistically significant compared to non-SBP. Conclusion. The quantitative determination of calprotectin in ascites by the Quantum Blue Calprotectin Ascites (LF-ASC25) assay can be used as an alternative to the determination of PMNC in ascites. SBP occurs in patients with severe hepatic dysfunction calculated according to the Child-Pugh II score and the MELD score. Serum and ascites C-reactive protein values were not significantly elevated in patients with SBP, but were significantly different from non-SBP patients.

## Вовед

Спонтаниот бактериски перитонитис (СБП) кај пациентите со црнодробна цироза е новонастаната, спонтанa бактериска инфекција на стерилна асцитна течност, во отсуство на интраабдоминални извори на инфекција или малигнитет.<sup>1,2,3</sup>

Прв пат е опишан во 1964 година од страна на Conn, со висока стапка на mortalитет од 90%<sup>4</sup>. Денес со навремено поставување на дијагнозата и соодветен антибиотски третман, mortalитетот е сведен на 20-30%. Годишната стапка на рецидиви на СБП е 70%, а едногодишното преживување по првата епизода се движи од 30% до 40%<sup>4,5,6</sup>.

Главен фактор во патогенезата на СБП е бактериската транслокација (БТ) на цревните бактерии или нивните производи од луменот на црево во мезентеричните лимфни јазли, лимфната циркулација, системската циркулација и/или екстраинтестиналните органи во перитонеалната шуплина<sup>7-14</sup>.

Најсензитивен показател за поставување на дијагнозата е бројот на полиморфонуклерани клетки (ПМНК)  $\geq 250$  во 1 мл асцитна течност (рачно микроскопско или автоматизирано пребројување) и/или кога во микробиолошката култура ќе биде изолиран еден бактериски вид<sup>15,16,17</sup>.

Иако одредувањето на бројот на ПМНК клетки во асцитот останува златен стандард за поставувањето на дијагноза на СБП, последниве години истражувањата се насочени кон пронаоѓање нови дијагностички и прогностички маркери. Како потенцијални маркери присутни во асцитната течност се издвојуваат: проинфламаторните цитокини (тумор некротизирачки фактор -TNF и интерлеукинот 6 IL-6), лактоферинот, прокалцитонинот, калпротектинот, С-реактивниот протеин (CRP) и прокоагулантните фактори (ткивен тромбoplastин, ендотоксин и колаген). Дел од нив се комерцијално недостапни, дел со ниска осетливост, или висок ризик од лажно негативни резултати, особено кај пациентите со низок број на неутрофили. Досега не е докажана вредноста на ниту еден маркер сам за себе како оптимален за дијагноза на СБП,

што укажува на потребата од дополнителни студии. Исто така треба да се напомене дека класичните техники на микробиолошката култура се негативни во 65% од примероците на асцитна течност со присутни неутрофили<sup>18,19,20</sup>.

Вредноста на калпротектинот во асцит како дијагностички и прогностички фактор за СБП кај пациентите со црнодробна цироза е објавена во неколку трудови<sup>21-38</sup>.

Калпротектинот е хетеротримерен протеин со молекуларна тежина од 36 kDa, составен од два тешки и еден лесен синцир, нековалентно поврзани со калциум и цинк. Изолиран е речиси од секоја телесна течност во човечкото тело (плазма, плунка, урина, цереброспинална течност, асцит и фецес), ткива и клетки. За време на воспалителниот процес, калпротектинот директно се ослободува од леукоцитите. Во неутрофилите, се наоѓа во екстрализозомалниот цитозол во концентрација од 5-15 mg/ml, и претставува 60% од сите цитосолубилни протеини што се наоѓаат во клеточната цитоплазма на неутрофилните гранулоцити<sup>39-44</sup>.

Целта на трудот беше да се одреди концентрацијата на калпротектин во асцит кај пациентите со СБП и не-СБП, и да се споредат просечните вредности на Turcotte-Pugh II и MELD скорот кај пациентите со СБП и не-СБП и просечните вредности на С-реактивниот протеин во серум и во асцит во испитуваните групи.

## Материјал и методи

Во оваа проспективно, аналитичко-опсервациска пилот студија која се спроведе на Универзитетската клиника за гастроентерохепатологија во Скопје беа вклучени 30 пациенти со црнодробна цироза и асцит, поделени во две групи. Поделбата на групите беше направена во зависност од бројот на полиморфонуклеарни клетки (ПМНК) во асцитот. Во првата група беа вклучени 15 пациенти со број на ПМНК  $\geq 250$  во 1 мл асцитна течност (СБП), а во втората група 15 пациенти со број на ПМНК  $< 250$  во 1 мл асцитна течност (не-СБП).

Пациентите кои беа вклучени во студијата беа на возраст >18–70 години. Критериуми за невклучување во студијата беа: акутна црнодробна инсуфициенција, хируршка интервенција на стомакот во последните 3 месеци, инфективен плеврален излив, карциноматоза на перитонеум, хеморагичен асцит, хепатоцелуларен карцином и пациенти кои примале антибиотик најмалку 2 недели пред вклучувањето во студијата.

По претходно запознавање со структурата, содржината и целта на студијата, на пациентите им беше кажано дека за да учествуваат во неа треба да ја потпишат понудената информирана согласност. Протоколот на студијата беше во согласност со етичките принципи на Декларацијата од Хелсинки, и таа беше приложена, разгледана и одобрена од Етичката комисија на Медицинскиот факултет при Универзитетот „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје.

Парацентезата се изведе под асептични услови кај пациент во лежечка позиција и пункција во лев или десен долен квадрант на стомакот, со ултразвучна визуелизација (ниеден пациент немаше компликации поврзани со дијагностичката парацентеза). Сите примероци за дијагностичко тестирање веднаш беа испратени во Централната клиничка лабораторија. Од вкупно 20 мл асцит, 5 мл се користеа за автоматско броење на ПМНК, 5 мл за микробиолошка култура (bottle method), 5 мл за квантитативно одредување на калпротектин и 5 мл за биохемиска анализа на асцитот (С-реактивен протеин, вкупни протеини, албумини, глобулини). Истовремено за потребите од биохемиските анализи на крв се правеше венепункција на 10 мл крв.

Квантитативното мерење на калпротектин во асцит како маркер за покачено ниво на ПМНК во асцит се вршеше со тестот Quantum Blue Calprotectin Ascites (LF-ASC25), со помош на Quantum Blue Reader (читач).

Принцип на тестот: Тестот е дизајниран за селективно мерење на антигенот на калпротектин (MRP8/14) со директен сендвич имуноесеј. Мембраната за тестирање е обложена со првото моно-

клонално антитело (mAb), кое е специфично за фаќање на калпротектинот. Второто моноклонално антитело го конјугира калпротектинот со колоидно злато и потоа го пушта во системот на реакција по додавањето на разредениот примерок од асцитот. Анти/калпротектинот-калпротектинот конјугиран со злато се врзува за анти-калпротектин антителата со која е обложена мембраната (тест линија; тест лента), а преостанатиот слободен анти-калпротектин конјугиран со злато се врзува за goat anti-mouse антитела со која е обложена мембраната за испитување (контролна линија; контролна лента). Примероците од асцитот се разредуваат со Chase Buffer во однос 1:5 и по 12 минути инкубација на собна температура, интензитетот на сигналот на линијата за тестирање и контролната линија се мереа квантитативно со BÜHLMANN Quantum Blue® Reader.

Процедура на тестот: Собраните примероци на асцитот се чуваат во стерилни епрувети во фрижидер на температура 20°C безкакви било хемиски или биолошки адитиви. Постојат 2 методи за читање на тестот: со внатрешен тајмер и без внатрешен тајмер. Ние ја користевме првата метода во која скенирањето започнуваше автоматски по 12 минути (720 секунди). Опсегот на концентрациите на калпротектинот во асцитот се движеа од 0,18 до 1,80 µg/mL.

MELD скор (Model for End-Stage Liver Disease) се пресметуваше според формулата:  $MELD = [(0,957 \times \ln \text{Creatinin}) + (0,378 \times \ln \text{Bilirubin}) + (1,12 \times \ln \text{INR}) + (0,643) \times 10]$ .<sup>45</sup> Се користи за да се предвиди тримесечниот ризик од смрт кај пациентите со цироза и компликации, како што се варикозно крвавење, спонтан бактериски перитонитис, акутна хепатална инсуфициенција и алкохолен хепатитис. Ние ја користевме ревизијата на Child-Turcotte-Pugh скор според Angermayr и сор.<sup>46</sup> која вклучи шест параметри: албумин и билирубин во крв, количина на асцит, степен на енцефалопатија, протромбинско време и креатинин во серум. Го предвидува едногодишното преживување пресметано во проценти: 100% преживување (класа А), 80% (класа В) и 45% (класа С).

Собраните податоци се обработија со помош на статистичкиот програм SPSS 23 for Windows. Базите на податоци се формираа со примена на специфични компјутерски програми наменети за таа намена. Нивната обработка се изврши со помош на стандардни дескриптивни и аналитички биваријантни и мултиваријантни методи. Атрибутивните статистички серии се анализираа со одредување на коефициент на односи, пропорции, стапки и со одредување на статистичката значајност меѓу откриените разлики. Нумеричките серии се анализираа со мерки на централна тенденција и со мерки на дисперзија на податоците. Статистичка сигнификантност меѓу нумеричките параметри во двете групи се анализираше со Mann-Whitney U тест. Вредноста на P помала од 0,05 покажа статистички значителна разлика.

## Резултати

Во нашата студија беа вклучени 30 пациенти со црнодробна цироза и асцит. Просечната возраст во ИГ беше 60,6 години со SD  $\pm 12,3$ , а во КГ 59,9 со SD  $\pm 12,6$ . Разликата која се регистрираше помеѓу просечните возрасти според Mann-Whitney U тестот беше статистички несигнификантна за  $p < 0,5$  и според возраста на пациентите се работеше за хомогени групи.

Од вкупно 15 пациенти во ИГ, 9 (60,0%) беа од машки пол, а 6 (40%) од женски, додека во ОКГ 10 (66,7%) пациенти беа од машки пол, а 5 (33,3%) од женски; процентуалната разлика однос на полот и во двете групи беше статистички несигнификантна (Difference test,  $p = ,7034$ ) (табела. 1).

**Табела 1.** Приказ на процентуална застапеност на испитаниците според пол, етиологија, степен на црнодробната дисфункција пресметана според Child-Turcotte-Pugh II скор и процентуална застапеност на рефракторниот асцит.

	<b>Испитувана група</b>		<b>Контролна група</b>		p
<b>пол</b>	број	%	број	%	
мажи	9	60,0	10	66,7	>0,05
жени	6	40,0	5	33,3	
<b>етиологија</b>					
алкохол	8	53,3	6	40,0	$p < 0,05$
криптогена	3	20,0	3	20,0	
ХБВ+	2	13,3	3	20,0	
имуногена	2	13,3	2	13,3	
НСV+	0	0	1	6,7	
<b>Child-Turcotte-Pugh II</b>					
C	15	100	10	66,7	$p = 0,0144$
B			5	33,3	
<b>Рефракторен асцит</b>					
не	6	40,0	14	93,3	
да	9	60,0	1	6,7	$p = 0,0020$

Во однос на етиологијата на црнодробната цироза и во двете групи доминираше алкохолот (Difference test,  $p < 0,05$ ) (табела бр. 1).

Според Child-Turcotte-Pugh II класификација сите пациенти од испитуваната група беа класа C, додека во контролната група 66,7% од пациентите беа класа C, а 33,3% класа B (Difference test,  $p = 0,0144$ ) (таб. 1). Просечната вредност на MELD скорот во испитуваната група изнесуваше  $29,8 \pm 6,14$ , а во контролната

група  $23,9 \pm 6,24$  (табела бр. 2, граф.2). Според Mann-Whitney U тест разликата помеѓу просечните вредности беше статистички сигнификантна за  $p < 0,05$  ( $p = 0,02926$ ) (табела бр. 3).

Рефракторен асцит беше регистриран кај 60,0% во ИГ, а кај 6,7% во КГ (Difference test,  $p = 0,0020$ ) (таб.1).

Само еден пациент (6,7%) од испитуваната група имаше позитивна микробиолошка култура на асцитот (*Klebsiella pneumoniae*).

**Табела 2.** Приказ на просечна вредност на испитуваните варијабли

Контролна група	N	просек	минимум	максимум	Стд.Дев
MELD	15	23,9	10,0	33,0	6,24347
калпротектин	15	0,28	0,18	0,5	0,110095
CRP асцит	15	0,6	0	3,0	0,985611
CRP серум	15	2,5	0	14,0	3,961722
Испитувана група	N	просек	минимум	максимум	Стд.Дев
MELD	15	29,8	16,0	40,0	6,143522
калпротектин	15	1,4	0,87	1,81	0,3882
CRP асцит	15	3,3	1,0	20,0	5,04582
CRP серум	15	11,4	0,82	57,9	14,04044

**Табела 2.** Приказ на разликата помеѓу просечните вредности на MELD скорот и C-ре активниот протеин во серум во испитуваните групи според Mann-Whitney U Тест

	Rank Sum – ИГ	Rank Sum - КГ	U	Z	p-value
MELD	289,5	175,5	59,5	2,1776	0,02926
Калпротектин ИГ	345	120	12	464,554	<,00001
CRP во асцит	305,0	160,0	40,0	2,98642	0,002823
CRP во серум	309,0	156,0	36,0	3,15233	0,001620

Просечната вредност на калпротектин во КГ изнесуваше  $0,28 \pm 0,11$ , а во ИГ  $1,4 \pm 0,38$  (таб.2). Според Mann-Whitney U тест разликата помеѓу просечните вредности беше статистички сигнификантна за  $p < 0,05$  ( $<,00001$ ) (таб.3, граф.1).



Графикон 1.

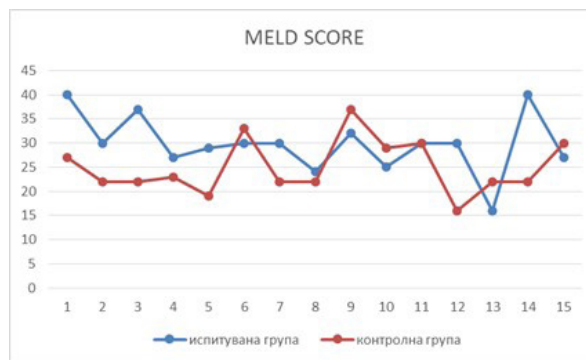
Просечната вредност на С-реактивен протеин во асцит во ИГ изнесуваше  $3,3 \pm 5,0$  во распон од 1 до 20, а во КГ  $0,6 \pm 1,0$  во распон од 0 до 3 (таб. 2). Според Mann-Whitney U тест разликата помеѓу просечните вредности беше статистички сигнификантна за  $p < 0,05$  ( $p = 0,0028$ ) (таб. 3).

Просечната вредност на С-реактивниот протеин во серум во ИГ изнесуваше  $11,4 \pm 14,0$  во распон од 0,82 до 57,9, а во КГ  $25 \pm 4,0$  во распон од 0 до 14 (таб. 2). Според Mann-Whitney U тест разликата помеѓу просечните вредности беше статистички сигнификантна за  $p < 0,05$  ( $p = 0,0016$ ) (таб. 3).

## Дискусија

Спонтаниот бактериски перитонитис кај пациентите со црнодробна цироза и асцит е една од најчестите и најтешки инфективни компликации.

Брзата дијагноза и рано започнување со антибиотски третман се клучни стратегии за подобрување на прогнозата кај овие пациенти<sup>1-4</sup>. Според клиничките препораки за третман на пациенти со црнодробна цироза и асцит, сите пациенти при прием во болница треба да се подложат на дијагностичка парацентеза и биохемиско/микробиолошко испитувања на асцитот со цел за да се исклучи/потврди СБП. Дијагностичка парацентеза треба да се изведе и кај пациенти со гастроинтестинално крвавење, шок, треска или други знаци на системско воспаление, како и кај пациенти со влошена функција на црниот дроб и бубрезите (хепаторенален синдром), како и кај хепатална енцефалопатија<sup>15,16,17</sup>.



Графикон 2.

Целта на нашата пилот студија беше квантитативно мерење на калпротектинот во асцит кај пациентите со СБП и не-СБП со BÜHLMANN Quantum Blue® Reader. Истовремено кај испитуваните групи се направи статистичка обработка на податоците со цел да се види дали има сигнификантна разлика помеѓу просечните вредности на Turcotte-Pugh II и MELD скороти просечните вредности на С-реактивниот протеин во серум и асцит во испитуваните групи.

Во нашата студија просечната вредност на калпротектинот кај пациенти со СБП изнесуваше  $1,4 \mu\text{g/mL}$ . Најниската вредност на калпротектин беше регистрирана кај еден пациент ( $0,69 \mu\text{g/mL}$ ), додека највисоката вредност ( $1,81 \mu\text{g/mL}$ ) кај четири пациенти. Резултатите покажаа повисоки вредности на калпротектин во асцит кај пациентите со алкохолна болест на црниот дроб во споредба со останатите етиологии. Рефракторен асцит беше регистриран кај 60,0% од испитаниците, а само кај еден пациент (6,7%) беше регистрирана *Klebsiella pneumoniae* во микробиолошката анализа на асцитот.

Објавените студии кои го обработуваат овој проблем презентираат слични просечни вредности на калпротектин во асцитот како и во нашата студија.

Студија на Delphine Weil и соп.<sup>37</sup> вклучила 236 пациенти со црнодробна цироза и асцит. Авторот реферира просечна вредност на калпротектин во асцит  $1,51 \mu\text{g/mL}$  кај пациентите со СБП. Студијата на Samuel Raimundo Fernandes<sup>30</sup> покажала дека просечната вредност на калпротектинот во асцит од  $1,57 \text{ mg/mL}$  имала висока чувствителност (87,8%),

специфичност (97,9%), позитивна (97,3%) и негативна (90,2%) предиктивна вредност за дијагностицирање на СБП. Една понова студија, од 2018 година, објави значително повисоки вредности на калпротектин во асцит кај пациентите со СБП во споредба со не-СБП и истовремено покажа дека повисоки вредности на калпротектин се регистрираат кај пациентите со сериозни оштетувања на црниот дроб<sup>25</sup>.

Од друга страна, пак, во студијата на Bugri E и sor.<sup>38</sup> прикажана е пониска просечна вредност на калпротектин во асцит (0,51 µg/mL) во споредба со просечната вредност на калпротектин во нашата студија. Меѓутоа, треба да се напомене дека оваа студија беше составена од нехомогени групи (11 пациенти со малиген асцит и 4 пациенти со СБП) и неможе да се донесе заклучок дека објавената просечна вредноста е реална за дијагноза на СБП. Слични резултати се објавени и студијата на Abdel-Razik A и sor.<sup>22</sup> со пониска просечна вредност на калпротектин во асцит од 0,445 µg/ml.

Концентрацијата на калпротектинот во асцитот зависи и од етиологијата на црнодробната цироза. Имено, две студии покажаа дека пациентите со алкохолна болест на црниот дроб имаат повисоки вредности на калпротектин во асцит во споредба со пациентите со вирусна етиологија<sup>26,32</sup>.

Во нашата студија, според Child-Turcotte-Pugh II класификација сите пациенти од испитуваната група беа класа C, додека просечната вредност на MELD скорот изнесуваше 29,8±6,14. Одредувањето на бројот на леукоцити во асцит е важен за дијагноза на СБП, но не дава прогностички информации за болеста.

Номан С и сор.<sup>26,32</sup> во 1995 и 2003 година покажале дека пациентите со декомпензирана црнодробна цироза, кои имаат повисоки концентрации на калпротектин во асцитот, се со зголемен ризик за смртност.

Во студијата на Gundling F и сор.<sup>35</sup> била испитувана концентрацијата на фекалниот калпротектин кај 62 пациенти со црнодробна цироза, и покажала дека

таа била многу повисока во споредба со онаа кај контролната група здрави испитаници, и зависела од сериозноста на црнодробното оштетување и степенот на хепатална енцефалопатија. Од друга страна, пак, во студијата на Montalto M и сор.<sup>33</sup> не била покажана сигнификантна разлика во концентрациите на фекалниот калпротектин помеѓу пациенти со хронично консумирање алкохол и здравите контролни пациенти.

Студијата на Alempijević T и сор.<sup>36</sup> се фокусираше на хепаталната енцефалопатија (ХЕ) и потврдила дека висината на калпротектинот позитивно корелира со степенот на ХЕ според West-Havenov-ите критериуми на групирања.

Студијата на Lutz P и сор.<sup>29</sup> ја потврдила позитивната корелација помеѓу висината на калпротектинот во асцит со тежината на болеста пресметани според Child-Pugh скорот. Авторот укажува дека односот на вредноста на калпротектинот во асцитот со вкупниот протеин може да биде ветувачки нов не само дијагностички туку и прогностички маркер кај пациенти со цироза на црниот дроб и СБП.

Во нашата студија разликата помеѓу просечните вредности на С-реактивниот протеин во серум и во асцит кај пациентите со СБП беше статистички сигнификантна за  $p < 0,05$  ( $p = 0,001620$ ) во споредба со не-СБП.

Студијата на Vota DP и сор.<sup>23</sup> го испитувала значењето на висината на С-реактивниот протеин како маркер на воспаление во серум кај 79 пациенти со хепатална цироза од вкупно 864 испитаници. Резултатите покажале дека имало незначајна статистичка разлика во концентрациите на овој маркер кај пациентите со црнодробна цироза во споредба со тежината на болеста пресметана според Child-Pugh скорот. Студијата на Delphine Weil и сор.<sup>37</sup> покажала дека постои позитивна корелација на вредноста на калпротектин во асцит со бројот на леукоцити и С-реактивниот протеин во серум, но не и со Child-Pugh и MELD скорот.

Имено, овој протеин во акутната фаза на инфламација останува покачен дури и во контекст на напредната инсуфициенција на црниот дроб, а неговата вредност го рефлектира степенот на системска инфламација, без оглед на нејзината причина. Капацитетот на С-реактивниот протеин за дијагностицирање на СБП е помалку релевантен од мерењето на калпротектин во асцит.

### Заклучок

Концентрацијата на калпротектин во асцитната течност кај пациентите со СБП беше сигнификантно повисока во споредба со онаа кај контролната група. Квантитативното одредување на калпротектин во асцит со тестот Quantum Blue Calprotectin Ascites (LF-ASC25) може да се користи како алтернатива на одредувањето ПМНК во асцит. СБП се јавува кај пациентите со сериозна хепатална дисфункција пресметана според Child-Pugh II и MELD скорот. С-реактивниот протеин во серум и во асцит кај пациентите со СБП не покажа високи вредности, но сепак имаше сигнификантна разлика во споредба со пациентите со не-СБП.

### Референци:

- Rimola A, García-Tsao G, Navasa M, Piddock LJ, Planas R, Bernard B, Inadomi JM. Diagnosis, treatment and prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis: a consensus document. *J Hepatol* 2000;32:142-53.
- Wiest R, Krag A, Gerbes A. Spontaneous bacterial peritonitis: recent guidelines and wider. *Gut* 2012;61:297-310.
- Dever JB, Sheikh MY. Review article: spontaneous bacterial peritonitis-bacteriology, diagnosis, treatment, risk factors and prevention. *Aliment Pharmacol Ther* 2015;41:1116-1131.
- Conn HO. Spontaneous peritonitis and bacteremia in laennec's cirrhosis caused by enteric organisms. A relatively common but rarely recognized syndrome. *Ann Intern Med* 1964;60:568-80.
- Oliveira AM, Branco JC, Barosa R, Rodrigues JA, Ramos L, Martins A, Karvellas CJ, Cardoso FS. Clinical and microbiological characteristics associated with mortality in spontaneous bacterial peritonitis: a multicenter cohort study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2016;28:1216-1222.
- Oladimeji AA, Temi AP, Adekunle AE, Taiwo RH, Ayokunle DS. Prevalence of spontaneous bacterial peritonitis in liver cirrhosis with ascites. *Pan Afr Med J* 2013;15:128.
- Bal CK, Daman R, Bhatia V. Predictors of fifty days in-hospital mortality in decompensated cirrhosis patients with spontaneous bacterial peritonitis. *World J Hepatol* 2016;8:566-572.
- Fernández J, Navasa M, Gómez J, Colmenero J, Vila J, Arroyo V, Rodés J. Bacterial infections in cirrhosis: epidemiological changes with invasive procedures and norfloxacin prophylaxis. *Hepatology* 2002; 35: 140-148.
- Wiest R, Rath HC. Gastrointestinal disorders of the critically ill. Bacterial translocation in the gut. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003; 17: 397-425.
- Ruiz-del-Arbol L, Urman J, Fernández J, González M, Navasa M, Monesillo A, Albillos A, Jiménez W, Arroyo V. Systemic, renal, and hepatic hemodynamic derangement in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 2003;38(5):1210-8.
- Berg RD. Mechanisms promoting bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Adv Exp Med Biol* 1999; 473: 11-30.
- Guarner C, Soriano G. Bacterial translocation and its consequences in patients with cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17: 27-31
- Moore K. Spontaneous bacterial peritonitis (SBP). In Warrel DA et al. *Oxford Textbook of Medicine*, 4th Edition, Oxford University Press 2003, Vol 2, sections 11-17, 739-741
- Jalan R, Fernandez J, Wiest R, et al. Bacterial infections in cirrhosis: a position statement based on the EASL. *J*



- Hepatol 2014;60(6):1310–1324.
15. Wiest R, Krag A, Gerbes A. Spontaneous bacterial peritonitis: recent guidelines and wider. *Gut* 2012;61: 297–310.
  16. EASL clinical practice guidelines on the management of ascites, spontaneous bacterial peritonitis, and hepatorenal syndrome in cirrhosis. *World J Hepatol* 2010; 53: 397–417.
  17. Runyon BA, AASLD. American association for the study of liver diseases practice guideline management of adult patients with ascites due to cirrhosis 2012. *Hepatology* 2013; 57: 1651–3.
  18. Shizuma T. Diagnostic Laboratory Markers for Spontaneous Bacterial Peritonitis. *Ann Clin Lab Res.* 2016, 4: 4.
  19. Di Martino V, Weil D, Cervoni JP, Thévenot T. New prognostic markers in liver cirrhosis. *World J Hepatol* 2015; 7: 1244–50.
  20. Koutsounas I, Kaltsa G, Siakavelas SI, Bamias G. Markers of bacterial translocation in end-stage liver disease. *World J Hepatol* 2015; 7(20): 2264–2273
  21. Burri E, Schulte F, Muser J, Meier R, Beglinger C. Measurement of calprotectin in ascitic fluid to identify elevated polymorphonuclear cell count. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 2028–36.
  22. Abdel-Razik A, Mousa N, Elhammady D, Elhelaly R, Elzehery R, Elbaz S, Eissa M, El-Wakeel N, Eldars W. Ascitic Fluid Calprotectin and Serum Procalcitonin as Accurate Diagnostic Markers for Spontaneous Bacterial Peritonitis. *Gut Liver* 2016;10:624–631.
  23. Bota DP, Van Nuffelen M, Zakariah AN, Vincent JL. Serum levels of C-reactive protein and procalcitonin in critically ill patients with cirrhosis of the liver. *J Lab Clin Med* 2005; 146: 347–351
  24. Johne B, Fagerhol MK, Lyberg T, Prydz H, Brandtzaeg P, Naess-Andresen CF, Dale I. Functional and clinical aspects of the myelomonocyte protein calprotectin. *Mol Pathol* 1997; 50:113–123
  25. Heikla A, El-Nokeetya M, Roshdya E, Moheyb A. Ascitic calprotectin as a diagnostic marker for spontaneous bacterial peritonitis in hepatitis C virus cirrhotic Egyptian patients. *The Egyptian J Int Med* 2018; 30(1):1–7
  26. Homann C, Garred P, Graudal N, Haselqvist P, Christiansen M, Fagerhol MK, Thomsen AC. Plasma calprotectin: a new prognostic marker of survival in alcohol-induced cirrhosis. *Hepatology* 1995; 21: 979–985
  27. Nacken W, Roth J, Sorg C, Kerkhoff C. S100A9/S100A8: Myeloid representatives of the S100 protein family as prominent players in innate immunity. *Microsc Res Tech* 2003; 60: 569–580
  28. Roseth AG, Schmidt PN, Fagerhol MK. Correlation between faecal excretion of indium-111-labelled granulocytes and calprotectin, a granulocyte marker protein, in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1999;34:50–4.
  29. Lutz P, Pfarr K, Nischalke HD, Krämer B, Goeser F, Glässner A, et al. The ratio of calprotectin to total protein as a diagnostic and prognostic marker for spontaneous bacterial peritonitis in patients with liver cirrhosis and ascites. *Clin Chem and Lab Med (CCLM)* 2015; 53(12): 2031–2039
  30. Fernandes SR, Santos P, Fatela N, Baldaia C, Marinho RT, Proença H, Ramalho F. Ascitic Calprotectin is a Novel and Accurate Marker for Spontaneous Bacterial Peritonitis. *J Clin Lab Anal* 2016; 30:1139–1145
  31. Heikl AA, El-Nokeety MM, Roshdy E, Mohey A. Ascitic calprotectin as a diagnostic marker for spontaneous bacterial peritonitis in hepatitis C virus cirrhotic Egyptian patients. *Egypt J Intern Med* 2018;30:1–7
  32. Homann C, Christensen E, Schlichting P, Philipsen EK, Graudal NA, Garred P. Ascites fluid and plasma calprotectin concentrations in liver disease. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38: 415–420
  33. Montalto M, Gallo A, Ferrulli A, Visca D, Campobasso E, Cardone S, et al. Fecal calprotectin concentrations in alcoholic patients: a longitudinal study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2011; 23: 76–80

34. Johne B, Fagerhol MK, Lyberg T, Prydz H, Brandtzaeg P, Naess-Andresen CF, Dale I. Functional and clinical aspects of the myelomonocyte protein calprotectin. *Mol Pathol* 1997; 50(3):113-23.
35. Gundling F, Schmidtler F, Hapfelmeier A, Schulte B, Schmidt T, Pehl C, et al. Fecal calprotectin is a useful screening parameter for hepatic encephalopathy and spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis. *Liver Int* 2011; 31: 1406-1415
36. Alempijević T, Štulić M, Popovic D, Culafić D, Dragasević S, Milosavljević T. The role of fecal calprotectin in assessment of hepatic encephalopathy in patients with liver cirrhosis. *Acta Gastroenterol Belg* 2014; 77: 302-305
37. Weil D, Heurgue-Berlot A, Monnet E, Chassagne S, Cervoni J.P, Feron T, et al. Accuracy of calprotectin using the Quantum Blue Reader for the diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis in liver cirrhosis. *Hepatology Research* 2018 doi: 10.1111/hepr.13239
38. Burri E, Felix Schulte, Muser J, Meier R, Beglinger Ch. Measurement of calprotectin in ascitic fluid to identify elevated polymorphonuclear cell count. *World J Gastroenterol* 2013; 19(13):2028-2036
39. Johne B, Fagerhol MK, Lyberg T, et al. Functional and clinical aspects of the myelomonocyte protein calprotectin. *Mol Pathol* 1997;50(3):113-123.
40. Korndorfer IP, Brueckner F, Skerra A. The crystal structure of the human (S100A8/S100A9)<sub>2</sub> heterotetramer, calprotectin, illustrates how conformational changes of interacting alpha-helices can determine specific association of two EF-hand proteins. *J Mol Biol* 2007;370(5):887-898.
41. Fagerhol MK. Nomenclature for proteins: is calprotectin a proper name for the elusive myelomonocytic protein? *Clin Mol Pathol* 1996;49(2):M74-M79.
42. Dale I, Brandtzaeg P, Fagerhol MK, Scott H. Distribution of a new myelomonocytic antigen (LI) in human peripheral blood leukocytes. *Am J Clin Pathol* 1985;84:24-34.
43. Johne B, Fagerhol MK, Lyberg T, et al. Functional and clinical aspects of the myelomonocyte protein calprotectin. *Mol Pathol* 1997;50(3):113-123.
44. Andersson KB, Sletten K, Berntzen HB, Dale I, Brandtzaeg P, Jellum E, Fagerhol MK. The leucocyte L1 protein: identity with the cystic fibrosis antigen and the calcium-binding MRP-8 and MRP-14 macrophage components. *Scand J Immunol* 1988; 28(2): 241-5.
45. Jung GE, Encke J, Schmidt J, Rahmel A. Model for end-stage liver disease. *Der Chirurg* 2008;79 (2): 157-63.
46. Angermayr B, Cejna M, Karnel F, Gschwantler M, Koenig F, Pidlich J, et al. Child-Pugh versus MELD score in predicting survival in patients undergoing transjugular intrahepatic portosystemic shunt. *Gut* 2003;52(6):879-8