

16 Laboratorní diagnostika malabsorpčního syndromu

Petr Kocna

Maldigesce, malabsorpce a malasimilace popisují poruchy (vrozené nebo získané) jedné nebo více základních funkcí trávicího traktu, trávení, vstřebávání, sekrece a motility. Malabsorpční syndrom může být způsoben řadou různých onemocnění a je provázen širokým spektrem klinických projevů, symptomů i biochemických nálezů. Laboratorní testy zaměřené na malabsorpční syndrom jsou orientovány na základní diagnostiku nozologických jednotek primárního i sekundárního procesu, na posouzení funkčního aspektu trávení a absorpce cukrů, tuků a bílkovin, a konečně i na posouzení a monitorování terapie.

16.1 Historie a současnost

Laboratorní diagnostika, především funkční diagnostika, prochází v posledních letech výrazným vývojem. Funkční testy, které jsme před 20 lety rutinně denně prováděli, téměř vymizely. Gastroenterologická laboratoř Interního oddělení Fakultní polikliniky FN2 v Praze vyšetřovala v roce 1985

rutinně žaludeční chemizmus – titrací frakcí žaludeční šťávy, sekretin, pankreozyminový test, PABA/ALTAB test, zátěžové testy s D-xylózou a A vitamínem. V roce 1985 bylo provedeno 564 funkčních testů, v roce 2005 z uvedených testů nebyl proveden ani jediný. V letech 2003–2005 jsme provedli cca 300 funkčních testů ročně, ve zcela novém spektru technik, které jsme před 20 lety k dispozici neměli (tab. 16.1).

Doporučení a algoritmy pro vyšetřování malabsorpčního syndromu, které jsou uznávány v Evropě a které lze najít na internetovém zdroji Světové gastroenterologické asociace, zahrnují tři skupiny laboratorních testů – základní laboratorní vyšetření, testy doporučené pro diferenciální diagnostiku primárního nebo sekundárního procesu (tab. 16.2). Většina z uvedených testů není u nás rutinně, pro klinickou praxi, dostupná.

16.2 Vyšetření stolice

Komplexní vyšetření stolice, od makroskopického posouzení, stanovení obje-

Tab. 16.1 Funkční laboratorní diagnostika v roce 1985 a 2005, přehled a počet provedených testů v gastroenterologické laboratoři ÚKB LD VFN Praha

	1985	2005
Test sekrece HCl s pentagastrinem	178	–
¹³ C-urea dechový test	–	76
Sekretin-pankreozyminový test	13	–
Stanovení elastázy-1 ve stolici	–	172
ALTAB test v séru a v moči	279	–
¹³ C-MTG dechový test	–	24
Zátěžový test s D-xylózou	69	–
¹³ C-xylózový dechový test	–	7
Toleranční test s A-vitaminem	25	–

Tab. 16.2 Doporučené laboratorní testy v diagnostickém algoritmu vyšetření při malabsorpčním syndromu v návrhu Světové gastroenterologické asociace (OMGE)

Diagnostický algoritmus		
Základní laboratorní metody	– laktóзовý H ₂ dechový test – fruktóзовý H ₂ dechový test – sérologické markery celiakie	– detekce lamblíí – detekce parazitů – detekce enterobakterií
Diferenciální dg. – tenké střevo	– glukóзовý H ₂ dechový test – testy bakteriálního přerůstání	– Schillingův test s vitaminem B ₁₂
Diferenciální dg. – pankreas	– sekretin/CCK test	– stanovení elastázy ve stolici – stanovení chymotrypsinu ve stolici

mu, struktury, pH, k analytickému stanovení laboratorních markerů je považováno za základní vyšetřovací proces při podezření na malabsorpční syndrom. Kvalitativní stanovení přítomnosti nenatravených cukrů, tuků a proteinů – mikroskopicky hodnocené barvení stolice uvádějí i nejnovější publikace interní medicíny (Bureš 2003, Harrison 2001), gastroenterologie (Mařatka 1999) i klinické biochemie (Tietz 2006). Metodika mikroskopického barvení stolice, s ilustrovanými barevnými fotografiemi, je naposledy detailně popsá-

na v Gastroenterologii pro praxi (Mnichov 1975). Moderní imunotechnické metody nabízejí dnes široký rozsah analytů, které lze stanovit v jediném vzorku stolice (tab. 16.3). Toto vyšetření je jedním z mála zcela neinvazivních pro nemocného. Kvantitativní analýza stolice, především tuků v 72hodinovém sběru, byla doporučena jako zlatý standard diagnostiky malabsorpce před více než 50 lety. Dosud je toto vyšetření při definovaném příjmu tuků 100 g denně považováno za nejpřesnější metodu, i když je rutinně prováděno mini-

Tab. 16.3 Přehled analytů, použitelných v diagnostice malabsorpčního syndromu, které je možno stanovit ve vzorku stolice

Detekce protilátek a antigenů	– antigen <i>Helicobacter pylori</i> – sekreční IgA protilátky ke gliadinu – protilátky ke tkáňové transglutamináze
Stanovení pankreatických enzymů	– pankreatická amyláza – pankreatická lipáza – chymotrypsin – elastáza 1
Detekce zánětlivých markerů	– polymorfonukleární elastáza – myeloperoxidáza – albumin – lysozym
Markery tumorů a zánětů TLS	– calprotectin – lactoferin – hemoglobin
Molekulárně/genetické markery	– PCR detekce v DNA/RNA

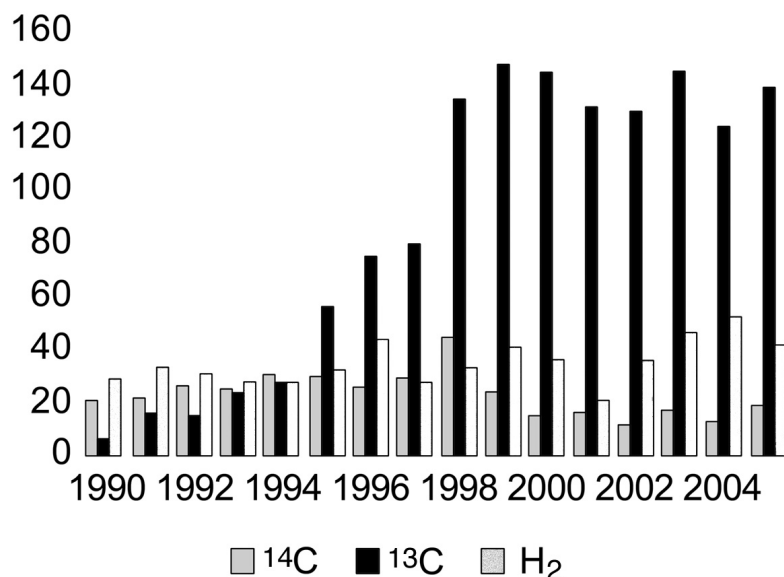
málně, vzhledem k procesu sběru, uchovávání a zpracování 600–1200 g stolice.

Nabízí se zde otázka, zda nestojí za úvahu opět do laboratorní diagnostiky více integrovat metodiky, které využijí vzorku stolice pro posouzení malabsorpčního syndromu. Naše pracoviště provádí pro klinickou praxi, kromě běžného Haemocultu, stanovení krve ve stolici (imunochemicky), elastázy 1 a antigenu *Helicobacter pylori*, přibližně v počtu 300–400 ročně. Klinický zájem z jiných pracovišť je minimální, ovlivněn však může být i skutečností, že většina nabízených analýz není hrazena ze zdravotního pojištění. Kontrastem je zde přístup k uvedeným metodám ve světě – ve Spojených státech bylo v roce 2004 zařazeno mezi hrazené výkony CPT (Current Procedural Terminology) kvantitativní stanovení ve stolici pankreatické elastázy (kód 82656), lactoferrinu (kód 83630) a calprotectinu (kód 83520). Nový sazebník

výkonů zveřejněný ve Sbírce zákonů č. 493/2005 a platný od 1. ledna 2006 obsahuje i kód pro pankreatickou elastázu–1 (kód 81725).

16.3 Neinvazivní funkční diagnostika – dechové testy

Moderní variantu neinvazivní laboratorní techniky pro funkční testy v gastroenterologii, především v diagnostice malabsorpčního syndromu, představují dnes dechové testy. Ve vydechovaném vzduchu můžeme stanovovat celou řadu markerů, nejčastější se jedná o koncentraci vodíku H_2 nebo izotopů uhlíku ^{14}C a ^{13}C . Dechové testy s měřením vodíku byly popsány již před 30 lety, použití markeru ^{14}C v posledních letech klesá, protože většina metodik vypracovaných s tímto radioizotopem je dnes modifikována pro použití stabilního izotopu ^{13}C . Klinické použití dechových testů, především s použitím



Obr. 16.1 Trend využití dechových testů se stanovením vodíku (H_2 -testy), uhlíku ^{14}C a uhlíku ^{13}C za 15 let (1990–2005) dle aplikací publikovaných v Medline

stabilního izotopu ^{13}C výrazně stoupá. Přehled publikovaných aplikací podle databáze Medline a trend za období 1990–2005 (obr. 16.1) vykazuje téměř stabilní počet aplikací s použitím vodíkových dechových testů (30–40 ročně) a vzestup aplikací s markerem ^{13}C od 5 v roce 1990 na 139 v roce 2005.

16.3.1 Dechové testy s měřením koncentrace vodíku

Ve vydechaném vzduchu měříme jeho koncentraci, která stoupá při metabolickém procesu – bakteriální anaerobní hydrolyze – některých substrátů především cukerné povahy (laktózy, glukózy, xylózy, fruktózy, laktulózy) v tlustém střevu. Tyto testy jsou rutinně užívány především v pediatrii,

zejména ve skandinávských zemích, kde jsou základním testem pro malabsorpční syndrom. Dechové testy založené na analýze vodíku jsou opakovaně zmíněny v algoritmu laboratorních testů malabsorpčního syndromu OMGE.

V diagnostice malabsorpčního syndromu lze použít tři typy H_2 -dechového testu. Stanovení primární malabsorpce laktózy, fruktózy nebo sacharózy provádíme po podání 20–50 g přirozeného substrátu, zvýšení koncentrace vodíku nad 20 ppm je považováno za průkaz malabsorpce. Druhou variantou H_2 -dechového testu je detekce bakteriálního přerůstání po podání glukózy nebo laktulózy. Ve srovnání s jejunální kulturou je senzitivita a specifita H_2 -dechového testu 60–80 %. Třetím typem testu je stanovení motility, rychlosti pasáže, OCTT (orocékální transit-

-time) po podání laktulózy. Stanovení rychlosti pasáže, motility, je velmi významným údajem pro funkční diagnostiku a pro další testy může posloužit jako referenční, korekční údaj.

Analyzátory pro měření koncentrace vodíku ve vydechovaném vzduchu jsou většinou jednoduché, ruční, bakteriové, cenově dostupné, aplikace je možná i pro malé děti od jednoho roku věku. Na ručním analyzátoru s elektrochemickým detektorem se přímo odečítá koncentrace vodíku, jedná se samozřejmě o kinetické měření, trvající několik hodin. Dechové analyzátory mají obvykle citlivost detekce vodíku 1 ppm a rozsahu měření v koncentraci 0–500 ppm. K určitým omezením aplikace H_2 -dechových testů patří 5–20% falešná negativita testů daná nízkou bakteriální produkcí vodíku. V České republice je tato metodika využívána zcela ojediněle, přestože výkon je hrazen zdravotními pojišťovnami (kód 15140).

16.3.2 Dechové testy založené na stabilním izotopu uhlíku ^{13}C

Dechové testy, které jako marker používají stabilní izotop uhlíku ^{13}C , používají perorálně podávané substráty, ve kterých je atom uhlíku ^{12}C nahrazen atomem uhlíku ^{13}C . Funkční skupina s uhlíkem ^{13}C je pak enzymaticky štěpena tak, aby metabolický proces končil exspirací značeného CO_2 . Metodika testu musí zajistit, aby limitujícím faktorem byla právě tvorba $^{13}CO_2$, jehož koncentrace je stanovována ve vydechovaném vzduchu. Stabilní izotop uhlíku ^{13}C tvoří přirozeně pozadí 1,11% uhlíku, a analýza dechových testů sta-

novuje změnu poměru $^{13}C/^{12}C$ po podání značeného substrátu, proti výchozí hodnotě (DOB – Delta Over Baseline). Funkční diagnostika v gastroenterologii většinou vyžaduje komplexní posouzení v několikahodinovém intervalu výpočtem kumulativního výdeje (cPDR – Cumulated Percentage of Dose Recovery). Výpočet kumulativního výdeje používá matematického modelu produkce CO_2 většinou na základě povrchu těla pacienta, zohledňujícího pouze výšku a váhu, BSA (Body Surface Area) faktorem 300 mmol/hod. Komplexnější modely zahrnují i věk a pohlaví, např. model BMR (Basal Metabolic Rate), výpočet kumulativního výdeje s tímto indexem udává hodnoty v průměru o 27 % vyšší, jak jsme popsali při hodnocení 200 dechových testů (Chleboun 2005).

Přehled substrátů pro funkční diagnostiku v gastroenterologii dokumentuje tab. 16.4. Zdrojem je 1225 abstrakt s klinickou aplikací dechových testů, které byly publikovány v letech 1994–2005 na kongresech Digestive Disease Weeks ve Spojených státech. Přehled substrátů je rozdělen podle použitého markeru – H_2 , ^{13}C a ^{14}C , a použití markeru ^{13}C ve 23 z 29 substrátů prokazuje rozvoj těchto dechových testů.

Analýzu vydechovaného vzduchu a stanovení poměru koncentrace $^{13}CO_2$ ku $^{13}CO_2$ lze provádět několika technologiemi, které se liší principem detekce a analytickou citlivostí. Nejpreciznější je metoda poměrové hmotnostní spektrometrie (IRMS Isotope Ratio Mass Spectrometry), kde pro analýzu stačí několik mikrolitrů vzorku vzduchu a pro tuto technikou jsou určeny soupravy, kde vydechovaný vzduch je sbírán do 5–10ml zkumavek. Hmot-

Tab. 16.4 Přehled substrátů pro H₂, ¹³C a ¹⁴C – dechové testy v souboru abstrakt Digestive Disease Week's 1994-2005 (1225 aplikací dechových testů)

	MARKER DECHOVÉHO TESTU		
	¹³ C	¹⁴ C	H ₂
AMINOPYRINE	▲		
CAFFEINE	▲	▲	
CELLULOSE			▲
FRUCTOSE			▲
GALACTOSE	▲		
GLUCOSE	▲		▲
GLYCINE	▲	▲	
GLYCOCHOLIC ACID	▲		
HIOLEIN	▲		
INULIN CARBOXYLIC ACID		▲	
CHOLESTEROL-OCTANOATE	▲	▲	
KETOISOCAPRONIC ACID	▲		
LACTOSE	▲		▲
LACTOSE-UREIDE	▲		
LACTULOSE			▲
LEUCIN-EGG PROTEIN	▲		
METHACETINE	▲		
METHIONINE	▲		
MIXED TRIGLYCERIDES	▲	▲	
NEOLATE	▲		
OCTANOIC ACID	▲	▲	
ORNITHINE	▲		
PECTIN			▲
PHENYLALANINE	▲		
SODIUM ACETATE	▲		
SORBITOL			▲
STARCH	▲		▲
UREA / MOČOVINA	▲	▲	
XYLOSE	▲	▲	▲

nostní spektrofotometr má speciální detektor, respektive trojici detektorů, které zachycují a počítají částice s hmotností 44 ($^{12}\text{CO}_2$), hmotností 45 ($^{13}\text{CO}_2$) a hmotností 46 pro eliminaci chyby v přítomnosti stabilního izotopu kyslíku – ($^{12}\text{C}^{16}/^{18}\text{O}_2$). Druhým přístupem je detekce v infračerveném spektru (NDIRS – Nondispersive Isotope-selective Infrared Spectroscopy). Principem detekce je rozdílné absorpční maximum obou izotopů uhlíku v oblasti 4350 nm infračerveného spektra. Analyzátoři tohoto typu jsou řádově lacinější, menší, nevyžadují speciální obsluhu a jsou typu POCT (Point Of Care Testing), vhodné např. pro ambulance odborného lékaře. Nižší citlivost IR analyzátorů vyžaduje mnohem větší objemy vzorku vzduchu (10–100 ml) a pro odběr vzduchu se používají sáčky z hliníkové fólie. Nejnovější technologií v oblasti IR detekce dechových testů je tzv. MCS (Molecular Correlation Spectroscopy) založená na dvojici velmi přesně a úzce specifických IR zdrojů, měření je kontinuální zavedenou nosní sondou, přístroj je výhradně POCT typu. Třetím typem je analyzátor LARA založený na optogalvanickém měření vlastností laserového paprsku. Analyzátor tohoto typu je uzavřeným systémem a u nás zatím nikde instalován není.

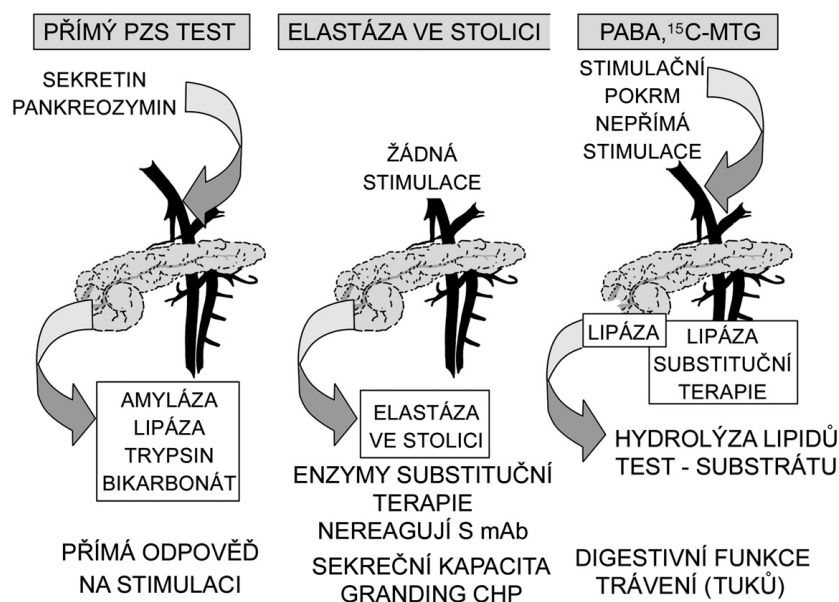
Správnost a přesnost výsledků dechových testů je závislá nejen na typu analyzátoru, ale především na intra- a extra-laboratorní kontrole kvality a v případě kumulativního výpočtu cPDR na volbě metodiky stanovení CO_2 produkce. Zkušenosti našeho pracoviště za období 2001–2005 potvrzují matematické analýzy o statistických nejistotách při hodnocení výsledků de-

chových testů (Chleboun 2005). Analytická spolehlivost NDIRS analyzátoru Isomax-4000 (Isodiagnostika, Kanada) vykazala odchylku hodnoty stanovené NDIRS proti IRMS metodě během 15 kontrolních cyklů v průměru 4,9 %, shodu NDIRS a IRMS hodnoty s korelací 0,990, průměrnou odchylku ΔDOB v hodnotě 0,2 (soubor 1760 analýz), ale statisticky významný rozdíl výpočtu cPDR metodou BSA proti metodě BMR, jejíž hodnoty jsou v průměru o 26,1 % vyšší (230 funkčních testů, rozdíl cPDR o 7,8–79,4 %).

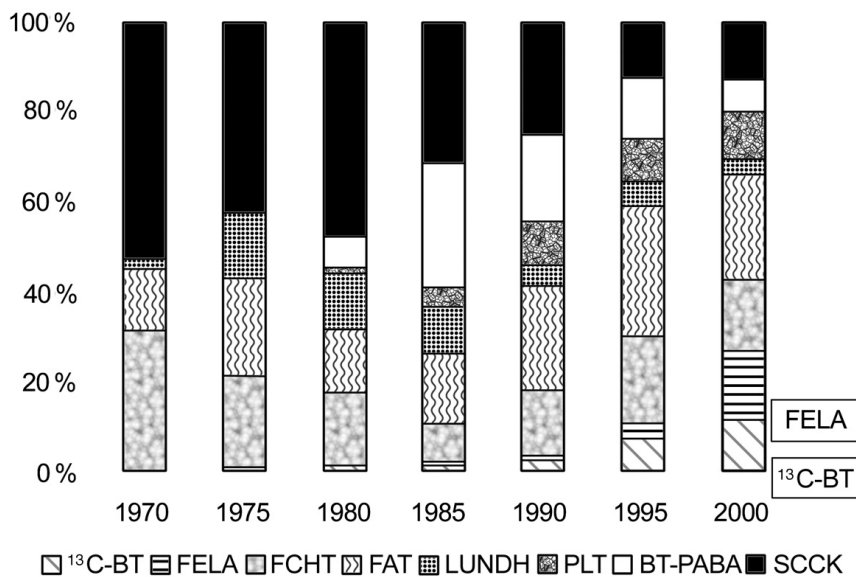
16.4 Vyšetření zevně sekretorické funkce pankreatu

Steatorea je nejprůzračnějším projevem malabsorpce, a diagnostické metody jsou velmi často primárně orientovány na pankreatickou insuficienci. Laboratorní diagnostika nabízí celou řadu technik pro vyšetření zevně sekretorické funkce pankreatu. Přímý test nejlépe vyhodnotí sekreční odpověď pankreatické tkáně na přímou, intravenózní podanou, hormonální stimulaci. Nepřímé testy reagují na komplexní digestivní proces, nepřímou stimulaci testovacím pokrmem a substituční léčbu pankreatickými enzymy. Třetím typem jsou testy bez jakékoliv stimulace, specifické pouze pro posouzení sekreční kapacity pankreatu – např. test elastázy ve stolici (obr. 16.2). Spektrum laboratorních metodik, používaných pro stanovení exokrinní funkce pankreatu, se během posledních 40 let výrazně posunulo (obr. 16.3, Boeck 2001).

Nejpřesnějším vyšetřením zůstává sekretinový test, který jediný umožňuje relativně časnou detekci pankreatické



Obr. 16.2 Princip testů exokrinní funkce pankreatu - přímého funkčního testu (sekretin - pankreozymín), nepřímého testu (PABA, PLT, ¹³C-MTG) a stanovení elastázy 1 ve stolici



Obr. 16.3 Spektrum aplikovaných testů exokrinní funkce pankreatu v časovém profilu 30 let (1970-2000): ¹³C-dechové testy (¹³C-BT), elastáza 1 ve stolici (FELA), chymotrypsin ve stolici (FCHT), kvantitativní analýza tuků ve stolici (FAT), Lundhův test (LUNDH), pankreolauryl (PLT), PABA test (BT-PABA) a sekretin/cholecystokinín (SCCK). Upraveno podle údajů Boeck 2001

insuficience, senzitivita přímého testu pankreatické insuficience je pro lehké, počínající formy chronické pankreatitidy cca o 5–10 % vyšší než zobrazovací metody (endoskopická retrográdní cholangiopankreatografie, magneticko-rezonanční cholangiopankreatografie nebo CT). Vyšetření existuje v různých modifikacích s podáním Lundhova testačního pokrmu, caeruleinu a sekretinu – cholecystokininu. Stále platí, že toto vyšetření je zlatým standardem, ale jeho praktický význam v diagnostice chronické pankreatitidy je dnes obtížné definovat. Frekvence použití přímého SCCK testu klesla z 50 % (v roce 1970) na 15 % (v roce 2000).

Neinvasivní testy, které nevyžadují intubaci, dosahují dostatečné diagnostické přesnosti u pokročilé chronické pankreatitidy a jednoznačné steatorey, kdy snížení zevně sekretorické funkce je zřejmé již z klinického obrazu. Diagnostický význam nepřímých testů má význam pro dlouhodobé sledování nemocných, follow-up, a především pro monitorování a optimalizaci substituční terapie. Nepřímé funkční testy jsou založeny na principu, kdy je perorálně podán chromogenní (nebo fluorogenní) substrát, který je štěpen pankreatickými enzymy (chymotrypsinem, lipázou). NBT-PABA test (Bentiromid) obsahoval substrát N-benzoyl-L-tyrosyl-4-aminobenzoovou kyselinu (Bz-Tyr-PAB), český ALTAB test (Spofa-Gnost Pankenzan, Léčiva) se substrátem N-acetyl-L-tyrosyl-4-aminobenzoovou kyselinou (Ac-Tyr-PAB), poskytoval lepší diskriminaci mezi souborem nemocných s insuficiencí pankreatu a kontrolním souborem. Fluorogenní variantou je preparát Pankreolauryl (substrátem je fluorescein-di-laurylester). Mezi neinva-

zivní testy patří také ^{13}C -dechové testy, jejichž frekvence spolu s nejčastěji používaným testem stanovení pankreatické elastázy ve stolici tvoří dnes více než 25 % aplikovaných testů. Velmi významným testem zůstává, a frekvence cca 20–25 % se během 40 let nezměnila, metoda kvantitativního stanovení tuků ve stolici v 72hodinovém sběru (viz vyšetření stolice).

16.4.1 Dechový test pankreatické funkce ^{13}C – MTG

Moderní, neinvasivní, funkční testy exokrinní funkce pankreatu jsou založeny na substrátech, kde analytickým markerem je atom uhlíku ^{13}C (starší testy s izotopem ^{14}C), jehož koncentraci stanovujeme ve vydechovaném vzduchu. Specifická testů je závislá na volbě substrátu – v klinických studiích byla testována celá řada substrátů, kdy výsledky dechových testů korelují např. s < 10% poklesem sekrece amylázy (substrátem je ^{13}C -škrob), nebo se steatoreou > 11 g/den (substrátem je ^{13}C -triolein). Přehled ^{13}C -substrátů pro dechové testy pankreatické malabsorpce je v tab. 16.5.

Naše pracoviště provádí od roku 2001 dechový test s perorálním podáním 250 mg ^{13}C -mixed triglyceridů (^{13}C -MTG). Substrátem je triglycerid s ^{13}C -označeným octanoátem v poloze 2, a stearátem v poloze 1 a 3, které jsou odštěpeny pankreatickou lipázou. ^{13}C -octanoát je dále oxidován v játrech (beta-oxidace tuků) a ve vydechovaném vzduchu je množství $^{13}\text{CO}_2$ stanoveno analyzátozem dechových testů. Kumulativní výdej, recovery (cPDR), vypočítáváme za 6 hodin pomocí úda-

Tab. 16.5 Přehled ^{13}C -substrátů pro dechové testy v diagnostice pankreatické malabsorpce s klinicko-laboratorní korelací

^{13}C – substrát	klinicko-laboratorní korelace
^{13}C – triolein	steatorea > 11–14 g/den
^{13}C – hiolein	intraluminální lipolýza
^{13}C – mixed triglyceride	specifická k pankreatické lipáze, výdej lipázy < 90 kU/hod
^{13}C – cholesteryl octanoate	pankreatická cholesterol esteráza, steatorea > 11 g/den
^{13}C – tripalmitin	malabsorpce tuků
^{13}C – trioctanoin	tkáňové poškození, fibróza > 30 %
^{13}C – starch	sekrece amylázy < 10%

je BMR. Referenční hodnota cPDR naší modifikace ^{13}C -MTG testu je hodnotou 30%, vypočtenou ze souboru 50 osob s vyloučením pankreatické insuficience zobrazovacími metodami. Literární údaje udávají hodnotu ^{13}C -MTG testu 22–23 %, pro výpočet používající zásadně jednoduchého modelu BSA, který podle našich zkušeností udává hodnoty průměrně o 26,1 % nižší. Tomuto faktoru proto odpovídá i naše vyšší referenční hodnota 30 %.

16.4.2 Vyšetření pankreatické elastázy ve stolici

Lidská pankreatická elastáza-1 je syntetizována acinárními buňkami pankreatu. Enzym je secernován pankreatickou šťávou do duodena a během střevní pasáže není degradována proteinová sekvence zvolená pro imunochemickou detekci. Stanovení elastázy-1 vykazuje proto vyšší diagnostický přínos, na rozdíl od chromogenní metody stanovení chymotrypsinu ve stolici, klinický význam nemá ani stanovení lipázy ve stolici. V roce 2004 byla zavedena také imunochemická detekce chymotrypsinu ve stolici, klinických

zkušeností je zatím velmi málo. Aktivita lidské pankreatické elastázy-1 ve vzorcích stolice odráží míru exokrinní pankreatické funkce. Nejnovější aplikace doporučují stanovení pankreatické elastázy-1 v duodenální šťávě při stimulovaném funkčním testu. Laboratorní metoda (FELA) je založena na imunologickém průkazu ELISA metodou s monoklonální (nebo polyklonální) protilátkou k lidské pankreatické elastáze. Referenční hodnoty jsou 200 až 500 $\mu\text{g/g}$ stolice, hraniční pásmo je 100–200 $\mu\text{g/g}$, závažná pankreatická insuficience je stanovena při hodnotách < 100 $\mu\text{g/g}$ stolice. Imunochemické stanovení elastázy-1 není ovlivněno pasáží tlustým střevem, substituční terapií ani jinými faktory, které ovlivňují enzymové stanovení chymotrypsinu ve stolici. Specifická metody je 93 %, senzitivita dosahuje pro těžkou pankreatickou insuficienci hodnoty 100 %, pro střední a lehké formy 87 %. Stanovení pankreatické elastázy-1 ve stolici je běžně používáno v pediatrii k průkazu cystické fibrózy se specifitou i senzitivitou téměř 100 %. Falešná snížená hodnota může být způsobena zředěním (obsahem vody) při průjmu.

Laboratorní diagnostika malabsorpčního syndromu

Tab. 16.6 Soubor vyšetřených pacientů se susp. chronickou pankreatitidou. Klasifikováno dle metody Büchlera a Malfertheinera (počet, věkový průměr a poměr žen/mužů), výsledky testů elastázy 1 ve stolici (FELA) a dechového testu s ^{13}C -mixed triglyceridy (^{13}C -MTG)

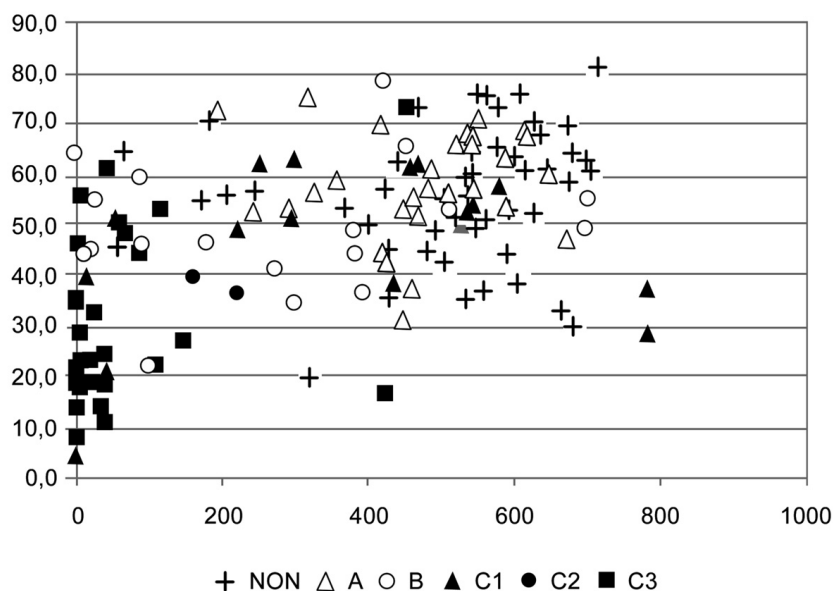
CHP skupina	NON	A	B	C1/C2	C3
Počet	55	32	27	22	34
věkový průměr	45,5	51,8	48,1	57,5	50,9
poměr Ž : M	1:1	1:1	1:2	1:1	1:6
hodnota FELA	509,6	456,7	230,8	320,2	57,6
hodnota ^{13}C -MTG cPDR	56,3	57,8	45,8	41,9	29,6

Naše studie byla zaměřena na porovnání dvou technologií funkčních testů exokrinního pankreatu – hodnot FELA testu a dechového testu ^{13}C -MTG. Studie byla provedena na souboru 170 osob se susp. chronickou pankreatitidou (CHP), pro klasifikaci jsme použili systém zohledňující funkční aspekt – přítomnost steatorey a diabetes mellitus (Büchler 2000). Kategorie A – lehká forma CHP, bez komplikací, bez klinických projevů snížení funkce pankreatu; kategorie B – klinické komplikace, bez klinických projevů snížení funkce pankreatu; kategorie C – klinické projevy pankreatické insuficience, diabetes mellitus nebo steatorea (C1), diabetes mellitus a steatorea (C2) s klinickými komplikacemi (C3). Skupinu CHP C1 a C2 jsme při hodnocení spojili, vzhledem k velmi malému počtu osob kategorie C2. Hodnota elastázy-1 ve stolici signifikantně klesá a koreluje tedy velmi dobře s gradingem CHP (tab. 16.6). Grafické porovnání obou dvou testů (obr. 16.4). Stanovení elastázy-1 ve stolici doporučujeme jako vhodný statický marker pro posouzení kapacity exokrinního pankreatu, dechový test ^{13}C -MTG navrhujeme jako dynamický, funkční test k posouzení komplexního,

digestivního efektu. Korelační koeficient při porovnání obou metodik je roven hodnotě $r = 0,567$. Rozdíl v hodnocení obou testů je především ve skupinách CHP-B a CHP-C3, tj. ve skupinách s prokázanými organickými komplikacemi, kde mírou poškození pankreatické tkáně může být hodnota FELAe a mírou funkční schopnosti hodnota ^{13}C -MTG.

16.5 Laboratorní diagnostika celiakie

Celiakie (celiakální sprue, CS) je onemocněním autoimunního charakteru s geneticky podmíněnou vazbou (HLA-DQ2/DQ8) a specifickou humorální odpovědí na spouštěcí faktor – peptidy pšeničného gliadinu (lepku), resp. zásobní proteiny (prolaminy) příbuzných obilovin, ječmene, žita a ovsa. Diagnostika celiakie je založena na histologickém, příp. histochemickém vyhodnocení biopsických vzorků sliznice tenkého střeva. Při celiakii prokazujeme léze sliznice tenkého střeva se snížením nebo vymizením klků, hypertrofií Lieberkühnských krypt, poruchou vyzrávání enterocytů a ústup těchto změn při bezlepkové dietě.



Obr. 16.4 Porovnání výsledků dvou testů exokrinní funkce pankreatu – elastázy 1 ve stolici (FELA, 0–1000 µg/g stolice) a dechového testu s ^{13}C -mixed triglyceridy (^{13}C -MTG, hodnota kumulativního výdeje za 6 hodin – cPDR, 0–90 %) v souboru 170 osob vyšetřených pro susp. chronickou pankreatitidu, klasifikováno dle metody Büchlera a Malfertheinera

Sérologické markery celiakie zahrnují protilátky ke gliadinu třídy IgA a IgG (AGA-A, AGA-G), protilátky k retikulínu (ARA) a endomyziu (EmA) třídy IgA a protilátky ke tkáňové transglutamináze třídy IgA a IgG (atTG-A, atTG-G). Žádný z uvedených markerů není 100% specifickým a současně 100% senzitivním, senzitivita a specifita těchto testů se pohybuje v rozmezí 31–100 % v závislosti na použitém antigenu/substrátu, nastavení cut-off hodnoty, použité metodě a standardizaci testu. Nejvyšší citlivost jsme prokázali stanovením AGA-A a AGA-G protilátek s purifikovaným α -gliadinem (senzitivita 0,970), specifitu má nejvyšší test protilátek k endomyziu v titru 1:20–0,950, nejvyšší spolehlivost je prokázána pro stanovení IgA protilátek ke

tkáňové transglutamináze s lidským, rekombinantním antigenem – 0,916 (tab. 16.7). Algoritmy screeningových programů zahrnují sekvenční nebo i paralelní stanovení jednotlivých markerů, pozitivní výsledek však musí být v každém případě potvrzen histologickým vyšetřením. Histologickým výsledkem biopsie v souboru 374 nemocných s podezřením na celiakii (tab. 16.8) potvrzujeme spolehlivost a citlivost sérologických markerů. V remisi při bezlepkové dietě hladina protilátek klesá a proto jejich stanovení může být velmi dobře použito pro dlouhodobé sledování, follow-up, a monitoring dodržování bezlepkové diety. Nejnovější metody pro screening jsou imunochromatografické rapid testy a zahrnují především metodu stanovení protilátek

Laboratorní diagnostika malabsorpčního syndromu

Tab. 16.7 Statistické parametry (SN – senzitivita, SP – specifita, PPV – pozitivní prediktivní hodnota, NPV – negativní prediktivní hodnota, ACC – spolehlivost) pro sérologické markery celiakie AGA-A/G (antigliadinové protilátky IgA a IgG), EmA (protilátky k endomyziu IgA), gp-atTG (protilátky ke tkáňové transglutamináze IgA s morčecím antigenem), hr-atTG (protilátky ke tkáňové transglutamináze s lidským, rekombinantním antigenem)

	SN	SP	PPV	NPV	ACC
AGA-A/G	0,970	0,462	0,604	0,949	0,695
EmA	0,813	0,950	0,925	0,871	0,891
gp-atTG	0,877	0,687	0,682	0,880	0,769
hr-atTG	0,930	0,904	0,888	0,940	0,916

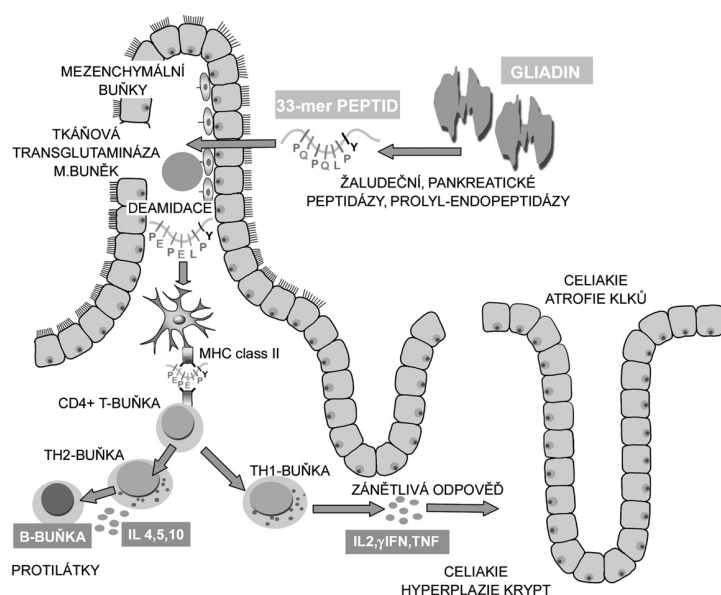
Tab. 16.8 Porovnání positivity/negativity sérologických markerů celiakie (antigliadinových protilátek IgA a IgG – AGA-A/G, protilátek ke tkáňové transglutamináze IgA – atTG, protilátek k endomyziu IgA – EmA) a hodnocení biptických vzorků v souboru 374 vyšetřených osob v období 1997–2005 (CSF – floridní, aktivní celiakie, CSR – celiakie v remisi, HLA – izolovaný deficit laktázy, NORM – normální obraz sliznice tenkého střeva)

		AGA-A/G+				AGA-A/G-			
		atTG+		atTG-		atTG+		atTG-	
Biopsie	počet	EmA+	EmA-	EmA+	EmA-	EmA+	EmA-	EmA+	EmA-
CSF	150	117	13	5	10	1	2	–	2
CSR	21	4	4	–	7	–	–	–	6
HLA	67	8	5	2	28	1	–	1	22
NORM	136	8	15	1	49	1	7	–	55

k tkáňové transglutamináze a gliadinu, existují i metody typu DotBlot, sekvenční ELISA proces vázaný na jednodlivý proužkový test.

Tkáňová transglutamináza je enzymem, který má klíčovou roli nejen v diagnostice, ale i ve vlastní patogenezi onemocnění. Gliadin, gliadinové fragmenty a peptidy obsahují velmi vysoké procento glutaminu (30–40 % tvoří glutamin a prolin) a gliadin je proto velmi dobrým substrátem pro enzym-tkáňovou transglutaminázu. Tkáňová transglutamináza je strukturou v endomyziu, proti které se tvoří protilátky, je vlast-

ním autoantigenem celiakie. Tkáňová transglutamináza vytváří vazbu na substrát (gliadin), modifikuje tyto peptidy a vznikající neoepitopy se vážou s povrchovými glykoproteiny HLA-DQ2 DQ8 pozitivních imunokompetentních buněk a vyvolávají imunitní odpověď ve sliznici tenkého střeva. Struktura vazebného místa je přesně popsána, a peptid gliadinu délky 33 aminokyselin se sekvencí -PQPQLPY- je transglutaminázou deamidován na sekvenci -PEPELPY- (obr. 16.5). Schéma zobrazuje i další etiopatogenetické mechanismy projevů celiakie.



Obr. 16.5 Etiopatogenetické mechanismy celiakie v procesu hydrolýzy gliadinu, deamidace tkáňovou transglutaminázou, autoimunitní odpovědi, tvorby protilátek a zánětlivých mediátorů, vedoucích k atrofii klků a hypertrofii krypt sliznice tenkého střeva. Upraveno podle údajů Mowat 2003.

16.6 Toleranční test s D-xylózou

Zátěžový test s D-xylózou (xylózový absorpční test) je indikován v diferenciální diagnostice malabsorpčního syndromu. D-xylóza je 5-uhlíkový monosacharid (pentóza), který je asi ze 60 % pasivně absorbován v proximální části tenkého střeva (duodenojejunální) a z cirkulace je eliminován ledvinami. Clearance cca 87 % je dána tubulární resorpcí D-xylózy. Test provádíme po podání 25 g D-xylózy (pro dospělé), u dětí 5 g; alternativní postup (především u dětí) doporučuje 0,5 g/kg váhy. Toleranční test s D-xylózou je obvykle indikován k potvrzení střevní malabsorpce u glutenové enteropatie (celiakální sprue), tropické sprue. Výsledek výdeje močí je ovlivněn funkcí ledvin.

Falešně pozitivní výsledek může být stanoven např. při zvracení, dehydrataci, myxedému, ascitu, edému. Celá řada léků snižuje exkreci D-xylózy ledvinami, např. kyselina aminosalicyllová, acetylosalicyllová, digitalis, indomethacin, neomycin a další. Klinicky je tento test využíván v posledních letech minimálně. Dechové testy s perorálně podávanou xylózou (viz další oddíl) mají zcela jinou indikaci, nejsou variantou zátěžového testu s D-xylózou.

16.6.1 Dechový test s ^{13}C -xylózou

Dechový test s podáním ^{13}C značené xylózy je doporučen především v diagnostice bakteriálního přerůstání, při syndromu slepé klíčky. Diagnosticky

má význam především vlastní kinetika stanovených DOB hodnot, kumulativní výdej 6hodinového testu (cPDR) je údajem doplňkovým. U nemocných s bakteriálním přerůstáním v tenkém střevě, např. z důvodů slepé kličky, dochází k dvoufázové hydrolýze podaného substrátu – ^{13}C -xylózy, první vrchol nastupuje mnohem dříve a je podstatně vyšší než u zdravých osob. Test provádíme 6 hodin po perorálním podání 100 mg ^{13}C -xylózy. V letech 2001–2005 jsme provedli 60 dechových testů s ^{13}C -xylózou, v 6 případech byla hodnota DOB > 10 a v 83,5 % byl důvod bakteriálního přerůstání chirurgicky ověřen.

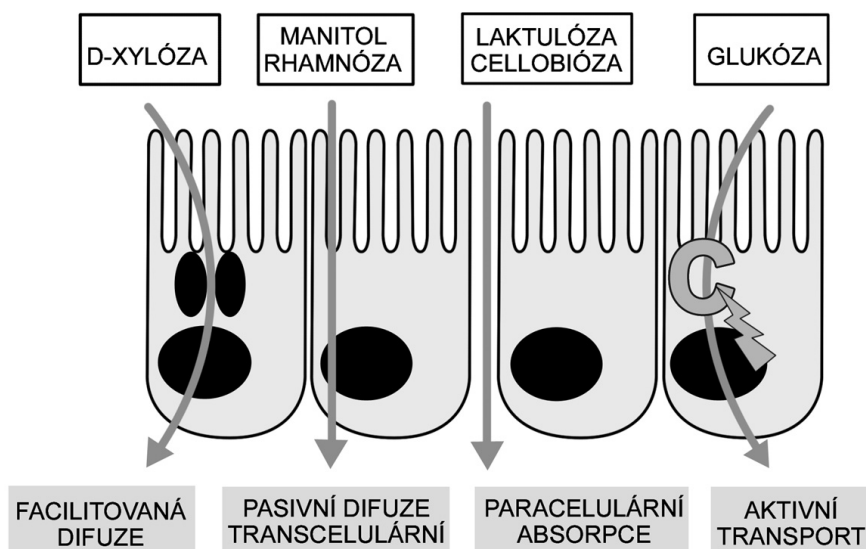
16.7 Testy střevní propustnosti – laktulózo/mannitolový (LA/MA) test

Testy střevní propustnosti jsou vhodné v diferenciální diagnostice onemocnění tenkého střeva, malabsorpčního syndromu. Pro hodnocení střevní permeability lze použít celou řadu markerů – monosacharidy, disacharidy, ^{51}Cr -EDTA, polyetyleneglykol (PEG), resp. jejich kombinace. U nás je nejpoužívanější test laktulózo/mannitolový, popsány jsou kombinace s cellobiózou, případně se sacharózou. Laktulóza je markerem paracelulární absorpce, a např. při celiakii dochází k rozvolnění buněčných vazeb, rozšíření těsné zóny a zvýšení prostupu laktulózy. Mannitol je markerem aktivního transportu přes buňku (enterocyt) a při celiakii je absorpce mannitolu snížena redukcí aktivního povrchu při atrofii střevní sliznice. LA/MA testu střevní permeability lze využít při monitorování postoperační chemoterapie. Laktulózo/man-

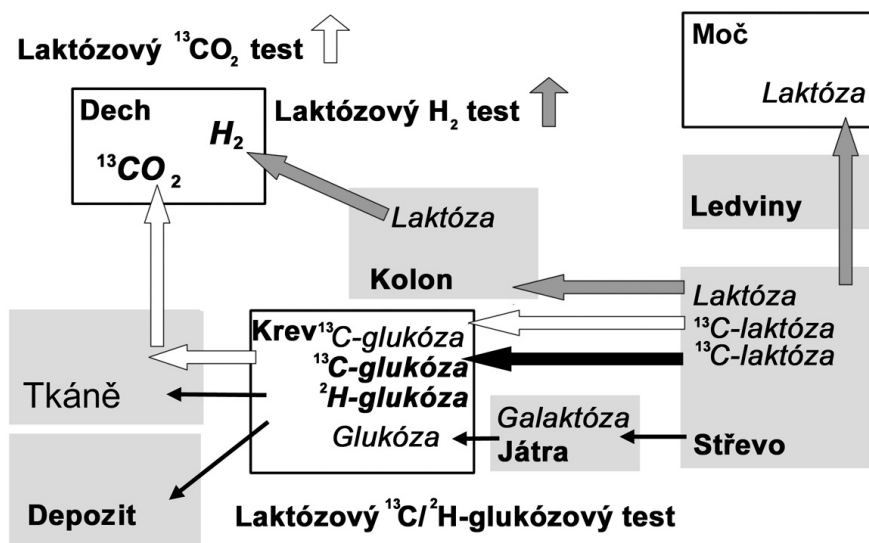
nitolový test lze kombinovat i s podáním D-xylózy, tato verze testu byla zavedena na pracovišti v Hradci Králové. Perorálně je podán roztok 10 g laktulózy, 2 g mannitolu, 2 g D-xylózy a 11 g glukózy ve 100 ml destilované vody, hyperosmolarita roztoku 1500 mosm/l zvyšuje senzitivitu testu. Analýza jednotlivých cukrů je provedena technikou plynové chromatografie, vypočtena jsou relativní množství jednotlivých cukrů v poměru k podanému množství a konečné indexy permeability LA/MA a LA/XY. Některé další studie doporučují širší kombinace tří substrátů, například s podáním sucralózy – stabilní během pasáže tlustým střevem. Schéma na obr. 16.6 demonstruje čtyři typy absorpce a transportu přes enterocyty tenkého střeva jednotlivých sacharidů, a princip jejich aplikace v testech střevní propustnosti.

16.8 Laboratorní diagnostika laktóзовé intolerance

Laktóзовý toleranční test je nepřímým měřením aktivity intestinální laktázy, enzymu kartáčového lemu enterocytu, který hydrolyzuje laktózu na glukózu a galaktózu. Laktóзовý test pro diferenciální diagnostiku laktóзовé nesnášenlivosti se klasicky prováděl hodnocením hladiny glykémie za 15, 30, 60 a 90 minut po perorálním podání 50 g laktózy v 500 ml vody. Průkazem deficitu laktázy je vzestup glykémie o méně než 1 mmol/l. Laktóзовý test lze dnes hodnotit moderními, neinvazivními dechovými testy, a to H_2 -testem, kdy ve vydechaném vzduchu stoupá koncentrace vodíku následkem bakteriálního rozkladu nerozštěpené lak-



Obr. 16.6 Stanovení střevní permeability podáním kombinace několika sacharidů s různým typem absorpce a transportu přes strukturu enterocytů ve sliznici tenkého střeva



Obr. 16.7 Diagnostika intolerance střevní laktázy funkčními testy s podáním laktózy. Schéma zachycuje tři typy testu: dechový test se stanovením vodíku ve vydechovaném vzduchu (H_2 -dechový test, šedé šipky), dechový test se stanovením ^{13}C uhlíku ve vydechovaném vzduchu ($^{13}\text{CO}_2$ test, bílé šipky) a kombinovaný test dvou izotopů ^{13}C -laktózy a ^2H -glukózy hodnocený LDI indexem v plazmě (Lactose Digestion Index, černé šipky).

tózy v tlustém střevě, nebo detekcí uhlíku ^{13}C po podání značené ^{13}C -laktózy. Velmi přesné výsledky poskytuje kombinovaná metoda $^{13}\text{C}/\text{H}_2$ -laktózový test, kdy je hodnoceno enzymatické štěpení laktózy (markerem je ^{13}C uhlík) a současně jako korekce motility, pasáže je použito bakteriálního štěpení v tlustém střevě (markerem je H_2). Diagnostiku laktózové intolerance lze také doplnit DNA stanovením specifického genotypu – varianta –13910 T/C metodou PCR. Pro zvýšení spolehlivosti testu laktózové intolerance lze použít i kombinace dvou izotopových markerů, nebo stanovovat izotopově značené markery přímo v plazmě (Stellaard, 2005). Schéma na obr. 16.7 popisuje několik variant funkčních testů s perorálním podáváním laktózy.

Literatura

1. Boeck, W.G., Adler, G., Gress, T.M.: Pancreatic function tests: when to choose, what to use. *Current Gastroenterology Reports* 2001, 3, s. 95–100.
2. Büchler, M.W., Malfertheiner, P.: A proposal for new classification of chronic pancreatitis based on clinical picture, imaging and pancreatic function. And the implications for conservative, interventional or surgical treatment. *Chronic pancreatitis, International Meeting EDS/EAGE Postgraduate Course, Bern, 2000.*
3. Frič, P., Dvořák, M., Nevoral, J.: Tenké střevo a malabsorpce. In: *Gastroenterologie, Mařatka, Z. (ed.), Karolinum 1999, s. 201–214.*
4. Ghos, Y., Geypens, B., Rutgeerts, P.: Stable isotopes and $^{13}\text{CO}_2$ breath tests for investigating gastrointestinal functions. *Food and Nutrition Bulletin*, 2002, 23, Suppl. 3, s. 166–168.
5. Ginsburg P.M., Janefalkar P., Rubin D.T., Ehrenpreis E.D.: Malabsorption Testing: A Review, *Current Gastroenterology Reports* 2000, 2, s. 370–377.
6. Green, P.H.R., Kamran Rostami, K., Michael N. Marsh, M.N.: Diagnosis of coeliac disease. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2005, 19, 3, s. 389–400.
7. Hill, P.G.: Gastric, Pancreatic, and Intestinal Function. In: Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Burns, D.E. (eds.): *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, Elsevier Saunders 2006, s. 1849–1889.
8. Chleboun, J., Kocna, P.: Isotope Selective Nondispersive Infrared Spectrometry Can Compete with Isotope Ratio Mass Spectrometry in Cumulative $^{13}\text{CO}_2$ Breath Tests: Assessment of Accuracy. *Klin. Biochem. Metab.*, 2005, 13; 34, s. 92–97.
9. Kocna, P., Kohout, P.: Biochemické vyšetřování tenkého střeva. In: Kohout P. et al. (ed.): *Možnosti neinvazivního vyšetřování tenkého střeva. Praha, Galén 2002, s. 29–39.*
10. Kocna, P.; Vaníčková, Z.; Perušičová, J., Dvořák, M.: Tissue Transglutaminase - Serology Markers for Coeliac Disease. *Clin.Chem.Lab.Med.*, 2002, 40, 5, s. 485–492.
11. Kocna, P.: Laboratorní diagnostika malabsorpčního syndromu. In: Lukáš M., Bortlík M. (eds.): *Malabsorpční syndrom. Praha, Solavay sro. 2003, s. 19–32.*
12. Kocna, P.: Biochemická diagnostika v gastroenterologii. In: Petr Schneiderka a kol. (eds.): *Kapitoly z klinické biochemie. 2. doplněné vydání, Praha Karolinum 2004, s. 131–157.*
13. Kocna, P., Vaníčková, Z.; Krechler, T.; Lukáš, M., Doseděl, J.: Test exokrinní funkce pankreatu – ^{13}C -MTG dechový test. *HPB Bulletin* 2004, 12; 3: s. 76–77.
14. Kopáčová, M.: Choroby tenkého střeva. In: Bureš, J., Horáček, J. (eds.): *Základy vnitřního lékařství. Galén 2003, s. 289–303.*

15. *Mowat, A.M.*: Coeliac disease – a meeting point for genetics, immunology, and protein chemistry, *Lancet* 2003, 361, s. 1290–1292.
16. *Špičák, J., Martínek, J., Kocna, P.*: Laboratorní diagnostika v gastroenterologii. In Zima, T. (ed.): Laboratorní diagnostika. Praha, Galén 2002, s. 59–79.
17. *Stellaard F.*: Use of dual isotope tracers in biomedical research. *Isotopes Environ Health Stud.* 2005, 41, s. 275–286.