Diagnostic utility of fecal calprotectin in chronic diarrhea of bacterial etiology in pediatric patients

Utilidad diagnóstica de la calprotectina fecal en la diarrea crónica de etiología bacteriana en pacientes pediátricos

Dear Editor:

Chronic diarrhea is defined as a diarrheal process that lasts more than 14 days and that may be associated, although not exclusively, with an infectious cause (persistent diarrhea). It is a relatively common problem in pediatric age, originating approximately 2–5% of pediatric consultations, and it is generally of functional origin.[1,2]

In this context, it is important to assess the inflammatory status and the quantification of fecal calprotectin is a useful, simple, and non-invasive test that can rule out intestinal inflammation in children with gastrointestinal symptoms. However, diagnostic accuracy of fecal calprotectin has not yet been adequately evaluated in pediatric persistent diarrhea.[3]

We report the diagnostic utility of fecal calprotectin in chronic diarrhea of bacterial etiology in pediatric patients. Seven hundred and seventy-seven patients (52.3% males, 47.7% females) with a diarrheal process lasting more than 14 days and aged between 1 and 14 years (median: 6 years) were included. This study met ethical recommendations of the Declaration of Helsinki[4] and it was approved by the Sevilla Sur Research Ethics Committee (No.1569-M1-17).

Calprotectin was quantified by fluorescence enzyme immunoassay in a Phadia®100 analyzer (Thermo Fisher Scientific, Germany). A laboratory study of infectious etiology was carried out by molecular techniques (LightMix® Modular-Gastro-Bacteria-Parasite-Virus Multiplex Testing. Roche, USA). Data were processed using R-software (R-Core Team, 2014) and MedCalc 13.0 software (Ostend, Belgium).

The results showed that in 11.3% of patients an infectious cause was detected and in 12.2% an inflammatory process was detected, although, in many cases, these processes were not isolated findings, but they were interrelated. Non-infectious causes were detected in 693 patients with a median calprotectin of 12 μg/g (median absolute deviation (MAD): 2; confidence interval (CI) 95%: 10–14.2) (Fig. 1a). Regarding cases in which an infectious origin of diarrhea was found, bacteria of clinical interest were detected in 31 patients (4%) with a median calprotectin of 123 μg/g (MAD: 44; CI95%: 95–218) (Fig. 1): the most prevalent bacteria were *Campylobacter* spp. with 20 cases (64.5%), followed by *Salmonella* spp. with 11 cases (35.5%). The presence of parasites was detected in 55 patients (7.1%) with a median calprotectin of 10 μg/g (MAD: 0; CI95%: 10–19) (Fig. 1a); in 22 cases (40%) the parasites had a proven clinical value (*Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp.) while in 33 cases (60%) the parasites were of uncertain clinical significance (*Blastocystis* spp., *Dientamoeba* spp.) (Fig. 1a). Viral etiology was not very prevalent, being detected in 2 patients (0.3%), and both corresponding to an infection by adenovirus. Furthermore, in 4 patients, there was a concomitant bacterial and parasitic infection: 2 cases of *Giardia* spp. and 1 case of *Blastocystis* spp. associated with diarrhea caused by *Salmonella* spp., and 1 case of *Blastocystis* spp. associated with diarrhea caused by *Campylobacter* spp.

Calprotectin results greater than 50 μg/g have been observed in some patients with a parasitic infection and in some patients without an infection. These patients presented a concomitant bacterial infection, inflammatory bowel disease, hematochezia, processes associated with immunoglobulin A deficiency, or autoimmune disease. Specifically, in the hematochezia cases studied, the median calprotectin was 118.5 μg/g; other recent studies show that calprotectin represents approximately 30% of neutrophil cytosol and, therefore, calprotectin levels increase as the extent of inflammation and bleeding increases.[5]

According to the results, the optimal cut-off point to differentiate bacterial diarrhea in the pediatric community was calculated in the ROC (receiver operating characteristic) curve. A calprotectin value of 74 μg/g (Fig. 1b) presented an adequate discriminatory value with a sensitivity of 96.77%, specificity of 97.45%, positive predictive value of 80.6% and negative predictive value of 99.6%.

These results agree with other studies which indicate that fecal calprotectin may be a useful biomarker in children with infectious diarrhea, since calprotectin values increase in an acute bacterial infection and they are related to the severity of symptoms. In the case of chronic diarrhea, different studies have reported its utility in the evaluation and discrimination of infectious diarrhea of bacterial etiology in children.[6] Usefulness of calprotectin in parasitic diarrhea in children has not been studied much, but the results of the only available study agree with the findings of our study: in absence of other associated underlying causes, the values of calprotectin in a parasitic infection are very low, except in an *Entamoeba histolytica* infection.[7]

In conclusion, our findings suggest the use of calprotectin as a biomarker of chronic diarrhea of bacterial etiology in pediatric patients. However, the discriminatory value of calprotectin can be affected in other situations such as hematochezia, inflammatory bowel disease, celiac disease, or the inclusion of children under 1 year of age. Therefore, their values should be interpreted in conjunction with clinical symptoms and other laboratory tests.

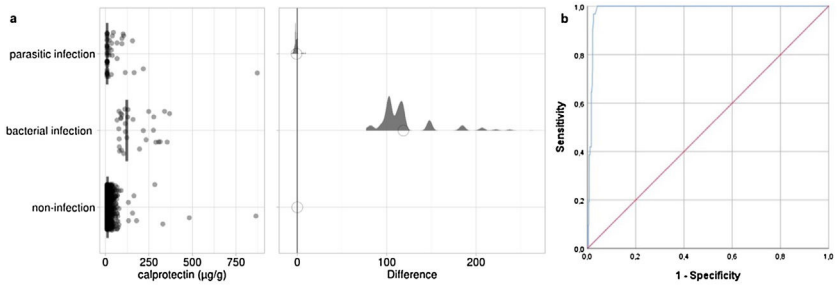

Fig. 1. (a) Fecal calprotectin in symptomatic patients without an infection, in patients with bacterial infection and in patients with parasitic infection. (b) ROC curve to differentiate patients with and without bacterial infection.

Bibliografía

1. Mathai J, Raju B, Bavdekar A. Pediatric Gastroenterology Chapter, Indian Academy of Pediatrics. Chronic and persistent diarrhea in infants and young children: status statement. Indian Pediatr. 2011;48:37–42.
2. Lee KS, Kang DS, Yu J, Chang YP, Park WS. How to do in persistent diarrhea of children? Concepts and treatments of chronic diarrhea. Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr. 2012;15:229–36.
3. Holtman GA, Lisman-van Leeuwen Y, Reitsma JB, Berger MY. Noninvasive tests for inflammatory bowel disease: a meta-analysis. Pediatrics. 2016;137:1–11.
4. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. JAMA. 2013;310:2191–4.
5. Day AS, Adamji M. Commentary: impact of fecal calprotectin measurement on decision-making in children with inflammatory bowel disease. Front Pediatr. 2017;5:133.
6. Holtman GA, Lisman-van Leeuwen Y, Kollen BJ, Norbruis OF, Escher JC, Kindermann A, et al. Diagnostic accuracy of fecal calprotectin for pediatric inflammatory bowel disease in primary care: a prospective cohort study. Ann Fam Med. 2016;14:437–45.
7. Salman YJ, Ali CA, Razaq A. Fecal calprotectin among patients infected with some protozoan infections. Int J Curr Microbiol Appl Sci. 2017;6:3258–74.

Esperanza Lepe-Balsalobre [a,*], Ricardo Rubio-Sánchez [a], Cristina Úbeda [b], José M. Úbeda Ontiveros [c]

[a] *Department of Clinical Biochemistry, Valme University Hospital, Seville, Spain*
[b] *Department of Nutrition and Food Science, Toxicology and Legal Medicine, Faculty of Pharmacy, University of Seville, Seville, Spain*
[c] *Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of Seville, Seville, Spain*

* Corresponding author.
E-mail address: esplepbal@gmail.com
(E. Lepe-Balsalobre).

https://doi.org/10.1016/j.eimc.2020.07.014
0213-005X/ © 2020 Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Anisakiosis colónica, un caso infrecuente caracterizado molecularmente mediante PCR-RFLP

Colonic anisakiasis, an infrequent case molecularly characterised by PCR-RFLP

La anisakiosis es una zoonosis emergente y subestimada en España, cuya incidencia es la mayor de Europa[1]. Los principales agentes etiológicos pertenecen al complejo *Anisakis simplex* sensu lato (s.l.), compuesto por 3 especies gemelas: *Anisakis simplex* sensu stricto (s.s.), *Anisakis pegreffii y Anisakis berlandi.* Existen diferentes formas clínicas: anisakiosis gástrica, gastroalérgica, intestinal y ectópica. En la forma intestinal, el íleon terminal suele ser el segmento más afectado[2], y, por el contrario, el colon y el yeyuno, los menos implicados[3].

En este estudio, presentamos un caso de anisakiosis colónica en un varón de 69 años, español, con antecedente de pólipos en colon y polipectomía endoscópica de lesión adenomatosa de 30 mm 2 años antes, al que se le realiza colonoscopia de control. El paciente no refiere clínica digestiva, ni de otro tipo.

En la colonoscopia se observa, además de 3 pólipos sésiles que se extirpan, un gusano blanquecino transparente de 6-8 mm que penetra la mucosa en el colon descendente (fig. 1A), y que se envía al laboratorio para su identificación molecular.

Inicialmente, se realiza una identificación morfológica de la larva extraída al microscopio siguiendo las claves de Petter y Maillard (1988)[4]. La larva, parcialmente destruida, de color blanquecino y de 19 mm, es identificada morfológicamente como compatible con *A. simplex* s.l. Posteriormente, la extracción automatizada del ADN genómico se llevó a cabo empleando el kit comercial QIAamp® DNA FFPE (QIAGEN, Hilden, Alemania) con un paso previo de incubación con proteinasa K y buffer ATL a 56 °C durante toda la noche.

Para la caracterización molecular, los productos de PCR correspondientes a la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADN ribosómico son amplificados y posteriormente digeridos con las enzimas de restricción HhaI y HinfI (New England Biolabs, Massachusetts, EE. UU.) según el protocolo descrito por D'Amelio et al. 2000[5]. Los resultados de la PCR (fig. 1B) determinan que el ADN amplificado de la larva presenta un peso molecular (960 pb) compatible con el esperado para el complejo *A. simplex* s.l. El líquido de transporte de la larva también muestra una amplificación a 960 pb, aunque con menor intensidad (amplificación de ADN libre).

En el análisis de los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) del ADN amplificado, la larva presenta los perfiles característicos descritos para la especie *A. simplex* s.s.[5] (fig. 1C). La secuenciación confirmó la identificación del genotipo *A. simplex* s.s. y la secuencia se ha anotado en el GenBank (NA: MT516319). Esta presenta elevada homología con otros aislados del mismo genotipo (99,9% NA: MN871437.1, NA: KY973681.1).

La anisakiosis es una patología poco habitual en las regiones más distales del tubo digestivo, siendo infrecuente su presencia en el colon, aunque sí se han llegado a reportar casos en el segmento ascendente[6,7]. Hasta la fecha, Joo et al.[8] han sido los únicos que han descrito casos en el segmento descendente, y ninguno ha sido reportado en España.

Las manifestaciones clínicas de la anisakiosis intestinal son bastante diversas, desde una afección asintomática, pasando por dolor abdominal difuso con náuseas, vómitos. . ., hasta un abdomen agudo por perforación intestinal, obstrucción, invaginación, etc.[8]. También se ha postulado la asociación entre la colonización por *Anisakis* spp. y cáncer, debido al posible efecto tumorigénico resultante de la inflamación local persistente, así como al inducido por ciertas secreciones del parásito[9].

El caso presentado es un paciente asintomático, en el que el hallazgo de anisakiosis fue incidental, sin embargo, se desconoce el pronóstico si se hubiera dejado a su libre evolución. La localización de la larva a nivel del colon descendente dota a nuestro caso de una mayor singularidad. Una de las razones que explicarían por qué es más frecuente encontrar las larvas en el colon ascendente es que, en esta región, el peristaltismo intestinal está enlentecido, y de esta forma la larva encuentra las condiciones idóneas para su penetración y no se ve obligada a migrar hacia regiones más distales del colon[8].

La técnicas moleculares son de gran utilidad en el diagnóstico de las anisakiosis intestinales, siendo aplicables incluso cuando la larva se encuentra en mal estado de conservación, lo cual es habitual debido a la manipulación durante el proceso de extracción, o como resultado de la respuesta inmunitaria del paciente al intentar eliminarla. Estas técnicas también proporcionan el genotipado, con una caracterización inequívoca a nivel de especie, a diferencia del estudio morfológico, en el que no solamente hay que tener en cuenta la integridad de la larva, sino también la imposibilidad de distinguir especies gemelas. Además, cabe resaltar su alta sensibilidad, que permite la amplificación e identificación, incluso con el ADN presente en el líquido de transporte de la muestra, como se ha demostrado.