

## Approcci diagnostici innovativi per le malattie infiammatorie croniche intestinali

Andrea Padoan<sup>1</sup>, Daniela Basso<sup>1</sup>, Renata D'Incà<sup>2</sup>, Giorgio Arrigoni<sup>3</sup>, Maria Luisa Scapellato<sup>4</sup>, Nicole Contran<sup>1</sup>, Mario Plebani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina (DIMED), Università degli Studi di Padova e Dipartimento Didattico-Scientifico-Assistenziale (DIDAS), Servizi di Diagnostica Integrata, Azienda Ospedale-Università di Padova;

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Chirurgiche Oncologiche e Gastroenterologiche (DISCOG), Università degli Studi di Padova

<sup>3</sup>Dipartimento di Scienze Biomediche (BIOMED), Università degli Studi di Padova

<sup>4</sup>Dipartimento di Scienze Cardio-Toraco-Vascolari e Sanità pubblica, Università degli Studi di Padova

*Questo lavoro è stato in parte presentato al 51° Congresso Nazionale SIBioC, 20-22 Novembre 2019, Padova, quale Comunicazione Orale*

### ABSTRACT

#### New diagnostic approaches for inflammatory bowel diseases.

Inflammatory bowel diseases (IBD), that include ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD) are among the most serious and perplexing digestive diseases. Indeed, diagnosis is sometimes delayed due to the variability and subtlety of its initial manifestations, especially in CD. Since no gold standard is currently defined for the diagnosis and monitoring of IBD, a number of genomic, metabolomic and proteomic studies have tried to address this issue. After illustrating the traditional diagnostic approach (mainly fecal calprotectin), this Opinion Paper reports about the utility of some new biomarkers (micro-RNA, proteomic and metabolomic markers). In particular, the results of a study on fecal peptides are commented. After verifying that proteolytic degradation was clearly visible in fecal samples of a number of control (n=34) and patients with IBD (n=133), the matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) time of flight (TOF) mass spectrometry was used to evaluate peptides patterns of fecal samples, in a range from 1 000 to 4 000 Da. This cohort was used to derive an algorithm for IBD diagnosis. Diagnostic performances were then estimated using an additional validation cohort, including subjects with IBD (n=42) and without IBD (n= 28). Sensitivity was 54.8% (95%CI: 38.7%–70.2%) and specificity 96.4% (95%CI: 81.7%–99.9%) with a positive and a negative predictive value of 95.8% (95%CI: 76.7%–99.4%) and 58.7% (95%CI: 50.3–66.6%), respectively. In comparison, fecal calprotectin, achieved sensitivity and specificity of 78.6% (95%CI: 63.2%–89.7%) and 42.9% (95%CI: 24.5%–62.8%). In spite of the obtained good diagnostic performances, any candidate biomarker, once identified, should be carefully validated before being translated into clinical practice.

### INTRODUZIONE

Le malattie infiammatorie croniche intestinali (MICI) rappresentano un gruppo eterogeneo di patologie idiopatiche che interessano il tratto gastrointestinale, con una storia clinica caratterizzata da fasi di remissione alternati a periodi di riacutizzazione (1). Secondo la classificazione di Montreal, la malattia di Crohn (MC) e la colite ulcerosa (RCU) rappresentano le due principali tipologie di MICI, tra le quali si deve includere la colite indeterminata, caratterizzata da

localizzazione colica ma con caratteristiche tali da non permettere una classificazione chiara né alla MC né alla RCU (1,2). L'incidenza di MICI in Italia è variabile da regione a regione ed è più bassa per la MC che per la RCU (3,4). Una analisi ha valutato che tra il 2008 e il 2009 l'incidenza nella regione Lazio era di 12,2 e 14,5 nuovi casi su 100 000 abitanti per MC e RCU, rispettivamente (5). In aggiunta, recenti studi epidemiologici hanno dimostrato che l'incidenza delle MICI presenta una tendenza all' aumento, soprattutto nelle regioni meno industrializzate del pianeta (6).

Corrispondenza a: Andrea Padoan, Dipartimento di Medicina (DIMED), Università degli Studi di Padova e Dipartimento Didattico-Scientifico-Assistenziale (DIDAS), Servizi di Diagnostica Integrata, Azienda Ospedale-Università di Padova, via Giustiniani 2, 35124 Padova, Tel 049-8212801, E-mail andrea.padoan@unipd.it

Ricevuto: 28.08.2020

Revisionato: 06.11.2020

Accettato: 09.12.2020

Publicato on-line: 23.02.2021

DOI: 10.19186/BC\_2020.105

### Quadro clinico e fattori di rischio

Il quadro clinico delle MICI include dolore addominale persistente, diarrea, anche ematica, e calo ponderale e può essere anche particolarmente severo e invalidante. Pertanto, queste malattie sono generalmente considerate delle malattie "sociali", di grosso impatto economico, caratterizzate da una compromissione a lungo termine della qualità della vita reale, ma che può portare anche a complicanze gravi quali le neoplasie del tratto gastro-intestinale (7,8). L'eziologia di queste affezioni non è ancora chiarita, anche se è considerata multifattoriale e fattori genetici e ambientali ne contribuiscono allo sviluppo. Recentemente sono stati identificati nove fattori di rischio per le MICI, tra cui il fumo, la vita urbana, appendicectomia o tonsillectomia precedenti, l'assunzione di antibiotici, contraccettivi orali e bevande alcoliche, deficit di vitamina D e colonizzazione intestinale da infezioni da *Helicobacter* spp (esclusa la specie *Helicobacter pylori*) (9).

### DIAGNOSI

Nelle MICI, e in particolare nella MC, il processo diagnostico può richiedere un periodo lungo di tempo. Infatti, poiché le manifestazioni iniziali possono essere non specifiche e generiche e confuse con sintomatologia legata alla sindrome dell'intestino irritabile, la diagnosi può essere talvolta tardiva (10). La diagnosi di MICI si avvale non solo dei dati clinici, ma anche dei risultati di esami endoscopici, istologici e radiologici. Gli esami di laboratorio di primo livello utilizzati includono l'esame emocromocitometrico, la determinazione della velocità di eritrosedimentazione (VES) e la misura della concentrazione della proteina C reattiva (PCR); tuttavia, questi parametri presentano generalmente un'utilità piuttosto limitata, in quanto sono indicatori di un quadro infiammatorio generico. Altri esami sulle feci quali l'esame parassitologico e la coprocoltura, sono eseguiti in concomitanza alle valutazioni biochimiche ed ematologiche, principalmente per escludere casi di diarrea infettiva.

Ad oggi, un marcatore sempre più utilizzato nella diagnosi delle MICI è la calprotectina fecale (CalFec). La calprotectina è un etero-complesso composto dalle proteine S100A8 e S100A9 e la sua conformazione ed attività dipendono dal legame con calcio e zinco (11); è prodotta principalmente dai granulociti neutrofilici e può essere rilasciata nel lume intestinale in seguito a processi infiammatori. È stato dimostrato che la calprotectina è resistente alla degradazione proteolitica normalmente presente nel tratto intestinale (12) e pertanto la sua concentrazione può essere determinata efficacemente nelle feci, facilitando quindi il suo utilizzo come marcatore di malattia.

Nel contesto della diagnosi di primo livello, la CalFec permette di differenziare tra sindrome dell'intestino irritabile e le MICI con un valore predittivo negativo (VPN) del 97% e un valore predittivo positivo (VPP) del

40% (13). Valori elevati di CalFec possono indirizzare i pazienti alla visita specialistica e/o ad eventuali ulteriori accertamenti diagnostici. Per la determinazione della CalFec è richiesta una piccola quantità di materiale fecale (almeno 0,5 g) e l'analisi può essere eseguita sia su feci liquide che formate. Ulteriori accertamenti diagnostici possono essere svolti determinando i livelli sierici degli autoanticorpi verso costituenti intestinali endogeni, come gli anticorpi anti-citoplasma dei neutrofilici (ANCA) e verso i microorganismi, quali gli anticorpi anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA), specialmente per la discriminazione tra MC e RCU. Il tasso di positività ad ANCA (pattern atipico di positività) è del 60-70% nelle RCU e nel 10-30% dei pazienti con MC. Diversamente, gli ASCA sono positivi nel 60%-70% nei pazienti con MC. Inoltre, nei pazienti con ANCA positivi e con MC (10%-15%), il fenotipo clinico è simile a quello della RCU (14). La sola determinazione di ANCA ed ASCA, comunque, non è sufficiente per la diagnosi del sottotipo di malattia, anche se può essere di aiuto per differenziare le due condizioni.

### Nuovi marcatori per la diagnosi delle malattie infiammatorie croniche intestinali e per l'identificazione del sottotipo

Le difficoltà spesso incontrate nella diagnosi, soprattutto nei bambini in cui questa è spesso tardiva, motivano la intensa ricerca di nuovi biomarcatori per le MICI, svolta negli ultimi anni. Altri ambiti di impiego di biomarcatori per le MICI possono essere la caratterizzazione efficace del sottotipo (MC o RCU) e il monitoraggio della ripresa di malattia nel tempo.

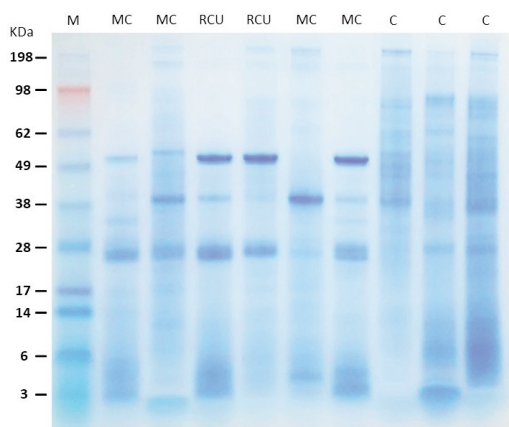
È noto che gli RNA non codificanti circolanti, quali i micro-RNA (miRNA), per la loro capacità di indirizzare l'espressione di quasi un terzo di tutti i trascritti umani, hanno un ruolo chiave nello sviluppo e nell'omeostasi dei tessuti. Pertanto, la loro deregolazione è verosimilmente implicata nella patogenesi di diverse malattie umane. Recentemente, i livelli di diversi miRNA sono stati descritti come alterati nelle MICI (15) e, pertanto, è stato suggerito come i miRNA possano avere un ruolo nella diagnosi di malattia, nell'identificazione del sottotipo ed eventualmente anche nel monitoraggio della terapia (16). Per esempio, miR-200c e miR-155, identificati nel siero e verificati essere sovra-espressi nei pazienti con MICI, sono stati descritti come coinvolti nella patogenesi della malattia (16).

Altri ambiti in cui sono stati ricercati e descritti nuovi biomarcatori per le MICI sono la metabolomica clinica e la proteomica clinica. Lo studio del metaboloma è motivato dal concetto che la produzione dei metaboliti (che costituiscono il metaboloma) è regolata ed influenzata, oltre che dagli stati patologici (quali le MICI), anche dai microorganismi intestinali. Pertanto, sia la variazione fisiopatologica causata dalle MICI, sia l'effetto sul microbiota intestinale della malattia stessa possono causare alterazioni significative del metaboloma (17). Tra i diversi metaboliti studiati, è stato evidenziato come i lipidi, la colina e i profili di diversi aminoacidi

differiscano tra MC e RCU. Uno studio recente, ha evidenziato come tra pazienti con MICI e soggetti sani siano rilevabili 173 metaboliti alterati nel siero, inclusi appunto lipidi, amminoacidi e metaboliti del ciclo degli acidi tricarbossilici (16). La scienza che oggi più di altre sembra essere in grado di studiare e catalogare le proteine, quantificandole, è la proteomica. Una recente revisione della letteratura sull'argomento, ha individuato 32 studi di proteomica che analizzano le MICI (18). Considerando complessivamente i risultati, la maggior parte di questi studi ha mostrato che esistono chiare differenze nel proteoma tra pazienti MICI e soggetti di controllo. Tuttavia, sebbene questi nuovi marcatori possano essere utilizzati come esami di primo e di secondo livello per la tipizzazione delle MICI, i risultati non sono ancora stati validati da studi indipendenti, un passaggio fondamentale per l'impiego di nuovi biomarcatori nella pratica clinica.

#### *L'analisi peptidomica delle feci come potenziale strumento per la diagnosi delle malattie infiammatorie croniche intestinali*

La funzione intestinale di assorbimento dei nutrienti è resa possibile dall'attività degli enzimi proteolitici (proteasi), presenti a livello dell'orletto a spazzola (ad esempio enteropeptidasi e aminopeptidasi), a livello intracellulare e di membrana, oppure come enzimi secreti dal pancreas (tripsina, chimotripsina, ) (19). Recentemente, è stato suggerito che le proteasi intestinali possano svolgere un ruolo nella patogenesi delle malattie infiammatorie, autoimmuni e neoplastiche gastrointestinali (19). In accordo a quanto riportato in letteratura, una prima analisi preliminare da noi eseguita tramite elettroforesi su gel di poliacrilammide, su una serie di campioni di feci di 3 soggetti di riferimento e 6 pazienti con MICI, ha permesso di evidenziare che il proteoma fecale è povero nella frazione ad alto peso molecolare (>100 kDa) (Figura 1).



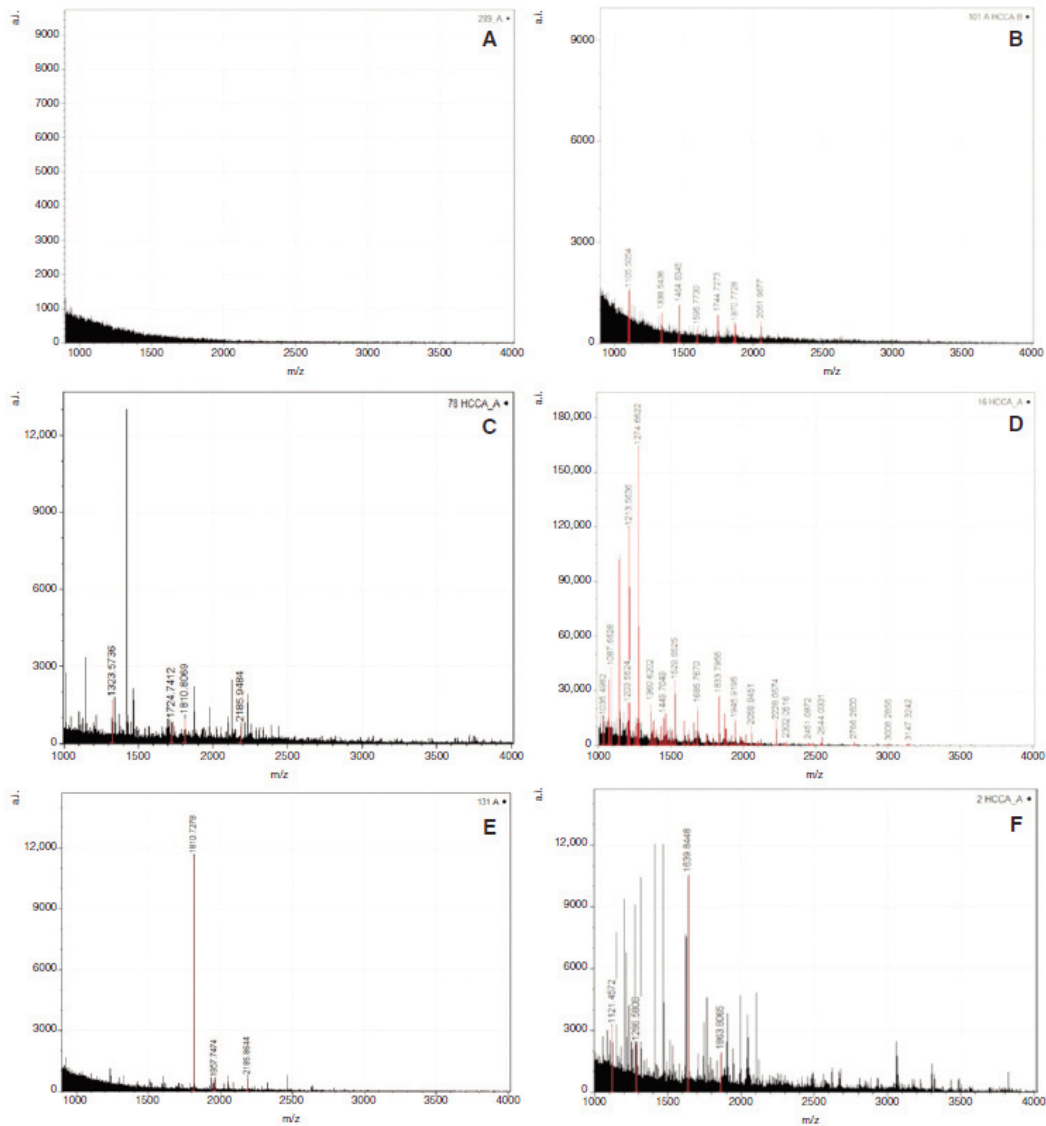
**Figura 1.** Elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecil solfato di 6 soggetti con MICI e 3 soggetti di riferimento che non presentavano malattie gastrointestinali (M, marcatore di peso molecolare; C, soggetti di controllo; MC, malattia di Chron; RCU, rettocolite ulcerosa).

Inoltre, sono spesso visibili sul gel processi di degradazione proteolitica, presenti sia sui soggetti di controllo che sui soggetti con MICI. Tuttavia, la determinazione delle proteine totali tramite saggio colorimetrico Bradford, ha permesso di evidenziare che le feci hanno un contenuto proteico variabile compreso tra 0,1 e 10 g/L. Nonostante la bassa numerosità dei casi, questi risultati suggeriscono come il materiale fecale non sia quindi privo di proteine/peptidi, sebbene esista una variabilità complessiva, probabilmente legata a fattori quali contenuto in liquidi, la dieta e il metabolismo. Tali risultati esplorativi sono di interesse, sebbene sarebbe opportuno una valutazione del proteoma ad alto peso molecolare su una coorte più diversificata e più ampia di soggetti.

Allo scopo di identificare eventuali differenze nel peptidoma fecale (componente del proteoma che include peptidi con peso molecolare <4000 Da) in relazione alla presenza o assenza delle MICI, è stata utilizzata la tecnologia di spettrometria di massa (MS) a ionizzazione matrice-assistita tramite desorbimento laser (MALDI), accoppiata al metodo di rilevamento basato sul tempo di volo (TOF). L'utilizzo della tecnologia MALDI-TOF presentava il vantaggio di ottenere dei risultati semi-quantitativi riproducibili in diversi fluidi biologici (20,21), con una fase pre-analitica e analitica rapida e a basso costo. In breve, questo processo analitico (che è stato oggetto di un brevetto Numero 102018000005689 e WO 2019/224663) prevede una fase di estrazione dei peptidi in acqua (estratto). Successivamente, l'estratto viene miscelato in egual volume con la matrice alfa-ciano-4-idrossicinnamico acido (disciolta in 70% acetonitrile e 30% di 0,1% acido trifluoroacetico alla concentrazione di 5mg/mL). Infine, la soluzione viene analizzata tramite spettrometria di massa MALDI-TOF, in un intervallo di massa 1000-4000 Da, come dettagliatamente descritto in una recente pubblicazione (22).

In questo studio sono state arruolate due coorti di individui. La prima coorte (coorte esplorativa), arruolata tra settembre 2016 e settembre 2017, includeva soggetti senza (n=34) (soggetti di controllo) e pazienti con MICI (n=133), di cui 72 MC, 56 RCU e 5 a fenotipo indeterminato. La seconda coorte (coorte di validazione) è stata arruolata tra ottobre 2017 e febbraio 2019 e, similmente alla prima, includeva soggetti di controllo (n=28) e pazienti con MICI (n=42), di cui 27 MC e 15 RCU. Lo studio ha ricevuto l'approvazione dal Comitato Etico Locale (Prot. 3756/AO/16).

L'analisi della coorte esplorativa ha permesso di identificare complessivamente 438 segnali MALDI (picchi); tra questi alcuni erano comuni tra pazienti e soggetti di riferimento, altri erano quasi esclusivamente presenti in uno o nell'altro gruppo. Il risultato più evidente è stato che molti degli spettri di massa dei soggetti di riferimento erano privi di segnali MALDI nell'intervallo di massa studiato in 13/34 (38%) dei casi (Figura 2A) (22). Tra gli spettri di massa dei 21 soggetti rimanenti, è stato identificato un gruppo di picchi di controllo, composto da 12 picchi (2,8%) (gruppo "controllo") presenti



**Figura 2.** Spettri MALDI-TOF esemplificativi di: pannello A un soggetto di riferimento con spettro privo di picchi; pannello B un soggetto di riferimento con picchi del gruppo “condiviso”; pannelli C e D due spettri di soggetti con malattia di Crohn (MC); pannelli E e F due spettri di soggetti con rettocolite ulcerosa (RCU).

esclusivamente nei controlli. Inoltre, sono stati identificati 79 picchi condivisi con i pazienti con MICI (gruppo “condivisi”) (22). Considerando gli spettri di massa dei soggetti con MICI, 67/438 (15,3%) picchi erano condivisi tra soggetti di controllo e pazienti (gruppo “condivisi”), mentre 359 (81,9%) picchi erano associati quasi esclusivamente alla malattia (gruppo “MICI”) (22). A questo punto è stato realizzato un algoritmo diagnostico che considerasse i soli segnali MALDI come segue:

- se presenti segnali dei gruppi “controllo” o “condivisi”, allora il campione era da classificare come appartenente a un soggetto di controllo;
- se presenti segnali del gruppo “MICI”, allora il campione era da classificare come appartenente ad un paziente MICI (22).

In base a questo algoritmo, la coorte di validazione è stata classificata in cieco in soggetti di riferimento e MICI e i risultati confrontati con la diagnosi clinica, ottenendo una sensibilità del 54,8% [intervallo di confidenza al 95% (IC95%): 38,7%–70,2%] e una specificità del 96,4% (IC95%: 81,7%–99,9%), con un valore predittivo positivo (VPP) del 95,8% (IC95%: 76,7%–99,4%) e valore predittivo negativo (VPN) del 58,7% (IC95%: 50,3–66,6%). In questa stessa coorte, la CalFec presentava sensibilità del 78,6% (IC95%: 63,2%–89,7%), specificità del 42,9% (IC95%: 24,5%–62,8%), VPP del 67,4% (IC95%: 59,1%–74,7%) e VPN del 57,1% (IC95%: 39,4%–73,3%).

In una ulteriore analisi è stato valutato se attraverso i 359 picchi associati alle MICI era possibile identificare

dei segnali MALDI caratteristici del sottotipo di malattia nella coorte esplorativa. Come risultato, 34 picchi erano associati alla MC, 25 alla RCU. Questi picchi erano associati alla MC ed alla RCU nella corte esplorativa (test esatto di Fisher:  $p < 0,0001$  for MC e  $p = 0,028$  for RCU).

## CONCLUSIONI

L'aumento dell'incidenza delle MICI, unita al fatto che la loro diagnosi può essere tardiva specialmente nei soggetti pediatrici, pone enfasi sull'attuale necessità di identificare nuovi biomarcatori per queste malattie. Diversi approcci, legati prevalentemente alle nuove scienze “-omiche”, supportano l'utilizzo di nuove tecnologie per la ricerca di biomarcatori su diversi fluidi biologici, tra cui le feci. Tuttavia, prima che questi marcatori possano essere resi disponibili per la diagnostica *in vitro*, devono subire un processo di validazione a più fasi, che garantisca di ottenere risultati robusti e riproducibili. Lo studio qui illustrato rappresenta un esempio di come una tecnologia di spettrometria di massa ad alta produttività, come quella MALDI-TOF, possa essere impiegata efficacemente per fini diagnostici, offrendo al contempo un nuovo ambito di indagine per le MICI, il peptidoma, fin ora poco considerato nella ricerca di nuovi biomarcatori diagnostici. Tuttavia, la strada per trasformare questi risultati in un esame diagnostico alternativo alla CalFec, il marcatore attualmente più utilizzato per la diagnosi delle MICI, richiede ulteriori sforzi, in particolare per l'automazione della fase analitica e per la creazione di un software in grado di interpretare i risultati di spettrometria di massa, nonché la verifica delle caratteristiche operative dell'esame su altri gruppi di soggetti di interesse clinico.

## CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

## BIBLIOGRAFIA

- Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, et al. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: Controversies, consensus, and implications. *Gut* 2006;55:749–53.
- Nemati S, Teimourian S. An overview of inflammatory bowel disease: general consideration and genetic screening approach in diagnosis of early onset subsets. *Middle East J Dig Dis* 2017;9:69–80.
- Tragnone A, Corrao G, Miglio F, et al. Incidence of inflammatory bowel disease in Italy: A nationwide population-based study. *Int J Epidemiol* 1996;25:1044–52.
- Galeone C, Pelucchi C, Barbera G, et al. Crohn's disease in Italy: A critical review of the literature using different data sources. *Dig Liver Dis* 2017;49:459–66.
- Di Domenicantonio R, Cappai G, Arcà M, et al. Occurrence of inflammatory bowel disease in central Italy: A study based on health information systems. *Dig Liver Dis* 2014;46:777–82.
- M'Koma AE. Inflammatory bowel disease: An expanding global health problem. *Clin Med Insights Gastroenterol* 2013;6:33–47.
- Moradkhani A, Beckman LJ, Tabibian JH. Health-related quality of life in inflammatory bowel disease: Psychosocial, clinical, socioeconomic, and demographic predictors. *J Crohn's Colitis* 2013;7:467–73.
- Axelrad JE, Lichtiger S, Yajnik V. Inflammatory bowel disease and cancer: the role of inflammation, immunosuppression, and cancer treatment. *World J Gastroenterol* 2016;22:4794–801.
- Piovani D, Danese S, Peyrin-Biroulet L, et al. Environmental Risk Factors for Inflammatory Bowel Diseases: An Umbrella Review of Meta-analyses. *Gastroenterology* 2019;157:647–59.
- Fiorino G, Danese S. Diagnostic delay in Crohn's Disease: Time for Red Flags *Dig Dis Sci* 2016;61:3097–8.
- Laserna-Mendieta EJ, Lucendo AJ. Faecal calprotectin in inflammatory bowel diseases: a review focused on meta-analyses and routine usage limitations. *Clin Chem Lab Med* 2019;57:1295–307.
- Røseth AG, Fagerhol MK, Aadland E, et al. Assessment of the neutrophil dominating protein calprotectin in feces: A methodologic study. *Scand J Gastroenterol* 1992;27:793–8.
- Turvill J, O'Connell S, Brooks A, et al. Evaluation of a faecal calprotectin care pathway for use in primary care. *Prim Heal Care Res Dev* 2016;17:428–36.
- Saibeni S, Folli C, de Franchis R, et al. Diagnostic role and clinical correlates of anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies (ASCA) and anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (p-ANCA) in Italian patients with inflammatory bowel diseases. *Dig Liver Dis* 2003; 35:862–8.
- Coskun M, Bjerrum JT, Seidelin JB, et al. MicroRNAs in inflammatory bowel disease - pathogenesis, diagnostics and therapeutics. *World J Gastroenterol* 2012;18:4629–34.
- Chen P, Zhou G, Lin J, et al. Serum biomarkers for inflammatory bowel disease. *FrontMed* 2020 doi: 10.3389/fmed.2020.00123.
- Lavelle A, Sokol H. Gut microbiota-derived metabolites as key actors in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2020;17:223–37.
- Gisbert JP, Chaparro M. Clinical usefulness of proteomics in inflammatory bowel disease: A comprehensive review. *J Crohns Colitis* 2019;13:374–84.
- Antalis TM, Shea-Donohue T, Vogel SN, et al. Mechanisms of disease: Protease functions in intestinal mucosal pathobiology. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2007;4:393–402.
- Padoan A, Basso D, La Malfa M, et al. Reproducibility in urine peptidome profiling using MALDI-TOF. *Proteomics* 2015;15:1476–85.
- Padoan A, Basso D, Zambon C-F, et al. MALDI-TOF peptidomic analysis of serum and post-prostatic massage urine specimens to identify prostate cancer biomarkers. *Clin Proteom* 2018 doi: 10.1186/s12014-018-9199-8.
- Basso D, Padoan A, D'Inca R, et al. Peptidomic and proteomic analysis of stool for diagnosing IBD and deciphering disease pathogenesis. *Clin Chem Lab Med* 2020;58:968–79.