

Misura di Calprotectina fecale: un prezioso esame non invasivo nella Malattia Infiammatoria Cronica Intestinale (MICI)

Gino Ciarrocchi¹, Luisita Marinelli¹, Massimo Tocchini¹, Caterina Todeschini², Antonio Benedetti², Giuseppe Feliciangeli²

¹U.O. Laboratorio analisi, Settore Sierologia, Azienda Ospedaliera Policlinico "Ospedali Riuniti", Ancona

²U.O. Clinica di Gastroenterologia, Università degli Studi di Ancona, Ancona

ABSTRACT

Measurement of calprotectin in stool: a valuable non-invasive test for active Inflammatory Bowel Disease (IBD)

Calprotectin is a calcium binding leukocyte-derived protein, accounting for 60% in the cytosol of neutrophil leukocytes; it has stability in faeces, thus rendering suitable the assessment of protein in stool samples. Calprotectin is considered a biomarker of intestinal inflammation and recent studies have demonstrated a close correlation among increased levels of protein in stool and an active inflammatory bowel disease (IBD), such as Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), whereas normal or slightly altered values are found in healthy subjects and in patients with functional irritable bowel syndrome (IBS). A total of 130 patients suffering for a lot of intestinal symptoms were submitted to clinical evaluation and to colonoscopic examination ("gold standard"); they were diagnosed as follows: 51 with CD, 21 with UC, 21 with intestinal pathology other than IBD, 37 with IBS. Assessment of calprotectin was performed in stool samples collected from all enrolled patients and from a group of 30 healthy asymptomatic subjects. Median calprotectin value was significantly elevated in CD patients (330 µg/g) and in UC patients (385 µg/g); normal values were found in IBS patients (40 µg/g) and in ASY subjects (18 µg/g), with statistical difference among groups ($p < 0,0001$). Assessment of faecal calprotectin seems to be a suitable, not expensive and non-invasive biomarker of intestinal inflammation causing intestinal mucosal damage, especially in active inflammatory bowel disease. It also provides a useful tool in follow up of diagnosed patients.

INTRODUZIONE

La Malattia Infiammatoria Cronica Intestinale (MICI) è una sindrome intestinale associata a grave danno organico delle mucose, la cui eziologia è a tutt'oggi ancora ignota. Essa comprende due differenti entità cliniche ben caratterizzate: la Malattia di Crohn (MC) e la Retto-Colite Ulcerosa (RCU).

La diagnosi di MICI ha rappresentato finora una sfida per il gastroenterologo, a causa del sovrapporsi di segni obiettivi aspecifici, quali diarrea, dolore addominale ed ematochezia, presenti anche in disordini con alterazione funzionale ma non organica dell'intestino (21,22), come la Sindrome dell'Intestino Irritabile (SII), ma anche in patologie extraintestinali, come artrite reumatoide e alcuni processi autoimmuni (1). Non si conoscono a tutt'oggi biomarcatori specifici di MICI: a completamento di indagini clinico-strumentali, il clinico si avvale della ricerca di indicatori infiammatori generici (VES, proteina C-reattiva, α -1-antitripsina), che tuttavia mostrano livelli di sensibilità e specificità inadeguati. Lo stesso è vero per la ricerca del sangue occulto fecale (1).

Appare evidente che una corretta diagnosi debba essere formulata sulla base di indagini diagnostiche invasive dirette, quali la colonscopia, con eventuali prelievi biotici, e la diagnostica per immagini (TAC addominale, clisma opaco, ecc.). Tuttavia, la complessità ed il costo di tali indagini, associate al loro sgradevole impatto psico-fisico

per il paziente, hanno indirizzato verso la ricerca di più semplici esami diagnostici non invasivi, in grado di rivelare con accuratezza lo stato infiammatorio intestinale e di poter discriminare tra presenza ed assenza di patologia organica (11,19,22).

Le iniziali ricerche condotte allo scopo sulle proteine leucocitarie in campioni fecali (elastasi, lactoferrina, ecc.), dirette a segnalare uno stato infiammatorio intestinale (2), si dimostrarono deludenti a causa della loro instabilità (3,6). Nel 1980 fu scoperta una proteina leucocitaria che sembrava possedere le caratteristiche per dimostrare, con la sua presenza, il coinvolgimento delle mucose intestinali nel grave processo infiammatorio alla base dei rilevanti danni organici. Tale proteina è denominata calprotectina, per la sua capacità di legare calcio e zinco: ciò la rende stabile nelle feci e resistente alla degradazione enzimatica (3,4). Essa rappresenta circa il 60% delle proteine citoplasmatiche dei leucociti neutrofilici e possiede un'azione batteriostatica e micostatica. La sua azione sembra esercitarsi mediante inibizione di metallo-proteinasi zinco-dipendenti, con ruolo attivo quindi nella regolazione dell'infiammazione (6,16). Nella MICI la quantità di calprotectina fecale è legata alla escrezione di leucociti neutrofilici e macrofagi migrati dal sangue nel lume intestinale attraverso la mucosa infiammata (10,12,18,19). Tanto più elevato il grado del processo infiammatorio coinvolgente i leucociti, tanto maggiore la quantità di calprotectina presente nelle feci.

La prima evidenza del ruolo diagnostico della calprotectina nella MC e nella RCU è stata fornita da Roseth, il quale dimostrò la correlazione tra infiammazione intestinale e calprotectina fecale impiegando come "gold standard" infiammatorio l'escrezione fecale di granulociti neutrofili radioattivi marcati con In ¹¹¹ (14). Tuttavia, questo tipo d'indagine non è proponibile nella routine a causa della sua complessità, del costo elevato e dell'impiego di isotopi radioattivi. Il nostro studio aveva lo scopo di valutare la capacità diagnostica della determinazione di calprotectina fecale nel discriminare pazienti con patologia organica dell'intestino (in particolare MC e RCU) e pazienti con disordini funzionali dell'intestino (SII).

MATERIALI E METODI

Soggetti inclusi nello studio. Nel periodo febbraio 2004 - maggio 2005, furono selezionati 130 soggetti maschi e femmine di età adulta (tra i 20 ed i 78 anni) afferenti alle U.O. Clinica di gastroenterologia e Gastroenterologia degli Ospedali Riuniti di Ancona per disturbi gastro-intestinali di varia entità, potenzialmente riferibili a Malattia Infiammatoria Cronica Intestinale (MICI) sulla base di segni clinico-anamnestici. Un gruppo di 30 soggetti asintomatici (ASI) fu aggiunto allo studio. Tutti i 130 pazienti furono sottoposti ad esami di laboratorio, secondo i criteri clinici standard; ad indagine colonoscopica con eventuale prelievo biptico, e ad ulteriori accertamenti clinici inerenti la formulazione diagnostica. Sulla base dell'esito fornito dall'indagine colonoscopica, i pazienti furono clinicamente così definiti: 51 con MC, 21 con RCU, 21 con patologie intestinali non-MICI (AP), 37 con SII. La diagnosi clinica formulata sulla base del risultato della colonoscopia fu adottato quale "gold standard" per valutare l'efficienza diagnostica della determinazione di calprotectina fecale.

Raccolta dei campioni e determinazione di Calprotectina. I campioni di feci sono stati raccolti in contenitori sterili, identificati e subito conservati a -20°C fino al giorno della seduta analitica, eseguita di norma entro 7-10gg. Per l'esecuzione dell'esame è stato utilizzato un procedimento analitico basato su principio immunochimico non-competitivo con marcatore enzimatico ("ELISA", enzyme linked immunosorbent assay), con prodotti forniti da Eurospital Diagnostics di Trieste ("CALPREST"), in grado di misurare la quantità di proteina presente nel campione, esprimendola come µg/g di feci. Di ogni campione raccolto è stata pesata mediante bilancia analitica una aliquota compresa tra 40 mg e 120 mg, cui è stata aggiunta la soluzione di

estrazione in quantità proporzionale (rapporto peso/volume 1:50). Il procedimento analitico è stato quindi eseguito secondo le istruzioni del fornitore. I risultati sono stati ottenuti in base al confronto dei valori di assorbanza di ogni campione con una curva di taratura di tipo polinomiale costruita con calibratori di concentrazione nota. In ogni seduta analitica sono stati altresì inseriti due sieri di controllo a valore noto.

Analisi statistica. I valori di calprotectina sono presentati come media e mediana, con intervallo di confidenza (IC) del 95%. Le differenze statistiche tra i gruppi sono state calcolate con test di Kruskal-Wallis.

RISULTATI

La tabella 1 riassume il totale dei 160 pazienti inclusi nello studio, suddivisi in gruppi di differenti patologie. La tabella 2 mostra i valori di media e mediana di calprotectina osservati nei differenti gruppi: le differenze tra i valori medi sono risultate statisticamente significative ($p < 0,0001$). La figura 1 mostra graficamente le differenti dispersioni dei singoli valori di calprotectina osservati in ogni gruppo di soggetti in studio.

La tabella 3 confronta i parametri di efficienza diagnostica [sensibilità, specificità, valore predittivo positivo (VPP) e valore predittivo negativo (VPN)] di calprotectina fecale, elaborati dai risultati ottenuti nei differenti gruppi, per due differenti valori-soglia (rispettivamente, 50 µg/g e 100 µg/g). Il valore soglia di 50 µg/g è indicato nelle istruzioni allegate al kit reattivi impiegato. L'adozione di un valore soglia alternativo (100 µg/g) è stata suggerita da una preliminare esperienza (dati non mostrati), in cui l'adozione del valore soglia alternativo consentiva di ottenere una migliore correlazione tra calprotectina e diagnosi clinica, e di raggiungere livelli soddisfacenti di sensibilità

Tabella 1
Soggetti inclusi nello studio, suddivisi per gruppo

Gruppo	Numero di soggetti
Morbo Crohn (MC)	51
Retto-Colite Ulcerosa (RCU)	21
Altre Patologie Intestinali (*) (AP)	21
Sindrome dell'Intestino Irritabile (SII)	37
Individui Asintomatici (ASI)	30
Totale	160

(*) polipi, diverticoli, coliti aspecifiche, colicistiti, neoplasie.

Tabella 2
Valori medi e mediani di calprotectina fecale nei differenti gruppi di pazienti inclusi nello studio

Gruppo	Calprotectina media (µg/g)	Calprotectina mediana (µg/g)
Morbo Crohn (MC)	302	336
Retto-Colite Ulcerosa (RCU)	377	385
Altre Patologie Intestinali (*) (AP)	180	132
Sindrome dell'Intestino Irritabile (SII)	62	40
Individui Asintomatici (ASI)	19	18

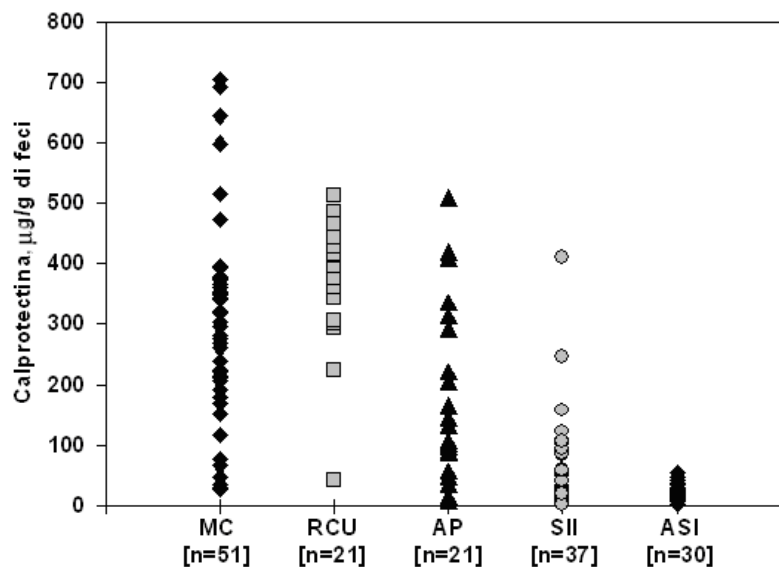


Figura 1
 Dispersione dei valori di calprotectina nei differenti gruppi inclusi nello studio. MC: Morbo d Crohn; RCU: Retto-Colite Ulcerosa; AP: Altre Patologie intestinali; SII: Sindrome dell'Intestino Irritabile; ASI: Individui Asintomatici

Tabella 3
 Efficienza diagnostica di calprotectina fecale, calcolata dai valori osservati in soggetti MICI (n = 72), SII (n = 37) e ASI (n = 30): effetto dello spostamento del valore soglia da 50 µg/g a 100 µg/g.

Valore soglia mg/g	Positivi		Negativi		Efficienza diagnostica			
	veri	falsi	veri	falsi	Sensibilità %	Specificità %	VPP %	VPN %
50	67	20	47	5	93,1	70,1	77,0	90,4
100	65	7	60	7	90,3	89,6	90,3	89,6

e specificità. In effetti, secondo i dati di tabella 3, spostando da 50 a 100 µg/g il valore soglia, la sensibilità si modifica poco, scendendo da 93% a 90%, mentre la specificità mostra un vantaggioso incremento (da 70% a 90%). La tabella 4 illustra l'impatto della variazione del valore soglia sui risultati ottenuti nel gruppo di pazienti con patologie intestinali non-MICI (AP).

La tabella 5 confronta l'efficienza diagnostica di calprotectina con quella di VES e proteina C-reattiva, questi ultimi due come parametri aspecifici di flogosi, in un gruppo di 32 pazienti dello studio con riscontro di MC o RCU: è evidente la migliore efficienza di calprotectina.

DISCUSSIONE

Sulla base dei risultati ottenuti nello studio, possiamo affermare che calprotectina è un biomarcatore infiammatorio ben correlato alla evidenza clinica di patologie organiche intestinali, in particolare alla Malattia Infiammatoria Cronica Intestinale. La sua determinazione in campioni fecali permette di differenziare i soggetti con patologia organica da quelli con disturbi funzionali (VPP = 90,2%; VPN = 89,5% con valore soglia di 100 µg/g).

La qualità diagnostica del test è basata sulla stabilità della proteina in ambiente fecale, nonché sulla riproducibilità analitica dei risultati, purché il campione di feci sia raccolto accuratamente e pesato con bilancia analitica

Tabella 4
 Numero (e percentuale) di pazienti con valori elevati e normali di calprotectina fecale osservati in 21 pazienti con patologie intestinali non-MICI (gruppo AP), con due differenti valori soglia.

Valore soglia di calprotectina	Calprotectina elevata	Calprotectina normale
50 µg/g	17 (81%)	4 (19%)
100 µg/g	13 (62%)	8 (38%)

Tabella 5

Confronto dell'efficienza diagnostica di calprotectina fecale, VES e proteina C-reattiva in 32 dei 72 soggetti MICI inclusi nello studio.

Esame	Casi di MICI con valore patologico	Casi di MICI con valore normale	Totale
Calprotectina fetale	30 (93,7%)	2 (6,3%)	32
VES	8 (25,0%)	24 (75,0%)	32
Proteina C-reattiva	18 (56,1%)	14 (43,9%)	32

(intervallo 40-120 mg), ovvero campionato con dispositivi di raccolta standardizzati dedicati.

I livelli di sensibilità ottenuti sono eccellenti, confermando uno studio recente italiano (1), e si sono rivelati ben superiori a quelli mostrati dai biomarcatori specifici di infiammazione (VES, proteina C-reattiva), che non identificano il distretto corporeo coinvolto nel processo infiammatorio (25,27). Nella elaborazione dei risultati sono compresi anche quattro casi di Morbo di Crohn in verosimile fase di remissione clinica, con valori di calprotectina nella norma. Ciò corrisponde con quanto affermato da Roseth (15) circa la corrispondenza tra valori normali di calprotectina e remissione clinica e istologica in pazienti MICI.

La determinazione di calprotectina è un esame non invasivo per il paziente, basato sulla semplice raccolta di un (o più) campione di feci. Nello studio esso è stato eseguito contestualmente ad una completa indagine clinica, comprensiva dell'indagine endocoloscopica. Dal confronto diagnostico tra le due procedure appare evidente che l'adozione di un basso valore-soglia di calprotectina esprime il massimo livello di sensibilità, confermando l'ipotesi suggestiva avanzata in altri studi (1,15), secondo cui valori normali di calprotectina rilevati in campioni fecali raccolti in tempi differenti, escluderebbero una patologia organica e di conseguenza la necessità di eseguire la coloscopia.

D'altro canto, i nostri risultati evidenziano che una parte non trascurabile di pazienti SII mostrava valori di calprotectina compresi nell'intervallo 50-100 µg/g e oltre, come riportato in altri studi (5). Ciò è dovuto alla variabilità individuale dell'escrezione di calprotectina: di conseguenza, è consigliabile l'esecuzione della determinazione su tre campioni successivi, come indicato per la ricerca di sangue occulto fecale.

L'innalzamento del valore-soglia da 50 µg/g a 100 µg/g, che consente una classificazione dei pazienti meglio correlata con il "gold standard" clinico, migliora la specificità (da 70,1% a 89,6%) ed il VPP (da 77,0% a 90,3%), senza modificare sostanzialmente la sensibilità, che passa da 93,1 a 90,3 (vedi tabella 3).

Un altro elemento che può inficiare l'efficacia diagnostica del test riguarda la presenza di etiologie infettive o infiammatorie intestinali o extraintestinali, da tenere in debito conto nel primo approccio al paziente. Ad esempio, il 3-10% dei pazienti con diarrea cronica, senza alterazioni organiche, presenta microcoliti non diagnosticcate, associabili a processi infiammatori anche rilevanti (10,19). Un'altra evidenza ottenuta riguarda l'elevata concentrazione di calprotectina riscontrata, indipendentemente dal-

la soglia adottata, nel gruppo di pazienti con diagnosi di patologie intestinali non-MICI, rappresentate da diverticolosi, poliposi, colecistite acuta, neoplasia, aderenze, ecc. I valori di mediana (128 µcg/g) in questi casi risultano inferiori a quelli mostrati dai pazienti MICI, ma significativamente superiori a quelli dei gruppi SII e ASI. Ciò sembra testimoniare la presenza di un non trascurabile stato infiammatorio associato verosimilmente a tali patologie e confermerebbe, almeno per alcuni aspetti, quanto rilevato in altri studi, concernenti elevati livelli di calprotectina in pazienti con polipi adenomatosi (9,21). Quest'aspetto dello studio necessita di futuri e mirati approfondimenti, orientati in specie verso gruppi di popolazione a rischio per familiarità di tale patologia o di neoplasia intestinale (9).

Nella sorveglianza post-diagnostica dei pazienti MICI, il dosaggio di calprotectina appare molto utile, poiché la concentrazione della proteina varia al variare dello stato infiammatorio, perciò è in grado di svelare una precoce ripresa della malattia al suo aumentare, ancor prima dell'evidenza dei segni clinici. La persistenza di valori modestamente elevati di calprotectina, pur in fase di remissione clinica, indicherebbero un indizio di latenza dello stato infiammatorio, prodromico alla ripresa della malattia (18).

In conclusione, la misurazione della calprotectina fecale appare un esame prezioso per rivelare il grado di infiammazione intestinale, con ottime qualità diagnostiche in confronto agli altri biomarcatori infiammatori, contribuendo in modo rilevante alla definizione del quadro clinico, sovente complesso e variegato dei pazienti con MICI, e al monitoraggio del suo decorso.

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano per la preziosa collaborazione professionale i signori operatori tecnici Angela Neri e Giuseppe Rondello.

BIBLIOGRAFIA

- Costa F, Mumolo MG, Bellini M, Romano MR, Ceccarelli L, Arpe P, et al. Role of faecal calprotectin as non-invasive marker of intestinal inflammation. *Dig Liver Dis* 2003; 35: 642-7.
- Cronin CC, Shanahan F. Immunological tests to monitor inflammatory bowel disease: have they delivered yet? *Am J Gastroenterol* 1998;93:295-7.
- Dale I, Fagerhol MK, Naesgaard I. Purification and partial characterization of highly immunogenic human leucocyte protein, the LI antigen. *Eur J Biochem* 1983;134:1-6.

4. Fagerhol MK, Andersson KB, Naess-Andresen CF, Brandtzaeg P, Dale I. Calprotectin (the LI leukocyte protein). In: Smith V, Dedman JR, editors. Stimulus response coupling: the role of intracellular calcium-binding proteins, Boca Raton, FL: CRC Press 1990, pp. 187-210.
5. Husebye E, Ton H, Johne B. Biological variability of fecal calprotectin in patients referred for colonoscopy without colonic inflammation or neoplasm. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 2683-7.
6. Johne B, Fagerhol MK, Lyberg T, Prydz H, Brandtzaeg P, Naess-Andresen CF, et al. Functional and clinical aspects of the myelomonocyte protein calprotectin. *Mol pathol* 1997;50:113-23.
7. Johne B, Kronborg O, Ton HI, Kristinsson J, Fuglerud P. A new fecal calprotectin test for colorectal neoplasia. Clinical results and comparison with previous method. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:291-6.
8. Kristinsson J, Armbruster C, Ugstad M, Kriwanek S, Nygaard K, Ton H, et al. Fecal excretion of calprotectin in colorectal cancer. Relationship to tumor characteristics. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:202-7.
9. Kronborg O, Ugstad M, Fuglerud P, Johne B, Hardcastle J, Scholefield JH, et al. Faecal calprotectin levels in a high risk population.
10. Limburg PJ, Ahlquist DA, Sandborn WJ, Mahoney DW, Devens ME, Harrington JJ, et al. Fecal calprotectin levels predict colorectal inflammation among patients with chronic diarrhea referred for colonoscopy. *Am J Gastroenterol* 2000;95:2831-7.
11. Poullis A, Foster R, Northfield TC, Mendall MA. Review article: faecal markers in the assessment of activity in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:675-81.
12. Roseth AG, Fagerhol MK, Aadland E, Schjonsby H. Assessment of the neutrophil dominating protein calprotectin in faeces. A methodologic study. *Scand J Gastroenterol* 1992; 27: 793-8.
13. Roseth AG, Aadland E, Jahnsen J, Raknerud N. Assessment of disease activity in ulcerative colitis by faecal calprotectin, a novel granulocyte marker protein. *Digestion* 1997;58:176-80.
14. Roseth AG, Schmidt PN, Fagerhol MK. Correlation between faecal excretion of Indium111 labelled granulocytes and calprotectin, a granulocyte marker protein in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1999;34:50-4.
15. Roseth AG. Commentary on Determination of faecal calprotectin, a novel marker of organic gastrointestinal disorders. *Dig Liver Dis* 2003; 35:607-609.
16. Steinbakk M, Naess-Andresen CF, Lingaas E, Dale I, Brandtzaeg P, Fagerhol MK. Antimicrobial actions of calcium binding leucocyte LI protein, calprotectin. *Lancet* 1990;336:763-5.
17. Suffredini AF, Fantuzzi G, Badolato R, Oppenheim JJ, O'Grady NP. New insights into the biology of the acute phase response. *J Clin Immunol* 1999;19:203-14.
18. Tibble JA, Sigthorsson G, Bridger S, Fagerhol MK, Bjarnason I. Surrogate markers of intestinal inflammation are predictive of relapse in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2000;119:15-22.
19. Tibble JA, Teahon K, Thjodleifsson B, Roseth AG, Sigthorsson G, Bridger S, et al. A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease. *Gut* 2000;47:506-13.
20. Tibble JA, Sigthorsson G, Foster R, Sherwood R, Fagerhol MK, Bjarnason I. Faecal calprotectin and faecal occult blood tests in the diagnosis of colorectal carcinoma and adenoma. *Gut* 2001;49:402-8.
21. Tibble JA, Sigthorsson G, Foster R, Forgacs I, Bjarnason I. Use of surrogate markers of inflammation and Roma criteria to distinguish organic from nonorganic intestinal disease. *Gastroenterology* 2002;23:450-60.
22. Thompson WG, Longstreth GF, Drossman DA, Heaton KW, Irvine EJ, Muller-Lissner SA. Functional bowel disorders and functional abdominal pain. *GUT* 1999; (Suppl. II) II: 43-47.