

Nuovi marcatori di flogosi intestinale

Zanella D., Orso Giaccone G.*, Ceretta M.** , Giolitti A.***

Responsabile di U.O.S. laboratorio analisi di Giaveno (TO). *Direttore del Dipartimento dei Servizi Diagnostici dell'ASL 5 - DSC dei Laboratorio analisi di Rivoli, Giaveno, Collegno (TO). **CPSE laboratorio analisi di Giaveno (TO). ***Dirigente biologo laboratorio analisi di Giaveno (TO)

RIASSUNTO

Le MICI sono un gruppo di affezioni croniche intestinali quali RCU e MC che presentano molti problemi di diagnosi differenziale con altre affezioni croniche dell'intestino. Da anni si sta cercando di individuare un marcatore sierico che possa essere utilizzato per lo screening, la diagnosi ed eventualmente la prognosi. Oltre ai seguenti autoanticorpi: ANCA, ASCA, anticorpi anti pancreas, anticorpi anti cellule caliciformi intestinali, l'attenzione è caduta sulla calprotectina. E' una proteina presente in grande quantità nei granulociti neutrofili che rappresenta il 5% delle proteine totali ed il 60% di quelle della porzione citoplasmatica. Da recenti studi condotti è emerso che il dosaggio della calprotectina possa essere usato routinariamente per porre diagnosi, nel follow-up e nel monitoraggio terapeutico di queste patologie

PAROLE CHIAVE: calprotectina, intestino, flogosi

INTRODUZIONE

Malattie infiammatorie croniche intestinali, con questo termine si designano la colite ulcerosa e la malattia di Crohn. Si tratta probabilmente di un termine non corretto, poiché vengono escluse molte altre condizioni patologiche che sono caratterizzate da un'infiammazione intestinale, come le infezioni batteriche e protozoarie e la colite ischemica.

Nonostante ciò anche per la mancanza di un'etiologia nota della colite ulcerosa e della malattia di Crohn, il termine "malattie infiammatorie intestinali" può essere utile a scopo clinico per identificare queste condizioni patologiche (16).

E' indispensabile notare come la colite ulcerosa e la malattia di Crohn presentino aspetti epidemiologici ed eziopatogenetici simili che ne permettono la discussione parallela. Tali malattie sono più frequenti tra i bian-

chi che nella popolazione nera ed orientale, con una incidenza più elevata (da tre a sei volte) tra gli ebrei. Entrambe i sessi sono ugualmente colpiti. L'incidenza e la prevalenza delle due malattie differiscono leggermente per la colite ulcerosa che sembra essere, secondo la maggior parte degli studi, più frequente.

Mentre l'incidenza definisce i nuovi casi di diagnosticati per anno, la prevalenza invece rappresenta il numero di pazienti affetti da malattia ogni 100.000 abitanti e ne definisce sia l'impatto nella comunità, sia il peso socioeconomico.

Nell'Europa occidentale e negli Stati Uniti, l'incidenza della colite ulcerosa (compresa la proctite ulcerosa) è di circa 6-8 casi per 100.000 abitanti l'anno con una prevalenza di circa 70-150 casi per 100.000 abitanti.

L'incidenza dalla malattia di Crohn (colon + tenue) è di circa due casi per 100.000/anno con prevalenza attorno a 20-40 casi per 100.000. Le eccezioni sembrano essere rappresentate da Francia, Belgio e Germania in cui invece si è rivelata una maggiore incidenza del morbo di Crohn. Negli anni '90 lo studio condotto dall'EC-IBD study è stato il primo lavoro di tipo prospettico che ha permesso di raccogliere dati sull'incidenza della RCU e della malattia di Crohn nei paesi del bacino Mediterraneo ottenendo un'incidenza di 8,6 per la RCU e 3,69 per il M.C. per quanto riguarda l'Italia, (GISC, Int.J.Epidemiol. 1996) il tasso di prevalenza di RCU è stato di 5,2, mentre quello del M.C di 2,3.

E' stata anche segnalata una certa stagionalità dell'esordio della colite ulcerosa con un picco a dicembre-gennaio che farebbe pensare ad un concorso di fattori ambientali stagionali. È confermata una maggiore incidenza di IBD nelle zone urbane ed industrializzate (questo ha aperto il campo a speculazioni riguardanti un possibile contributo di fattori inquinanti) (3).

Benché non siano disponibili dati sicuri, sembra che l'incidenza della malattia di Crohn (soprattutto colica) sia in aumento (fig.1).

Diagnostica sierologica delle malattie infiammatorie croniche intestinali (M.I.C.I)

Da alcuni anni si sta cercando di individuare un marcatore sierico che possa essere utilizzato per lo screening, la diagnosi ed eventualmente la prognosi

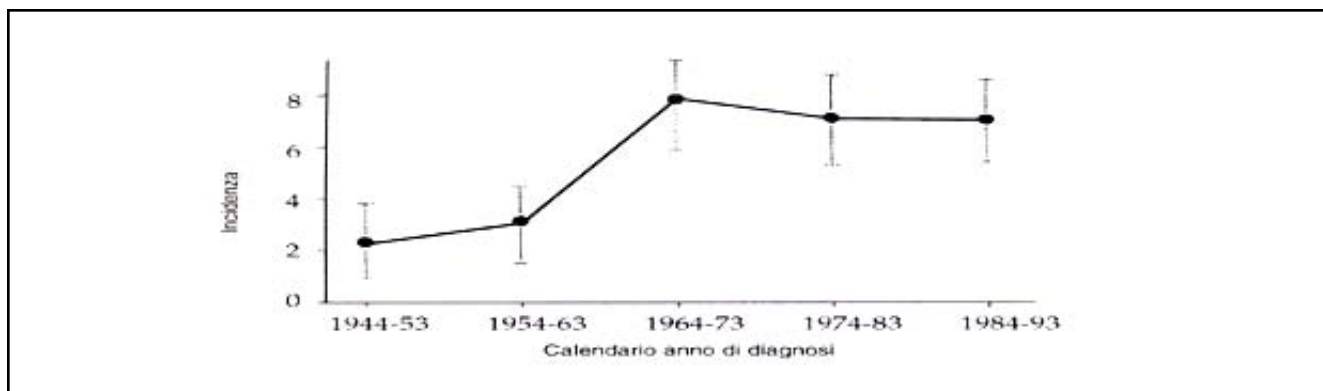


Figura 1. Andamento della comparsa della malattia di Crohn.

di queste malattie (6). Già nel 1959 un gruppo di ricercatori (Broberger et al.) descrisse la presenza di auto anticorpi nelle IBD (14). Recentemente l'attenzione fu rivolta ad un loro possibile ruolo diagnostico nella differenziazione tra UC e CD in particolare ai seguenti autoanticorpi:

1. anticorpi anticitoplasma dei neutrofili (p-ANCA);
2. anticorpi anti-saccharomyces cerevisiae (ASCA);
3. anticorpi anti pancreas;
4. anticorpi anti cellule caliciformi intestinali
5. un nuovo marcatore proteico: calprotectina.

Anticorpi anti-citoplasma nei neutrofili

Sono considerati i primi markers sierologici delle vasculiti e sono stati ritrovati nella granulomatosi di Wegener, nella poliartrite microscopica nodosa, nella glomerulonefrite progressiva, nella colite ulcerosa e nel Morbo di Crohn (15). Gli Anca (c-ANCA e p-ANCA) possono venire determinati con l'I.F.I. (immunofluorescenza indiretta) e con tecniche E.L.I.S.A. Con la metodica in I.F.I si possono distinguere 3 differenti patterns (4):

1. pattern granulare citoplasmatico
2. pattern perinucleare
3. un terzo, piuttosto raro, caratterizzato da una fluorescenza che è una peculiare mistura di quella dei c-ANCA e dei p-ANCA, chiamata atipica o x-ANCA e che è spesso associata alla colite ulcerosa o al morbo di Crohn

Anticorpi anti-saccharomyces Cerevisiae (ASCA)

Gli anticorpi ASCA riconoscono un antigene carboidratico ricco in mannani (fosfopeptidomannani) della parete cellulare del Saccharomyces (11-13). Da studi condotti da gruppi diversi non emerge una correlazione tra andamento clinico e presenza e/o titolo degli Asca (1).

Anticorpi anti pancreas

E' stata evidenziata un'elevata specificità tra la presenza nel siero di anticorpi contro il pancreas esocrino e l'insorgenza del morbo di Crohn. L'ipotesi più accre-

ditata è che tale malattia sia causata da un'immuno-reazione contro il secreto pancreatico. L'antigene pancreatico passando nell'intestino nel dotto pancreatico potrebbe diffondere nella parete intestinale e successivamente unito agli anticorpi formare immunocomplessi che attiverebbero il complemento dando origine a fatti infiammatori cronici.

La metodica usata per la determinazione di questo anticorpo è l'I.F.I; il substrato ottimale è rappresentato da pancreas umano (3).

Anticorpi anticellule caliciformi intestinali

Gli anticorpi anticellule caliciformi intestinali si ritrovano nei soggetti affetti da colite ulcerosa. Dati della letteratura dimostrano come nel 28% dei pazienti affetti da tale patologia questi anticorpi siano presenti a titoli significativi.

Anche per questa determinazione la metodica di riferimento è l'I.F.I ed il substrato utilizzato è l'intestino umano, ancor meglio se fetale (duodeno fetale)

Calprotectina: struttura, funzione, localizzazione

La calprotectina appartiene al gruppo delle proteine Ca-leganti della famiglia S100. E' costituita da una catena polipeptidica leggera e da due catene polipeptidiche pesanti, ha peso molecolare di 36.5 kDa, ed è in grado di legare sei atomi di calcio (fig. 2).

E' presente in grande quantità nei granulociti neutrofili, dove rappresenta il 5 % delle proteine totali e il 60 % di quelle della porzione citoplasmatica; in minore quantità, la proteina è stata riscontrata nei monociti e nei macrofagi attivati (9).

La calprotectina, scoperta nel corso della ricerca di un marcatore plasmatico di aumentato turn-over leucocitario e inizialmente chiamata proteina leucocitaria L1, possiede un'attività batteriostatica e micostatica paragonabile a quella degli antibiotici già a minime concentrazioni inibenti; la sua abbondanza nei granulociti neutrofili e la sua attività antimicrobica suggeriscono un ruolo rilevante nelle funzioni difensive dell'organismo.

La proteina leucocitaria sembra esercitare i suoi effetti mediante la riduzione della concentrazione

locale di zinco, con l'inibizione di alcune metallo-proteasi Zn-dipendenti, condizione a che sottolinea un suo coinvolgimento nella regolazione della infiammazione (10).

In presenza di calcio, essa è notevolmente resistente alla degradazione da parte degli enzimi proteolitici e al calore, sia in vivo che in vitro.

L'efficiente rilascio extracellulare è favorito dalla sua naturale esistenza in uno stato preformato all'interno dei neutrofili e dalla sua localizzazione extralisosomiale.

La presenza di calprotectina è stata riscontrata nel siero, nella saliva, nel liquido cerebrospinale, nelle urine e nelle feci.

Dal momento della sua scoperta, è stata osservata una sua rilevanza clinica in molte malattie come la fibrosi cistica, l'artite reumatoide, le MICI, il cancro colon rettale, l'AIDS e altre malattie infiammatorie infettive e neoplastiche in particolare. La concentrazione plasmatica di calprotectina aumenta da 5 a 40 volte nelle malattie infettive ed infiammatorie. Inoltre, alcuni autori hanno recentemente evidenziato la presenza di una correlazione tra i suoi livelli e gli indici clinici di attività di malattia nei pazienti con MICI. Al contrario dei suoi livelli plasmatici che, così come gli altri indici sierologici di flogosi, non presentano un'elevata sensibilità e specificità come marker di infiammazione della mucosa intestinale, il suo dosaggio nelle feci offre invece notevoli vantaggi nella valutazione del grado locale di flogosi intestinale. È stato, infatti, osservato che la proteina è estremamente stabile nelle feci, anche per più di 7 giorni, a temperatura ambiente, caratteristica che può essere parzialmente spiegata dalla sua attività antimicrobica. Nei soggetti sani, la concentrazione della calprotectina fecale risulta essere, approssimativamente, sei volte più elevata rispetto alle concentrazioni normali della proteina plasmatica. Come suggerito da alcuni studi, questi valori sembrano essere determinati dalla migrazione dei neutrofili attraverso la mucosa intestinale nella fase terminale del loro turn-over.

L'aumento di calprotectina fecale nelle MICI sembra dovuta all'escrezione fecale dei neutrofili e dei



Figura 2. Struttura della calprotectina.

macrofagi migrati dal circolo sanguigno nel lume intestinale attraverso la mucosa infiammata.

Diagnosi di laboratorio

Le MICI presentano notevoli problemi di diagnosi differenziale con altre patologie simili. Negli ultimi anni sono stati identificati alcuni test che rivestono una certa importanza in aggiunta ad altri test che già da molti anni vengono utilizzati nella pratica clinica (8).

Questi esami sono suddivisi in esami routinari ed esami di recente introduzione.

Fra gli esami "routinari" vanno ricordati la VES e le proteine della fase acuta. La VES ha una emivita piuttosto lunga (di alcuni giorni), per cui al brusco miglioramento clinico del paziente non sempre corrisponde un corrispondente rapido calo del valore dell'esame. Secondo alcuni la VES si alzerebbe in particolare nella MC del colon ma non in quello dell'ileo e non nelle proctiti ulcerose, presumibilmente per la ridotta estensione del tratto interessato (7).

Anche diverse proteine della fase acuta correlano con l'attività della malattia; in particolare sono state studiate le orosomucoidi, la proteina C reattiva, il fibrinogeno, la lattoferrina, l'alfa 1 antitripsina. L'andamento di queste proteine è strettamente legato alla loro metabolizzazione.

Fra i markers di flogosi "non routinari" vanno ascritte le citochine e le molecole di adesione cellulare (2).

I linfociti attivati nella mucosa infiammata liberano una grande quantità di mediatori chimici, tra loro intercorrelati. L'espressione di citochine proinfiammatorie sulle cellule della mucosa infiammata è notevolmente aumentata, anche se tale attivazione locale non necessariamente aumenta la concentrazione di queste citochine nel sangue. È intuibile l'interesse dei ricercatori nel tentare di valutare se fra le varie citochine ne esistano alcune il cui dosaggio sia in grado di rispecchiare fedelmente l'attività infiammatoria della malattia. Fra le molte citochine studiate, quelle che hanno suscitato maggior interesse sono state TNF-alfa, IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 (5).

Accanto ai test sierologici vi sono i test fecali:

- o Ricerca sangue occulto che possiede una bassa sensibilità;
- o Ricerca dei leucociti fecali che necessita della presenza di un citologo esperto ed il dato è essenzialmente qualitativo;
- o Elastasi neutrofila, esterasi leucocitaria e lattoferrina che presentano una elevata instabilità;

MATERIALI E METODI

Scopo del nostro lavoro, in collaborazione con il Servizio di Gastroenterologia dell'Ospedale di Rivoli ed il reparto di Chirurgia dell'Ospedale di Giaveno è

stato quello di testare 33 pazienti (vedi. Fig. 3) con problemi gastrointestinali, e 10 pazienti sani (di controllo) secondo un protocollo stabilito che prevedeva quanto segue:

1. studio dell'accuratezza di diversi marcatori clinici e biochimici di malattia:

pazienti affetti da IBD (malattia di Crohn, rettocolite ulcerosa, colite indeterminata) vengono sottoposti al momento, di una visita di controllo, a registrazione contemporaneamente dell'attività clinica (giudizio complessivo del clinico in termini di remissione -attività ed anche di CDAI per malattia di Crohn e CAI per RCU/colite indeterminata), bioumorale (emocromo, PCR, VES albumina) e dosaggio fecale di calprotectina.

Analisi statistica basata sulla valutazione della correlazione tra i diversi indici di malattia (clinici, bioumorali e calprotectina)

2. marcatori di attività di malattia nella risposta al trattamento e previsione del relapse:

pazienti affetti da IBD (malattia di Crohn, rettocolite ulcerosa, colite indeterminata) selezionati al momento della riacutizzazione di malattia; i pazienti vengono seguiti clinicamente e trattati con schemi standard di trattamento secondo le indicazioni (steroidi per os/budesonide, antibiotici, azatioprina). Alla stessa maniera potranno essere arruolati i pazienti in remissione, per i quali sarà considerato solo valore predittivo della valutazione basale sul rischio di riacutizzazione clinica.

A tutti i controlli (visita basale, ed all'incirca a +1 mese, +3 mesi, +6 mesi, +12 mesi) i pazienti saranno sottoposti alla contemporanea registrazione dell'attività clinica (giudizio complessivo del clinico in termini di remissione-attività ed anche di CDAI per malattia di Crohn e CAI per RCU/colite indeterminata) bioumorale (emocromo, PCR, VES albumina) e dosaggio fecale di calprotectina.

L'analisi statistica comprenderà la valutazione della concordanza tra i diversi marcatori di attività (clinica-endoscopica, clinica-bioumorali, clinica-calprotectina) ed il valore prognostico dei diversi sistemi nella predizione della possibilità di relapse a breve termine, attraverso l'analisi della sopravvivenza libera da riacutizzazione in rapporto alle misure di attività subclinica.

Pertanto a ciascun paziente sono stati determinati:
o VES, PCR, ASCA, ANCA, Calprotectina.

I campioni di feci (1-5g) sono stati inviati al Laboratorio entro 4 giorni dalla raccolta; qui si è proceduto subito all'estrazione della calprotectina (rapporto peso/volume 1:50) e alla omogeneizzazione.

Gli omogenati sono stati quindi congelati a -20°C per la successiva determinazione (non oltre 3 mesi).

Per la valutazione dei livelli di CALPROTECTINA fecale è stato impiegato il test ELISA quantitativo "Calprest" della ditta Eurospital (Trieste, Italia), che prevede l'uso di anticorpi policlonali IgG anti-calprotectina umana (coniglio) marcati con fosfatasi alcalina.

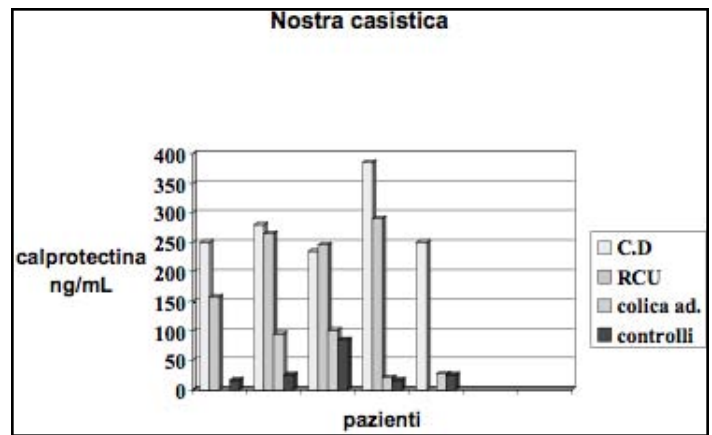


Figura 3. Presentazione della nostra casistica.

I risultati sono stati espressi in mg di calprotectina per kg di feci.

La sensibilità diagnostica del test è dichiarata al 95%, mentre la specificità è al 93%.

La sensibilità analitica è pari a 6,25 ng/ml, corrispondenti a 15,6 mg/kg di feci quando il campione è diluito 1:2500.

La variabilità intra-saggio è espressa da un CV medio di 3,5%, la variabilità inter-saggio 11,0%, quella inter-lotto 6,7%.

Il cut-off è calcolato a 50 mg/kg e il valore medio di calprotectina atteso per individui sani è di circa 25 mg/kg, mentre per pazienti con malattie infiammatorie croniche intestinali (MICI) è tra 200 e 20000 mg/kg.

RISULTATI

La tabella. 1 riassume i risultati ottenuti.

Dei 10 pazienti affetti da M. di Crohn, tutti presentavano valori di calprotectina > 250ng/ml quindi decisamente elevati: elevati anche i markers di flogosi quali PCR VES ed ASCA.

I 7 pazienti affetti RCU manifestavano valori di calprotectina elevati così come i markers di flogosi;

Diagnosi	N°	Calprotectina	Ves	PCR	Anca	Asca
Crhon	10	>250	6 casi		Neg	
R.C.U.	7	(4) >250 (3) >200	4 casi		Neg	Neg
Coliche addominali	2	>100<200			Neg	Neg
Colon irritabile	4	Neg				
Controlli	10	Neg				

Tabella 1.

I pazienti affetti da coliche addominali, hanno mostrato valori di calprotectina elevati mentre tutti i markers di flogosi erano nella norma.

I pazienti con colon irritabile presentavano tutti i parametri testati negativi in assoluto accordo con la letteratura internazionale.

Lo stesso dicasi per i controlli.

Il test ha mostrato un'accuratezza diagnostica dell'82%; una sensibilità dell'83% con VPP del 90%; una specificità dell'82% con un VPN del 71%

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Da quanto sopra esposto, si evince che il dosaggio della calprotectina fecale è in perfetto accordo con quanto enunciato dalla letteratura internazionale. Inoltre è una metodica semplice e non invasiva, è capace di rilevare con buona accuratezza diagnostica la presenza di flogosi nella parete intestinale. Il dosaggio della calprotectina possiede una maggiore sensibilità e specificità rispetto ai normali indici biochimici di flogosi nella diagnostica differenziale della diarrea e del dolore addominale cronico. La correlazione positiva tra concentrazione fecale di calprotectina e il grado di attività nei soggetti con MICI rende possibile un suo impiego routinario nella diagnosi, follow up e monitoraggio terapeutico di queste patologie. E' infine ipotizzabile un ruolo del test nella diagnosi precoce delle lesioni neoplastiche dell'intestino.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Barnes R.M.R., Allan S., Taylor-Robinson C.H., Finn R., Johnson P.M.: Serum Antibodies Reactive with *Saccharomyces cerevisiae* in inflammatory Bowel Disease: Is IgA Antibody a Marker for Crohn's Disease?. *Int. Arch Allergy Appl. Immunol.* 1990,92,9-15.
- 2) Conrad K., Humbel R.L., Meurer K., Shoenfeld Y., Tan E.M.: Autoantigens and Autoantibodies: Diagnostic Tools and Clues to Understanding Autoimmunity.
- 3) Cronin C.C., Shanahan F.: Immunological test to monitor inflammatory bowel disease have they delivered yet? *Am j Gastroenterol.* 1998; 93:295-297.
- 4) D.H. Present M.D., P.A. Banks md. Section Editors' Commentary. The Role of p-ANCA and ASCA in Differentiating Ulcerative Colitis, Crohn's Disease, and Indeterminate Colitis. *Inflammatory Bowel Disease* 1999;5(1):66-67.
- 5) Fagerhol M.K. et al.: Calprotectin (The L1 leukocyte protein) in: Smith V.L. and Dedman J.R. (eds.): Stimulus response coupling: The role of intracellular calcium-binding proteins. CRC Press. Boca Raton 1990:187-210.
- 6) Fecarotta e. e Cucchiara S.: Esiste una diagnosi sierologia delle Malattie Infiammatorie Croniche Intestinali (MICI)? Editoriale Sigeip.
- 7) Gjaffer M.H., Clark A., Holdsworth C.D.: Antibodies to *Saccharomyces cerevisiae* in patients with Crohn's disease and their possible pathogenic importance. *GUT*, 1992,33,1071-1075.
- 8) Hoffenberg E.J., Fidanza S., Sauaia A.: Serologic testing for inflammatory bowel disease. *J Pediatr.* 1999;134:447-452.
- 9) Johne B. et al: A new fecal calprotectin test for colorectal neoplasia. Clinical results and comparison with previous method. *Scand. J Gastroenterol.* 2001;36:291-296.
- 10) Limburg P.J. et al.: Fecal calprotectin levels predict colorectal inflammation among patients with chronic diarrhea referred for colonoscopy. *Am J Gastroenterol.* 2000;95:2831-2837.
- 11) Lindberg E., Magnusson K.E., Tysk C., Jarnerot G.: Antibody (IgG, IgA, and IgM) to baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), yeast mannan, gliadin, ovalbumin and betalattoglobulin in monozygotic twins with inflammatory bowel disease. *GUT*, 1992,33,909-913.
- 12) Main J., Mc Kenzie H., Yeaman G.R., Kerr M.A., Robson D., Pennington C.R., et al.: Antibody to *Saccharomyces cerevisiae* (baker's yeast) in Crohn's disease. *BMJ* 1988;297:1105-6.
- 13) Mc Kenzie H., Main J., Pennington C.R., Parratt D.: Antibody to selected strains of *Saccharomyces cerevisiae* (baker's and brewer's yeast) and *Candida Albicans* in Crohn's disease. *Gut* 1990;31:536-8.
- 14) Rutgeers P., Vermeire S.: Clinical Value of the Detection of Antibodies in the Serum for Diagnosis and Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 1998;115:1006-1022.
- 15) Shanahan F.: Antibody's markers in Crohn's disease: opportunity or overstatement? *Gut* 1997;40:557-558.

- 16) Tibble J. Et al.: A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease. *Gut* 2000;47:506-513.
- 17) Ton H. et al.: Improved assay for fecal calprotectin. *Clinica Chimica Acta* 2000;292:41-54.
- 18) Young R.L., M.D.: ASCA-New Marker for Crohn's Diseases? *The Am.J of Gastroenterol.* Vol B.
- 19) Zerge B., Teegen B., Dahnrich C., Schlumberg W., Muller-Kunert E., Grouery M., Humbel R.L., Stocher W.: Relevance of antibodies against *Saccharomyces cerevisiae* for the diagnosis of chronic-inflammatory bowel disease.