

La determinazione della calprotectina fecale

Cristina Guiotto, Cristiana Marchese, Marco Migliardi
SC Laboratorio Analisi, AO Ordine Mauriziano, Torino

RIASSUNTO *La calprotectina (Cal), proteina presente prevalentemente nei neutrofili, è un marcatore sensibile e non invasivo di flogosi. Un aumento dei livelli di calprotectina fecale (CF) è stato associato alla presenza di malattie infiammatorie intestinali (IBD). La CF è determinata, previo processo di estrazione dal campione di feci, con metodi ELISA; l'estrazione viene effettuata con dispositivi dedicati, caratteristici di ciascun metodo di dosaggio. I metodi per la misurazione della CF, quantitativi o qualitativi, utilizzano anticorpi monoclonali o policlonali diretti contro vari epitopi presenti sulla struttura dimerica della Cal. Diverse sono le criticità relative alla misurazione della CF, la mancanza di una standardizzazione tra metodi è sicuramente il problema centrale nella misurazione di questo marcatore fecale. Noi abbiamo voluto confrontare le prestazioni di 4 test per la misura della CF, due eseguiti su strumentazione automatica e due in ELISA eseguiti manualmente, su un totale di 63 campioni di pazienti. Dai risultati ottenuti è evidente la necessità di una standardizzazione. Nonostante le differenze tra i metodi testati, il cut-off fornito dalle ditte è il medesimo; è fondamentale nel monitoraggio del paziente, utilizzare lo stesso metodo di misura della CF.*

Parole chiave: Malattie infiammatorie intestinali; Marcatore fecale; Dosaggi ELISA; Standardizzazione

ABSTRACT *The assesment of fecal calprotectin. Calprotectin, a protein present mainly in neutrophils, is a sensitive and non-invasive marker of inflammation. An increase in fecal calprotectin (FC) levels has been associated with intestinal inflammatory disease (IBD). FC is determined by ELISA methods, after the stool sample extraction process; the extraction is carried out with dedicated devices, different and specific for each used assay. Methods for FC measurement, quantitative or qualitative, use monoclonal or polyclonal antibodies directed against various epitopes on the dimeric structure of calprotectin. There are several critical steps related to FC measurement, the lack of standardization among methods is the central issue in the assesment of this fecal marker. We wanted to compare the performance of four FC diagnostic tests, two performed on automatic instrumentation and two performed in ELISA manually, on a total of 63 patient samples. From the results obtained there is a clear need for standardization. Despite the differences between the evaluated methods, the cut-off provided by the manufacturers is the same; it is essential in patient monitoring, to use the same method of measuring the FC.*

Key-words: Inflammatory bowel disease; Fecal marker; ELISA assays; Standardization

INTRODUZIONE

La calprotectina (Cal), codificata dal gene q12-q21 presente sul cromosoma 1, è una proteina costituita da due catene pesanti (MRP-14 o S-100A9) e da una catena leggera (MRP-8 o S-100A8) con un peso molecolare complessivo di 36 kDa¹; l'attuale denominazione di calprotectina origina dalla capacità di legare il calcio e di inibire la crescita microbica². Oltre al sito per legare il calcio, la Cal contiene un dominio in grado di legare lo zinco, che non è influenzato dal legame con ioni calcio; il sequestro dello ione zinco è responsabile dell'attività antimicrobica attraverso un meccanismo di inibizione della crescita batterica³.

La Cal è presente nelle cellule, nei tessuti e nei liquidi di tutti i distretti del corpo umano; in particolare, nel citoplasma dei neutrofili la sua concentrazione è molto elevata e costituisce il 5% delle proteine totali e il 50-60% delle proteine solubili presenti.

Viene rilasciata in conseguenza alla distruzione o alla morte dei neutrofili oppure in seguito alla loro stimolazione. Il meccanismo attraverso cui viene rilasciata, diverso da quello attivo nei lisosomi, non è ancora stato del tutto chiarito; quello che attualmente appare chiaro è che il suo rilascio può avvenire in presenza di numerosi fattori citotossici che rendono permeabile la membrana cellulare. In seguito al suo rilascio, la concentrazione della Cal aumenta nel plasma così come nel liquor, nel liquido sino-

viale, nelle urine e nelle feci. L'attività antimicrobica e la capacità di indurre apoptosi le attribuiscono un ruolo di assoluto rilievo tra le funzioni biologiche dei neutrofili. Inoltre, la stimolazione della produzione delle immunoglobuline e l'attività chemotattica sono tra le principali funzioni deputate alla difesa dell'organismo e alla regolazione della reazione infiammatoria. La capacità di legare lo zinco le consente di inibire le metallo-proteinasi, enzimi che necessitano di questo ione come cofattore e che svolgono un ruolo di primo piano nello sviluppo dell'embrione, nell'angiogenesi, nella riparazione delle ferite, nell'infiammazione, nei tumori e nella distruzione dei tessuti.

LA CALPROTECTINA FECALE COME MARCATORE DI INFIAMMAZIONE INTESTINALE

Solo pochi pazienti che accusano disturbi gastrointestinali sono affetti da patologie organiche e raramente può essere posta la diagnosi corretta con un semplice esame clinico. Le malattie infiammatorie croniche intestinali (*Inflammatory Bowel Disease*, IBD) sono malattie croniche che alternano episodi di riacutizzazione a periodi di remissione anche lunghi, per cui i pazienti che ne sono affetti necessitano di controlli dello stato della malattia spesso per tutta la vita. Il principale obiettivo del trattamento farmacologico è la soppressione efficace e duratura dello stato infiammatorio per ottenere prima e conservare poi la remissione clinica. Tuttavia, anche nel caso di

successo del trattamento può persistere un'infezione subclinica della parete intestinale che aumenta significativamente il rischio di ricadute. Le indagini endoscopiche rappresentano la procedura di riferimento per la diagnosi, compresa la diagnosi differenziale tra retto-colite ulcerosa e morbo di Crohn, e costituiscono anche il mezzo impiegato per valutare lo stato di attività della malattia e l'efficacia della terapia. Tali indagini non possono essere ripetute frequentemente per il loro carattere invasivo, per il loro costo e, nel caso della popolazione infantile, devono essere eseguite in anestesia generale.

Una procedura di indagine non invasiva e non dolorosa sarebbe auspicabile e il dosaggio della calprotectina fecale (CF) eseguito con tecnica semplice e a basso costo potrebbe essere una buona scelta per identificare i pazienti, sia adulti che bambini, con la mucosa intestinale infiammata da sottoporre ad ulteriori indagini più approfondite.

Nella popolazione sana la CF è presente nelle feci ad una concentrazione circa 10 volte più alta rispetto a quella del plasma; tale riscontro è compatibile con l'ipotesi che la maggior parte dei neutrofili termini la sua esistenza migrando attraverso la parete intestinale. La loro lisi nel lume intestinale ed il rilascio della calprotectina citosolica rendono conto della concentrazione media fecale di Cal di 2-3 mg/L, riscontrata in soggetti sani. Il dosaggio fecale è l'unico che può fornire indicazioni dirette sulla localizzazione dell'infiammazione, mentre il dosaggio nel siero o nel plasma (al pari della proteina C reattiva) evidenzia uno stato di infiammazione che può essere localizzato ovunque.

LA MISURA DELLA CALPROTECTINA IN LABORATORIO

Da quando la misurazione della CF è stata introdotta nei laboratori clinici, diverse modificazioni e migliorie sono state apportate, tra cui la possibilità di dosaggio su un campione ridotto, una maggiore diluizione del campione stesso e l'ottimizzazione delle soluzioni di estrazioni della proteina dalle feci.

La concentrazione di Cal nei campioni fecali è correlata al numero di neutrofili che hanno migrato e hanno rilasciato Cal nel lume intestinale, mostrando una buona correlazione anche con i test di escrezione dei leucociti marcati, che peraltro risultano particolarmente indaginosi. La Cal si ritrova oltre che nelle feci, che rappresentano il materiale utilizzato nella pratica clinica, anche nel sangue (siero/plasma), nelle urine, nel liquido cerebrospinale ed in quello sinoviale. Tuttavia in letteratura emerge che nelle enteropatie di qualsiasi natura il dosaggio della CF si dimostra molto più specifico e sensibile rispetto al dosaggio della Cal plasmatica. E' stata osservata in generale una bassa variabilità intra-individuale da giorno a giorno, di conseguenza si propone l'utilizzo di un singolo campione di feci, anche se alcuni studi invitano ad una certa cautela.

La CF è determinata, previo processo di estrazione dal campione di feci, con metodo ELISA.

La prima metodica utilizzata per l'estrazione e la determinazione della calprotectina fecale è stata descritta dal gruppo di Roseth in un lavoro del 1992 che determi-

nava la CF, espressa in mg/l, su piccoli volumi di feci ottenuti da una raccolta delle 24 ore, dimostrando anche la stabilità nelle feci per 7 giorni a temperatura ambiente ⁴.

L'imprecisione (CV) del metodo era di 1,9% nella serie e di 14,8% tra le serie. Tale metodica mostrava un basso recupero nell'estrazione di Cal dal campione di feci ed un alto rischio di contaminazione, essendo la procedura basata sull'impiego di 5 g di feci e l'omogeneizzazione eseguita con un miscelatore meccanico a bacchetta in un contenitore aperto ⁴.

Un nuovo metodo è stato sviluppato in seguito e descritto in un lavoro del gruppo di Ton ⁵. Questo metodo richiede una quantità di feci molto inferiore (50-100 mg), presenta una più elevata diluizione del campione (1:50 contro 1:3 del precedente metodo), utilizza agenti dissocianti (urea) nella soluzione di estrazione e la procedura di omogeneizzazione avviene in un contenitore chiuso a perdere. In entrambe le metodiche si determina la CF presente nel surnatante con metodo ELISA, utilizzando anticorpi anti-calprotectina ottenuti nel coniglio. Nella metodica più recente, l'anticorpo rivelatore è coniugato con fosfatasi alcalina. La media del recupero della CF su 54 campioni era del 78% (intervallo: 41-100%), con un incremento di 5 volte superiore rispetto al precedente metodo. I limiti decisionali, forniti dalla ditta produttrice del test e ricavati (seppur in maniera approssimativa) dai dati in letteratura, sono i seguenti: concentrazione di CF <50 µg/g (campione negativo per infiammazione intestinale), concentrazioni tra 50 e 100 µg/g (campione "borderline" per infiammazione intestinale), concentrazione di CF >100 µg/g (campione positivo per infiammazione intestinale). Questi sono i limiti decisionali che ad oggi vengono prevalentemente utilizzati nella pratica clinica, tuttavia le problematiche relative ai valori soglia, anche in relazione ai metodi di misurazione differenti, verranno discusse a breve.

Sempre nello stesso lavoro del gruppo di Ton, le concentrazioni di CF in campioni di feci di grandi dimensioni (10-20 g) conservati a -20 °C per un anno risultavano stabili e riproducibili. Se le feci sono conservate a temperatura ambiente, la CF è stabile per almeno 3 giorni. Inoltre, è stabile per 6 mesi in piccoli (50-100 mg) campioni di feci conservati a -20°C, anche se questa differenza sulla base della quantità di campione appare poco chiara. La Cal è, infine, stabile nel surnatante congelato e scongelato fino a 4 volte. Non si riscontrano interferenze con la determinazione di CF da parte di particolari alimenti, supplementi vitaminici e farmaci assunti per via orale ⁵.

L'estrazione del campione

La misura della CF risulta più complessa rispetto alla misura della Cal plasmatica; la causa è da ricercare almeno in parte nella fase di estrazione dell'analita dal campione di feci, passaggio che richiede tempo e, come vedremo in seguito, apporta una notevole variabilità al valore finale.

L'estrazione viene effettuata con dispositivi dedicati, caratteristici di ciascun metodo di dosaggio.

E' possibile procedere utilizzando dispositivi di raccolta del campione, messi a disposizione dalle ditte, che dosano una quantità precisa e costante di feci e sono pre-

riempiti con il tampone di estrazione; in questo modo, utilizzando un volume costante del tampone e un quantità standardizzata di campione di feci, anche il fattore di diluizione rimane costante.

In alternativa, il campione di feci può essere pesato manualmente, in genere entro un intervallo di 80-120 mg. In questo caso se si utilizza un volume costante di tampone indipendentemente dalla quantità di campione, il fattore di diluizione da tenere in considerazione per i calcoli finali varierà a seconda della quantità di campione utilizzato. Al contrario, se si vorrà mantenere costante un fattore di diluizione preciso da utilizzare per tutti i campioni nella valutazione finale dei risultati, il volume del tampone da utilizzare varierà in base al peso del campione di feci che si utilizza per l'estrazione.

Le procedure di centrifugazione e separazione dell'analita dalle feci variano da metodo a metodo; una volta eseguito il primo passaggio di diluizione ed estrazione del campione, generalmente il sovrinatante ottenuto viene ulteriormente diluito con il tampone (secondo passaggio di diluizione) ed è quindi pronto per l'analisi.

Metodi manuali e metodi automatizzati

I metodi per la misurazione della CF si basano tutti su tecniche immunochimiche e utilizzano anticorpi monoclonali o policlonali diretti contro vari epitopi presenti sulla struttura dimerica della Cal.

Tutti i metodi presenti in commercio possono essere suddivisi in due categorie: metodi che producono un risultato quantitativo e metodi che producono un risultato qualitativo, ovvero positivo o negativo. Questi ultimi sono progettati principalmente per l'utilizzo in un contesto di *point-of-care* e il risultato può essere letto visivamente oppure con un dispositivo di misurazione.

I primi metodi erano tutti test immunoenzimatici (ELISA) *"in-house"* ovvero studiati e progettati dai singoli utilizzatori, quindi con una variabilità tra un test e l'altro ancora maggiore rispetto ad ora. Oggi, pur non essendoci ancora una standardizzazione tra metodi, sono disponibili

sul mercato diversi saggi immunoenzimatici per la misurazione della calprotectina fecale; nella tabella 1 ne sono elencati alcuni.

I metodi ELISA disponibili in commercio sono molto simili e possono essere eseguiti manualmente oppure in automazione utilizzando varie piattaforme ELISA.

Uno svantaggio del formato in micropiattaforma ELISA è la necessità di processare al massimo 35-40 campioni per volta; questo, in un comune laboratorio di analisi cliniche, ha l'effetto di allungare i tempi di consegna dei valori di CF.

Negli ultimi anni diversi produttori hanno immesso sul mercato metodi immunochimici in fluorescenza, chemiluminescenza o immunoturbidimetria *"random access"*, ovvero ad accesso casuale e continuo. Sono tutte misure quantitative le cui prestazioni analitiche sono simili, ma, per la loro possibilità di processare un campione in qualsiasi momento anche singolarmente, permettono una maggiore flessibilità nel numero di campioni analizzati durante la giornata e, di conseguenza, riducono i tempi di consegna ⁶.

Come abbiamo visto nel paragrafo precedente, tutti i metodi di misura della CF richiedono un pre-trattamento del campione al fine di estrarre la Cal dai campioni di feci, mediante un tampone di estrazione che ne permette poi la quantificazione successiva. Il metodo *gold standard* per le estrazioni consiste nel diluire nel tampone di estrazione una certa quantità pesata di feci. Questa tecnica è ovviamente più complessa e vi sono disponibili in commercio diversi dispositivi di estrazione, seppur con delle limitazioni di cui discuteremo a seguire.

Problematiche e criticità

Diverse sono le criticità relative alla misurazione della CF e ad oggi molte questioni sono ancora in parte irrisolte. La mancanza di una standardizzazione tra metodi è sicuramente il problema centrale nella misurazione di questo marcatore fecale.

Le prime variabili da tenere in considerazione nell'analisi della CF sono relative alla fase di estrazione del campione. Se da una parte l'utilizzo di dispositivi di estrazione dedicati forniti da ciascuna ditta facilita l'isolamento della Cal dalle feci limitando al minimo la manipolazione del campione, dall'altra apporta notevole variabilità nel recupero della giusta quantità secondo la consistenza delle feci, con oggettiva difficoltà di un recupero preciso da campioni di feci acquose ⁷.

La fase successiva di misurazione dell'analita con tecniche immunoenzimatiche mostra notevoli differenze secondo il tipo di metodo utilizzato, a causa della mancanza di una standardizzazione ⁸⁻⁹. Vi sono in letteratura molti studi che mettono a confronto le prestazioni dei diversi metodi per l'analisi dei marcatori fecali, mentre sono scarsi i dati di confronto tra differenti test di misura della CF da un medesimo campione. Nonostante le differenze tra metodi, la maggior parte dei test disponibili in commercio utilizzano un valore soglia di 50 µg/g per differenziare valori normali rispetto a valori patologici, ma in genere valori tra 50 e 100 µg/g sono considerati come "zona grigia"⁹⁻¹⁰. Questa variabilità non comporta grossi problemi nel caso in cui il campione abbia una concentra-

Tabella 1

Alcuni metodi disponibili in commercio per la determinazione della calprotectina fecale

Ditta	Test
Buhlmann	EK-CAL ELISA quantitative Quantum Blue rapid quantitative (immunochromatography) FACL Turbo quantitative (immunoturbidimetric)
Calpro	Calpro ELISA quantitative
Eurospital	Calprest ELISA quantitative Calfast rapid quantitative (immunochromatography)
Immundiagnostik	ELISA quantitative
Phadia	Immunocap Elia Calprotectin quantitative (FEIA)
Preventis	Immunochromatographic semiquantitative test
Diasorin	Liaison XL quantitative (CLIA)
Biotec	Certest semiquantitative immunochromatography

Le proteine S100: la calprotectina

zione bassa di calprotectina, tuttavia diventa cruciale qualora i valori siano ai limiti superiori della norma e sulla base di questi risultati gli specialisti debbano prendere delle decisioni.

Pavlidis e coll.¹¹ hanno esaminato questo aspetto in una coorte di pazienti adulti a cui veniva richiesta la CF nell'ambito di indagini di primo livello. Ad un cut-off di 50 µg/g gli autori hanno trovato un valore predittivo negativo (VPN) della CF del 98% e un valore predittivo positivo (VPP) del 28%. Aumentando il valore di cut-off a 150 µg/g, il VPN rimane confrontabile (97%), ma si ottiene un significativo aumento del VPP (71%). Considerando questi valori, nel lavoro in questione, l'aumento del cut-off a 150 µg/g ridurrebbe sigmoido-scopie e colonscopie del 10% a fronte di 4 casi di IBD non correttamente diagnosticati su un totale di 686 pazienti.

Recentemente presso la nostra SC Laboratorio Analisi abbiamo condotto uno studio che si propone di indagare questi punti critici, con particolare attenzione alle variabili analitiche e individuali che possono influenzare il risultato finale.

La nostra esperienza in laboratorio

Abbiamo voluto confrontare le prestazioni del test DiaSorin LIAISON Calprotectin (CLIA) su strumentazione LIAISON (DiaSorin, Saluggia – VC) (metodo A) con i seguenti test disponibili sul mercato:

Thermo Scientific – Phadia, EliA Calprotectin (FEIA) su strumentazione IMMUNOCAP 250 (Phadia AB – ImmunoDiagnostics Division di Thermo Fisher Scientific, Milano) (metodo B); Eurospital, Calprest (ELISA) (Eurospital, Trieste) (metodo C), TecnoGenetics – ImmunDiagnostik, Phical Calprotectin ELISA (TecnoGenetics, Milano) (metodo D). Per i test eseguiti su strumentazione automatica abbiamo effettuato una valutazione della precisione strumentale, della precisione sulle estrazioni manuali e di variabilità delle concentrazioni di analita su campioni sequenziali.

Abbiamo raccolto 39 campioni di feci provenienti da una serie consecutiva di pazienti afferenti all' SC Laboratorio Analisi dell'AO Ordine Mauriziano di Torino, inviati dal medico curante con richiesta di dosaggio della CF per diversi motivi, e 24 campioni di feci provenienti da

pazienti con IBD, alcuni ricoverati, altri in cura presso la SC di Gastroenterologia dell'AO Ordine Mauriziano di Torino. Prima di iniziare qualsiasi procedura analitica, a ciascun campione è stato assegnato un punteggio da 1 a 7 secondo la *Bristol Stool Chart* (Fig. 1).

I campioni di feci sono stati aliquotati a fresco in 5/6 aliquote, congelati a -20°C e successivamente analizzati con i 5 metodi seguendo procedure e materiali forniti da ciascuna ditta.

Tutti i metodi prevedono una fase preanalitica manuale di estrazione della CF dal campione con dispositivi dedicati, che permettono di evitare i procedimenti di pesa-

Bristol Stool Chart

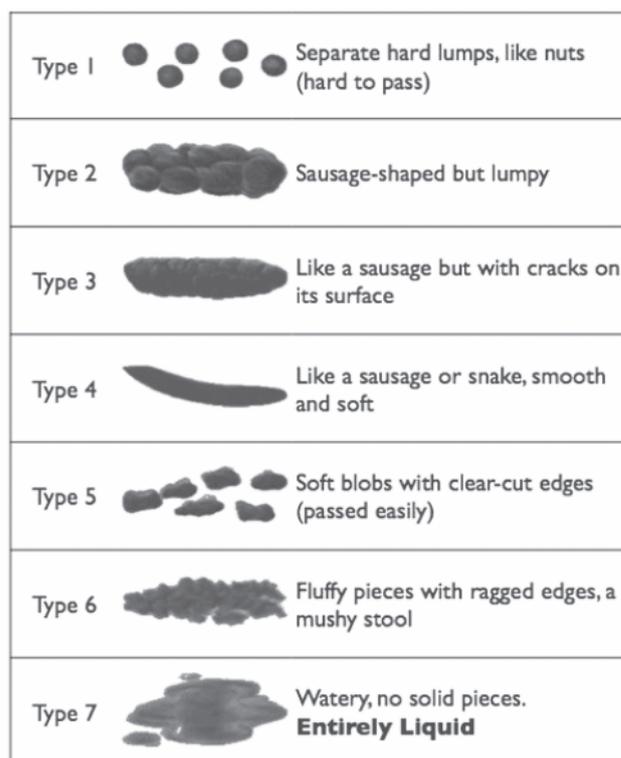


Figura 1
Scala delle feci di Bristol.

Tabella 2

Rette di Passing & Bablok e coefficienti di Spearman sul totale dei campioni

n = 63	Thermo Scientific-Phadia EliA Calprotectin (x)	ImmunDiagnostik, Phical Calprotectin TecnoGenetics (x)	Phical Calprotectin (ELISA) Eurospital (x)
Diasorin Liaison Calprotectin (y)	y = 0,574x + 4,091 r = 0,893 p < 0,0001	y = 0,349x - 1,053 r = 0,922 p < 0,0001	y = 1,981x - 24,801 r = 0,912 p < 0,0001

Tabella 3

Rette di Passing & Bablok e coefficienti di Spearman nel sottogruppo di pazienti con IBD

n = 24	Thermo Scientific-Phadia EliA Calprotectin (x)	ImmunDiagnostik, Phical Calprotectin TecnoGenetics (x)	Phical Calprotectin (ELISA) Eurospital (x)
Diasorin Liaison Calprotectin (y)	y = 0,584x + 10,228 r = 0,866 p < 0,0001	y = 0,486x - 8,282 r = 0,872 p < 0,0001	y = 2,105x - 47,45 r = 0,763 p < 0,0001

tura e prelevare quantità standard sempre uguali di campione. Dopo la fase di estrazione, per lo più simile per tutti i metodi in esame, si procede alla misurazione dell'analita nell'estratto.

Per lo studio di confronto tra i quattro metodi abbiamo eseguito analisi di regressione lineare di Passing & Bablok e calcolato i coefficienti di correlazione di Spearman. La stima dell'accordo tra metodi è stata ottenuta con il coefficiente K di Cohen (K_c), con intervallo di confidenza (IC) al 95%. Per gli studi di precisione abbiamo calcolato i diversi coefficienti di variazione, ottenendo un coefficiente di variazione medio in percentuale.

Il metodo A è stato messo a confronto con gli altri 3 metodi sul totale dei 63 campioni e successivamente solo

nel sottogruppo dei 24 campioni caratterizzati da IBD.

Il metodo A correla significativamente con il metodo B, con il metodo C e con il metodo D. Nelle tabelle 2 e 3 sono riassunte le rette di Passing & Bablok e i coefficienti di Spearman relativi al confronto metodi, sul totale dei campioni e nel sottogruppo di pazienti con IBD.

Utilizzando l'unico valore soglia riconosciuto unanimemente da tutte le ditte, ovvero 50 $\mu\text{g/g}$, i risultati ottenuti da ciascun metodo possono essere trasformati in variabili categoriche, positivi e negativi. E' stata quindi calcolata la Kappa di Cohen, che ha dimostrato una buona correlazione tra metodo A e metodo B ($k = 0,78$), un'ottima correlazione tra metodo A e metodo C ($k = 0,94$) e una discreta correlazione tra il metodo A e il metodo D ($k = 0,43$).

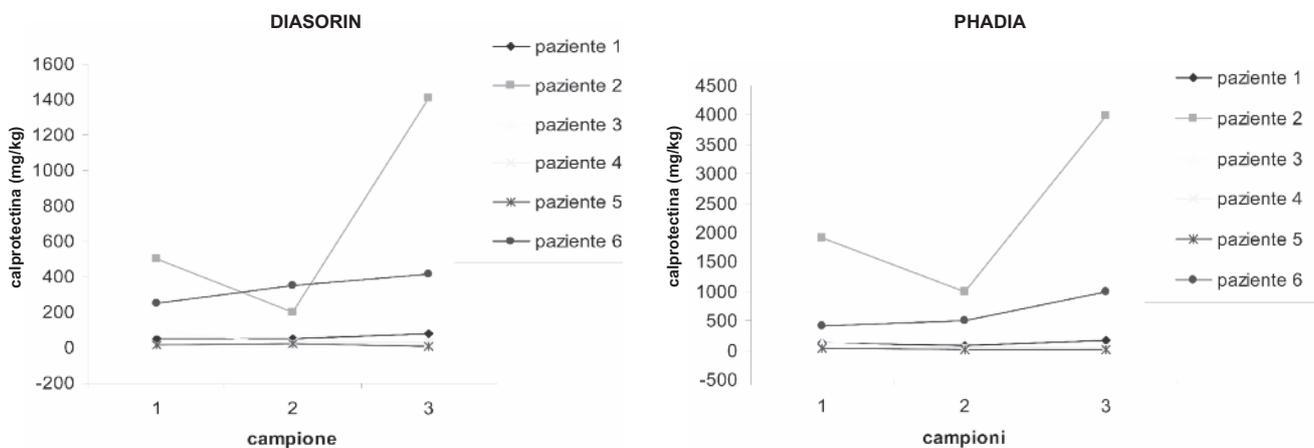


Figura 2
Variazioni della CF in tre campioni consecutivi di sei pazienti misurati con metodo A (DiaSorin) e metodo B (Phadia).

Tabella 4
Valori della CF di tre campioni consecutivi di sei pazienti misurati con metodo A (DiaSorin) e metodo B (Phadia)

DIASORIN				PHADIA			
Paziente	ID	data	calprotectina (mg/kg)	Paziente	ID	data	calprotectina (mg/kg)
1	1a	10/06/2015	53.4	1	1a	10/06/2015	129
	1b	11/06/2015	49.2		1b	11/06/2015	84
	1c	12/06/2015	81.7		1c	12/06/2015	172
2	2a	26/06/2015	503	2	2a	26/06/2015	1900
	2b	27/06/2015	200		2b	27/06/2015	987
	2c	28/06/2015	1407		2c	28/06/2015	3995
3	3a	25/07/2015	90.8	3	3a	25/07/2015	114
	3b	26/07/2015	18.3		3b	26/07/2015	32
	3c	27/07/2015	30.9		3c	27/07/2015	46
4	4a	18/08/2015	14.9	4	4a	18/08/2015	37
	4b	24/08/2015	25.3		4b	24/08/2015	47
	4c	25/08/2015	29.2		4c	25/08/2015	36
5	5a	24/08/2015	15.4	5	5a	24/08/2015	26
	5b	25/08/2015	21.9		5b	25/08/2015	18
	5c	26/08/2015	5.9		5c	26/08/2015	12
6	6a	09/09/2015	253	6	6a	09/09/2015	405
	6b	10/09/2015	352		6b	10/09/2015	498
	6c	11/09/2015	415		6c	11/09/2015	992

Su cinque campioni abbiamo eseguito una prova di precisione intra-saggio sulle strumentazioni LIAISON e IMMUNOCAP 250. I campioni sono stati estratti una sola volta, come prescritto dalle rispettive due metodiche, e l'estratto è stato testato 10 volte nella stessa seduta dai rispettivi strumenti. I CV% medi relativi ai cinque pazienti ottenuti con metodo A e metodo B sono rispettivamente 4,8 e 3,4.

Per quanto riguarda la prova di precisione sulle estrazioni, cinque campioni di feci a vari livelli di CF e di tipologia diversa secondo la Bristol Stool Chart sono stati estratti 10 volte dal medesimo operatore come prescritto dalle rispettive due metodiche e dosati sui rispettivi strumenti. I CV% medi ottenuti sono i seguenti: 18,2 per il metodo A e 14,2 per il metodo B. Risulta evidente come la variabilità aumenti su campioni di feci diarroiche.

Infine per sei pazienti è stato misurato, con entrambi gli strumenti e come prescritto dalle rispettive metodiche, il livello di CF su tre campioni raccolti in tre giorni consecutivi. Di questi sei pazienti, tre erano ricoverati presso il reparto di gastroenterologia, gli altri tre erano seguiti in regime ambulatoriale dal medesimo reparto e tutti e sei erano affetti da IBD. Come è possibile vedere in figura 2 ed in tabella 4, l'andamento dei livelli di CF è il medesimo con entrambi i metodi.

I pazienti con maggiore variabilità da un giorno rispetto ad un altro sono i pazienti ricoverati; si può supporre che questo sia dovuto a possibili manovre endoscopiche effettuate o a specifiche terapie messe in atto e, di conseguenza, a miglioramenti/peggioramenti nell'attività della malattia.

Da un punto di vista clinico, nei pazienti selezionati con IBD attiva i livelli di CF risultano nettamente maggiori, con tutti i metodi testati, rispetto ai livelli di CF in pazienti con IBD in remissione o altre patologie.

CONCLUSIONI

La misura della CF risulta essere un utile strumento per stabilire la presenza di infiammazione in sede intestinale e valutarne l'entità. Non vi sono dati sufficienti in letteratura per preferire un test rispetto ad un altro relativamente all'efficacia clinica, tuttavia diversi sono gli aspetti a cui prestare attenzione nell'esecuzione e nella valutazione dei risultati del test. Tra le criticità analitiche di maggior rilievo emerge sicuramente la mancanza di uno standard internazionale e, in qualche modo conseguente a questo, i problemi interpretativi riguardo i valori soglia. Considerate le evidenti differenze tra metodi, la prima cosa che appare ovvia ma fondamentale è che il paziente, monitorato nel tempo per i valori di CF, misuri l'analisi in questione sempre nel medesimo laboratorio con il medesimo metodo.

BIBLIOGRAFIA

1. **Fagerhol MK.** Nomenclature for proteins : is calprotectin a proper name for the elusive myelomonocytic protein ? *Clin Mol Pathol* 1996;49:M74-9.
2. **Steinbakk M, Naess-Andresen C-F, Lingaas E, et al.** Antimicrobial actions of calcium binding leucocyte L1 protein, calprotectin. *Lancet* 1990;336:763-5
3. **Barassi A, Melzi d'Eril GV.** La calprotectina nella malattia infiammatoria e nel cancro del colon. *RIMeL/IJLaM* 2008;4:104-8
4. **Roseth 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
5. **Ton H, Brandsnes O, Dale S, et al.** Improved assay for fecal calprotectin. *Clin Chim Acta* 2000;292:41-54
6. **Walsham N, Sherwood R.** Fecal calprotectin in inflammatory bowel disease. *Clinical and Experimental Gastroenterology* 2016;9 21-9
7. **Whitehead SJ, French J, Brookes MJ, et al.** Between-assay variability of fecal calprotectin enzyme-linked immunosorbent assay kits. *Ann Clin Biochem.* 2013;50:53-61
8. **Labaeere D, Smismans A, Van Olmen A, et al.** Comparison of six different calprotectin assays for the assessment of inflammatory bowel disease. *United European Gastroenterology Journal* 2014;2(1): 30-7
9. **Prell C, Nagel D, Freudenberg F, et al.** Comparison of three tests for faecal calprotectin in children and young adults: a retrospective monocentric study. *BMJ Open* 2014;4:e004558
10. **Manceau H, Chicha-Cattoir V, Puy H, Peoc'h K.** Fecal calprotectin in inflammatory bowel disease: update and perspectives. *Clin Chem Lab Med* 2017; 55(4): 474-83
11. **Pavlidis P, Chedgy FJ, Tibble JA.** Diagnostic accuracy and clinical application of faecal calprotectin in adult patients presenting with gastrointestinal symptoms in primary care. *Scand J Gastroenterol.* 2013;48:1048-54

Per corrispondenza:

Dott.ssa Cristina Guiotto
SC Laboratorio Analisi
AO Ordine Mauriziano
Largo Turati, 62
10128 - Torino
Tel.: 011 5085033 fax.: 011 5085376
email: cguiotto@mauriziano.it