

La Calprotectina nella malattia infiammatoria e nel cancro del colon

A. Barassi, G.V. Melzi d'Eril

Dipartimento di Medicina, Chirurgia e Odontoiatria, Laboratorio di Analisi, Ospedale San Paolo, Università degli Studi, Milano

Riassunto

Numerose molecole sono state studiate riguardo al loro impiego clinico nella diagnosi, nella valutazione della gravità e nella previsione di ricaduta delle malattie infiammatorie croniche intestinali. Tra queste, la calprotectina, una proteina legante il calcio e lo zinco, che è sintetizzata principalmente da granulociti neutrofili e monociti. La calprotectina è stabile nelle feci e la recente letteratura descrive i suoi incrementi ben correlati alla forma attiva delle malattie intestinali come il morbo di Crohn e la colite ulcerosa, sia nella popolazione adulta che pediatrica. Scopo di questo articolo è la descrizione delle caratteristiche biochimiche e del ruolo della calprotectina insieme alle indicazioni fornite dal suo dosaggio nelle feci per l'impiego clinico nella diagnosi e nel monitoraggio della malattia infiammatoria cronica intestinale.

Summary

Calprotectin in inflammatory bowel disease and in colon cancer

Various laboratory biomarkers have been studied in inflammatory bowel disease as diagnostic aids, indicators of disease activity or severity and to predict the risk of relapse in those patients in remission. Calprotectin, a calcium binding leukocyte-derived protein accounting for 60% in the cytosol of neutrophil leukocytes, is considered a biomarker of bowel inflammation, such as Crohn's disease and ulcerative colitis, in adults and children. It has an extremely stability in faeces, thus rendering suitable the assessment of protein in stool samples. The aim of this article is to describe biochemical, analytical and clinical findings of this marker of intestinal inflammation.

Introduzione

La calprotectina (Cal) è stata purificata e descritta per la prima volta da Fagerhol nel 1980 che la battezzò "proteina L1"¹. Solo più tardi assunse l'attuale denominazione di calprotectina che trae lo spunto dalla capacità di legare il calcio e di inibire la crescita microbica². La Cal, codificata dal gene q12-q21 presente sul cromosoma 1³, 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 kDa⁴. In presenza di EDTA la Cal è carica negativamente e sottoposta a separazione elettroforetica migra in zona α_2 mentre in presenza di ioni calcio è debolmente basica e migra in zona γ . Quando la proteina lega ioni calcio subisce modificazioni conformazionali, con esposizione di radicali aromatici sul-

la sua superficie, che ne diminuiscono la reattività nei confronti di anticorpi anti-calprotectina; oltre a ciò, in presenza di ioni calcio diventa resistente al calore e alla proteolisi⁵. Oltre al sito per legare il calcio, la Cal contiene un *domain* in grado di legare lo zinco e che non è influenzato dal legame con ioni calcio. Infatti, entrambi i peptidi MRP-8 che MRP-14 contengono alcune sequenze contenenti istidina (His-X-X-X-His) che legano specificatamente lo zinco e il sequestro di questo ione è responsabile dell'attività antimicrobica⁶. La Cal è presente nelle cellule, nei tessuti e nei liquidi di tutti i distretti del corpo umano. In particolare, la sua concentrazione nel citoplasma dei neutrofili è molto elevata raggiungendo 5-15 mg/mL e quindi costituisce il 5% delle proteine totali dei neutrofili e il 50-60% delle proteine solubili presenti⁷. La Cal è pure presente nelle cel-

lule endoteliali e in quelle dell'epidermide in concentrazioni diverse⁸. Mediante tecniche di immunocitochimica è stata rivelata la presenza della Cal sulla membrana di cellule epiteliali squamose e, occasionalmente, nei tubuli renali⁹. Viene rilasciata in conseguenza alla distruzione o alla morte dei neutrofili oppure in seguito alla loro stimolazione^{10,11}. Il meccanismo attraverso cui viene rilasciata, diverso da quello attivo nei lisosomi, non è ancora stato del tutto chiarito; quello che attualmente risulta è che il suo rilascio può avvenire in presenza di numerosi fattori citotossici che rendono permeabile la membrana cellulare oppure mediante qualche specifico meccanismo di rilascio ancora sconosciuto¹². In seguito al suo rilascio, la concentrazione della Cal aumenta nel plasma così come nel liquor, nel liquido sinoviale, nelle urine e nelle feci. La sua concentrazione nel sangue aumenta in modo marcato e rapido in risposta ad infezioni batteriche: nella setticemia da meningococco si eleva di 100 volte rispetto ai livelli normali. Nella popolazione sana la calprotectina fecale (FCal) è presente nelle feci ad una concentrazione circa 10 volte più alta rispetto a quella del plasma¹³. Tale riscontro è compatibile con l'ipotesi che la maggior parte dei neutrofili termina la sua esistenza migrando attraverso la parete intestinale¹⁴.

Numerose pubblicazioni hanno recentemente messo in evidenza diverse funzioni biologiche svolte dalla Cal sia in vitro che in vivo¹⁵. Essendo espressa sulla membrana dei monociti è coinvolta nel loro reclutamento attraverso l'adesione alle cellule endoteliali là dove si manifesta una infiammazione. In seguito all'attivazione dei neutrofili o alla adesione dei monociti all'endotelio la Cal viene rilasciata svolgendo ruoli diversi. Tra questi, l'attività antimicrobica e la capacità di indurre apoptosi le attribuiscono un ruolo di assoluto rilievo tra le funzioni biologiche dei neutrofili¹⁶. Inoltre, la stimolazione della produzione delle immunoglobuline¹⁷ e l'attività chemotattica¹⁸ sono tra le principali funzioni deputate alla difesa dell'organismo e legate alla sua funzione nella regolazione della reazione infiammatoria¹⁹. La capacità di legare lo zinco le consente di inibire le metalloproteinasi, 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. Sempre sequestrando lo zinco la Cal è in grado di inibire la crescita batterica. In conclusione, pur non essendo giunti a comprendere in modo completo ed organico la sua funzione, è probabile che la Cal svolga un ruolo di difesa proteggendo le cellule che la sintetizzano, e in particolare i neutrofili, contro i batteri che possono invaderne il citoplasma²⁰.

Malattie infiammatorie croniche dell'intestino (MICI)

Solo una piccola porzione di pazienti che accusano disturbi gastrointestinali sono affetti da patologie or-

ganiche e raramente può essere posta la diagnosi corretta con un semplice esame clinico. Di norma, è necessario svolgere indagini dispendiose, invasive e non prive di rischio per il paziente. Le MICI 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 una infiammazione subclinica della parete intestinale che contribuisce significativamente al rischio di ricaduta. Le indagini endoscopiche rappresentano la procedura di riferimento per la diagnosi, compresa la diagnosi differenziale tra colite ulcerosa (UC) e morbo di Crohn (DC), ed anche il mezzo impiegato per valutare lo stato di attività della malattia e l'efficacia della terapia. Tuttavia, le indagini endoscopiche non possono essere ripetute frequentemente per il loro carattere invasivo, per il loro costo e nel caso della popolazione infantile perché devono essere eseguite in anestesia generale. L'ipotesi diagnostica di MICI dovrebbe sempre essere presa in attenta considerazione in presenza di sintomi quali diarrea, sangue nelle feci, dolori addominali e perdita di peso. Una volta escluse le infezioni gastroenteriche, le indagini di conferma spaziano dalla ricerca di sangue nelle feci, a indagini endoscopiche, colonscopia, e occasionalmente, ai test con leucociti marcati. Tali indagini sono traumatiche, particolarmente per i bambini, e devono essere ripetute se la diagnosi viene confermata. Quindi, una procedura di indagine non invasiva e non dolorosa sarebbe di particolare valore. Il dosaggio della FCal 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.

La calprotectina fecale nella diagnosi delle MICI

All'inizio degli anni '90 del secolo scorso, è stato messo a punto un metodo di dosaggio della Cal nelle feci per la diagnosi e per il monitoraggio delle MICI²¹. Il metodo si basa su una estrazione della Cal dal campione fecale e quindi sul suo dosaggio con metodo immunometrico (ELISA). La proteina è stabile fino a sette giorni a temperatura ambiente e il test può essere eseguito con pochi grammi di materiale anche inviato al laboratorio mediante la posta²². Già dalle prime applicazioni cliniche del test si è evidenziato un suo significativo incremento in numerose patologie del tratto gastrointestinale tra cui il tumore dello stomaco, il tumore o l'adenoma del colon, la malattia di Crohn e la colite ulcerosa. Una recente meta-analisi ha valutato i risultati presentati in 30 lavori scientifici, pubblicati entro il mese di marzo 2006, per un totale di 5983 pa-

zienti con MICI²³, che ponevano a confronto la concentrazione della FCal alla diagnosi istologica. Mediante la curva ROC (Receiver-Operating Characteristic), la cui area sotto la curva (AUC) era pari a 0.95, è stata calcolata la sensibilità e la specificità per la diagnosi di MICI pari a 95% e 91%, rispettivamente. Dalla stessa metanalisi risulta che la precisione diagnostica nella popolazione infantile è più elevata rispetto a quella della popolazione adulta. Tra gli altri motivi di tale differenza, la cirrosi epatica, più comune negli adulti, può essere la causa di aumentata escrezione di calprotectina²⁴. Benché i livelli di FCal nei pazienti con CD siano più elevati rispetto a quelli con UC tale riscontro non è di particolare rilevanza clinica dal momento che l'intervallo dei valori in entrambe le patologie è molto ampio e il test non trova applicazione per differenziare le due condizioni²⁵. I pazienti affetti da cancro al colon, pur presentando livelli di FCal mediamente più alti rispetto ai livelli della popolazione normale non raggiungevano mediamente una differenza significativa ($P = 0.18$). La sensibilità e la specificità erano 36% e 71%, rispettivamente, con $AUC = 0.66$. La Cal non è presente nelle cellule tumorali ma il suo incremento in questa patologia si spiega considerando che il numero dei neutrofili è significativamente aumentato nello stroma peritumorale del carcinoma del colon²⁶. Analogamente, nessuna differenza significativa risulta tra i livelli nei pazienti con sindrome del colon irritabile (IBS) e quelli negli individui normali ($P = 0.66$). Recentemente, è stato dimostrato che anche nei pazienti affetti da morbo celiaco ancora non sottoposti a trattamento terapeutico, i livelli di FCal non sono statisticamente diversi da quelli dei soggetti normali ($P = 0.163$). Inoltre, in questi pazienti i livelli di FCal non dipendono dalla fase più o meno attiva della malattia, dalla gravità istologica delle lesioni e dal grado di infiltrazione dei neutrofili²⁷.

La calprotectina fecale nel monitoraggio delle MICI

La gravità delle malattie intestinali e la loro evoluzione possono essere valutate con indici clinici di attività, valutazioni endoscopiche, dosaggio di marcatori sierici o fecali. Gli indici clinici danno solo una misura indiretta della attività della malattia e non sono in grado di misurare l'attività infiammatoria in modo accurato e preciso cosa che avviene attraverso l'esame endoscopico ed istologico. La valutazione endoscopica è tuttavia costosa ed invasiva. Quindi, è sentita la necessità di un marcatore biochimico di attività della malattia di basso costo ed affidabile da usare nella pratica quotidiana. I marcatori di infiammazione sono di norma più elevati nei pazienti con le forme più gravi delle patologie intestinali. Così, anche i livelli della FCal sono da una parte strettamente correlati all'esame endoscopico ed istologico con le forme più attive di CD e di UC, e dall'altra i livelli si normalizzano quando la fase infiammatoria regredisce^{28,29}. In un lavoro molto recente viene messa in evidenza la capacità della misura

della FCal di distinguere i pazienti adulti con UC in fase attiva da quelli in remissione con una sensibilità 92% e una specificità 80%, ben al di sopra di quanto ottenuto con PCR (62% e 69%, rispettivamente) e VES (65% e 69%, rispettivamente)³⁰. Nello stesso lavoro si evidenzia pure la capacità della FCal di differenziare significativamente le forme lievi, moderate e gravi. Per quanto attiene alla popolazione infantile sembra essere un metodo assai promettente per il monitoraggio delle MICI: nella pratica quotidiana il dosaggio della FCal può guidare le decisioni del clinico riguardo al trattamento e alle indagini colonscopiche dal momento che aumenta proporzionalmente al grado di infiammazione e infine può contribuire a scoprire quando i sintomi provengono da cause diverse da quelle infiammatorie. Nel caso in cui la FCal risulti elevata anche con gastroscopia e colonscopia normali questo può essere indice di presenza di infiammazione nell'intestino tenue³¹.

La calprotectina fecale nella previsione dell'evoluzione delle MICI

Le MICI hanno un andamento irregolare e sia CD sia UC sono caratterizzate da periodi di remissione intervallati da improvvisi ed imprevedibili peggioramenti. La maggior parte dei pazienti in fase di remissione ha tuttavia uno stato flogistico seppure di lieve entità ed è probabile che i sintomi della riacutizzazione si manifestino allorché tale processo infiammatorio raggiunge e supera un determinato livello critico³². Inoltre, deve essere tenuto in considerazione che l'infiammazione può essere descritta come un processo unitariamente progressivo, senza discontinuità; quindi, la misura diretta del grado dell'attività infiammatoria può fornire una misura quantitativa presintomatica della prossima imminente ripresa della malattia. Di conseguenza, se tali riacutizzazioni venissero previste in tempo, con l'instaurare precocemente una terapia più aggressiva potrebbero forse essere evitate. Due diverse sperimentazioni hanno affrontato tale problema facendo uso della FCal per la previsione di ricaduta. Il primo ha attribuito al test una sensibilità di 90% e una specificità di 83% in 80 pazienti affetti da MICI in fase di remissione per un periodo fino a 12 mesi³³. Per un paziente con FCal al di sopra del livello decisionale calcolato dagli autori era possibile prevedere un rischio 13 volte maggiore di ricaduta. Nel secondo lavoro, con un livello decisionale di tre volte il limite superiore dell'intervallo di riferimento, erano riportati risultati molto simili (sensibilità 89% e specificità 82%) per la UC ma meno accurati nel prevedere la ricaduta nei pazienti con CD (sensibilità 87%, specificità 42%)³⁴. I pazienti con CD tra l'altro registravano valori più elevati di FCal rispetto a quelli con UC anche dopo un lungo periodo di remissione. Quindi, mentre nella UC la concentrazione della FCal è in grado di dividere nettamente la popolazione che avrà una ricaduta da quella a minore rischio, nei pazienti con CD valori elevati di FCal non sono necessariamente in grado di prevedere la riacutizzazione della

malattia. Questo avviene perché la maggior parte dei pazienti con CD dopo terapia, anche se sembrano clinicamente in una fase di remissione, hanno ancora lesioni rilevabili endoscopicamente con presenza di infiammazione intestinale. A conferma di ciò, una volta raggiunta la remissione clinica con trattamento steroideo, nessuna differenza era registrata nel numero delle ricadute nell'arco di 18 mesi tra i pazienti con CD guariti all'esame endoscopico e quelli con ancora presenti lesioni alla mucosa³⁵. Comunque, i risultati delle due sperimentazioni sono poco confrontabili avendo gli autori usato due differenti livelli decisionali. E' stato recentemente ipotizzato che l'obiettivo terapeutico ottimale del trattamento di CD non dovrebbe fermarsi alla scomparsa dei sintomi ma piuttosto continuare fino alla guarigione completa della mucosa; in tale contesto, la FCal potrebbe essere utile come marcatore della salute della mucosa. Infine, anche nei bambini con CD, in uno studio durato 9 mesi, i livelli di FCal elevati in fase di remissione hanno dimostrato la capacità di prevedere una futura ricaduta.

La calprotectina fecale nel trattamento

Le variazioni della concentrazione dei marcatori di fase acuta durante la terapia è un buon parametro per riconoscere l'effetto del farmaco nel ridurre l'infiammazione. Anche nei pazienti in cui i sintomi si modificano in modo sfumato, il decremento della PCR in risposta alla terapia rappresenta una evidenza oggettiva che il farmaco ha un effetto benefico. La recente introduzione di terapie biologiche ha ampliato la scelta terapeutica. Gli anticorpi anti-TNF- α hanno dimostrato una grande efficacia in caso di CD. Dati preliminari recentemente pubblicati su pazienti con CD indicano che la normalizzazione della FCal dopo terapia con *infliximab* si attua in circa 10 giorni nei pazienti in cui guarisce la mucosa, all'analisi sia istologica sia con indagine endoscopica³⁶.

Conclusioni

Per una completa conoscenza della struttura, del ruolo biologico e della funzione molecolare della Cal dovranno essere svolte ulteriori approfondite ricerche. Tuttavia, la rilevanza clinica e la potenzialità diagnostica del dosaggio fecale, è stata dimostrata da numerosi studi e il suo impiego viene incoraggiato considerando la buona correlazione con il test ai leucociti marcati, ritenuto il *gold standard*, così come con la indagine endoscopica ed istologica. Si ritiene che i valori elevati di FCal nei pazienti con MICI sia il risultato di un accentuato *turnover* di leucociti nelle pareti intestinali e quindi della migrazione dei neutrofili nel lume intestinale. Un test negativo indica una bassa probabilità di infiammazione della mucosa intestinale e altre diagnosi devono essere ipotizzate, in particolare, nel caso di sintomatologia vaga. Un test positivo depone per la diagnosi di MICI e suggerisce l'uso di procedure endoscopiche

come conferma. Tra l'altro, il test è molto meno costoso ed è più sicuro per il paziente. Si può affermare quindi che è uno strumento diagnostico estremamente utile per differenziare i pazienti con MICI, che richiedono ulteriori indagini a volte con urgenza, dalla popolazione assai numerosa che soffre di IBS o lamenta sintomi a livello gastrointestinale non specifici. Questo aspetto trova particolare applicazione in campo pediatrico ove è richiesta l'anestesia generale per l'esecuzione della colonscopia³⁷. Per quanto riguarda l'impiego come test di screening per il cancro del colon, la sua sensibilità e specificità, entrambe relativamente basse, non consentono di raccomandarlo. A tale scopo, il test del sangue occulto fecale appare preferibile. Infine, ha una buona precisione diagnostica nel riconoscimento dei pazienti con elevata probabilità di recidive in corso di CD e UC. Può quindi servire da *target* per una terapia più intensa da somministrare ai pazienti ad alto rischio di ricaduta.

In conclusione, si può affermare che la più importante caratteristica del dosaggio della FCal è che rappresenta una diretta misura della attività infiammatoria della parete intestinale e che è in grado di registrarla anche a uno stadio così lieve da non essere sufficiente a modificare la VES o la PCR; inoltre, i suoi livelli nelle feci non sembrano essere influenzati da flogosi in altri distretti che possono invece provocare un innalzamento dei marcatori sistemici di infiammazione. La FCal non può comunque sostituire i test invasivi, che restano sempre indispensabili per la loro specificità e per la possibilità di ottenere campioni di tessuto da analizzare, per il riconoscimento delle complicazioni in conseguenza di MICI e per avere una immagine della distribuzione della malattia. Qualora le indagini invasive vengano eseguite unicamente per valutare la gravità dello stato infiammatorio o per riconoscere la risposta al trattamento farmacologico, la misura della FCal può essere considerata una valida alternativa.

In attesa di ulteriori apporti scientifici e di conferme del ruolo della calprotectina in ambito assistenziale, conviene ancora oggi seguire il consiglio di Lehrer che quindici anni or sono raccomandava "Stay tuned. Calprotectin, whatever it is, could be interesting"³⁸.

Bibliografia

1. Fagerhol MK, Dale I, Anderson I. Release and quantitation of a leucocyte derived protein (L1). *Scand J Haematol* 1980; 24:393-8.
2. Steinbakk M, Naess-Andresen C-F, Lingaas E, Dale I, Brandtzaeg P, Fagerhol MK. Antimicrobial actions of calcium binding leucocyte L1 protein, calprotectin. *Lancet* 1990; 336:763-5.
3. Dorin JR, Emslie E, van Heyningen V. Related calcium-binding proteins map to the same subregion of chromosome 1q and to an extended region of synteny on mouse chromosome 3. *Genomics* 1990; 8:420-6.
4. Fagerhol MK. Nomenclature for proteins: is calprotectin a proper name for the elusive myelomonocytic protein? *Clin*

- Mol Pathol 1996; 49:M74-9.
5. Naess-Andresen CF, Engeldalsdal B, Fagerhol MK. Calcium binding and concomitant changes in the structure and heat stability of calprotectin (L1 protein). *Clin Mol Pathol* 1995; 48:M278-84.
 6. Loomans HJ, Hahn BL, Li QQ, Phadnis SH, Sohnle PG. Histidine-based zinc-binding sequences and the antimicrobial activity of calprotectin. *J Infect Dis* 1998; 177:812-4.
 7. Berntzen HB, Fagerhol MK. L1, a major granulocyte protein: antigenic properties of its subunits. *Scand J Clin Lab Invest* 1988; 48:647-52.
 8. Zwaldo G, Schlegel R, Sorg C. A monoclonal antibody to a subset of human monocytes found only in the peripheral blood and inflammatory tissues. *J Immunol* 1986; 137:512-8.
 9. Brandtzaeg P, Dale I, Fagerhol MK. Distribution of a formalin-resistant myelomonocytic antigen (L1) in human tissues. Normal and aberrant occurrence in various epithelia. *Am J Clin Pathol* 1987; 87:700-7.
 10. Boussac M, Garin J. Calcium-dependent secretion in human neutrophils: a proteomic approach. *Electrophoresis* 2000; 21:665-72.
 11. Voganatsi A, Panyutich A, Miyasaki KT, Murthy RK. Mechanism of extracellular release of human neutrophil calprotectin complex. *J Leukoc Biol* 2001; 70:130-4.
 12. Roth J, Goebler M, Wrocklage V, Bos C, Sorg C. Expression of the calcium binding proteins MRP8 and MRP14 in monocytes is regulated by a calcium-induced suppressor mechanism. *Iochem J* 1994; 301:655-60.
 13. Røseth AG, Fagerhol MK, Aadland E, Schjønsby H. Assessment of the neutrophil dominant protein calprotectin in feces. A methodologic study. *Scand J Gastroenterol* 1992; 27:793-8.
 14. Fliedner SH, Cronkite EP, Robertson JS. Granulopoiesis senescence and random loss of neutrophilic granulocytes in human beings. *Blood* 1964; 40:4-14.
 15. Johne B, Fagerhol MK, Lyberg T, Prydz H, Brandtzaeg P, Naess-Andresen, et al. Functional and clinical aspects of the myelomonocyte protein calprotectin. *Clin Mol Pathol* 1997; 50:113-23.
 16. Sohnle PG, Collins-Lech C, Wiessner JH. Antimicrobial activity of an abundant calcium-binding protein in the cytoplasm of human neutrophils. *J Infect Dis* 1991; 163:187-92.
 17. Brun JG, Ulvestad E, Fagerhol MK, Jonsson R. Effects of human calprotectin (L1) on in vivo immunoglobulin synthesis. *Scand J Immunol* 1994; 40:675-80.
 18. Kocer M, Keny PA, Farram E, Majid KBA, Finlayjones JJ, Greczy CL. Functional chemotactic factors CP-10 and MRP-14 are abundant in murine abscesses. *Infect Immun* 1996; 64:1342-50.
 19. Berntzen HB, Fagerol MK, Ostensen M, Mowinckel P, Hryeraal HM. The L1 protein a new indicator of inflammatory activity in patients with juvenile rheumatoid arthritis. *J Reumatol* 1991; 18:1338.
 20. Striz I, Trebichavsky I. Calprotectina pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation. *Physiol res* 2004; 53:245-53.
 21. Tøn H, Brandsnes, Dale S, Holtlund J, Skuibina E, Schjønsby H, et al. Improved assay for fecal calprotectin *Clin Chim Acta* 2000; 292:41-54.
 22. Aadland E, Fagerhol MK. Faecal Calprotectin: a marker of inflammation throughout the intestinal tract. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14:823-5.
 23. von Roon AC, Karamountzos L, Purkayastha S, Reese GF, Darzi AW, Teare JP, et al. Diagnostic precision of fecal calprotectin for inflammatory bowel disease and colorectal malignancy. *Am J Gastroenterol* 2007; 102:803-13.
 24. Carroccio A, Iacono G, Cottone M, Di Prima L, Cartabelotta F, Cavataio F, et al. Diagnostic accuracy of fecal calprotectin assay in distinguishing organic causes of chronic diarrhea from irritable bowel syndrome: a prospective study in adults and children. *Clin Chem* 2003; 49:861-7.
 25. Tibble JA, Sigthorsson G, Foster R, Forgacs I, Bjarnason I. Use of surrogate markers of inflammation and Rome criteria to distinguish organic from nonorganic intestinal disease *Gastroenterology* 2002; 123:450-60.
 26. Svennevig JL, Lunde OC, Holter J. In situ analysis of the inflammatory cell infiltrates in colon carcinomas and in the normal colon wall. *Acta Path Microbiol Immunol Scand* 1982; 90:131-7.
 27. Montalto M, Santoro L, Curigliano V, D'Onofrio F, Cammarota G, Panunzi S, et al. Faecal calprotectin concentrations in untreated coeliac patients. *Scand J Gastroenterol* 2007; 42:957-61.
 28. Røseth 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.
 29. Røseth AG, Aadland E, Grzyb K. Normalization of faecal calprotectin: a predictor of mucosal healing in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2004; 39:1017-20.
 30. Xiang J, Ouyang Q, Li G, Xiao N. Clinical value of fecal calprotectin in determining disease activity of ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2008; 14:53-7.
 31. Fagerberg UL, Loof L, Lindholm J, Hansson LO, Finkel Y. Fecal calprotectin: a quantitative marker of colonic inflammation in children with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007; 45:414-20.
 32. Saverymuttu SH. Clinical remission in Crohn's disease: assessment using fecal indium-111 granulocyte excretion. *Digestion* 1986; 33:74-9.
 33. 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.
 34. Costa F, Mumolo MG, Ceccarelli L, Bellini M, Romano MR, Sterpi C, et al. Calprotectin is a stronger predictive marker of relapse in ulcerative colitis than in Crohn's disease. *Gut* 2005; 54:364-8.
 35. Landi B, Anh TN, Cortot A, Soule JC, Rene E, Gendre JP, et al. Endoscopic monitoring of Crohn's disease treatment: a prospective, randomized clinical trial. *Gastroenterology* 1992; 102:1647-53.
 36. Røseth AG. Determination of faecal calprotectin, a novel marker of organic gastrointestinal disorders. *Dig Liver Dis* 2003; 35:607-9.
 37. Bjarnason I, Sherwood R. Fecal calprotectin: a significant step in the noninvasive assessment of intestinal inflammation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001; 33:11-3.
 38. Leherer RI. Holocrine secretion of calprotectin: a neutrophil-mediated defense against *Candida albicans*. *J Lab Clin Med* 1993; 121:193-4.