

Diagnosi di laboratorio delle malattie infiammatorie croniche dell'intestino

E. Tonutti

Immunopatologia e Allergologia, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Udine

Riassunto

I marcatori di flogosi possono essere molto utili nella diagnosi e nel monitoraggio delle malattie infiammatorie croniche intestinali. Fra tutti gli indici di infiammazione la Proteina C Reattiva (PCR) è quella che meglio correla con l'attività di malattia sia nel morbo di Crohn che nella colite ulcerosa. I marcatori di flogosi fecali hanno aperto nuove possibilità diagnostiche in quanto sono in grado di indicare uno stato infiammatorio localizzato all'intestino anche quando i parametri sierici risultano poco significativi. La calprotectina sembra essere il marcatore più promettente tra quelli determinabili nel materiale fecale. In questi ultimi anni stanno emergendo un numero molto ampio di marcatori anticorpali in grado di correlare con le malattie infiammatorie croniche intestinali (MICI): assieme agli anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili (ANCA) e anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) possiamo determinare anticorpi diretti contro antigeni di origine batterica: anti-OmpC, anti-I2 e un nuovo gruppo di anticorpi anti-glicani come gli anti-laminaribioside (ALCA) anti-chitobioside (ACCA) e anti-mannobioside (AMCA). Questo articolo valuta il significato di questi anticorpi e la possibilità di un loro utilizzo nell'iter diagnostico delle MICI.

Summary

Laboratory diagnosis of chronic inflammatory bowel disease

Laboratory markers of inflammation are useful for the diagnosis and the monitoring of inflammatory bowel disease (IBD). Of all the laboratory markers, C reactive protein (CRP) has been shown to correlate well with disease activity both in Crohn's disease (CD) as well as in Ulcerative Colitis (UC). Faecal markers are more specific in detecting gut inflammation in patients with IBD. Promising results have been reported with the use of faecal calprotectin in the diagnosis and in the follow up of CD and UC patients. A variety of serological test are emerging that are relevant to the diagnosis of CD and UC; these tests include: anti-neutrophil cytoplasmic antibody with perinuclear staining (P-ANCA), anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibody (ASCA), outer membrane porin C antibody (anti-OmpC), anti-I2 antibody (novel homologue of the bacterial transcription-factor families) and a new group of antibodies against glycans as anti-laminaribioside (ALCA) anti-chitobioside (ACCA) and anti-mannobioside (AMCA). This article reviews the use of these markers in patients with IBD

Key Words: Crohn's disease, Ulcerative Colitis, anti-neutrophil cytoplasmic antibody, anti-*Saccharomyces Cerevisiae*, anti-glycans, C reactive protein, calprotectin.

Le Malattie Infiammatorie Croniche dell'Intestino (MICI)

Delle MICI fanno parte il morbo di Crohn (MC) e la Colite Ulcerosa (CU); il MC è un'infiammazione cronica che può colpire tutto il canale alimentare ma che si localizza prevalentemente nell'ultima parte dell'ileo e/o nel colon destro/cieco. I tratti intestinali colpiti si presentano infiammati, erosi, ulcerati con lesioni che

interessano a tutto spessore la parete intestinale. Il MC può anche presentarsi in forma perianale.

La Colite Ulcerosa (CU) è una malattia infiammatoria intestinale cronica che interessa il retto ed il colon. L'intestino tenue non è mai interessato dall'infiammazione. La malattia interessa il retto in tutti i casi e può "estendersi" ai segmenti a monte del colon in modo uniforme. È una malattia caratterizzata da fasi di atti-

vità e fasi di remissione completa. La mucosa appare iperemica e ulcerata; a seconda dell'estensione delle lesioni a carico del colon possiamo distinguere schematicamente vari tipi di CU: la colite distale (60%), che comprende la proctite e la proctosigmoidite, la pancolite (15%), che interessa il retto e la totalità del colon e le forme subtotali (25%) comprese tra le forme distali e la pancolite¹.

Il termine di Colite Indeterminata (CI) include tutti i casi con evidenza endoscopica, istologica e radiografica di un'inflammatione cronica confinata al colon, ma con assenza di criteri diagnostici certi di CU o MC. Questa diagnosi va considerata come temporanea in quanto un attento follow-up permette in genere di orientare verso l'una o l'altra patologia. Tuttavia, esiste la possibilità che la Colite Indeterminata possa essere un'entità a se stante².

Si calcola che in Italia ci siano almeno 100.000 persone affette da malattie infiammatorie intestinali (MICI) di cui probabilmente 30-40% affetti da MC; l'età di insorgenza per il MC presenta due picchi uno tra i 20 e i 30 anni e l'altro intorno ai 65 anni ma non sono rari casi anche nei bambini e negli adolescenti. Il MC pare essere più frequente nei Paesi Occidentali ed è raro se non assente nei Paesi del Terzo Mondo. Mentre l'incidenza (numero di nuovi casi descritti ogni anno per numero di abitanti) della colite ulcerosa pare stabile, quello del MC pare in continuo aumento. Tale aumento appare reale anche se, in parte, può essere dovuto ad una maggiore accuratezza nel formulare la diagnosi da parte dei medici. La frequenza della CU varia da una nazione all'altra; il massimo tasso di incidenza si riscontra nell'Europa del Nord Ovest e negli Stati Uniti. In Italia il numero di casi nuovi/anno è compreso tra 6 e 8 su 100.000 abitanti. La CU interessa ugualmente entrambi i sessi. E' una malattia dei giovani adulti (l'età media di insorgenza è 30 anni), ma la patologia si può contrarre a tutte le età³.

L'eziologia delle MICI è sconosciuta anche se molti fattori sono implicati nella patogenesi³:

- fattori genetici: le MICI sono più frequenti nei parenti di primo grado di un paziente affetto; sono inoltre più frequenti tra i gemelli monozigoti che tra i dizigoti; sono stati identificati alcuni linkage genetici predisponenti al MC e alla CU
- fattori infettivi: batteri e virus possono intervenire nel processo di accensione e riaccutizzazione della malattia
- fattori immunologici: disregolazioni citochiniche sono state ben descritte nei pazienti con MICI
- ruolo della flora batterica intestinale: vi è evidenza di una ridotta tolleranza immunologica nei confronti della propria flora batterica nei pazienti con MICI; inoltre vi è evidenza di un'alterazione della flora con evidenza di aumento di batteri potenzialmente patogeni e riduzione delle concentrazioni di batteri "protettivi" come i lattobacilli e i bifidobatteri.

I sintomi prevalenti nel MC sono i dolori addomi-

nali associati a diarrea e talora a febbre. Altri segni precoci della malattia possono essere le fistole e ascessi perianali. Le manifestazioni cliniche dipendono dall'estensione della malattia. Nella CU la rettoraggia con emissione di muco è costante e spesso associata al tenesmo; le forme distali si manifestano con diarrea ed emissione di sangue e muco. Nelle forme più severe di CU può essere presente il dolore addominale con febbre e dimagrimento. Più rari i sintomi e le associazioni con manifestazioni extraintestinali: articolari, cutanee, oculari, epatiche come la colangite sclerosante.

Le complicanze più frequenti del MC sono l'occlusione, la subocclusione, la perforazione intestinale e gli ascessi; tutte queste situazioni cliniche possono richiedere l'intervento del chirurgo.

Esiste un aumentato rischio di cancro del colon-retto correlato con la durata e l'estensione delle MICI. Il rischio di sviluppo di una neoplasia diventa maggiore, rispetto alla popolazione normale, dopo una durata di malattia di 8-15 anni.

La diagnosi di MC e CU è basata sulla combinazione di dati clinici, endoscopici, istologici, radiologici e laboratoristici. L'endoscopia costituisce l'esame cardine in questi pazienti in quanto permette la diagnosi valutando l'aspetto macroscopico e l'esame istologico di campioni della mucosa; qualora il colon non sia interessato dal processo infiammatorio (tipicamente nel MC) l'esame radiologico diventa fondamentale. Tradizionalmente l'esame eseguito nella MC è il clisma del tenue.

Il Laboratorio e le MICI: marcatori di flogosi

Ci sono diverse ragioni per le quali i marcatori di flogosi sono richiesti nei pazienti con MICI o sospetta MICI: per misurare oggettivamente lo stato di attività di malattia e per evitare procedure invasive come la colonscopia. Un marker ideale dovrebbe essere di rapida esecuzione, economico e riproducibile; dovrebbe inoltre essere in grado di individuare i soggetti a rischio per la patologia e in grado di predire le ricadute; un marker di questo tipo non è disponibile ma il laboratorio può fornire diversi parametri di flogosi come la VES la PCR e la determinazione della calprotectina fecale⁴.

Nella diagnosi

I dati di letteratura indicano che la PCR è il marcatore di flogosi più sensibile nelle MICI con valori che oscillano dal 50% al 60% per il MC e dal 70% al 100% per la CU⁵. Non ci sono dati sulla determinazione della PCR ultrasensibile in questo settore diagnostico. La calprotectina fecale risulta altrettanto efficace nella identificazione dei soggetti con MICI in fase attiva e qualora risulti negativa può supportare la diagnosi di patologie funzionali come il colon irritabile caratterizzate da una ipermotilità della muscolatura colica⁶. La calprotectina risulta essere un test da utilizzare particolar-

mente in età pediatrica prima di procedere ad esami invasivi.

Nel monitoraggio di attività di malattia

I pazienti con forme severe di malattia presentano in genere alterazioni significative di tutti i markers di flogosi: VES, PCR, albumina, proteine della fase acuta etc. La PCR risulta però essere il miglior marcatore sierico nella correlazione con lo stato clinico di attività di malattia; le variazioni di PCR osservabili nello stesso paziente in momenti diversi risultano più significative del dato quantitativo di PCR rispetto al *cut off*. La determinazione della calprotectina è altrettanto utile nel *follow up* del MC e della CU fermo restando che elevate concentrazioni di tale marcatore possono riscontrarsi anche in caso di infezioni delle vie aeree o per uso di farmaci⁷.

Nel predire le ricadute

Alcuni studi hanno dimostrato che valori elevati sia di PCR che di VES indicano un rischio di ricaduta nelle successive sei-otto settimane; valori negativi di VES e PCR hanno un valore predittivo negativo di ricaduta del 97%. Il marcatore in assoluto più affidabile nel predire le ricadute delle MICI risulta la calprotectina⁸: valori superiori a 50 µg/g indicano un rischio di ricaduta di 13 volte superiore ai soggetti con valori al di sotto di tale *cut off*; è dimostrato inoltre che valori basali di calprotectina di 150 µg/g o più sono predittivi di ricaduta entro un anno. La sensibilità risulta elevata sia nei casi di MC (87%) sia nei casi di CU (89%).

Nella valutazione della risposta terapeutica

Il decremento dei valori di PCR risulta essere il parametro sierologico più significativo nei pazienti responsivi al trattamento; la persistenza di valori elevati di PCR indica in genere che la terapia è inefficace nel controllo del processo infiammatorio. Il trattamento con inibitori del TNFα risulta molto efficace nei pazienti con MC in circa il 75% dei casi. In due studi è stata dimostrata una migliore risposta agli inibitori del TNFα nei pazienti affetti da MC e con con valori basali di PCR > 5 mg/L piuttosto che nei pazienti con PCR < 5 mg/L. Questo riscontro ha sollevato la questione se la selezione dei pazienti per trial terapeutici deve prendere in considerazione i valori di PCR⁹.

Il Laboratorio e le MICI: marcatori anticorpali

Nel siero di soggetti con MC e CU sono presenti anticorpi (ASCA e P-ANCA) in grado di correlare con la rispettiva patologia; più recentemente sono stati identificati, in pazienti affetti da MC, anticorpi che riconoscono epitopi propri di agenti microbici. Il riscontro di questi marcatori suggerisce che le MICI rientrano più propriamente nell'ambito delle patologie da disregolazione immunologiche piuttosto che nelle malattie

autoimmuni in senso stretto.

P-ANCA

Gli anticorpi anti-citoplasma dei neutrofilo (ANCA) si dividono in 3 sottogruppi in base al *pattern* di fluorescenza evidenziabile su granulociti fissati in etanolo e in base alla specificità: i C-ANCA presentano un *pattern* di fluorescenza citoplasmatico, riconoscono la Proteinasi 3 (PR3) come bersaglio antigenico e si associano a vasculiti autoimmuni (granulomatosi di Wegener); i P-ANCA producono una fluorescenza perinucleare che si aggetta nel nucleo, riconoscono la mieloperossidasi (MPO) come target autoanticorpale e sono associati a vasculiti (*Churg Strass*, glomerulonefrite rapidamente progressiva etc.); i P-ANCA atipici sono caratterizzati da una fluorescenza lineare del nucleo del neutrofilo senza rinforzo nucleare (il target antigenico non è stato ancora identificato) e si riscontrano nel 60-80% dei pazienti con CU. Questi anticorpi sono presenti anche nel 20% circa dei familiari sani di pazienti con CU; si riscontrano inoltre in una percentuale significativa di soggetti con MC (20%-25%) con quadro clinico ed endoscopico simil-CU. I P-ANCA dei pazienti con CU sembrano identificare antigeni propri del nucleo in quanto la digestione dei neutrofilo con DNasi non permette la visualizzazione del *pattern*; il target antigenico sembra localizzato a livello degli istoni tipo 1. Tali anticorpi non sono in grado di attivare in vitro il burst ossidativo dei neutrofilo¹⁰.

ASCA

Gli anticorpi anti-*Saccharomyces Cerevisiae* (ASCA) di classe IgA e/o IgG si riscontrano nel 40-60% dei pazienti con MC. Tali anticorpi identificano epitopi propri dei saccaromiceti, agenti lieviti utilizzati nell'industria alimentare e non patogeni per l'uomo. Gli ASCA si possono riscontrare nel 20% circa dei familiari sani di pazienti con MC. La specificità degli ASCA per MC risulta compromessa dal fatto che circa il 50% dei soggetti con celiachia presentano positività, anche ad alto titolo, per questo marcatore. In base a ciò alcuni autori indicano nella alterata permeabilità della mucosa intestinale la causa della produzione degli ASCA. I metodi immunoenzimatici su micropiastra permettono di eseguire test quantitativi per le classi IgA e IgG degli ASCA¹¹.

Anticorpi diretti contro antigeni batterici

Anticorpi anti-OmpC (*outer membrane protein C*), diretti contro antigeni di membrana dell'*Escherichia Coli* e anticorpi anti-I2 diretti contro antigeni dello *Pseudomonas Fluorescens* si riscontrano rispettivamente nel 45%-55% e nel 50%-59% dei pazienti con MC¹².

Recentemente sono stati identificati (sempre nei soggetti affetti da MC) anticorpi anti-glicani: IgG anti-laminaribioside (ALCA), IgA anti-chitobioside (ACCA), IgG anti-mannobioside (AMCA)¹³. Queste molecole

sono espresse sui globuli rossi, sulle cellule del sistema immunitario ma anche sulla parete cellulare di batteri patogeni e miceti. Le percentuali di positività per gli anti-glicani nei pazienti con MC sono: 18%-35 per ALCA, 21%-38% per ACCA e 16%-33% per AMCA. La specificità degli anti-glicani è riportata intorno al 80-92%.

La presenza di questi anticorpi confermerebbe l'ipotesi che nei malati di Crohn vi è una perdita di tolleranza nei confronti di agenti microbici presenti nel lume intestinale a causa di un deficit del sistema immunitario.

Utilità dei marcatori anticorpali nella diagnosi delle MICI

- I marcatori anticorpali possono avere una applicazione diagnostica nei casi in cui il quadro clinico, colonoscopico e istologico non sono dirimenti per MC o CU (colite indeterminata).
- Il solo marcatore per la conferma diagnostica di CU è il P-ANCA.
- Il marcatore più sensibile per MC sono gli ASCA tenendo ben presente che nella malattia celiaca gli ASCA sono positivi nel 50% dei casi.
- Il 75%-80% dei casi di MC ha almeno un anticorpo positivo tra ASCA, ALCA, ACCA, AMCA, anti-OmpC e anti-I2.
- Il valore predittivo positivo per MC in presenza di più marcatori (ASCA, ALCA, ACCA, OmpC etc.) è molto elevato.
- Per la diagnosi differenziale tra MC e CU la combinazione ASCA e ANCA è la più indicata.
- I pazienti con MC con complicazioni e quindi a rischio di intervento chirurgico presentano in genere positività multiple e con titoli elevati dei marcatori ASCA, ALCA, ACCA, AMCA e OmpC.

Bibliografia

1. Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1989; 24:2-6.
2. Price AB. Overlap in the spectrum of non specific inflammatory bowel disease - "colitis indeterminate". *J Clin Pathol* 1978; 31:567-77.
3. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002; 347:417-29.
4. Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. Laboratory markers in IBD: useful, magic or unnecessary toys? *Gut* 2006; 55:426-31.
5. Poullis AP, Zar S, Sundaram KK, Moodie SJ, Risley P, Theodossi A, et al. A new, highly sensitive assay for C-reactive protein can aid the differentiation on inflammatory bowel disorders from constipation and diarrhoea-predominant functional bowel disorders. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14:409-12.
6. Carroccio A, Iacono G, Cottone M, Di Prima L, Cartabello F, Cavataio F, et al. Diagnostic accuracy of faecal calprotectin assay in distinguishing organic cause of chronic diarrhoea from irritable bowel syndrome: a prospective study in adults and children. *Clin Chem* 2003; 49:861-7.
7. 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.
8. Tibble JA, Sighorsson 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.
9. Targan SR, Feagan BG, Fedorak RN, Lashner BA, Panaccione R, Present DH, et al. Natalizumab for the treatment of active Crohn's disease: results of the Encore Trial. *Gastroenterology* 2007; 132:1672-83.
10. Seibold F, Weber P, Klein R, Berg PA, Wiedmann KH. Clinical significance of antibodies against neutrophils in patients with inflammatory bowel disease and primary sclerosing cholangitis. *Gut* 1992; 33:657-62.
11. Main J, McKenzie H, Yeaman GR, Kerr MA, Robson D, Pennington CR, et al. Antibody to *Saccharomyces Cerevisiae* (bakers' yeast) in Crohn's disease. *BMJ* 1988; 297: 1105-6.
12. Mow WS, Vasiliasauskas EA, Lin YC, Fleshner PR, Papadakis KA, Taylor KD, et al. Association of antibody response to microbial antigens and complications of small bowel Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004; 126:414-24.
13. Dotan I, Fishman S, Dgani Y, Schwartz M, Karban A, Lerner A, et al. Antibodies against laminaribioside and chitobioside are novel serological markers in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2006; 131:366-78.