



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

**“CALPROTECTINA SIERICA COME
MARCATORE DI SEVERITÀ E FATTORE
PROGNOSTICO NELLE IBD PEDIATRICHE”**

***“SERUM CALPROTECTIN AS A MARKER OF
SEVERITY AND PROGNOSTIC FACTOR IN
PEDIATRIC IBD”***

Relatore:

Prof.ssa Simona Gatti

Tesi di Laurea di

Alice Martiri

Correlatore:

Dott.ssa Elisa

Franceschini

A.A. 2025/2026

1	ABSTRACT	1
1.1	INTRODUZIONE	1
1.2	MATERIALI E METODI.....	2
1.3	RISULTATI.....	2
1.4	CONCLUSIONE	3
2	INTRODUZIONE	4
2.1	MALATTIE INFIAMMATORIE CRONICHE INTESTINALI	4
2.1.1	EPIDEMIOLOGIA.....	7
2.1.2	EZIOPATOGENESI	9
2.1.3	CLINICA	14
2.1.4	DIAGNOSI.....	19
2.1.5	CLASSIFICAZIONE DI MONTREAL E DI PARIS	26
2.1.6	INDICI DI ATTIVITÀ DI MALATTIA	29
2.1.7	TERAPIA	35
2.2	MARCATORI DIAGNOSTICI E PROGNOSTICI DELLE IBD PEDIATRICHE: RUOLO DELLA CALPROTECTINA SIERICA.....	43
2.2.1	MARCATORI PRECLINICI DELLE IBD	43
2.2.2	OBIETTIVI DI TRATTAMENTO E MONITORAGGIO DELLA RISPOSTA.....	45
2.2.3	RUOLO DELLA CALPROTECTINA SIERICA	47
3	OBIETTIVO	51
4	MATERIALI E METODI.....	52
4.1	POPOLAZIONE IN STUDIO E CRITERI DI SELEZIONE	53
4.1.1	PAZIENTI AFFETTI DA IBD	53
4.1.2	GRUPPO CONTROLLO	54
4.1.3	CRITERI DI ESCLUSIONE	54
4.1.4	DIMENSIONE CAMPIONARIA	55

4.2	ANALISI DI LABORATORIO E SCORE CLINICI CONSIDERATI.....	55
4.2.1	PARAMETRI DI LABORATORIO E DOSAGGI.....	56
4.2.2	SCORE CLINICI ED ENDOSCOPICI.....	57
4.3	METODI STATISTICI	60
5	RISULTATI.....	62
5.1	ANALISI CASO – CONTROLLO.....	62
5.1.1	CARATTERISTICHE DEI PAZIENTI ARRUOLATI NELLO STUDIO	62
5.1.2	ANALISI DESCRITTIVA DELLA CALPROTECTINA SIERICA.....	63
5.1.3	ANALISI DELLA CURVA ROC	65
5.1.4	PROFILO CLINICO, LABORATORISTICO E RELAZIONI DI CORRELAZIONE DELLA CORTE DEI CASI	67
5.2	ANALISI LONGITUDINALE.....	71
5.2.1	CARATTERISTICHE DEI PAZIENTI ARRUOLATI NELLO STUDIO	71
5.2.2	DESCRIZIONE STATISTICA DELLA CALPROTECTINA SIERICA ..	72
5.2.3	ANALISI LONGITUDINALE ANOVA.....	73
5.2.4	ANALISI DELLE MATRICI DI CORRELAZIONE LONGITUDINALE 74	
5.2.5	EVOLUZIONE DELLO STATO DI REMISSIONE	78
6	DISCUSSIONE	80
7	CONCLUSIONE	85
8	BIBLIOGRAFIA	86

1 ABSTRACT

1.1 INTRODUZIONE

La malattia infiammatoria intestinale (Inflammatory Bowel Disease, IBD) comprende la malattia di Crohn (MC), la colite ulcerosa (RCU) e la colite indeterminata (CI). È una condizione caratterizzata da un decorso clinico recidivante e remittente, in cui fasi di quiescenza di variabile durata sono interrotte da episodi di riacutizzazione. Sono patologie caratterizzate da un'inflammatione cronica in vari tratti dell'apparato gastrointestinale che provocano diarrea e dolore addominale.

Attualmente, il *gold standard* per la diagnosi e il monitoraggio dell'attività di malattia nei pazienti affetti da IBD è rappresentato dalla valutazione endoscopica. Tuttavia, si tratta di una procedura invasiva che, soprattutto nei pazienti pediatrici, richiede spesso la necessità di anestesia. Per tale motivo, si è progressivamente affermato l'utilizzo di biomarcatori non invasivi, tra cui la calprotectina fecale (fC), utilizzata nella pratica clinica sia in ambito diagnostico sia nel follow-up della malattia.

Più recentemente, la calprotectina sierica (sC) è stata proposta come potenziale biomarcatore di attività infiammatoria in diverse patologie infiammatorie e autoimmuni di ambito reumatologico. Tuttavia, ad oggi, risultano ancora limitati gli studi che ne hanno indagato l'efficacia come biomarcatore clinico nelle IBD.

Si propone di valutare il ruolo della calprotectina sierica come indicatore di attività di malattia nei pazienti pediatrici affetti da IBD, analizzandone la correlazione con altri parametri clinici e laboratoristici. Inoltre, verrà esaminato il potenziale valore della sC come predittore di remissione a lungo termine nei pazienti pediatrici sottoposti a terapia con farmaci anti-TNF α .

1.2 MATERIALI E METODI

È uno studio pilota, monocentrico, prospettico e osservazionale condotto su pazienti pediatrici (<18 anni) affetti da IBD e su controlli sani. Il valore diagnostico della calprotectina sierica (sC) è stato valutato mediante uno studio trasversale caso-controllo (numerosità campionaria stimata: 30 soggetti).

Il valore prognostico e di severità è stato analizzato longitudinalmente in una coorte consecutiva di pazienti trattati proattivamente con farmaci anti-TNF α (Infliximab o Adalimumab) al baseline (T0), al termine dell'induzione (T1) e a 6 mesi (T6); a causa di vincoli temporali istituzionali, il *time-point* tardivo a 12 mesi (T12) è stato escluso dall'analisi statistica.

Lo stato di malattia e i target terapeutici (remissione dicotomizzata 0/1) sono stati standardizzati tramite score clinici (PUCAI, aPCDAI, MINI-Index continuo/categorico) ed endoscopici (UCEIS, SES-CD). La remissione è stata definita da: PUCAI/aPCDAI <10 (clinica), fC <250 mg/kg (laboratoristica), UCEIS <1 /SES-CD < 2 (endoscopica).

1.3 RISULTATI

Dall'analisi trasversale caso-controllo (15 casi MICI vs 15 controlli sani) è emerso un incremento statisticamente significativo dei livelli di calprotectina sierica (sC) nei pazienti con patologia attiva rispetto al gruppo di controllo (mediana: 2.00 mg/L vs 0.75 mg/L; $p = 0.001$, $r = 0.698$).

L'analisi della curva ROC ha documentato un'eccellente accuratezza diagnostica del biomarcatore, con un'area sotto la curva (AUC) pari a 0.849 (IC 95%: 0.688–0.962); il cut-off ottimale, individuato a 1.3 mg/L, ha espresso una sensibilità del 66.7% e una specificità dell'86.7%.

All'analisi di regressione logistica multivariata, la sC è risultata un predittore indipendente dello stato di malattia (OR: 9.32; $p = 0.045$).

Nella coorte globale, il marcatore sierico ha mostrato correlazioni lineari positive e significative con la calprotectina fecale ($\rho = 0.444$; $p = 0.039$) e con la PCR ($\rho =$

0.386; $p = 0.039$), mentre nel sottogruppo dei casi è stata rilevata una forte correlazione con l'indice di attività clinica PCDAI nella Malattia di Crohn ($\rho = 0.775$; $p = 0.041$).

Infine, l'analisi longitudinale ($n=6$) ha evidenziato una drastica e significativa riduzione della sC mediana già al termine della fase di induzione con Infliximab (da 3.20 mg/L a T0 a 0.700 mg/L a T1; $p = 0.021$), dato stabilizzatosi in un plateau di normalità a 6 mesi (1.02 mg/L a T6) in concomitanza con la remissione clinica stabile della coorte.

1.4 CONCLUSIONE

I dati emersi supportano l'efficacia e l'affidabilità della calprotectina sierica quale biomarcatore minimamente invasivo nella gestione del paziente pediatrico affetto da MICI.

La sC si dimostra capace di riflettere accuratamente sia lo stato infiammatorio locale (fC) sia il coinvolgimento sistemico (PCR, PCDAI). La soglia diagnostica di 1.3 mg/L esprime un'elevata specificità, ideale nei contesti di screening per minimizzare il tasso di falsi positivi.

Inoltre, la spiccata reattività mostrata dal marcatore in corso di terapia biologica con Infliximab ne suggerisce un ruolo cruciale nel monitoraggio precoce della risposta terapeutica.

In conclusione, pur con i limiti legati alla numerosità campionaria, la sC si propone come un promettente biomarcatore complementare da integrare negli attuali algoritmi di monitoraggio clinico e stratificazione prognostica secondo la strategia "treat-to-target".

2 INTRODUZIONE

2.1 MALATTIE INFIAMMATORIE CRONICHE INTESTINALI

Le malattie infiammatorie croniche intestinali (IBD, *Inflammatory Bowel Disease*) rappresentano un gruppo molto vario di patologie che hanno in comune un'inflammatione persistente del tratto gastrointestinale; sono patologie croniche caratterizzate da un decorso clinico variabile con un'alternanza di periodi di remissione e fasi di riacutizzazione ^[1].

Tra queste si individuano:

- la malattia di Crohn (MC);
- la rettocolite ulcerosa (RCU);
- la colite indeterminata (CI) anche definita IBD non classificata (IBD unclassified, IBD-U).

Tutte presentano una prevalenza epidemiologica bimodale, con una insorgenza dei sintomi prima dei 18 anni e, secondariamente, dopo i 60-80 anni; questo secondo picco di incidenza è più frequente nella malattia di Crohn rispetto alla colite ulcerosa ^[1]. Esiste anche una forma di malattia infiammatoria intestinale ad insorgenza molto precoce (VEO-IBD) dove la clinica si manifesta prima dei 6 anni di età, o di IO-IBD (Infantile Onset IBD) se si manifesta prima dei due anni ^[2].

Negli ultimi anni si è notato un incremento dell'incidenza delle IBD, soprattutto nella popolazione pediatrica, ma l'eziologia non è ancora del tutto nota. L'inflammatione è dovuta a una risposta immunitaria, cellulo-mediata, della mucosa gastrointestinale; sono malattie multifattoriali complesse in cui partecipano all'eziologia la disbiosi intestinale, fenomeni immunologici mucosali, fattori genetici e fattori ambientali ^{[3][5][6]}. La reazione immunitaria coinvolge il rilascio di mediatori dell'inflammatione, in particolare citochine (come le interleuchine e il TNF- α) ^{[3][19]}. Le IBD che insorgono nei primi anni di vita sono più spesso forme monogeniche, legate a difetti dell'immunità o a difetti della barriera intestinale. Comportano quadri clinici gravi e non responsivi alle

terapie convenzionali. Inoltre, i pazienti con VEO-IBD hanno un'incidenza più elevata di malattia infiammatoria intestinale non classificata (IBD-U) rispetto a IBD a insorgenza più tardiva [2].

La diagnosi differenziale tra la malattia di Crohn e la colite ulcerosa non sempre è così facile. Sono due patologie caratterizzate da una differente distribuzione delle lesioni mucosali e diverse caratteristiche clinico-patologiche, ma nel 10-15% dei casi non è possibile effettuare una netta distinzione tra le due condizioni. In questi casi viene applicato il termine colite indeterminata [1][3].

La malattia di Crohn è un'inflammatione di tipo transmurale, può colpire qualsiasi sede del tratto gastrointestinale. Le sue caratteristiche specifiche sono la più frequente localizzazione a livello dell'ileo terminale, altra sede frequente è il colon destro, la distribuzione discontinua delle lesioni, definite come "skip lesions", e lo sviluppo di complicanze, quali ascessi, stenosi intestinali e fistole [1].

La colite ulcerosa, invece, è una malattia infiammatoria non transmurale, una flogosi più superficiale limitata alla tonaca mucosa; colpisce il colon con un coinvolgimento caudo-craniale. A seconda dell'estensione anatomica della malattia, i pazienti possono essere classificati come affetti da proctite, colite sinistra o pancolite. Nei soggetti pediatrici la RCU ha una estensione anatomica maggiore rispetto agli adulti [1].

Il vasto spettro di manifestazioni cliniche fa sì che le IBD pediatriche siano gravate da un alto tasso di ritardo diagnostico. La manifestazione clinica può essere differente tra l'età adulta e quella pediatrica. Nella popolazione adulta il quadro clinico tende a manifestarsi in forma più localizzata e sono meno frequenti manifestazioni cliniche extra-intestinali; nella popolazione pediatrica invece, bisogna prestare adeguata attenzione alle complicanze nutrizionali e ai disturbi di crescita o dello sviluppo puberale [3].

Queste malattie compromettono la qualità di vita dei pazienti; la diagnosi precoce è quindi fondamentale. La presa in carico del paziente si compone di diverse tappe [27][32][44][45];

visita ambulatoriale che permette di effettuare una adeguata anamnesi ed un esame obiettivo;

programmazione dell'iter diagnostico che prevede indagini laboratoristiche e strumentali tra cui l'analisi della calprotectina fecale ed endoscopia digestiva con biopsia che rappresenta il *gold standard*.

l'iter terapeutico e la programmazione del follow-up - l'obiettivo primario della terapia è la remissione della malattia, dato che la guarigione non è possibile; mentre il *follow-up* ha lo scopo di prevenire complicanze legate alla malattia e al trattamento stesso.

In ambito pediatrico, particolare attenzione è rivolta al controllo della crescita, dello sviluppo puberale e del benessere psicologico.

Trova un ruolo fondamentale la calprotectina fecale: è una proteina legante il calcio Ca^{2+} presente nel citosol dei neutrofilo (anche monociti e macrofagi) e rilasciata nelle feci quando c'è un'inflammatione intestinale; ci permette di monitorare la terapia senza dover ricorrere ad esami invasivi come l'endoscopia [50][51][52].

Tabella 1 Le principali caratteristiche endoscopiche e anatomo-patologiche delle IBD [21]

	Malattia di Crohn	Rettocolite ulcerosa
Patogenesi	Probabile patogenesi T-linfocito-mediata con ipersensibilità verso antigeni luminali	Probabile patogenesi auto-immune anti-corpo-mediata
Incidenza	7/100.000	11/100.000
Localizzazione	Può essere interessato tutto il tratto gastro-intestinale con distribuzione discontinua delle lesioni (intestino tenue coinvolto nell'80% dei casi)	La malattia è limitata al colon per un'estensione caudo-craniale variabile (retto sempre interessato)
Sintomi	I sintomi più comuni sono diarrea cronica e calo ponderale (la rettorragia è rara)	La rettorragia è il sintomo più comune ed è sempre presente
Aspetto endoscopico	Ulcere aftoidi e serpiginoze profonde, aspetto "ad acciottolato", stenosi	Iperemia, erosioni e ulcere superficiali, essudato, pseudopolipi
Aspetto microscopico	Inflammatione transmurale (il granuloma è patognomonico ma raramente osservabile)	Inflammatione mucosale con ascessi criptici
Complicanze	È frequente lo sviluppo di stenosi, fistole e ascessi	Megacolon tossico
Interessamento extra-intestinale	Eritema nodoso, uveite, artrite, sacroileite, psoriasi, colangite sclerosante, pancreatite, colelitiasi, nefrolitiasi, pioderma, osteoporosi, episclerite, stomatite, scarsa crescita staturale-ponderale	

2.1.1 EPIDEMIOLOGIA

I tassi di incidenza sono per la malattia di Crohn attorno ai 5-6 casi/100.000 persone/anno con una prevalenza di 27-106 casi/100.000, e per la colite ulcerosa attorno ai 6-15 casi/100.000 persone anno con una prevalenza di 80-150 casi/100.000; la prevalenza occidentale è dello 0,3% circa, sostanzialmente stabile. La malattia di Crohn è leggermente più frequente nel sesso femminile (M: F =1:1,2) e insorge più precocemente rispetto alla colite ulcerosa ^{[1][3]}.

Negli ultimi anni è stato definito un aumento dell'incidenza e della prevalenza delle IBD ad insorgenza pediatrica a livello globale. Si ritiene che questo fenomeno sia dovuto ad una migliore comprensione dell'epidemiologia che si è evoluta nel corso degli ultimi anni. Ora, infatti, è regolarmente segnalata in regioni con la prevalenza precedentemente bassa ^{[3][5]}.

L'incidenza e la prevalenza della IBD sono più alte nelle regioni settentrionali (Canada, Europa settentrionale, Stati Uniti settentrionali), Israele e Nuova Zelanda; mentre sono più basse nell'Europa meridionale, in Asia, in Africa e in Medio Oriente. Ancora però, in molti paesi a basso e medio reddito (LMIC) non ci sono sufficienti dati sull'incidenza e la prevalenza della IBD pediatrica ^{[3][5]}.

Un ulteriore fattore che ha subito una variazione negli ultimi anni è rappresentato dall'età alla quale viene diagnosticata tale patologia, che risulta progressivamente in diminuzione ^{[3][6]}. Questo fenomeno è attribuibile a molteplici cause, tra cui una combinazione di esordio precoce della malattia, il progresso delle tecniche diagnostiche e un miglioramento nell'accesso alle cure specialistiche.

L'IBD ad esordio molto precoce rappresenta il 3%-15% di tutte le IBD pediatriche ^[2]; infatti, l'incidenza è aumentata in modo particolare tra i bambini di età compresa tra i 0 e i 5 anni (+7,2% all'anno) ^{[2][6]}. Nella maggior parte del mondo predomina, come

incidenza, la malattia di Crohn rispetto alla colite ulcerosa, tranne nei pazienti molto giovani dove la colite ulcerosa rimane la diagnosi più comune [7].

Comprendere e identificare gli aumenti delle incidenze delle malattie può essere molto utile per determinare informazioni sulla patogenesi e sull'eziologia delle malattie, in particolare modo può aiutare ad indentificare l'influenza dei fattori ambientali sulla genesi della patologia [3][4].

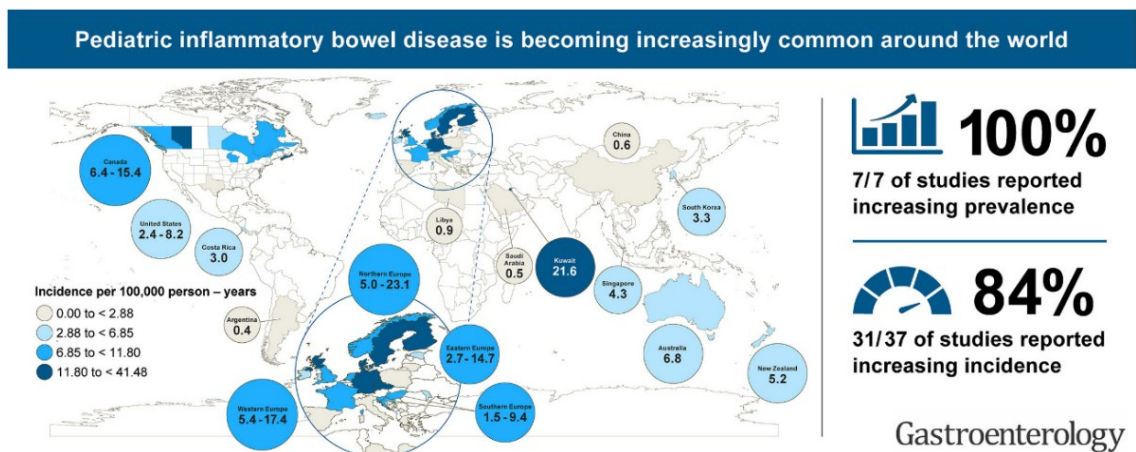


Figura 1 Incidenza della IBD [5]

Autori/articolo/anno	Paese	Numero di pazienti con IBD arruolati	Età dei pazienti	Periodo storico dello studio	Incidenza dell'IBD
Castro et al., Inflamm Bowel Dis 2008. ^[8]	Italia	tot 1576 UC 810 CD 635 IBD-U 131	Pediatria (<18 anni)	8 anni (1996–2003)	Incidenza IBD: 0,39/100.000 (1996) – 0,89/100.000 (2003)

Tabella 2 Incidenza delle IBD in Italia [8]

2.1.2 EZIOPATOGENESI

L'eziopatogenesi delle malattie infiammatorie croniche intestinali è multifattoriale, in cui hanno un ruolo fattori interni (genetici e immunologici) ed esterni. In soggetti geneticamente predisposti il sistema immunitario risponde in modo anomalo a fattori esterni, tra cui quelli ambientali, che non sono ancora del tutto noti.

Fanno eccezione il 3% delle forme di IBD pediatriche che hanno una eziopatogenesi monogenica ^[9]. I geni monogenici della IBD più frequentemente coinvolti sono stati *IL10RA/B*, *XIAP*, *CYBB*, *LRBA* e *TTC7A*. L'interleuchina 10 è una citochina antinfiammatoria secreta fisiologicamente dalle cellule dendritiche, dai Treg e macrofagi, anche a livello intestinale per ridurre la risposta infiammatoria verso i batteri commensali; alcuni polimorfismi dei geni *IL10*, *IL10RA* e *IL1RB* aumentano il rischio di sviluppare una RCU ad esordio molto precoce e a decorso aggressivo, motivo per cui si raccomanda un'analisi genetica nei pazienti che sviluppano i sintomi precocemente ^{[9][19][20]}.

Fattori genetici

Studi condotti su coppie di gemelli monozigoti hanno evidenziato l'importanza dei fattori genetici nella patogenesi; hanno mostrato una concordanza del 37% nella malattia di Crohn, mentre un tasso più basso, del 10% coinvolge la rettocolite ulcerosa; questo dato fa presupporre che ci sia un minore coinvolgimento della componente genetica in questa patologia ^[1]. Di conseguenza la familiarità rappresenta un fattore di rischio importante da prendere in considerazione, infatti, i pazienti affetti da malattia di Crohn e colite ulcerosa, hanno un parente di primo grado affetto da IBD rispettivamente nel 5,2-22,5% e nel 6,6-15,8% dei casi ^[1].

Nelle varianti poligeniche, le varianti genetiche hanno un ruolo differente e ciascuna contribuisce al rischio di sviluppare la IBD. Grazie a studi di associazione genome-wide (GWAS) si è riusciti a scoprire finora 240 loci associati all'IBD. Questi però, spiegano solo il 20-25% dell'ereditabilità dell'IBD ^{[5][9]}.

Sono disponibili diversi modi per calcolare punteggio di rischio poligenico (PRS) [9]. I modelli più comunemente utilizzati associano ad ogni allele un determinato peso in base alla loro significanza con la malattia. I PRS non permettono di prevedere o di diagnosticare la patologia ma possono distinguere individui con un rischio genetico aumentato di malattia [9].

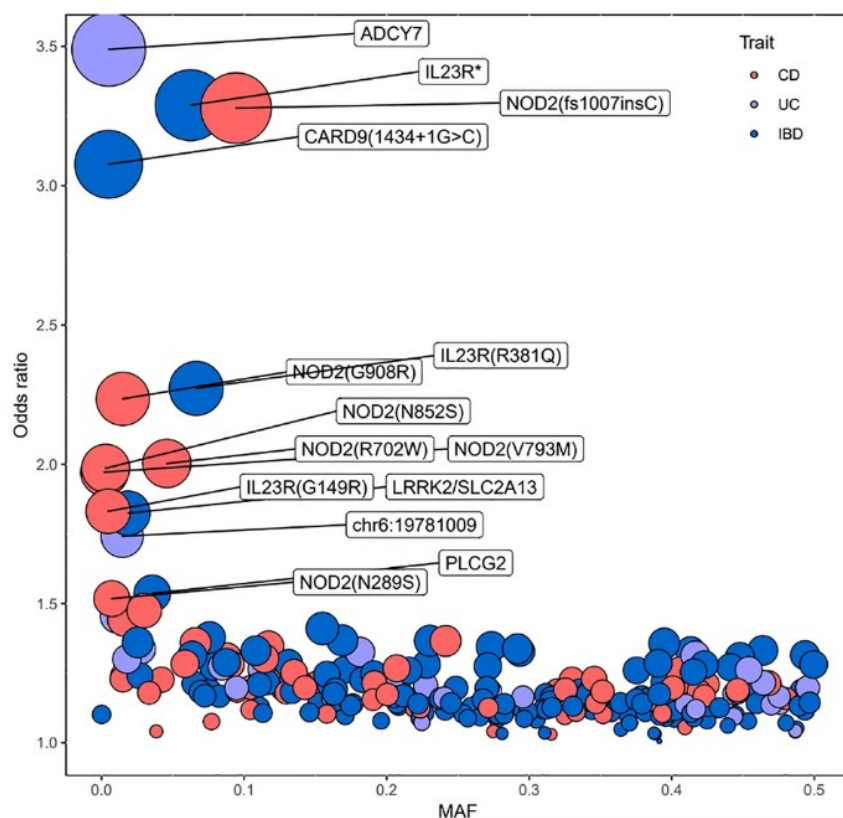


Figura 2 La genetica delle IBD non monogenica [9]

NOD2/CARD15 è stato il primo gene associato alla malattia di Crohn; infatti, tra i geni che conferiscono suscettibilità alle IBD il più studiato è il CARD15 (Caspase Activation Recruitment Domain Family 15) localizzato a livello del cromosoma 16 nel locus IBD1; questo gene codifica per la proteina NOD2 (Nucleotide Binding Oligomerization Domain 2) dotata di un'azione fondamentale nell'immunità innata intestinale. La perdita di funzione di NOD2/CARD15 comporta una perdita della segnalazione proinfiammatoria e riduzione della clearance batterica [10]. Quindi, si interrompono le interazioni ospite-patogeno, attivando anomale risposte infiammatorie [10].

La proteina NOD2 è espressa nella lamina propria dei macrofagi, granulociti neutrofili, cellule dendritiche, e nelle cripte ileali delle cellule di Paneth; attraverso il riconoscimento del muramil-dipeptide, componente della parete dei batteri Gram+ e Gram-, attiva la trascrizione di citochine proinfiammatorie causando flogosi intestinale ^[1].

La perdita di NOD2 influisce anche sul processo di differenziazione dei monociti del sangue appena reclutati, questo comporta interferenze patologiche tra i macrofagi e i fibroblasti ^{[10][11]}. Questa interazione modificata coinvolge una eccessiva presenza di liganti gp130 e attivazione di STAT3 che promuove una flogosi cronica intestinale con successiva fibrosi. Altri dati indicano variazioni di geni lungo l'intera via di segnalazione NOD2 nello sviluppo della malattia di Crohn ^[12]. Nei pazienti affetti da malattia di Crohn, le mutazioni del gene NOD2 possono essere associate a espressioni fenotipiche differenti, come la malattia fibrostenosante ^[13].

Queste mutazioni sono anche associate a malattie ileali nei bambini e negli adulti e a percentili di peso più bassi alla diagnosi nei bambini ^[14].

Associate alla malattia di Crohn e alla colite ulcerosa sono anche i locus IBD3 sul cromosoma 6 ^{[9][15]}, sede dei geni che codificano per il complesso maggiore di istocompatibilità MHC; tra questi, alcuni alotipi specifici HLA-DR, nella colite ulcerosa, sembrano essere associati ad una malattia più aggressiva; mentre nella malattia di Crohn alcuni alleli sono associati ad una malattia del colon e a manifestazioni extra-intestinali ^[15].

Fattori immunologici

La genesi delle IBD è caratterizzata da una inappropriata risposta immunitaria mucosale alla flora batterica autoctona; questi meccanismi non sono ancora del tutto noti.

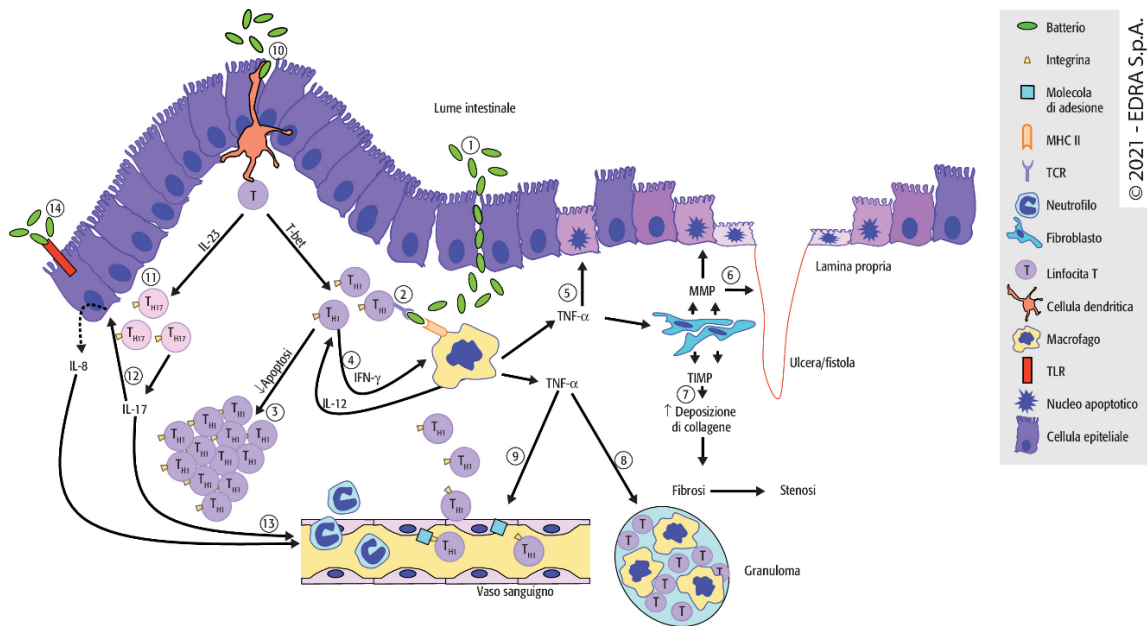


Figura 3 immuno-patogenesi delle IBD [1]

Alla base della eziopatogenesi è presente una perdita delle giunzioni epiteliali che facilita la traslocazione degli antigeni batterici. Questi, vengono presentati in modo eccessivo dai macrofagi attraverso il complesso di istocompatibilità, a questo si somma una produzione eccessiva di citochine con continua attivazione dell'asse macrofagi-linfociti [1][19].

A collaborare a tutto ciò, è presente un deficit di apoptosi linfocitaria con aumento della sopravvivenza delle cellule T e linfoaccumulo [1][19].

Anche il fattore di necrosi tumorale α (TNF- α), prodotto in quantità eccessiva dai macrofagi, causa danno endoteliale e formazione di ulcere e di granulomi nella malattia di Crohn; ha anche un ruolo importante nel mantenere l'infiammazione cronica [1][19].

Attualmente le cellule Th17/Treg sono considerate un fattore patogeno principale nella IBD [17]; il processo di differenziazione delle cellule TH17/Treg è determinato da diversi fattori, tra cui la composizione del microbiota endogeno intestinale [19].

Il microbiota intestinale trova un ruolo importante nell'eziopatogenesi delle IBD, è un ecosistema complesso, composto da tutti i microorganismi, principalmente da batteri, che risiedono all'interno del tratto gastrointestinale; ha un ruolo importante nel mantenere una normale risposta immunitaria [18][19]. La perdita di stabilità e diversità con disequilibrio

che comporta una preponderanza di alcuni ceppi pro-infiammatori come Proteobacteria (specie Enterobacteriaceae), e riduzione dei batteri protettivi come Firmicutes, Bacteroidetes; favorisce questo processo; tuttavia, servono ulteriori studi per verificare che queste alterazioni siano una possibile causa e non una conseguenza delle IBD ^{[5][18]}.

Fattori esterni

Non vanno tralasciati i fattori esterni che possono aumentare il rischio di sviluppare le IBD. Tra questi possiamo citare la dieta, un'eccessiva assunzione di zuccheri raffinati e di grassi polinsaturi; agenti infettivi tra cui Escherichia coli e alcuni ceppi di Bacteroides. Infine, altri fattori esogeni rilevanti comprendono lo stress psicologico, l'appendicectomia, l'uso di farmaci e il contesto di vita urbano. In particolare, l'appendicectomia è stata associata a un maggiore rischio di sviluppare MC, ma sembra avere un effetto protettivo nei confronti della RCU ^[1].

L'occidentalizzazione è associata ad una dieta con aumentato consumo di alimenti lavorati, latticini, cereali; e si associa ad un aumento dell'incidenza delle IBD, ma anche delle malattie infiammatorie in generale. Un aumento del rischio di sviluppare la malattia di Crohn era associato ad un consumo eccessivo di grassi polinsaturi e carne, mentre un elevato consumo di fibre alimentari e frutta era collegato ad una diminuzione del rischio di sviluppare questa patologia. Il paziente può influenzare la dieta e il microbiota intestinale, e questi fattori ambientali possono essere utilizzati anche nella strategia terapeutica ^{[1][25]}.

Ci sono tanti fattori esterni da tenere in considerazione, come inquinanti correlati al traffico, in alcuni casi di bambini e adolescenti lo sviluppo della malattia di Crohn potrebbe essere associata all'anidride di azoto; inquinanti correlati all'industria come l'anidride solforosa, che sembra essere associata ad un aumento del rischio di insorgenza della colite ulcerosa ^{[5][25]}. Tuttavia, la comprensione dell'interazione tra i fattori ambientali e l'eziopatogenesi delle IBD è complessa e non ancora del tutto nota.

2.1.3 CLINICA

La presentazione clinica è estremamente polimorfa ^{[1][24]}; varia in rapporto alla sede, al fenotipo di malattia, all'intensità dell'infiammazione e alla presenza di complicanze. Le manifestazioni cliniche vengono distinte, in base alla sede, in manifestazioni intestinali ed extra-intestinali ^{[27][32]}. I sintomi clinici possono essere molto variabili con un'enorme diversità di fenotipi di malattia; spesso possono essere simili a quelli osservati nella sindrome dell'intestino irritabile, nella gastroenterite allergica e nella gastroenterite infettiva ^[24].

Sono stati riportati periodi più frequenti di malattia attiva nelle IBD pediatriche ^[25], spesso si presenta con una malattia più estesa e con un decorso più aggressivo rispetto alla malattia ad insorgenza adulta.

Sintomi gastrointestinali

I sintomi più frequenti sono diarrea e dolore addominale per la malattia di Crohn, e diarrea e sangue nelle feci per la colite ulcerosa ^{[1][24]}.

Nella malattia di Crohn il dolore addominale è più frequente e persistente, ma in entrambi i casi, è associato ad un calo ponderale e malessere generale. I sintomi di accompagnamento, infatti, sono astenia, anoressia, nausea, vomito e febbre, meno frequente nella colite ulcerosa. In età pediatrica spesso è associato un ritardo di crescita, determinato in base alla deviazione standard di altezza rispetto al target per età; questo è un parametro fondamentale da analizzare poiché, se presente, classifica automaticamente il paziente come alto rischio ^{[1][24]}.

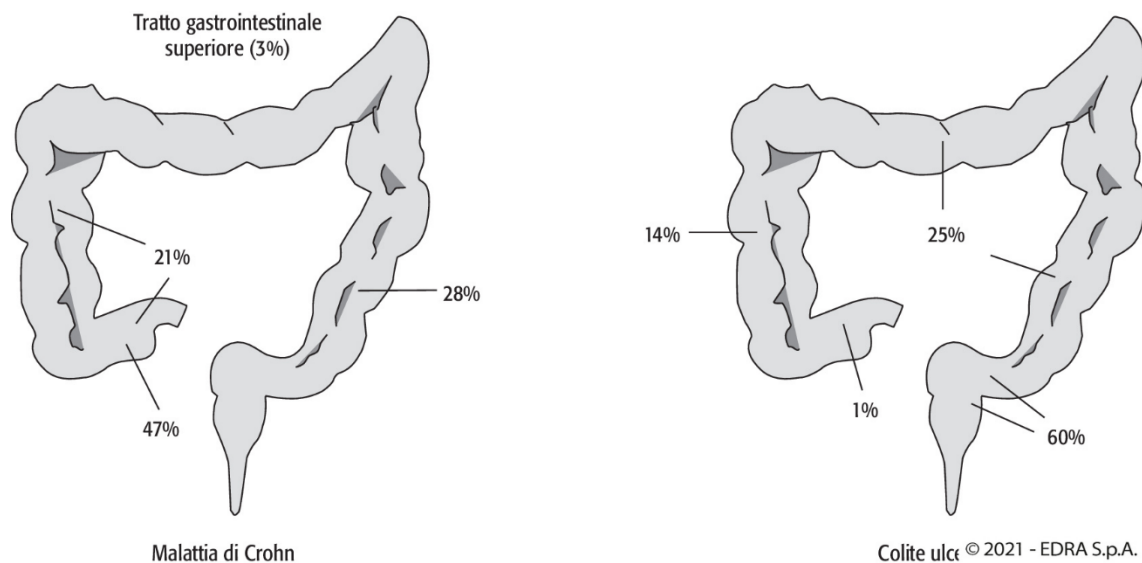


Figura 4 differente distribuzione delle lesioni intestinali nella malattia di Crohn e nella colite ulcerosa [1]

Nel caso in cui ci sia un coinvolgimento dell'intestino tenue prevalgono sintomi come diarrea cronica e calo ponderale associati o meno a vomito, distensione addominale e dolori addominali [1][24]. La porzione digiuno-ileale è più frequentemente colpita nei pazienti giovani e si manifesta con diarrea, steatorrea, dolore addominale cronico e calo ponderale associato a malnutrizione [1].

Mentre la porzione ileocecale deve essere sospettata se si riscontra all'esame obiettivo una dolorabilità addominale in fossa iliaca destra associato a dolore addominale pre-evacuativo alleviato dall'evacuazione. Questo quadro clinico può complicarsi nel momento in cui si presenta un interessamento fibrostenotico (*forma stenosante*) dell'ileo terminale o della valvola cecale con conseguente ostruzione intestinale [1][24][27]. Questa complicanza si presenta con dolore colico addominale intermittente e crampiforme, accompagnato da nausea; la stipsi da ostruzione cronica tende a sostituirsi con diarrea e, all'esame obiettivo, si può percepire una massa palpabile in fossa iliaca destra. Nei casi più gravi, in cui sono presenti ripetute crisi sub-occlusive, il quadro clinico si complica con febbre, vomito, leucocitosi e segni e sintomi di addome acuto.

Nella colite ulcerosa, in cui prevale un interessamento del retto e del colon, la sintomatologia è caratterizzata da diarrea e rettorragia.

Nella colite sinistra e nella pancolite la manifestazione clinica principale è la diarrea mucosanguinolenta; si presenta con feci semi formate o semiliquide mescolate con il sangue, accompagnata da dolori di tipo colico diffusi a diversi quadranti addominali.

Nella malattia di Crohn invece, l'interessamento fibrostenotico (*fenotipo stenosante*) del colon è meno frequente rispetto a quello ileale, e si manifesta con dolore colico addominale crampiforme e stipsi ^{[1][24][27]}.

Nei rari casi di interessamento gastrico o duodenale, i sintomi principali sono nausea, vomito, dispepsia ed epigastralgia con dolorabilità addominale alla palpazione in sede epigastrica; solitamente è più frequentemente colpita la seconda porzione duodenale rispetto al bulbo. Diversi studi hanno, però, riportato un maggiore coinvolgimento del tratto gastrointestinale superiore nella IBD pediatrica rispetto a quella ad insorgenza adulta ^{[24][25]}.

La malattia di Crohn può essere caratterizzata anche da un coinvolgimento perianale che si manifesta clinicamente con ragadi, ulcere, fistole, ascessi e skin tags (macerazioni, fissurazioni e ulcerazioni superficiali della cute perianale, *fenotipo penetrante*) ^[21] ^[1]. Colpisce circa un terzo dei pazienti con malattia di Crohn. Si manifesta con incontinenza, tenesmo ed è spesso associata ad una malattia emorroidaria; i sintomi da ostruzione sono rari.

Mentre la colite ulcerosa può complicarsi con il megacolon tossico, per coinvolgimento infiammatorio dei nervi mioenterici con paralisi e sovradistensione del colon; e cancro del colon retto ^[1].

Sintomi extra-intestinali

L'EIM (Extraintestinal manifestations) è comune nei pazienti pediatrici con IBD ^{[22][23]}; i tassi di EIM all'insorgenza della IBD sono più alti nei bambini rispetto agli adulti ^[24].

Non è stata rilevata alcuna differenza statisticamente significativa in base al sesso o al tipo di malattia ^[22].

In circa il 22% dei pazienti pediatrici con IBD, le prime manifestazioni cliniche sono extra-intestinali, ad esempio il ritardo acuto o cronico della crescita, anemia, stanchezza e malattie perianali, senza diarrea o altri disturbi gastrointestinali ^[25]; questa manifestazione clinica atipica nei pazienti pediatrici spesso provoca ritardi diagnostici.

Le EIM più comune nei bambini con IBD sono l'artrite e la stomatite aftosa; lo stesso studio, mostra che le EIM più comuni che si sviluppano dopo la diagnosi sono l'artrite e l'osteopenia/osteoporosi ^{[22][23]}. Infatti, il rimodellamento e la crescita ossea sono inibiti nei pazienti pediatrici con IBD; associato a ciò è presente anche una diminuzione dell'assorbimento di calcio e di vitamina D ^[23].

Le artropatie periferiche sono le più frequenti manifestazioni extra intestinali nel MC, più frequenti nei pazienti con un coinvolgimento del colon. Vengono classificate in forme di tipo 1 (pauciarticolare), acute e autolimitanti che si verificano in concomitanza della riacutizzazione della patologia e si risolvono in 10 settimane; e di tipo 2 (poliarticolari) che hanno una durata maggiore e non sono correlate all'attività della malattia. La forma di tipo due può accompagnarsi ad eritema nodoso e uveite. Non sono in genere deformanti, tendono a coinvolgere grandi articolazioni (anca e ginocchio) in modo asimmetrico e monoarticolare ^{[22][23]}.

Le artropatie assiali sono meno frequenti e si associano a HLA-B27+ e a irite e non sono collegate all'attività della malattia ^[1].

Le IBD sono associate anche a patologie autoimmuni cutanee come psoriasi (1-2% nella popolazione generale e 7-11% nei pazienti con IBD), vitiligine, polimiosite, lupus e sclerodermia ^[22]. L'eritema nodoso è la manifestazione cutanea più frequente nel MC mentre il pioderma gangrenoso è più frequente nella colite ulcerosa.

Altre possibili manifestazioni extra-intestinali possono essere oculari, epatobiliari, nefrourologiche ed ematologiche. La calcolosi biliare viene riscontrata in più di un quarto dei pazienti con MC, ed è causata da un malassorbimento degli acidi biliari, frequente se è presente un coinvolgimento dell'ileo terminale. La colangite sclerosante primitiva colpisce più spesso i pazienti con CU ^[1].

Le infezioni ricorrenti e atipiche sono riscontrate nelle IBD monogeniche, poiché sono spesso associate ad una deficienza immunitaria primitiva. L'esame obiettivo può riscontrare lesioni cutanee specifiche, linfadenopatie ed epatosplenomegalia.

È necessario sospettare una condizione monogenica se la presentazione clinica è caratterizzata da gravi malattie perianali, follicolite e/o artrite nella prima infanzia. Queste condizioni suggeriscono disturbi del signalling di IL-10.

Altre EIM possono essere anemia autoimmune, diabete mellito di tipo 1, trombocitopenia autoimmune, tiroiditi autoimmune, polmonite interstiziale o altre patologie autoimmuni multiorgano. Questo perché le IBD possono costituire uno dei sintomi della sindrome IPEX causata da un deficit di FOXP3 o sindrome IPEX-like, causata da mutazioni in *CTLA4*, *LRBA*, *STAT1*, *STAT3* o *CARMIL2* ^{[19][21]}.

2.1.4 DIAGNOSI

L'attività della malattia al momento della visita può variare da lieve a grave, i sintomi sono eterogenei e possono essere lievi o anche assenti; queste caratteristiche possono rendere la diagnosi delle IBD difficile e complessa. Nei bambini in cui si sospetta IBD è importante effettuare una adeguata diagnosi differenziale con infezioni enteriche.

Gli obiettivi clinici sono ^{[1][26]}:

- a. stabilire la diagnosi di malattia;
- b. identificare il fenotipo clinico,
- c. definire l'attività di malattia e definire la terapia più adeguata;
- d. individuare le complicanze e modificare il trattamento in base ad esse.

Le linee guida ECCO-ESPGHAN (European Crohn's and Colitis Organisation ed European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition) sono state preparate da un gruppo di lavoro internazionale di specialisti in IBD pediatrico della European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) e della European Crohn's and Colitis Organization (ECCO) ^{[26][27]}. Queste definiscono che non ci sia un unico standard di riferimento per la diagnosi delle IBD, ma una combinazione di indagini cliniche, biochimiche, fecali, endoscopiche, di imaging trasversale e istologiche ^{[26][27]}.

Esami biochimici

Alla diagnosi, ogni paziente dovrebbe sottoporsi a una valutazione biochimica con emocromo completo, marcatori infiammatori (proteina C-reattiva PCR), elettroliti, enzimi epatici e un campione di feci per l'analisi microbiologica, incluso il *C. difficile* ^[26].

L'aumento degli indici di flogosi si associa più spesso alla malattia di Crohn, mentre può essere completamente assente nella colite ulcerosa, tranne nel caso della colite acuta grave ^[27].

La PCR elevata e la leucocitosi non sono specifici delle IBD, per cui bisogna effettuare una diagnosi differenziale con le coliti infettive.

L'emocromo, tramite l'analisi delle piastrine, può evidenziare una condizione trombotica, espressione dello stato infiammatorio; più frequentemente nella malattia di Crohn rispetto alla colite ulcerosa ^{[1][27]}.

Può essere identificata un'anemia cronica normocromica e normocitica a causa dell'aumento dell'IL-6/TNF α che aumenta la captazione del ferro da parte dei macrofagi; o megaloblastica da diminuzione dell'assorbimento di vitamina B12 e folati (malattia ileale). L'anemia può anche essere sideropenica e ipocromica e microcitica da ematochezia, tipica di un coinvolgimento del colon ^{[1][19][27]}.

La diagnosi di carenza di ferro dipende dai livelli di infiammazione; nei pazienti senza evidenza clinica, endoscopica o biochimica di malattia attiva, la diagnosi viene effettuata nel momento in cui si evidenzia un valore della ferritina sierica <30 $\mu\text{g/L}$ ^[27].

Può essere riscontrata anche una diminuzione dei valori di albumina per malassorbimento e un aumento degli indici di colestasi che dovrebbe far sospettare una colangite sclerosante primitiva associata ^{[1][26][27]}.

La calprotectina fecale (fC), proteina derivata principalmente dai neutrofili, sembra essere il più sensibile marcatore di infiammazione intestinale. Non esiste un valore soglia esatto che permetta di effettuare una diagnosi differenziale tra le IBD e altre cause infiammatorie ma con il valore soglia di 150 $\mu\text{g/g}$ si può ottenere una buona accuratezza diagnostica; infatti, valori persistentemente maggiori di 50-150 $\mu\text{g/g}$ suggeriscono infiammazione; in base anche all'età del paziente ^{[28][27]}.

Rimane un marcatore poco specifico per distinguere le IBD da altre cause di infiammazione intestinale ^[26].

I campioni di feci devono essere prelevati per escludere patogeni comuni, tramite coprocultura; ulteriori test vengono effettuati sulla base dell'anamnesi effettuata precedentemente, ad esempio per chi ha effettuato recenti viaggi all'estero. La ricerca può essere per patogeni più comuni come *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli*; o più specifici come *Yersinia* e *Shigella*. Possono essere effettuate anche ricerche virologiche ad esempio per Rotavirus, Adenovirus, Enterovirus; anche per parassiti fecali tra cui la

Giardia. L'identificazione di un patogeno non esclude necessariamente una diagnosi di IBD, poiché un primo episodio o riacutizzazione di IBD può essere scatenato da un'infezione enterica documentata [28][27].

Sono inoltre indicate la sierologia per amebiasi e HIV, nonché lo screening per la malattia celiaca [26][27].

All'esame chimico fisico delle feci può essere evidenziata la steatorrea, tipica conseguenza di un malassorbimento intestinale di grassi causato da un coinvolgimento ileale [1].

Tra i marcatori sierologici si potrebbe riscontrare una positività a pANCA (anticorpi anticitoplasma dei neutrofili a pattern perinucleare) ed ASCA (anticorpi anti-*Saccharomyces cerevisiae*). Questi marcatori possono essere utilizzati per supportare una diagnosi considerando però che l'accuratezza dei migliori test disponibili è limitata e, di conseguenza, non sufficientemente accurata per differenziare la CD dalla CU. Il marcatore sierologico ASCA possiede una elevata specificità per la malattia di Crohn, ed è predittivo di un decorso complicato e severo della malattia, mentre il pANCA permette di orientarsi verso la diagnosi di colite ulcerosa [27][1].

Esame endoscopico ed istologia

Nei pazienti con sospetto clinico di IBD è necessaria l'ileocolonscopia con biopsie da segmenti infiammati e non infiammati per stabilire la diagnosi; fa eccezione la colite acuta grave per cui è sufficiente la sigmoidoscopia [27]. L'endoscopia dovrebbe essere eseguita da un gastroenterologo pediatrico dopo una preparazione adeguata all'età, sotto anestesia generale o sedazione profonda in un contesto adatto ai bambini [31][32].

Nessuna caratteristica endoscopica è specifica per la malattia di Crohn o per la colite ulcerosa. La discontinuità delle lesioni e il risparmio del retto possono aiutare nella diagnosi differenziale tra queste due patologie; infatti, le caratteristiche endoscopiche più utili per la diagnosi della malattia di Crohn sono lesioni discontinue, presenza di stenosi

e fistole e coinvolgimento perianale; mentre un coinvolgimento colonico continuo e confluyente con demarcazione di infiammazione e contatto rettale è tipico della colite ulcerosa [27]. In condizioni molto precoci può essere evidenziata un'architettura preservata.

Il grado di infiammazione viene definito in base all'iperemia della mucosa, al sanguinamento e alla presenza di ulcere o pseudopolipi infiammatori, più frequenti nella colite ulcerosa.

- Quadri endoscopici ed istologici caratteristici della malattia di Crohn: si può manifestare tramite una mucosa edematosa ed ulcerata a causa di un'infiammazione transmurale, con ulcere aftoidi, circolari, serpigginose e profonde e granulomi non caseosi. Possono essere presenti tratti di mucosa con aspetto ad acciottolato, mucosa solcata da tratti ulcerati ricoperti di fibrina [1][32].

<p>Typical macroscopic findings of CD:</p> <ul style="list-style-type: none"> Mucosal aphthous ulcers Linear or serpentine ulceration <p>Cobblestoning</p> <p>Stenosis/stricturing of bowel with prestenotic dilatation</p> <p>Imaging or surgical—bowel wall thickening with luminal narrowing</p> <p>Perianal lesions—fistula(s), abscesses, anal stenoses, anal canal ulcers, large and inflamed skin tags</p> <p>Skip lesions</p> <p>Jejunal or ileal ulcers</p> <p>Nonspecific macroscopic findings of CD</p> <ul style="list-style-type: none"> Oedema Erythema Friability Granularity <p>Exudate</p> <ul style="list-style-type: none"> Loss of vascular pattern Isolated aphthous ulcers Perianal lesions—midline anal fissures, small skin tags 	<p>Typical microscopic findings of CD:</p> <ul style="list-style-type: none"> Noncaseating granuloma(s)—must be remote from ruptured crypt Focal chronic inflammation, transmural inflammatory infiltrate, submucosal fibrosis <p>Nonspecific microscopic findings of CD:</p> <ul style="list-style-type: none"> Granuloma adjacent to ruptured crypt Mild nonspecific inflammatory infiltrate in lamina propria Mucosal ulceration/erosion Signs of chronicity (eg, crypt architectural changes, colonic Paneth cell metaplasia and goblet cell depletion)
<p>CD = Crohn disease.</p>	

Tabella 3 caratteristiche diagnostiche della malattia di Crohn pediatrica al momento della diagnosi [32]

- Quadri endoscopici ed istologici tipici di colite ulcerosa: può presentarsi tramite infiammazione cronica focale, della mucosa e della sottomucosa. Ha un aspetto diffuso con perdita precoce del pattern vascolare. La distorsione dell'architettura ghiandolare e la presenza di ascessi criptici rappresentano i principali reperti istologici della colite ulcerosa [1][27].

Presentation	Macroscopic features	Microscopic features
Typical	Contiguous disease from the rectum	Architectural distortion, basal lymphoplasmacytosis, disease most severe distally, no granulomas
Atypical		
1. Rectal sparing	No macroscopic disease in rectum or rectosigmoid	Same as typical, especially in the involved segment above sparing
2. Short duration	Contiguous disease from the rectum, may also have rectal sparing	May have biopsies with focality, plus signs of chronicity or architectural distortion may be absent; other features are identical. Usually occurs in young children with short duration of symptoms.
3. Cecal patch	Left-sided disease from rectum with area of cecal inflammation and normal appearing segment between the 2	Typical; biopsies from the patch may show nonspecific inflammation
4. UGI	Erosions or small ulcers in stomach, but are neither serpiginous nor linear	Diffuse or focal gastritis, no granuloma (except pericryptal)
5. Acute severe colitis	Contiguous disease from the rectum	May have transmural inflammation or deep ulcers, other features typical. Lymphoid aggregates are absent, ulcers are V-shaped fissuring ulcers

UC = ulcerative colitis; UGI = upper gastrointestinal.

Tabella 4 fenotipi della colite ulcerosa pediatrica al momento della diagnosi ^[32]

Imaging trasversale

L'ecografia intestinale è una metodica con scarsa invasività, ampia disponibilità e rapida esecuzione ma operatore dipendente; ha un basso costo e non possiede un rischio intrinseco di radiazioni ionizzanti.

Tra i segni tipici di malattia di Crohn può essere riscontrato un aumento dello spessore della parete dell'ileo terminale superiore a 3-4 mm associato a perdita della normale stratificazione della parete.

L'ecografia permette anche di identificare eventuali complicanze associate come ascessi, linfadenomegalie, stenosi e tragitti fistolosi ^[1].

L'uso di soluzione di contrasto anecoico orale (iso-osmolare polietilenglicole) può aumentare la sensibilità e ridurre la variabilità operatore dipendente.

È uno strumento importante di screening nella valutazione diagnostica preliminare nei pazienti pediatrici con sospetto di IBD, ma dovrebbe essere affiancata ed integrata da altre metodiche diagnostiche più sensibili ^{[31][32]}.

La TAC e la risonanza magnetica vengono entrambe utilizzate per valutare l'intestino tenue; possono determinare l'estensione e l'attività della malattia in base allo spessore della parete e all'aumento del contrasto endovenoso ^[29]. A causa dell'assenza di radiazioni, la risonanza magnetica dovrebbe essere preferita rispetto alla TAC, in particolare nei

pazienti giovani. La risonanza magnetica del bacino rappresenta il test diagnostico non invasivo più accurato nella valutazione della malattia di Crohn perianale sia nei bambini che negli adulti [30].

L'enterografia a risonanza magnetica (MRE) è attualmente la modalità di imaging scelta nella IBD pediatrica al momento della diagnosi. Può determinare il coinvolgimento dell'intestino tenue, cambiamenti infiammatori nella parete intestinale e individuare complicazioni della malattia (fistola, ascesso, stenosi) [31][32]. Questa metodica diagnostica è molto valida in quanto è in grado di identificare sia l'infiammazione intestinale che il grado di danno, ma non esiste un sistema di punteggio validato per questa modalità nei pazienti pediatrici.

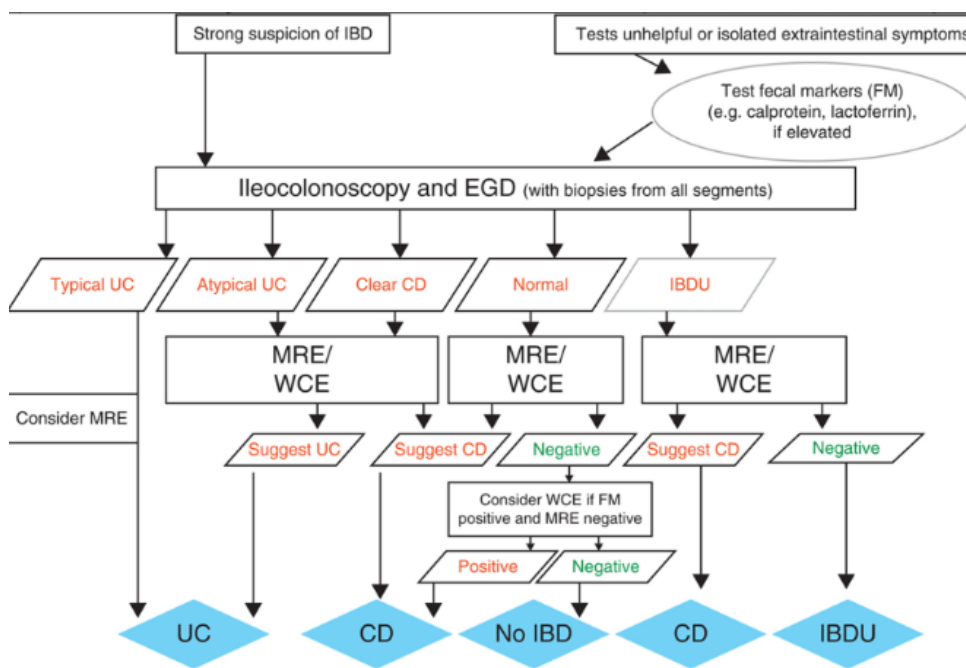


Figura 5 algoritmo riassuntivo delle linee guida ECCO-ESPGHAN [32]

Diagnosi IBD-Unclassified

IBD-U può essere considerata come diagnosi provvisoria dopo endoscopia e può essere utilizzata come diagnosi finale dopo imaging e un esame endoscopico completo [31][32]. Le IBD di tipo non classificato si riferiscono a pazienti con infiammazione limitata al

colon con caratteristiche che rendono incerta la differenziazione tra UC e CD anche dopo un esame completo.

Diagnosi delle IBD monogeniche

Le indagini genetiche per diagnosticare la IBD monogenica sono utili per la scelta della terapia più adeguata; ad esempio, guidano l'applicazione del trapianto di cellule staminali emopoietiche allogeniche nelle forme associate a immunodeficienze primarie, in particolare in caso difetti di segnalazione IL10 o difetti regolatori delle cellule T [31][32]. La *figura 6* mostra l'algoritmo diagnostico delle IBD monogeniche; il percorso diagnostico e terapeutico è eseguito da un team multidisciplinare [31][32].

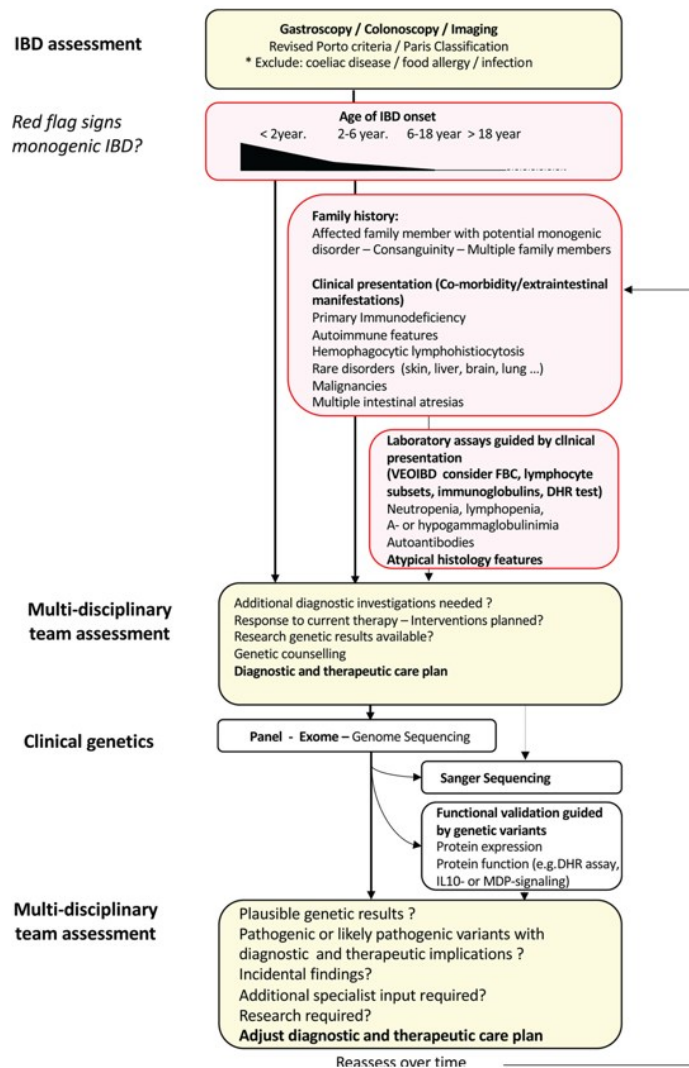


Figura 6 algoritmo diagnostico delle IBD monogenica [31]

2.1.5 CLASSIFICAZIONE DI MONTREAL E DI PARIS

È essenziale una classificazione dei fenotipi delle IBD; queste hanno lo scopo di identificare una correlazione genotipo-fenotipo.

La classificazione di Montreal, pur essendo ampiamente utilizzata, presenta limiti significativi nella popolazione pediatrica, in particolare per la scarsa considerazione del fenotipo dinamico della malattia e della crescita, elementi rilevanti nella prognosi a lungo termine.

Le IBD pediatriche sono caratterizzate da un fenotipo altamente dinamico, è presente un cambiamento della localizzazione e del comportamento della malattia nel tempo, e un coinvolgimento della crescita. Queste caratteristiche non sono adeguatamente prese in considerazione nella classificazione di Montreal che, invece, è più adeguata all'età adulta. Un gruppo internazionale di esperti pediatrici di IBD si è riunito a Parigi per effettuare una modifica pediatrica dei criteri di Montreal, basati su evidenze scientifiche, con lo scopo di definire standard uniformi sui fenotipi delle IBD pediatriche^[33].

Le modifiche importanti presenti nella classificazione di Parigi includono^[33]:

- La classificazione di Parigi suddivide l'età alla diagnosi in sottogruppi (A1a, A1b, A2 e A3), introducendo una maggiore granularità rispetto alla classificazione di Montreal, particolarmente utile nella popolazione pediatrica^[33]; rispettivamente: A1a (0 a <10 anni), A1b (10 a <17 anni), A2 (17 a 40 anni) e A3 (>40 anni). L'identificazione di disturbi monogenici in bambini molto piccoli (<2 anni) ha ulteriormente complicato la questione di dove debbano essere definite le linee guida pediatriche per l'età, anche se è chiaro che questi casi a precoce esordio infantile non dovrebbero essere raggruppati con i bambini più grandi^{[34][35]}.
- La classificazione di Parigi introduce una distinzione più dettagliata del coinvolgimento del tratto gastrointestinale superiore (L4), distinguendo tra

interessamento prossimale e distale rispetto al legamento di Treitz, riconoscendo il ruolo prognostico di tali localizzazioni ^{[33][32]}.

- Distingue una patologia stenotomica da una penetrante nello stesso paziente (B2B3), che possono essere presenti sia nello stesso momento, che in momenti differenti.
- Indica la presenza di insufficienza della crescita nel paziente in qualsiasi momento come G (1) contro G (0). L'introduzione del parametro G (growth) rappresenta uno degli elementi distintivi della classificazione pediatrica, in quanto il ritardo della crescita costituisce un marker prognostico rilevante e influenza le decisioni terapeutiche ^{[34][32]}.
- Aggiunge E4 per indicare l'entità della colite ulcerosa prossimale alla flessione epatica e indica la colite ulcerosa sempre grave durante il decorso della malattia con S1^[34].

La modifica di Parigi della classificazione di Montreal per pazienti pediatrici affetti da IBD è stata accettata nel 2011. L'introduzione della classificazione di Parigi ha permesso una migliore stratificazione prognostica nei pazienti pediatrici, influenzando le scelte terapeutiche precoci nei casi a rischio di malattia complicata o con ritardo di crescita.

Questa classificazione presenta importanti proprietà predittive. I fenotipi con esiti peggiori a lungo termine, e quindi con una peggiore prognosi, sono: la malattia complicata, una localizzazione ileale al momento della diagnosi nella malattia di Crohn. Mentre nella colite ulcerosa ha un valore prognostico peggiore la gravità della malattia e non la sua estensione ^[35].

	Montreal	Paris
Age at diagnosis	A1: <16 years A2: 17–40 years A3: >40 years	A1a: 0–<10 years A1b: 10–<17 years A2: 17–40 years A3: >40 years
Location	L1: terminal ileal ± limited cecal disease L2: colonic L3: ileocolonic L4: isolated upper disease ¹	L1: distal 1/3 ileum ± limited cecal disease L2: colonic L3: ileocolonic L4a: upper disease proximal to the ligament of Treitz ¹ L4b: upper disease distal to the ligament of Treitz and proximal to distal 1/3 ileum ¹
Behavior	B1: non-stricturing non-penetrating B2: stricturing B3: penetrating p: perianal disease modifier	B1: non-stricturing non-penetrating B2: stricturing B3: penetrating B2B3: both penetrating and stricturing disease, either at the same or different times p: perianal disease modifier
Growth	n/a	G0: no evidence of growth delay G1: growth delay

¹ In both the Montreal and Paris classification systems, L4 and L4a/L4b may coexist with L1, L2, and L3, respectively.

B1 = Non-stricturing, non-penetrating disease: uncomplicated inflammatory disease without evidence of stricturing or penetrating disease; B2 = stricturing disease: the occurrence of constant luminal narrowing demonstrated by radiologic, endoscopic, or surgical examination combined with prestenotic dilation and/or obstructive signs or symptoms but without evidence of penetrating

disease; B3 = penetrating disease: the occurrence of bowel perforation, intra-abdominal fistulas, inflammatory masses and/or abscesses at any time in the course of the disease, but no secondary postoperative intra-abdominal complication (excludes isolated perianal or rectovaginal fistulae); B2B3 = stricturing and penetrating disease: the presence of both B2 and B3 phenotypes in the same patient, either at the same moment in time or separately over a period of time.

Tabella 5 classificazione Montreal e Parigi per la malattia di Crohn [34]

	Montreal	Paris
Extent	E1: ulcerative proctitis E2: left-sided UC (distal to splenic flexure) E3: extensive (proximal to splenic flexure)	E1: ulcerative proctitis E2: left-sided UC (distal to splenic flexure) E3: extensive (hepatic flexure distally) E4: pancolitis (proximal to the hepatic flexure)
Severity	S0: clinical remission S1: mild UC S2: moderate UC S3: severe UC	S0: never severe (PUCAI ≥65) S1: ever severe (PUCAI ≥65)

Tabella 6 classificazione Montreal e Parigi per la colite ulcerosa [34]

2.1.6 INDICI DI ATTIVITÀ DI MALATTIA

L'obiettivo terapeutico delle IBD necessita dell'utilizzo di diversi trattamenti, come nutrizione, farmaci e interventi chirurgici, per indurre e mantenere la remissione.

La valutazione dell'attività di malattia si basa su diversi criteri tra cui: segni e sintomi, risultati clinici, imaging e procedure endoscopiche. È importante che ci sia una valutazione affidabile dell'attività e della gravità della malattia per pianificare adeguati *follow-up*, per determinare l'opzione terapeutica migliore e valutarne l'efficacia ^[38].

Esistono, quindi, indici quantitativi di misurazione dell'attività clinica di malattia che guidano la gestione terapeutica.

Sono stati sviluppati diversi score standardizzati per la valutazione dell'attività e gravità della malattia, clinici, endoscopici ma anche radiologici. Questi strumenti sono rilevanti per la diagnosi ma anche per il *follow-up* e la definizione della risposta alla terapia. Vengono utilizzati anche nell'accertamento delle recidive.

Per quanto riguarda il paziente adulto viene particolarmente utilizzato l'Indice di Attività della Malattia di Crohn (CAI). È stato il primo indice clinico per adulti dove un punteggio <150 è associato a malattie quiescenti; valori superiori indicano una malattia attiva; mentre valori superiori a 450 si osservano con malattia estremamente grave ^[36].

L'Indice Harvey-Bradshaw (HBI) è una semplificazione del CAI con lo scopo di semplificare la raccolta e il calcolo dei dati ^[38].

Indice di Attività della Malattia di Crohn Pediatrica (PCDAI)

L'Indice di Attività della Malattia di Crohn Pediatrica (PCDAI) è stato sviluppato nel 1990 con il contributo di 30 gastroenterologi pediatrici provenienti da 12 centri nordamericani, con l'obiettivo di essere uno strumento utilizzabile facilmente e riproducibile per la valutazione longitudinale dell'attività della malattia in studi multicentrici ^[39]. È composto da undici elementi, tra cui sintomi, esame obiettivo che

permette di identificare la presenza della malattia perianale e delle manifestazioni extra-intestinali; crescita definita tramite il peso, l'altezza e la curva di crescita rapportata con l'età del paziente; marcatori infiammatori sierici, tra cui ematocrito, velocità di eritrosedimentazione (VES) e albumina. Il punteggio va da 0 a 100 dove i valori più alti indicano un peggioramento dell'attività di malattia [37].

Questo score è stato modificato e aggiornato nel tempo (per esempio: mod-PCDAI); più recentemente, *Turner et al.*[40] hanno esaminato una versione matematicamente ponderata del PCDAI (wPCDAI) basata sulla eliminazione degli elementi superflui del PCDAI secondo l'opinione di un gruppo di esperti. Il wPCDAI discrimina meglio tra le varie categorie di attività della malattia e di conseguenza è un indice più affidabile e valido.

Tabella 7 Pediatric Crohn Disease Activity Index (PCDAI) [41]

<p>Pediatric Crohn's Disease Activity Index (PCDAI): Validated instrument for measuring disease activity in children and adolescents with Crohn's disease. Used in clinical and research application. Based on 7-day recall of clinical symptoms, weight and growth parameters, physical findings, laboratory result and general functioning. Disease activity is determined as a numerical score (0-100) based on evaluation of:</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Abdominal pain: presence/absence of abdominal pain and severity
<ul style="list-style-type: none"> • Stools per day: number of liquid stools and/or the presence/absence and volume of blood in stool
<ul style="list-style-type: none"> • Weight: stability of weight and/or degree of weight loss
<ul style="list-style-type: none"> • Linear growth: stability of height and/or degree of height velocity changes
<ul style="list-style-type: none"> • Physical findings <ul style="list-style-type: none"> • Abdominal pain: presence/absence of and severity of abdominal pain on physical exam • Perianal disease: presence/absence of perianal disease (including skin tags, fissure, fistula, and abscess) • Extra-intestinal manifestations: presence/absence of <ul style="list-style-type: none"> • Fever > 38.5 x 3 days in week • Arthritis • Uveitis • Erythema nodosum • Pyoderma gangrenosum
<ul style="list-style-type: none"> • Laboratory studies: the documentation of laboratory values based on the norm and variations from the norm for: <ul style="list-style-type: none"> • Hemoglobin/Hematocrit • ESR • Albumin
<ul style="list-style-type: none"> • Functioning and general well-being: description of general well-being and presence/absence of limitations on daily functioning (Based on a 1-week recall).
<ul style="list-style-type: none"> • Score ranges from 0 to 100 <ul style="list-style-type: none"> • 0-10 Inactive disease • 10-30 Mild disease • >30 Moderate to severe disease

Indice di Attività della Colite Ulcerosa Pediatrica (PUCAI)

Il PUCAI è un indice di attività non invasivo, è stato definito poiché la colonscopia è una metodica invasiva e meno utilizzata in ambito pediatrico. La selezione degli item è stata effettuata in modo giudicante utilizzando un gruppo Delphi composto da 36 esperti pediatrici di IBD [37].

Prende in considerazione 6 caratteristiche cliniche, tra cui la presenza di dolore addominale, ematochezia, la consistenza delle feci, il numero di evacuazioni ogni 24h, movimento intestinale notturno.

Questo indice è indicato nelle coliti sinistre; mentre la classificazione di Truelove e Witts [1] è più indicata nelle pancoliti severe/fulminanti dove non è possibile effettuare la colonscopia a causa dell'elevato rischio di perforazione [1].

La gravità della malattia endoscopica (punteggio endoscopico Mayo) generalmente è correlata alla gravità clinica della malattia misurata dal punteggio PUCAI [42].

Un limite di questo punteggio è rappresentato dai bambini con colangite sclerosante primaria e IBD (PSC-IBD); infatti, questi pazienti, che secondo i punteggi PUCAI sono in remissione clinica, hanno un rischio aumentato di malattia endoscopica e istologica attiva rispetto ai bambini con colite ulcerosa senza PSC. Pertanto, il PUCAI tende a sottostimare l'attività di malattia nel contesto di una RCU associata a PSC. [37].

Tabella 8 Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index (PUCAI) [41]

Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index (PUCAI) —Validated instrument for measuring disease activity in children and adolescents with Ulcerative Colitis. Disease activity is determined as a numerical score based on evaluation of:
• Abdominal pain: presence/absence of and severity of abdominal pain
• Number of stools per day
• Stool consistency
• Amount of blood in stools: presence/absence of blood and severity of bleeding
• Nocturnal stooling: presence/absence of nocturnal stooling
• Activity level: presence/absence of limitations and degree of limitations on daily functioning.
• Score ranges from 0 to >85 <ul style="list-style-type: none">• 0–9 Inactive disease• 10–4 Mild disease• 35–64 Moderate disease• 65–85 Severe disease

Punteggi di gravità endoscopica

Oltre agli indici clinici, trovano largo impiego sistemi di punteggio basati su valutazioni endoscopiche; tra i più accettati vi sono: UCEIS, SES-CD, CDEIS e Mayo. La maggiore invasività degli esami endoscopici, e la competenza richiesta per valutare l'entità delle lesioni, rendono meno utilizzati questi score rispetto agli score clinici.

Indice di Gravità Endoscopica della Malattia di Crohn (CDEIS) e SES-CD

Il CDEIS valuta l'aspetto endoscopico in quattro segmenti del colon (colon destro, trasverso, colon sinistro, sigma e retto) e nell'ileo terminale. Viene definito un punteggio in base all'aspetto della superficie, se è ulcerata, stenotica, e in base all'entità dei cambiamenti della mucosa e delle sue lesioni. Il punteggio va da 0 ad un massimo di 44 (peggiore) ^[37]. È uno score molto articolato e complesso, per cui è stato sviluppato il SES-CD (*Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease*), che considera meno variabili e si basa sulla dimensione dell'ulcera, estensione della superficie ulcerata, estensione della superficie interessata e stenosi, sempre dei cinque segmenti intestinali. L'SES-CD include quattro variabili da 0 a 3 in cinque segmenti dell'ileo e del colon-retto. In questo punteggio, le ulcere sono classificate per dimensione, mentre le lesioni colpite con superfici ulcerate e superfici intestinali sono classificate in base all'estensione ^[56]. Il SES-CD con un punteggio maggiore di 7 prevede la progressione di malattia; un punteggio minore di 6 può aiutare a identificare i pazienti meno propensi a progredire e che rientrano nella definizione di malattia di Crohn lieve ^[57].

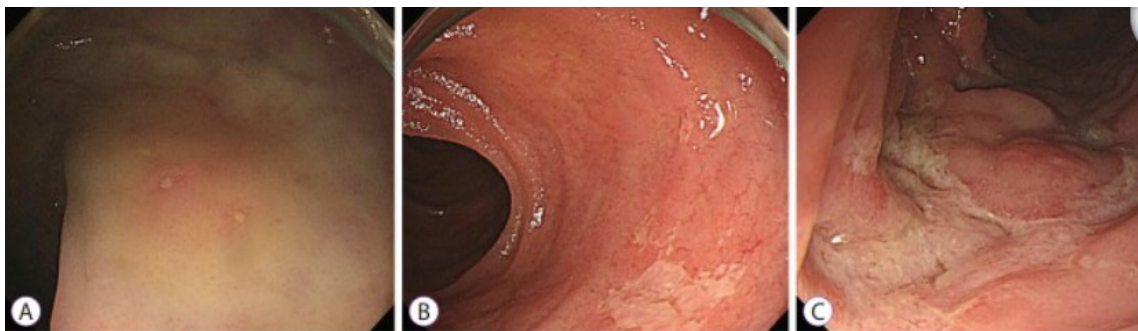


Figura 7 immagini endoscopiche secondo il Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease. Per la dimensione delle ulcere, (A) ulcere afte, (B) ulcere grandi e (C) ulcere molto grandi ^[56]

Indice di Gravità Endoscopica della Colite Ulcerosa (UCEIS)

L'UCEIS è uno strumento utilizzato per valutare l'attività endoscopica nella colite ulcerosa. È stato dimostrato che supera il più diffuso punteggio endoscopico di Mayo (MES) nella previsione della prognosi a lungo termine, inclusa la necessità della colectomia [54][55]. Ha anche mostrato la migliore correlazione con i sintomi clinici. Ha mostrato una buona affidabilità e può aiutare nella diagnosi della CU, negli studi clinici e nelle decisioni sul miglior trattamento. Gli elementi analizzati sono lo schema vascolare, il sanguinamento, le erosioni e ulcere. Un punteggio da 0 a 1 indica una remissione, da 2 a 4 una forma lieve, tra 5 e 6 moderata e tra 7 e 8 grave.

Descriptor (score most severe lesions)	Likert scale anchor points	Definition
Vascular pattern	Normal (1)	Normal vascular pattern with arborisation of capillaries clearly defined
	Patchy loss (3)	Patchy loss or blurring of vascular pattern
	Obliterated (5)	Complete loss of vascular pattern
Mucosal erythema	None (1)	The colour of the mucosa is normal
	Light red (3)	Some increase in colour of the mucosa that is probably abnormal, but would be best compared side by side with a normal examination
	Dark red (5)	Red or crimson colour of the mucosa that is similar to blood—that is, clearly abnormal even if not compared with a normal examination (does not include intramucosal haemorrhage)
Mucosal surface (Granularity)	Normal (1)	Smooth mucosa with a sharp light reflex, similar to a polished surface
	Granular (3)	Mucosal surface diffuses reflected light causing minor variation in the surface
	Nodular (5)	Evident nodular variation in mucosal surface
Mucosal oedema	None (1)	Normal appearance: no white or yellow substance visible
	Probable (3)	Slight swelling and thickening of mucosa
	Definite (5)	Marked thickening and oedema of the mucosa with blunting of the mucosal folds
Mucopus	None (1)	Normal appearance: no white or yellow substance visible
	Some (3)	White or yellow deposits on the mucosa unrelated to any bowel preparation
	Lots (5)	Mucopus substantially covering the mucosal surface unrelated to any bowel preparation
Bleeding	None (1)	No visible blood
	Mucosal (2)	Some spots or streaks of coagulated blood on the surface of the mucosa ahead of the scope, which can be washed away
	Luminal mild (3)	Some free liquid blood in the lumen
	Luminal moderate (4)	Frank blood in lumen ahead of endoscope or visible oozing from mucosa after washing intraluminal blood
	Luminal severe (5)	Frank blood in the same lumen with visible oozing from a haemorrhagic mucosa
Incidental friability	None (1)	No bleeding or intramucosal haemorrhage before or after passage of the endoscope
	Mild (2)	No bleeding at the site of assessment before, but minor bleeding or intramucosal haemorrhage after, passage of the endoscope
	Moderate (3)	Intramucosal haemorrhage without overt bleeding before passage of the endoscope
	Severe (4)	Overt bleeding after passage of the endoscope
	Very severe (5)	Overt bleeding from the mucosa
Contact friability	None (1)	No bleeding from the mucosa after light touch with closed biopsy forceps
	Probable (3)	Intramucosal haemorrhage or minor bleeding after light touch with closed biopsy forceps
	Definite (5)	Overt bleeding mucosa after light touch (within 10 s) with closed biopsy forceps
Erosions and ulcers	None (1)	Normal mucosa, no visible erosions or ulcers
	Erosions (2)	Tiny (≤ 5 mm) defects in the mucosa, of a white or yellow colour with a flat edge
	Superficial ulcer (3)	Larger (> 5 mm) defects in the mucosa, which are discrete fibrin-covered ulcers in comparison with erosions, but remain superficial
Extent of erosions or ulcers	Deep ulcer (4)	Deeper excavated defects in the mucosa, with a slightly raised edge
	None (1)	None seen during endoscopy
	Limited (2)	$< 10\%$ of the affected mucosa
	Substantial (3)	$10\% - 30\%$ of the affected mucosa
	Extensive (4)	$> 30\%$ of the affected mucosa

*An additional descriptor attempted to describe the transition from abnormal to normal mucosa, but was discarded during phase 1 on the basis that it defied definition. Erosions and ulcers had four (response) levels while the others had five because the expert panel were unable to form a range of five responses with meaningful or measurable distinctions between 2 and 3 or 3 and 4.

Tabella 9 descrittori e definizioni UCEIS [55]

Mayo (MES)

Il punteggio Mayo valuta la gravità endoscopica utilizzando uno score a quattro punti, partendo da un punteggio di zero, fino ad un massimo di tre che rappresenta la presenza di ulcera con sanguinamento spontaneo.

La versione modificata estende questo punteggio valutando i cambiamenti nei cinque segmenti del colon, si dimostra correlato ad altri marcatori di attività di malattia ^[37].

2.1.7 TERAPIA

Le IBD sono malattie che non possono essere curate solo per i sintomi intestinali poiché hanno implicazioni psicologiche e sociali importanti. Si associano a sintomatologie che portano imbarazzo ai pazienti, con importanti effetti collaterali ai farmaci (ad esempio la sindrome di Cushing iatrogeno), che possono comportare un isolamento sociale, problemi di immagine corporea, DCA, fobie alimentari, ansia e depressione. Motivo per cui il trattamento deve essere multidisciplinare.

Ora non si usa più l'approccio step-up alla piramide terapeutica che prevede l'utilizzo farmaci di impatto e di potenza crescente; è più utilizzato un approccio top-down ^{[46][48]}. L'approccio top-down, strategia d'elezione nei pazienti con un profilo di rischio elevato (malattia estesa, ulcere profonde), consiste nell'usare subito i farmaci più potenti per spegnere immediatamente l'infiammazione in pazienti ad alto rischio; vengono utilizzati quindi, i farmaci biologici mirati contro le citochine (TNF o IL-12, IL-23) come prima linea di terapia ^[46].

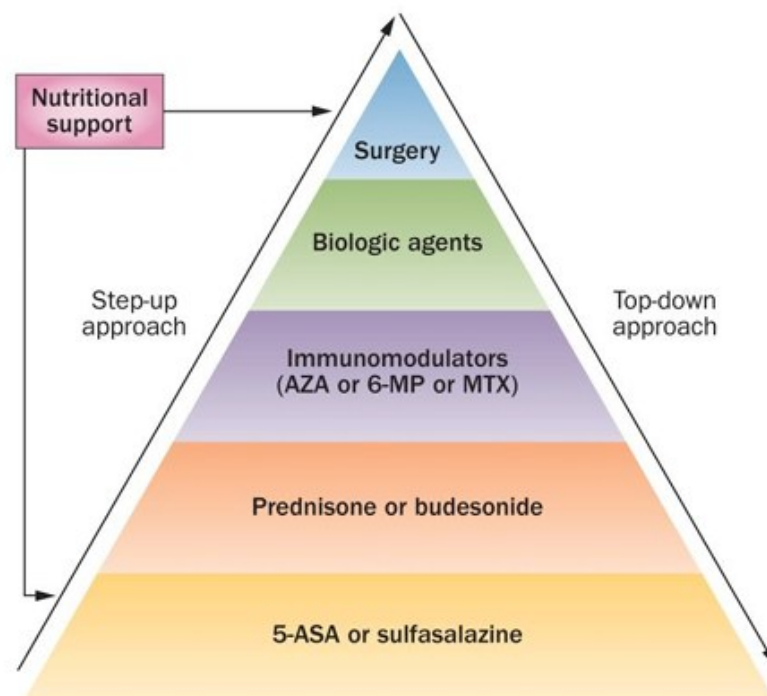


Figura 8 Piramide terapeutica per le IBD pediatriche ^[48]

Gli obiettivi terapeutici in un paziente con malattia attiva sono:

- Induzione della remissione profonda, ottimizzare la crescita e lo sviluppo puberale e migliorare la qualità di vita minimizzando la tossicità da farmaci; oltre a questo bisogna considerare anche il raggiungimento della guarigione mucosale.
- Mantenimento della fase di quiescenza;
- Gestione delle complicanze.

Gestione terapeutica della malattia di Crohn luminale pediatrico

Il piano di trattamento per un paziente pediatrico con malattia di Crohn deve considerare diversi fattori, tra cui l'età, la localizzazione della malattia, il comportamento e la presenza di ritardo di crescita, i potenziali effetti collaterali dei farmaci e la qualità di vita. È fondamentale identificare i pazienti ad alto rischio di sviluppare una patologia complessa con l'obiettivo di essere rapidi ed efficaci nell'ottenere il controllo dell'infiammazione e ridurre i danni intestinali a lungo termine; per questo, ha un ruolo importante la stratificazione del rischio dei pazienti ^[44].

Gli studi sul gruppo di lavoro di Porto IBD di ESPGHAN e sullo studio RISK sponsorizzato dalla Crohn's and Colitis Foundation of American mirano a stabilire strumenti predittivi più precisi nei bambini ^[45].

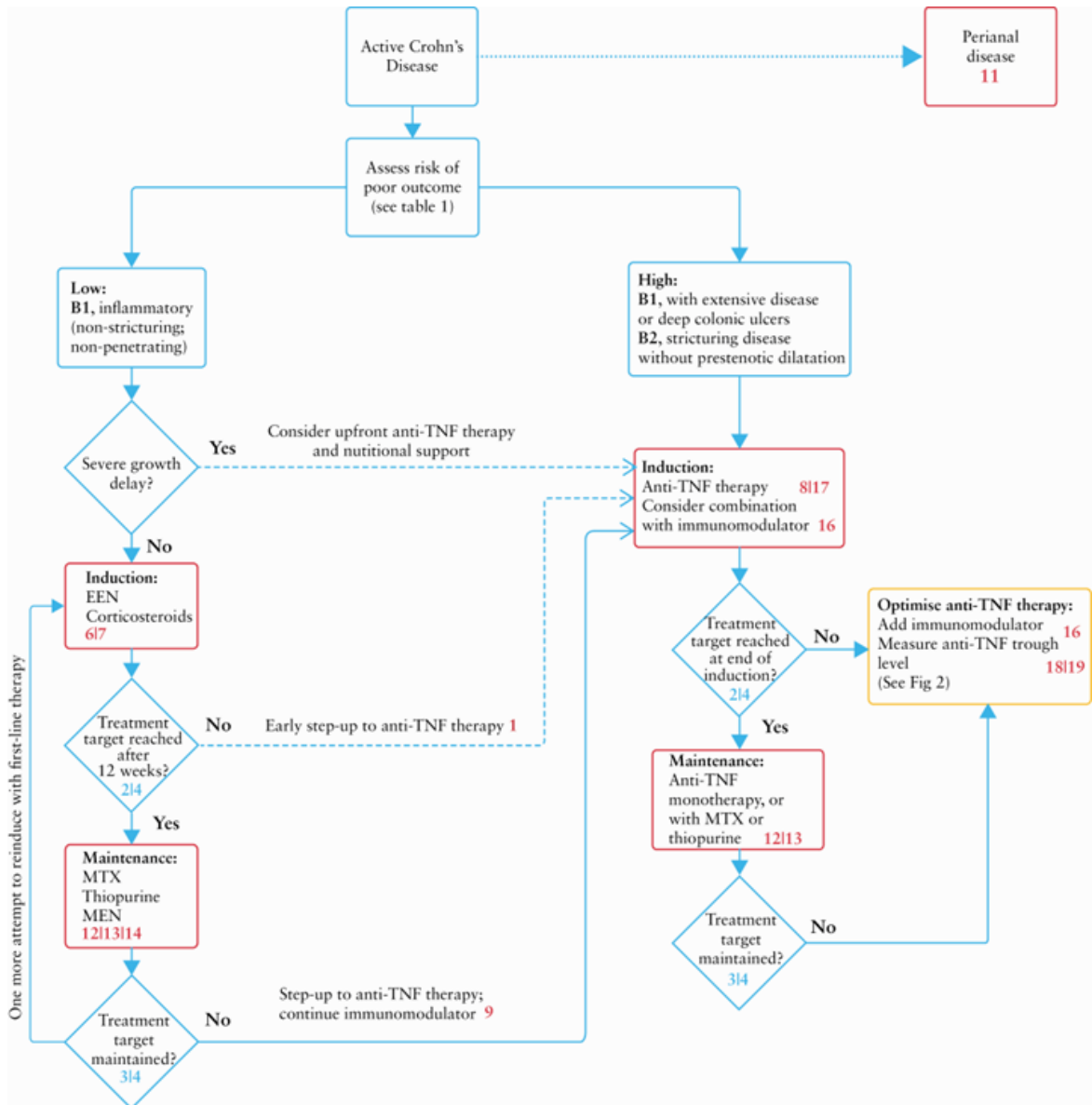


Figura 9 diagramma di flusso riassuntivo della gestione medica della malattia di Crohn luminale pediatrica [44]

Fino a quando questi non saranno disponibili, i seguenti fattori possono essere considerati potenzialmente predittivi di un esito negativo nei pazienti pediatrici:

- Ulcerazioni coloniche profonde durante l'endoscopia;
- malattia grave persistente nonostante un'adeguata terapia induttiva;
- malattia estesa;
- ritardo di crescita marcato;
- osteoporosi grave;
- malattia stenotante e penetrante (comportamento della malattia B2 e/o B3 all'inizio);
- malattia perianale grave.

La *tabella 10* elenca i predittori di esito negativo che definiscono la necessità precoce di un intervento chirurgico o il rischio di una rapida progressione del danno intestinale. Questi predittori devono essere presi in considerazione per definire la più adeguata terapia di induzione.

Tabella 10 predittori di scarso esito nella malattia di Crohn pediatrica e terapia di induzione suggerita ^[44]

Classificazione di Parigi al momento della diagnosi	Ulteriori fattori di rischio	Stratificazione del rischio	Terapia induzione suggerita
B1, infiammatorio non stenotico e non penetrante	nessuna	basso	Nutrizione enterale esclusiva; corticosteroidi
B1	Nessuna remissione clinica e biochimica 12 settimane dopo l'inizio della terapia di induzione	medio	Considera un passo accelerato verso la terapia anti-TNF
B1 +G1	Ritardo di crescita	medio	Nutrizione enterale esclusiva; Considera una terapia anti-TNF in anticipo

Classificazione di Parigi al momento della diagnosi	Ulteriori fattori di rischio	Stratificazione del rischio	Terapia induzione suggerita
B1 [L3 + L4]	Malattia estesa o ulcere del colon profonde	alto	Terapia anti-TNF diretta
B1 + p	Malattia perianale	alto	Terapia anti-TNF in anticipo in combinazione con antibiotici, interventi chirurgici o entrambi
B2	Malattia con stenosi	alto	Terapia anti-TNF diretta
B2	Dilatazione prestenotica, segni o sintomi ostruttivi, o entrambi	alto	Resezione intestinale in combinazione con terapia anti-TNF postoperatoria
B3	Malattia penetrante	alto	Chirurgia in combinazione con terapia anti-TNF post-operatoria

La terapia di induzione del CD luminale si basa sulla nutrizione enterale esclusiva, corticosteroidi e terapia anti-TNF; mentre non dovrebbe essere utilizzata la monoterapia con Tiopurine per indurre la remissione ^{[44][45]}.

L'EEN (nutrizione enterale esclusiva), secondo le linee guida ECCO-ESPGHAN del 2020, aggiornate nel 2021 ^[44], rappresenta la prima linea per la terapia di induzione della remissione nella malattia di Crohn. Prevede l'uso di una formula polimerica completa come unica fonte di nutrienti per 6-8 settimane; la scelta di questo trattamento può essere indipendente dalla localizzazione della malattia. L'EEN dovrebbe essere preferita ai corticosteroidi per ripristinare la densità minerale ossea e migliorare la crescita; tuttavia, non esistono dati certi sull'efficacia nella pancolite di Crohn grave e isolata o nelle malattie orali o perianali isolate ^[45].

Dovrebbe essere considerato un trattamento alternativo se non si ottiene una risposta clinica entro due settimane. Ad oggi non ci sono dati che supportino l'uso dell'EEN per artrite attiva, altre manifestazioni extraintestinali o malattie penetranti.

I corticosteroidi invece, sono raccomandati per indurre la remissione nei pazienti pediatrici con una forma di malattia attiva da moderata a grave, se EEN non rappresenta un'opzione terapeutica. Non dovrebbero essere usati come terapia di mantenimento.

La dose iniziale di budesonide è di 9 mg, dosi fino a 12 mg nelle prime 4 settimane; può essere ridotta entro 10–12 settimane ^{[45][44]}; un'alternativa è il prednisone.

Gli effetti collaterali sono dipendenti dalla dose e alla durata del trattamento, ma la sensibilità individuale è molto variabile. Un problema importante dell'uso di corticosteroidi in ambito pediatrico è il ritardo di crescita, motivo per cui è meglio utilizzare trattamenti che evitano o riducono la dose degli steroidi quanto più possibile.

La terapia di mantenimento invece si basa sull'utilizzo di Metotrexato (MTX), che può essere utilizzato per mantenere la remissione clinica come immunomodulatore di prima scelta, oppure dopo insufficienza o intolleranza alla Tiopurine (azatioprina o 6-mercaptopurina) ^{[44][45]}. Dopo aver ottenuto la remissione clinica, si può anche proseguire la terapia con la nutrizione enterale di mantenimento con almeno il 50% del fabbisogno energetico giornaliero.

La dose efficace di MTX è di 15 mg/m e può essere somministrato intramuscolare o sottocute una volta a settimana. Deve essere assunto, per tutto il periodo del trattamento, anche l'acido folico che permette di ridurre gli effetti collaterali. Gli eventi avversi includono nausea/vomito, sintomi influenzali, malattie epatocellulari del fegato e, molto meno frequentemente, mielosoppressione ^{[44][45]}.

Le Tiopurine da sole non sono raccomandate nella terapia di induzione poiché l'efficacia massima può richiedere da 8 a 14 settimane ^{[44][45]}. Non hanno la necessità di un aumento graduale della dose ma, nei pazienti eterozigoti nel gene della tiopurina metiltransferasi (TPMT) o con attività enzimatica intermedia, può essere necessaria una riduzione della dose. Bisogna effettuare un monitoraggio periodico che comprende un emocromo completo ed enzimi epatici, inizialmente ogni 1-2 settimane con una frequenza decrescente per tutta la durata della terapia. Nei primi mesi di trattamento potrebbe verificarsi una tossicità ematologica, nel 2-14% dei casi; un altro effetto collaterale potrebbe essere la pancreatite che tipicamente richiede la sospensione del farmaco.

Il rischio di neoplasia, in particolare del linfoma epatosplenico a cellule T, nei pazienti con IBD trattati con tiopurine è basso ma non deve essere trascurato ^{[44][45]}.

I principali farmaci biologici anti-TNF (fattore di necrosi antitumorale) sono l'Infliximab e Adalimumab. Secondo le linee guida ECCO ed ESPGHAN, sono altamente efficaci per indurre sia la remissione clinica che endoscopica. Nei pazienti di nuova insorgenza con alto rischio di un decorso complicato di malattia è raccomandata la terapia anti-TNF per indurre la remissione; mentre, per il mantenimento, è raccomandata una terapia combinata con un immunomodulatore associato.

Infatti, gli immunomodulatori, inclusi tiopurine e metotrexato, somministrati contemporaneamente ad agenti anti-TNF, riducono la probabilità di sviluppo di anticorpi anti-farmaci [ADA] ^[43]. La somministrazione endovenosa di infliximab è solitamente di 5 mg/kg con tre dosi di induzione nell'arco di 6 settimane; l'Adalimumab, invece, viene somministrato con la modalità sottocutanea. Tra gli effetti collaterali possono manifestarsi reazioni di ipersensibilità ritardate; queste possono verificarsi dopo un giorno dall'infusione e si presentano con artralgia e gonfiore articolare che possono essere associate a febbre e/o eruzione cutanea ^{[44][45]}.

Questa terapia comporta anche un rischio aumentato di infezioni opportunistiche, soprattutto nei pazienti che effettuano un trattamento in combinazione con immunomodulatori o che presentano malnutrizione; per questo motivo è obbligatorio il test per la tubercolosi prima di iniziare il trattamento, in tutti i pazienti. Nell'anamnesi bisogna anche indagare l'anamnesi vaccinale o l'immunità naturale, poiché, se sono sieronegativi, dovrebbe essere preso in considerazione l'immunizzazione contro il virus varicella zoster, tenendo, però, conto che è necessario un intervallo di 4-6 settimane prima di iniziare il trattamento immunosoppressivo ^{[44][45]}.

La terapia anti-TNF è raccomandata come terapia primaria di induzione e mantenimento nei pazienti con malattia di Crohn perianale fistulosa; in combinazione con antibiotici, e se necessario, anche ad un trattamento chirurgico ^{[44][45]}.

Gestione terapeutica della colite ulcerosa pediatrica

Nella colite ulcerosa ad insorgenza adulta la scelta del trattamento più adeguato si basa sull'entità e la gravità della malattia; nei pazienti pediatrici l'attività della malattia determina la scelta della strategia del trattamento più adeguata ^[46].

La terapia di induzione si basa sui regimi orali di 5-ASA (acido 5-aminosalicilico); questo farmaco è raccomandato come prima linea per la colite ulcerosa lieve o moderata, e a dosi più elevate nelle forme più estese e gravi. L'uso topico, invece, come monoterapia, trova una minore efficacia nei pazienti pediatrici rispetto agli adulti ^[46].

Sebbene i glucocorticosteroidi siano inizialmente efficaci nel 70–90% dei pazienti pediatrici con colite ulcerosa, la dipendenza da steroidi può essere riscontrata fino al 50% di questi, evento particolarmente negativo dato il loro effetto negativo sulla crescita ^[45].

Anche il trattamento di mantenimento vede come prima linea di terapia l'utilizzo di regimi orali di 5-ASA. L'uso associato di anti-TNF, o altri immunomodulatori, dovrebbe essere limitato a pazienti con malattia attiva o con dipendenza/refrattari agli steroidi. Questo perché la terapia combinata con tiopurine e infliximab comporta un rischio aumentato di linfoma a cellule T epatosplenico ^[46].

Un'ulteriore opzione è la colectomia, ma bisogna tenere in considerazione che comporta una riduzione della fertilità nelle femmine sottoposte a questa procedura chirurgica. In generale, l'escalation verso immunomodulatori e anti-TNF è più spesso indicata nei pazienti pediatrici rispetto ai pazienti adulti, ma comunque il tasso di colectomia rimane elevato ^[45]; infatti, bisogna bilanciare gli effetti collaterali delle terapie per un trattamento cronico e gli effetti collaterali dell'intervento chirurgico ^{[46][44][45]}. È fondamentale sottolineare l'importanza della guarigione istologica come obiettivo terapeutico oltre alla remissione clinica, poiché nella CU la persistenza di infiammazione microscopica è un forte predittore di recidiva.

2.2 MARCATORI DIAGNOSTICI E PROGNOTICI DELLE IBD PEDIATRICHE: RUOLO DELLA CALPROTECTINA SIERICA

È fondamentale analizzare l'associazione tra vari marcatori citati e il ruolo che ricoprono nella fase preclinica, diagnostica e prognostica, e il loro ruolo nel monitorare la risposta al trattamento terapeutico.

Infatti, come detto nel capitolo precedente, lo scopo è cercare di bilanciare in modo adeguato, analisi poco invasive che però siano efficaci e validate per verificare l'infiammazione e il danno mucosale nelle IBD pediatriche. L'endoscopia è il *gold standard* per fare ciò, ma è una metodica invasiva, soprattutto nei pazienti pediatrici dove necessita di anestesia generale per essere effettuata.

2.2.1 MARCATORI PRECLINICI DELLE IBD

Diversi studi hanno mostrato evidenze di marcatori sierologici correlati alla IBD nella fase preclinica nei pazienti con IBD, tra questi ci sono anche i marcatori dell'infiammazione ^[49]. I biomarcatori comunemente utilizzati nella diagnosi e nel *follow-up* per valutare l'attività di malattia delle IBD pediatriche sono: proteina C-reattiva (PCR), l'albumina sierica o plasmatica e la calprotectina fecale.

I biomarcatori dell'infiammazione intestinale hanno molte caratteristiche desiderabili; non sono invasivi e questo implica maggiore accettazione da parte dei pazienti, sono comodi e rapidi, è rapido il tempo di risposta dal test al risultato e questo accelera il processo decisionale clinico. Sono economici, riproducibili e standardizzati. L'ampia disponibilità facilita l'utilizzo ^{[50][51][52]}.

L'intensa infiammazione intestinale della IBD è accompagnata da una risposta di fase acuta evidenziabile nel siero e nel sangue. Questa risposta comporta un aumento della sintesi e del rilascio di proteine coinvolte nella coagulazione e nella fibrinolisi, proteine

di trasporto come aptoglobina e ceruloplasmina; e la proteina C-reattiva (PCR) e la ferritina. La velocità di sedimentazione degli eritrociti (VES) è una misura indiretta dell'inflammatione, poiché in questo contesto, si verifica un aumento della viscosità plasmatica per l'aumento delle proteine di fase acuta. Questo valore, però, è influenzato dall'ematocrito, dall'anemia e dalla policitemia ^[50].

La PCR ha una emivita relativamente breve di circa 19 ore, questo fa sì che sia un ottimo indicatore dell'inflammatione acuta. Gli epatociti producono PCR in risposta alle citochine proinflammatorie, principalmente IL-6, fattore di necrosi tumorale α e IL-1 β . I livelli di PCR sono tipicamente più alti nei pazienti con malattia di Crohn rispetto a quelli con colite ulcerosa ^[50].

I marcatori delle feci hanno il vantaggio di avere una maggiore specificità per i processi infiammatori localizzati nell'intestino. La calprotectina fecale è una proteina che si trova ad alte concentrazioni nei granulociti dei neutrofili. Aumenta nel plasma, urina, liquido cerebrospinale e feci durante i vari processi che causano un aumento dell'attività dei neutrofili. Ha proprietà antibatteriche, induce apoptosi, favorisce l'inflammatione e può aumentare di oltre cento volte in condizioni infiammatorie.

Ha un elevato valore predittivo negativo per l'inflammatione intestinale; questo implica che se il valore è sottosoglia si può escludere tale condizione.

È utilizzata per effettuare la diagnosi differenziale tra la sindrome dell'intestino irritabile dalla IBD e per il monitoraggio. Un aumento della calprotectina fecale può essere presente a volte mesi prima di una riacutizzazione ^{[49][51][52][43]}.

La calprotectina fecale è un marcatore sensibile per le IBD, ma anche un aumento della calprotectina sierica è stato osservato nella IBD attiva ^[49]. Lo studio *Daniel Lundgren et al.* ^[49] ha validato se un aumento della calprotectina sierica potesse essere rilevata prima dell'insorgenza clinica delle IBD; tuttavia, mostra che sia nei pazienti che successivamente hanno sviluppato la patologia, i livelli plasmatici di Sc erano uguali a quelli di controllo nella fase preclinica. Infatti, rispetto a PCR e all'albumina, la calprotectina sembra non rispondere alle malattie in fase preclinica ^[49].

2.2.2 OBIETTIVI DI TRATTAMENTO E MONITORAGGIO DELLA RISPOSTA

Il precoce trattamento con biologici e agenti immunomodulanti migliora i tassi di guarigione della mucosa e remissione clinica.

Per la remissione profonda si intende: remissione clinica, remissione dei biomarcatori e salute mentale, è un modo impattante per modificare il decorso della malattia nei pazienti con IBD ^[43].

Raggiungere una guarigione endoscopica o mucosale in risposta alla terapia di induzione è associata a risultati favorevoli a lungo termine.

La finestra terapeutica per queste patologie è molto ristretta e necessita di una adeguata valutazione e monitoraggio. Sono in fase di sviluppo punteggi infiammatori e di danno basati sull'applicazione della risonanza magnetica pediatrica (MRI), simili ai punteggi MaRIA e Lemann sviluppati per la CD adulta ^[43].

La risposta endoscopica è definita in base alla diminuzione del punteggio endoscopico semplice per la malattia di Crohn (SES-CD) o all'indice di gravità del CD (CDEIS) di almeno il 50% rispetto al punteggio iniziale. Valutare la risposta endoscopica però richiede una procedura invasiva, per cui è fondamentale valutare la risposta alla terapia anche tramite altri marcatori, tra cui la calprotectina fecale e l'imaging dell'intestino tenue (enterografia a risonanza magnetica ed ecografia intestinale).

La **calprotectina fecale**, dopo la terapia di induzione, può essere utilizzata come indicatore della risposta al trattamento; una diminuzione implica un miglioramento clinico. Non esiste una correlazione lineare tra i livelli di calprotectina fecale e la gravità o l'entità dell'infiammazione della mucosa; una diminuzione può essere considerata statisticamente significativa ma comunque indicativa di malattia attiva. Quindi, un valore alto, anche se in diminuzione, della calprotectina fecale non dovrebbe essere considerato un indicatore di una vera risposta terapeutica. Mentre una diminuzione di questo marcatore inferiore a 250 µg/g potrebbe essere considerata come un indicatore affidabile del successo del trattamento. Più il valore della calprotectina si avvicina a 50 µg/g, maggiore è la probabilità di una completa guarigione endoscopica ^[43].

D'altra parte, un aumento significativo del valore della calprotectina fecale dovrebbe comportare ulteriori indagini e la considerazione di un cambiamento della strategia terapeutica [43].

La calprotectina fecale è uno dei parametri che viene valutato nel **Mucosal Inflammation Noninvasive Index (MINI)** nei pazienti pediatrici con malattia di Crohn appena diagnosticata. Questo strumento prende in considerazione la calprotectina fecale ($\mu\text{g/g}$); il tasso di sedimentazione degli eritrociti (ESR espresso in mm/h) e la proteina C reattiva (PCR espresso in mg/l); l'ultimo parametro è l'interpretazione delle feci dove 0 punti sono indicativi di feci formate o fino a una volta al giorno di feci molle, e 8 punti rappresentano ≥ 6 feci liquide/molto molle in \geq giorno o diarrea notturna e/o qualsiasi sanguinamento grave [47][59].

Sommando il punteggio ottenuto da tutti i parametri presi in considerazione si ottiene un valore che va da un minimo di -3 ad un massimo di 25 [47].

Si correla positivamente con il punteggio SES-CD e PCDAI. Grazie alla sua non invasività e semplicità, l'indice MINI può essere considerato uno strumento intuitivo e utile per valutare l'infiammazione mucosa nei pazienti con CD pediatrico [47][59].

	Variabile	Punti
Sgabello*	0-1 feci normali o liquide, nessun sangue	0
	≤ 2 semi-formate con piccole quantità di sangue o 2-5 feci liquide	4
	Sanguinamento grossolano, o ≥ 6 feci liquide, o diarrea notturna	8
	Calprotectina fecale	
[$\mu\text{g/g}$]	< 50	-3
	50-99,9	0
	100-299,9	5
	300-599,9	7
	600-899,9	9
	≥ 900	12
ESR [mm/h] e CRP [mg/l]	ESR < 10 e CRP < 5	0
	ESR da 30 \geq 10 o 10 > CRP \geq 5	1
	ESR 50 \geq 30 o 30 > CRP \geq 10	2
	ESR \geq 50 o CRP \geq 30	5

Tabella 11 indice MINI [47]

2.2.3 RUOLO DELLA CALPROTECTINA SIERICA

La calprotectina fecale (fC) è un marker ampiamente utilizzato nel monitoraggio dei pazienti pediatrici con IBD, è sensibile e specifico dell'inflammatione intestinale. Tuttavia, la misurazione della fC è limitata dalla variazione quotidiana e dalla consistenza delle feci, che può modificarsi in modo molto evidente come manifestazione clinica di una riattivazione di questa patologia. Un altro limite di questo parametro è la bassa aderenza; infatti, gli adolescenti non sempre sono disponibili a fornire un campione fecale. Questo marcatore presenta, anche, una significativa variabilità sia nell'arco della giornata, sia tra diversi giorni. Nella colite ulcerosa attiva, la fC mostra un'elevata variabilità intra-giornaliera e non è chiaro quale sia il momento ottimale di campionamento ^{[53][52]}.

Queste caratteristiche legate alla raccolta e alla gestione del campione fecale prima dell'arrivo in laboratorio possono influenzare i livelli di fC e limitarne l'utilizzo nella pratica clinica di questo parametro, portando ad un monitoraggio subottimale.

Da qui, nasce la necessità di ricercare un biomarcatore sostitutivo non invasivo che possa aiutare il monitoraggio ogni volta che la misurazione della fC fallisca, molti studi propongono la calprotectina sierica (sC) come biomarcatore sostitutivo. La sC è stata studiata nelle IBD per prevedere la risposta e le recidive dopo terapia anti-fattore di necrosi tumorale ^{[52][53]}. Nei pazienti con malattia di Crohn, la sC mostra un profilo simile alla proteina C-reattiva ad alta sensibilità e, il suo valore, si integra con quello della calprotectina fecale e della PCR per la previsione delle recidive dopo la sospensione della terapia anti-TNF ^{[52][53]}.

I biomarcatori ematici offrono una stima non invasiva del carico infiammatorio nelle IBD di nuova diagnosi. Tuttavia, relativamente pochi biomarcatori ematici sono stati ampiamente validati nelle IBD e ancora meno sono utilizzati nella pratica clinica ^[53].

La calprotectina è una proteina appartenente alla famiglia S100 ed è principalmente presente nel citosol dei neutrofili. La famiglia delle proteine S100, inclusi S100A8/A9

(calprotectina) e S100A12 (calgranulina), ha un ruolo importante nella patogenesi della malattia ed è stata studiata come potenziale marker di infiammazione [52][53].

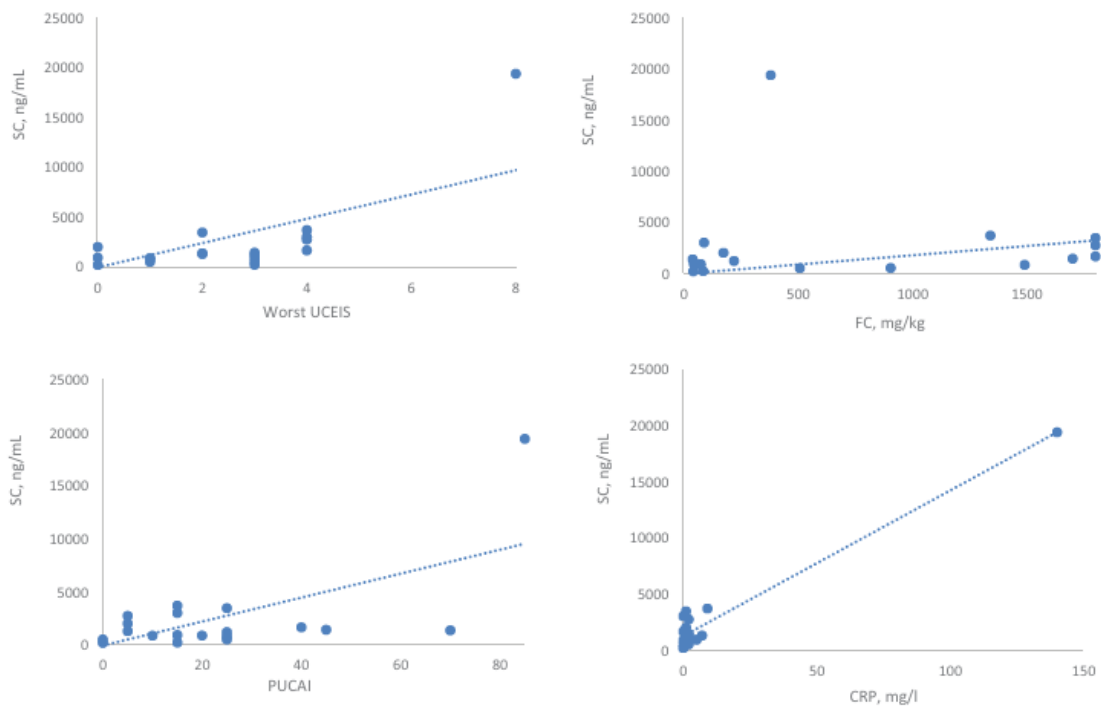
La calprotectina sierica risulta essere elevata in diverse patologie in cui la patogenesi è caratterizzata da infiammazione, come artrite e la fibrosi cistica [51].

Una differenza importante tra questi due marcatori è che la fC ha il vantaggio di evidenziare la calprotectina localizzata nel tratto intestinale; mentre la sC può riflettere in misura maggiore anche le infiammazioni presenti in altri distretti.

In letteratura ci sono diversi studi che cercano di capire il ruolo che potrebbe svolgere la calprotectina sierica nel monitoraggio e nella prevenzione delle recidive di IBD.

Secondo quanto riportato da *Carlsen et al.* [51], è stata osservata una correlazione positiva tra la calprotectina sierica e la proteina C-reattiva, entrambe infatti, riflettono l'infiammazione e possono essere considerate proteine di fase acuta. I risultati di questo studio suggeriscono che la sC possa essere un biomarcatore dell'infiammazione intestinale migliore rispetto alla fC.

Study A) Ulcerative colitis:



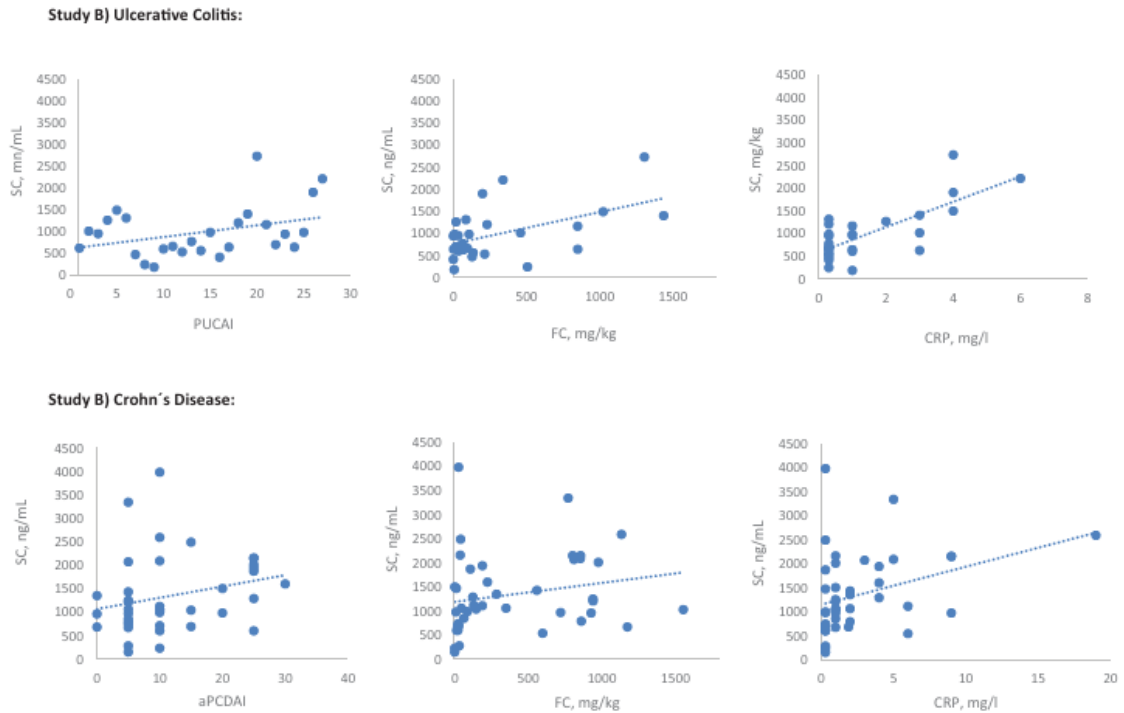


Figura 10 Grafici a dispersione tra la calprotectina sierica e i parametri di malattia (Studio A e Studio B) [51]

Questo studio pilota, effettuato su pazienti adolescenti affetti da IBD, condotto da *Carlsen et al.* [51], ha evidenziato che l'integrazione della sC nel prelievo ematico, invece della misurazione della calprotectina fecale, potrebbe migliorare l'aderenza. Poiché è stato riscontrato una correlazione tra la sC e l'infiammazione intestinale valutata endoscopicamente; questo biomarcatore sembra poter migliorare l'aderenza ed il monitoraggio negli adolescenti che non riescono a fornire campioni fecali per la determinazione della fC [51].

Lo studio condotto da *Kalla et al.* [52] ha dimostrato che la sC è biomarcatore con un elevato potere predittore indipendentemente dalla diagnosi di IBD; se correlata alla fC è utile nella fase diagnostica delle IBD e può predire l'escalation terapeutica e/o la chirurgia nelle malattie infiammatorie intestinali (IBD), in particolare nella malattia di Crohn. Riuscire ad evidenziare precocemente il decorso della patologia è molto importante, soprattutto per i pazienti che possono beneficiare di terapie più aggressive [52].

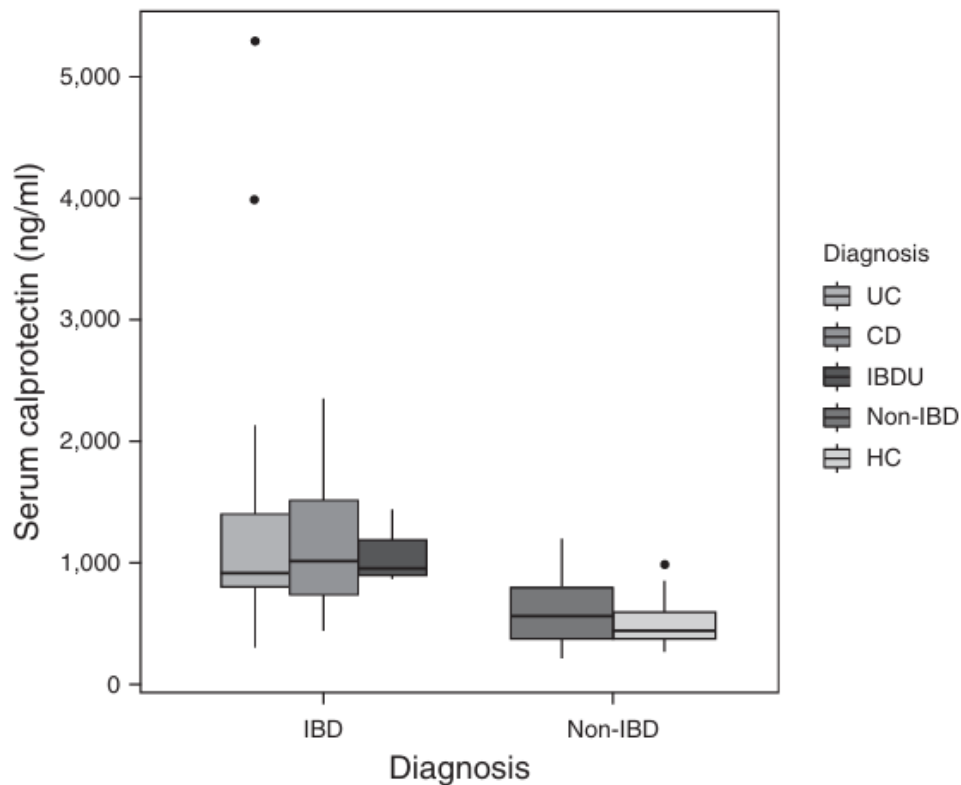


Figura 11 Livelli di calprotectina sierica nei pazienti con malattia di Crohn (CD), colite ulcerosa (UC), IBD non classificata (IBDU), controlli sintomatici (Non-IBD) e controlli sani (HC). I boxplot rappresentano mediana e intervallo interquartile della calprotectina sierica all'interno di ciascun sottogruppo.^[52]

Questo studio si è concentrato sull'indagare il ruolo della sC nei pazienti con nuova diagnosi di IBD. In più, grazie alla breve emivita della sC (5 ore), questa può fornire una misura più dinamica dello stato infiammatorio attuale rispetto ai marker infiammatori convenzionali come la PCR o l'albumina (rispettivamente con una emivita di 18 ore e 19 giorni). La calprotectina sierica ha una migliore correlazione con la conta dei neutrofili; quindi, i livelli di sC possono riflettere il rilascio della calprotectina da neutrofili attivati e da altre cellule immunitarie come monociti, macrofagi e cellule epiteliali ^[52].

La sC è stata studiata anche come marcatore prognostico in altre condizioni, come la previsione di colectomia nella colite acuta severa e la previsione di recidiva dopo sospensione dell'anti-TNF. In conclusione, lo studio definisce che un modello combinato in grado di integrare i valori di Calprotectina sierica con altri biomarcatori sia in grado di studiare accuratamente il carico infiammatorio e gli esiti clinici ^[52] ^[53].

3 OBIETTIVO

Lo scopo principale del nostro studio è quello di valutare il ruolo della calprotectina sierica come indicatore di attività di malattia nei pazienti pediatrici con IBD in relazione ad altri parametri di malattia; quindi, valutare il valore diagnostico della calprotectina sierica nelle IBD pediatriche e il suo ruolo come marcatore di severità di malattia rispetto agli altri parametri citati (score clinici, endoscopici, fC).

Obiettivo secondario è valutare le variazioni della sC in relazione al trattamento con inibitori del TNF α : valutare il valore aggiuntivo della sC come marcatore non invasivo nella valutazione della remissione durante le varie fasi del trattamento con anti-TNF α ; quindi, al termine dell'induzione, in combinazione con altri parametri (fC, score sintomatico, proteina C-reattiva, livelli di inibitori del TNF α).

Con lo scopo di predire la remissione a lungo termine (1 anno), nei pazienti in terapia con inibitori del TNF α .

4 MATERIALI E METODI

Il disegno di questo studio pilota è prospettico, monocentrico e osservazionale, no profit.

I pazienti affetti da IBD sono stati arruolati e seguiti longitudinalmente nel tempo, presso la SOD Clinica Pediatrica dell'Azienda Ospedaliera - Universitaria delle Marche (Presidio Salesi, Ancona. Sono stati raccolti parametri clinici e biochimici a time-points predefiniti dal baseline (T0) fino a 12 mesi di follow-up (T12). Tuttavia, a causa dei vincoli temporali legati alla finestra di osservazione e alla stesura del presente elaborato di tesi, l'analisi longitudinale dei dati si è focalizzata sulle risposte ottenute fino al time-point T6, escludendo dalla presente trattazione le valutazioni tardive a 12 mesi (T12), tuttora in corso di raccolta. Le analisi di laboratorio sono state svolte presso la SOD Medicina di Laboratorio.

Il protocollo ha previsto un disegno puramente osservazionale: durante il periodo di studio non è stato effettuato alcun intervento attivo sui regimi terapeutici, e i farmaci biologici (anti-TNF α) sono stati somministrati secondo la normale pratica clinica e le linee guida vigenti.

I vari time-points che vengono valutati sono:

- T0: avvio della terapia.
- T1: al termine dell'induzione che corrisponde a prima della quarta dose di Infliximab e prima della terza di Adalimumab.
- T6: a 6 mesi dall'avvio.
- T12: a 12 mesi dall'avvio.

Per ogni time-points viene valutato contemporaneamente al valore di calprotectina sierica i livelli dell'inibitore del TNF α utilizzato per la terapia (Infliximab o Adalimumab), i dati clinici, score di malattia (PARIS, UCEIS, SES-CD, PAUCAI, PCDAI e MINI-INDEX),

fC e proteina C-reattiva. Con lo scopo di definire il valore come parametro predittivo di remissione a lungo termine nei pazienti pediatrici in terapia con anti-TNF α .

Per fare ciò, abbiamo confrontato un campione di sangue e feci di bambini e ragazzi che affetti da IBD con il campione di sangue e feci di bambini e ragazzi che non soffrono di queste patologie.

La raccolta dei campioni biologici e dei dati clinici ha avuto inizio previa approvazione del Comitato Etico di riferimento ed è stata condotta nel pieno rispetto del D.Lgs. 30 giugno 2003, n. 196 ("Codice in materia di protezione dei dati personali").

4.1 POPOLAZIONE IN STUDIO E CRITERI DI SELEZIONE

La popolazione oggetto di studio è costituita da soggetti in età pediatrica (< 18 anni) pazienti alla SOD Clinica Pediatrica dell'AOU delle Marche. Per rispondere ai diversi quesiti clinici della ricerca, la popolazione in studio è stata suddivisa in due coorti distinte: un gruppo di studio composto da pazienti affetti da Malattia Infiammatoria Cronica Intestinale (IBD) e un gruppo controllo composto da soggetti sani.

4.1.1 PAZIENTI AFFETTI DA IBD

Il gruppo di studio comprende 15 pazienti pediatrici con diagnosi nota o sospetta di IBD, stratificati in due coorti metodologiche in base agli obiettivi specifici:

- A. Coorte di pazienti IBD sottoposti ad endoscopia: In questo gruppo di pazienti sono presenti soggetti pediatrici affetti da IBD sottoposti a valutazione endoscopica alla diagnosi e al follow up per la valutazione del valore diagnostico della calprotectina sierica nelle IBD pediatriche.
- B. Coorte di pazienti IBD in cui viene avviata terapia con antiTNFalfa ed effettuate valutazioni longitudinali: Sono presenti soggetti pediatrici affetti da IBD in cui

vengono avviati farmaci inibitori del TNF α per la valutazione della calprotectina sierica come marcatore di severità di malattia rispetto agli altri parametri (score clinici, endoscopici e valori di calprotectina fecale).

4.1.2 GRUPPO CONTROLLO

Il gruppo controllo è composto da 15 soggetti sani *matchati* per sesso ed età con l'obiettivo di valutare il valore diagnostico della calprotectina sierica nelle IBD pediatriche. Sono pazienti che afferiscono all'ambulatorio della Clinica Pediatrica per altre patologie non inerenti alle malattie gastrointestinali croniche e che non presentano sintomi gastrointestinali come diarrea o dolore addominale.

4.1.3 CRITERI DI ESCLUSIONE

- Utilizzo recente di FANS: Soggetti che hanno utilizzato farmaci antiinfiammatori non steroidei con una frequenza superiore a due volte alla settimana nei tre mesi precedenti all'esecuzione dell'esame endoscopico. I FANS possono causare un'enteropatia iatrogena con conseguente rialzo della calprotectina.
- Incompletezza dell'esame endoscopico: Soggetti nei quali non è stato possibile completare la colonscopia fino all'esplorazione dell'ileo terminale. Questa è una condizione necessaria per una corretta e completa stadiazione e applicazione degli score endoscopici utilizzati.
- Infezioni gastrointestinali concomitanti: pazienti con coltura delle feci positiva per la ricerca di batteri patogeni intestinali. In questi casi l'infiammazione mucosale potrebbe essere dovuta all'evento infettivo acuto sovrapposto.
- Altre comorbidità immunomediate: Evidenza di altre malattie autoimmuni in fase attiva clinica. Queste condizioni potrebbero indurre un incremento sistemico della calprotectina sierica non collegato all'attività della patologia intestinale.

4.1.4 DIMENSIONE CAMPIONARIA

La dimensione campionaria è stata calcolata sull'obiettivo primario, quindi con lo scopo di valutare il valore diagnostico della calprotectina sierica nelle IBD pediatriche.

Basandosi su dati di letteratura scientifica consolidati ^[52], che indicano una differenza attesa nei livelli di sC pari a 500 ng/ml tra pazienti IBD e pazienti sani, con l'obiettivo di raggiungere un potere statistico del 90% e un intervallo di confidenza del 95% e considerando un tasso di abbandono del 10%, la numerosità campionaria è pari a 30 pazienti (15 IBD e 15 controlli).

Per la valutazione della calprotectina sierica come marcatore di severità di malattia rispetto agli altri parametri considerati, e quindi, la sua valutazione prognostica longitudinale, è stato programmato l'arruolamento dei pazienti candidati all'avvio di terapia anti-TNF α (tasso stimato di circa 10/anno) valutati su un follow up complessivo di 12 mesi.

4.2 ANALISI DI LABORATORIO E SCORE CLINICI CONSIDERATI

La raccolta dei parametri clinici, biochimici ed endoscopici è stata strutturata secondo due percorsi metodologici creando così due diversi database: uno per l'analisi statistica caso-controllo e un altro per l'analisi statistica longitudinale.

In tutti i pazienti pediatriche con IBD sospetta o nota, sottoposti ad endoscopia, sono stati raccolti:

- i dati clinici;
- score di malattia (classificazione di PARIS, PUCAI, PCDAI, MINI Index continuo e categorico);
- i dati endoscopici (valutazione endoscopica, UCEIS, SES-CD), sC (mg/L) e fC (mg/kg), PCR (mg/dl), VES (mm/h).

Lo score endoscopico, assieme agli altri indicatori di malattia, hanno confermato la diagnosi di IBD; abbiamo poi classificato i pazienti come affetti da CD o UC o IBD-U.

Nel gruppo controllo di pazienti pediatriche sono stati analizzati segnali biochimici di infiammazione sistemica o intestinale (fC e PCR) valutati nei limiti di norma; in aggiunta a questi valori è stata dosata la calprotectina sierica.

Per il monitoraggio longitudinale della coorte in terapia con Infliximab sono stati raccolti e valutati prospettivamente i seguenti dati a time-point standardizzati nell'arco di 12 mesi:

- **T0 (avvio):** dati clinici, score di malattia (PARIS, PUCAI, PCDAI, MINI Index continuo e categorico), dati endoscopici (valutazione endoscopica, UCEIS, SES-CD), fC (mg/kg), sC (mg/L), PCR (mg/dl), VES (mm/h).
- **T1** (termine induzione, ovvero prima della IV dose di Infliximab e prima della III di Adalimumab): dati clinici, score di malattia (PARIS, PUCAI, PCDAI, MINI Index continuo e categorico), dati endoscopici (valutazione endoscopica, UCEIS, SES-CD), fC (mg/kg), sC (mg/L), PCR (mg/dl), VES (mm/h)., livelli inibitori del TNF α (Infliximab o Adalimumab).
- **T6** (6 mesi dall'avvio): dati clinici, score di malattia (PARIS, PUCAI, PCDAI, MINI Index continuo e categorico), dati endoscopici (valutazione endoscopica, UCEIS, SES-CD), fC (mg/kg), sC (mg/L), PCR (mg/dl), VES (mm/h), livelli inibitori del TNF α (Infliximab o Adalimumab).
- **T12** (12 mesi dall'avvio): dati clinici, score di malattia (PARIS, PUCAI, PCDAI, MINI Index continuo e categorico), dati endoscopici (valutazione endoscopica, UCEIS, SES-CD), fC (mg/kg), sC (mg/L), PCR (mg/dl), VES (mm/h)., livelli inibitori del TNF α (Infliximab o Adalimumab).

4.2.1 PARAMETRI DI LABORATORIO E DOSAGGI

- La calprotectina fecale è stata dosata con ELISA Calprest (Eurospital) secondo istruzioni del produttore.
- I livelli del farmaco inibitore del TNF α sono stati misurati con il test N Latex aTNF α integrato con il sistema Sistema BN II (Siemens) secondo istruzioni del produttore.

- I livelli di sC sono stati misurati con il GCAL[®] NEPH integrato con Sistema BN II (Siemens) utilizzato per la misurazione dei livelli di farmaco senza la necessità di utilizzare una piattaforma di test dedicata e con conseguente risparmio biologico.

I prelievi ematici e la raccolta delle feci sono stati eseguiti nell'ambito della normale routine clinica. In aggiunta agli esami normalmente eseguiti per la diagnosi e il follow-up dei pz con IBD, è stata prelevata una provetta per la calprotectina sierica; mentre il dosaggio dei farmaci anti-TNF α eseguito in maniera proattiva rientra già nella pratica clinica attuale.

Il processamento e l'analisi delle aliquote sono stati coordinati dalla SOD Medicina di Laboratorio dell'AOU delle Marche (Direttore: Dott. Marco Moretti). I campioni ematici, previa centrifugazione e separazione del siero, sono stati analizzati, in tempo reale, con nefelometro Sistema BN II (attualmente in uso nella pratica clinica) assieme al kit per il dosaggio della calprotectina sierica e successivamente conservati a -20°C per la durata dello studio.

4.2.2 SCORE CLINICI ED ENDOSCOPICI

Con lo scopo di standardizzare la valutazione dello stato di malattia, quantificare la gravità del quadro infiammatorio e monitorare in modo proattivo la risposta terapeutica nei diversi time-points dello studio (T0, T1, T6, T12), sono stati applicati, e di conseguenza inseriti nel database, score clinici ed endoscopici validati a livello internazionale, affiancati dal monitoraggio biochimico della flogosi intestinale. Ogni parametro e score è stato inserito all'interno di un database che valuta anche la remissione clinica, laboratoristica ed endoscopica.

I target terapeutici sono stati codificati nel database statistico anche in forma di variabili dicotomiche, dove il valore 1 indica la presenza di remissione e il valore 0 indica l'assenza di remissione.

Attività e remissione clinica:

È stata valutato e quantificato l'andamento e l'impatto clinico della patologia in base alla specifica forma di IBD:

- Colite Ulcerosa (UC): è stato utilizzato il *Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index* (PUCAI) ^{[37][42][41]}, uno score basato su 6 item clinici (presenza di dolore addominale, rettoragia, consistenza delle feci, numero di scariche nelle 24 ore, scariche notturne e limitazione delle attività quotidiane). Il punteggio globale varia da 0 a 85 punti. Lo stato di **remissione clinica** è stato definito in modo univoco da un punteggio di **PUCAI < 10**. Punteggi superiori indicano una malattia in fase attiva, classificata come lieve (10–34), moderata (35–64) o grave (>64) ^[58].
- Malattia di Crohn (CD): È stato utilizzato l'*abbreviated Pediatric Crohn's Disease Activity Index* (**aPCDAI**) ^{[39][41]}, una versione validata e focalizzata che valuta l'attività sintomatologica (dolore addominale, consistenza e frequenza delle feci, benessere generale) e l'esame obiettivo (massa addominale, complicanze perianali e manifestazioni extraintestinali). Lo score varia da 0 a 60 punti. La **remissione clinica** è stata identificata da un valore di **aPCDAI < 10**. Valori superiori indicano una fase di attività lieve (10–15), moderata (16–25) o grave (>25) ^[40].

Per la malattia di Crohn è stato valutato anche il MINI INDEX ^{[59][47]}. Questo score è stato valutato in modo continuo e in modo categorico.

- Variabile continua: è stato inserito nel database il valore assoluto sommando i punti ottenuti analizzando la consistenza e la frequenza delle feci (punteggio da 0 a 8), il valore di calprotectina fecale in $\mu\text{g/g}$ (con un punteggio da -3 a 12), e il valore di VES (mm/h) /PCR (mg/L) (con un punteggio da 0 a 5) per uno score totale tra -3 a 25.

- Variabile categorica: è stato attribuito il valore di 1 per un punteggio inferiore a 8; un valore di 2 per un punteggio tra 8 e 11; e un valore di 3 per un punteggio maggiore di 11.

Remissione laboratoristica:

Per valutare la remissione laboratoristica sono stati presi in considerazione i biomarcatori di flogosi intestinale. Nel presente protocollo, coerentemente con le linee guida e le raccomandazioni internazionali per i *treatment targets* nelle IBD pediatriche, la **remissione laboratoristica** è stata stabilita al raggiungimento di un valore di **Calprotectina fecale < 250 mg/kg** ^{[43][28][27]}.

Severità e remissione endoscopica:

La valutazione diretta dello stato della mucosa intestinale rappresenta il *gold standard* diagnostico e prognostico. Le procedure endoscopiche eseguite alla diagnosi e durante le rivalutazioni cliniche previste dal follow-up hanno permesso di calcolare i seguenti indici di severità mucosale:

- Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity (UCEIS) ^{[54][55]}: Utilizzato per la colite ulcerosa, valuta tre precise macro-aree endoscopiche nel segmento intestinale maggiormente colpito. Lo score varia da 0 a 8. Ai fini dello studio, il target di **remissione endoscopica** è stato definito da un punteggio **UCEIS compreso tra 0 e 1**; indicativo di mucosa normale o con minima distorsione vascolare senza ulcerazioni attive.
- Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease (SES-CD) ^{[56][57][37]}: Applicato per la malattia di Crohn, esplora 5 segmenti ileo-colici valutando quattro parametri: estensione delle ulcerazioni, estensione della superficie ulcerata, estensione della superficie affetta da altre lesioni e presenza di stenosi. La **remissione endoscopica** è stata identificata con valori dello score **SES-CD complessivo compreso tra 0 e 2**.

4.3 METODI STATISTICI

L'analisi statistica è stata eseguita con il software JASP (Version 0.18.3). La normalità delle distribuzioni è stata preliminarmente verificata mediante il Test di Shapiro-Wilk.

- **Analisi Descrittiva:** Le variabili continue a distribuzione normale sono state espresse come media \pm deviazione standard (DS), mentre quelle a distribuzione non normale come mediana e intervallo interquartile (IQR) o quartili (Q_1 – Q_3). Le variabili qualitative sono state espresse come frequenze assolute (n) e percentuali (%).
- **Confronto Caso vs Controllo:** Per confrontare le variabili continue tra il gruppo dei casi e dei controlli è stato utilizzato il test t di Student (per dati normali) o il test U di Mann-Whitney (per dati non parametrici). La dimensione dell'effetto (*effect size*) è stata valutata rispettivamente tramite il *d* di Cohen o la correlazione biseriale del rango. Le variabili qualitative sono state analizzate con il test Chi-quadrato o il Test Esatto di Fisher.
- **Analisi Longitudinale (T_0 , T_1 , T_6):** Per valutare le variazioni della calprotectina sierica (sC) nel tempo, l'ANOVA a misure ripetute è stata preferita come test di riferimento rispetto al test non parametrico di Friedman, data la dimostrata normalità dei residui al test di Shapiro-Wilk che permette di ovviare alla perdita di potenza dei test non parametrici sui piccoli campioni. I confronti a coppie sono stati eseguiti con il *Paired t-test* e il test di *Conover*, applicando la correzione di Holm per i confronti multipli.
- **Correlazioni e Modelli Predittivi:** Le associazioni tra la sC, gli indici di flogosi (fC, PCR, VES) e i punteggi clinico-endoscopici (PCDAI, SES-CD, ecc.) sono state valutate con il coefficiente di Spearman (ρ). La capacità diagnostica della sC è stata analizzata tramite la curva ROC (Receiver Operating Characteristic), calcolando l'Area Sotto la Curva (AUC) e identificando il *cut-off* ottimale tramite l'indice di Youden. Infine, è stato applicato un modello di regressione logistica binomiale (grezzo e aggiustato per l'età) per stimare l'Odds Ratio (OR) di malattia.

Per tutti i test eseguiti, la significatività statistica è stata fissata per valori di $p < 0.05$.

5 RISULTATI

5.1 ANALISI CASO – CONTROLLO

5.1.1 CARATTERISTICHE DEI PAZIENTI ARRUOLATI NELLO STUDIO

Lo studio ha incluso una casistica complessiva di 30 soggetti in età pediatrica, equamente suddivisi tra il gruppo dei Casi (n=15 affetti da malattie infiammatorie croniche intestinali) e il gruppo dei Controlli (n=15 soggetti sani). I due gruppi mostrano una differenza statisticamente significativa in termini di età media (12.1 ± 3.8 anni nei casi e 6.1 ± 4.1 anni nei controlli); Non è stata invece riscontrata una differenza epidemiologicamente significativa nella distribuzione del sesso.

Tabella 12 Caratteristiche demografiche e biochimiche basali dei Casi e dei Controlli.

VARIABILE	CASI	CONTROLLI
Età (anni) → media ± DS	12.2 ± 3.6	6.0 ± 4.0
Genere (Maschi), n (%)	8 (53,3%)	7 (46.7%)
sC (mg/L), mediana	2.00 mg/L (Q1-Q3: 1.04–3.20)	0.75 mg/L (Q1-Q3: 0.54–1.03)
fC (mg/kg), mediana	500 mg/kg (Q1- Q3: 96.5-500)	21 mg/kg (Q1-Q3: 15–24.5)
PCR (mg/dL), mediana	0.39 mg/dL (Q1- Q3: 0.33-1.045)	0.20 mg/dL (Q1- Q3: 0.103–0.305)
VES (mm/h), mediana	28 mm/h (Q1-Q3: 10.5-39)	10 mm/h (Q1-Q3: 5.75–12)

Nota: sC = Calprotectina sierica; fC = Calprotectina fecale; PCR = Proteina C Reattiva; VES = Velocità di Eritrosedimentazione; DS = Deviazione Standard; IQR = Range Interquartile.

Correlazioni nella coorte complessiva:

Tra le varie correlazioni calcolate nella coorte complessiva e riportate nella tabella 14, sono risultate statisticamente significative le correlazioni tra la calprotectina sierica (sC) e la calprotectina fecale (fC) e la proteina C reattiva (PCR).

Tabella 13 correlazioni nella coorte complessiva

correlazione	rho	p
sC-età	0.336	0.069
sC-VES	0.359	0.110
sC-fC	0.444	0.039 (n=22)
sC-PCR	0.386	0.039 (n=22)

5.1.2 ANALISI DESCRITTIVA DELLA CALPROTECTINA SIERICA

L'obiettivo primario dell'analisi comparativa è stato quello di valutare l'esistenza di una differenza statisticamente rilevante nei livelli di calprotectina sierica (sC) tra la popolazione dei pazienti affetti da IBD pediatriche e i soggetti sani.

I risultati documentano un incremento clinicamente rilevante dei livelli circolanti di sC nei bambini con IBD.

Nel dettaglio, il gruppo dei Casi ha registrato un valore mediano di sC pari a 2.00 mg/L (Q1-Q3: 1.04–3.20). Al contrario, nel gruppo dei Controlli sano la concentrazione plasmatica del biomarcatore è risulta decisamente inferiore e più omogenea con una mediana di 0.75 mg/L (Q1-Q3: 0.54–1.03).

Il test Mann-Whitney ha confermato la significatività statistica $p < 0.001$.

Per quantificare l'ampiezza di questa osservazione, indipendente dalla numerosità campionaria, è stata calcolata la Rank-biserial correlation (effect size): $r = 0.698$. Nella metrica statistica, un effect size superiore a 0.50 viene classificato come "forte/ampio" (large effect size).

I *boxplot* (figura 12) rappresentano graficamente test non parametrici come il Mann-Whitney. Mostra visivamente la mediana, i quartili e la dispersione dei dati dei due gruppi, rendendo visibile la separazione dei valori tra casi e controlli.

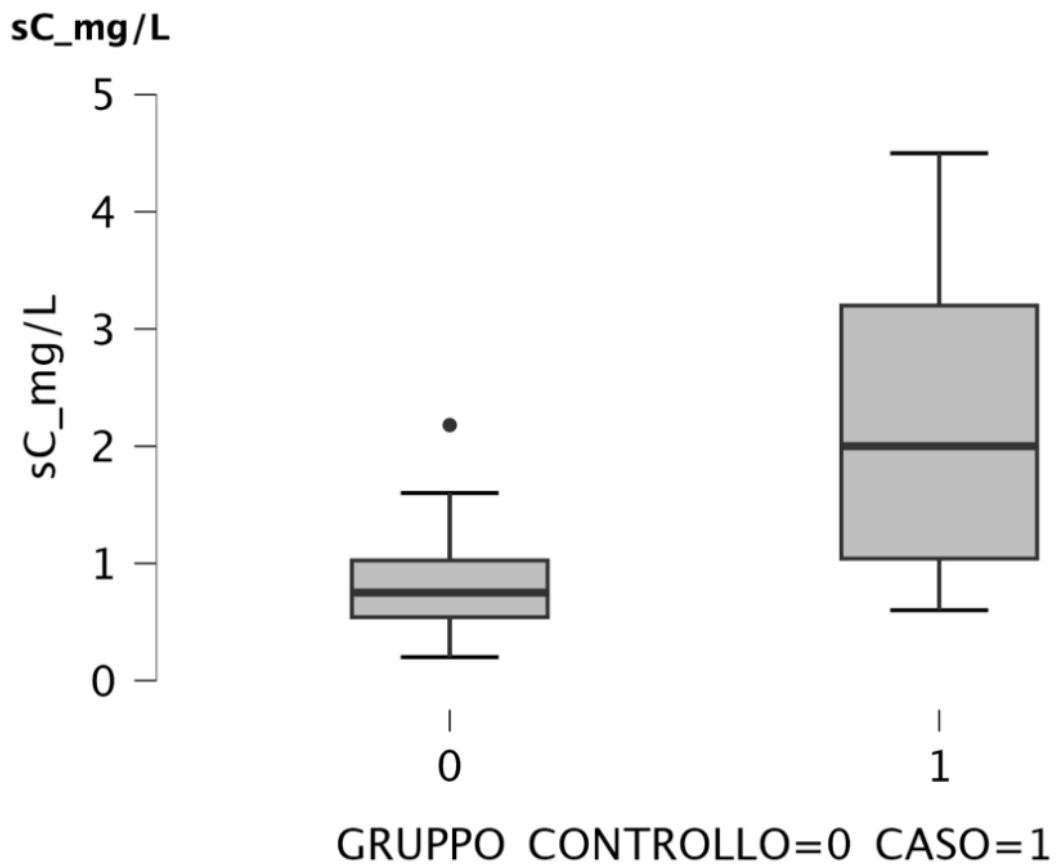


Figura 12 Boxplot sC caso-controllo:

5.1.3 ANALISI DELLA CURVA ROC

Per determinare il potere discriminante intrinseco della Calprotectina sierica (sC), ovvero la sua capacità di distinguere accuratamente i soggetti affetti da IBD (Casi) dai soggetti sani (Controlli), è stata condotta un'analisi basata sulla curva ROC (Receiver Operating Characteristic).

La curva ROC viene costruita tracciando la Sensibilità (frazione di veri positivi) in funzione della Complementare della Specificità per ogni possibile valore soglia del biomarcatore.

Parametro fondamentale per quantificare l'accuratezza globale del test è rappresentato dall'Area Sotto la Curva (AUC) che in questo caso ha il valore di 0.849 (IC95%: AUC 0.688–0.962).

Questa netta separazione delle due popolazioni è apprezzabile visivamente dall'andamento della curva, che cresce rapidamente verso l'angolo superiore sinistro del grafico (figura 13). La linea diagonale tratteggiata rappresenta la linea di referenza (accuratezza nulla, $AUC = 0.5$), rispetto alla quale la curva del biomarcatore mostra una netta e significativa deviazione verso l'alto a sinistra, corrispondente al punto di cut-off ottimale di 1.3 mg/L.

L'utilizzo di questo specifico cut-off garantisce un bilanciamento perfetto tra le proprietà intrinseche del test offrendo contemporaneamente una sensibilità $SE = 66.7\%$ (IC95%: SE 38.4–88.2%), e una specificità $SP = 86.7\%$ (SP 59.5–98.3%).

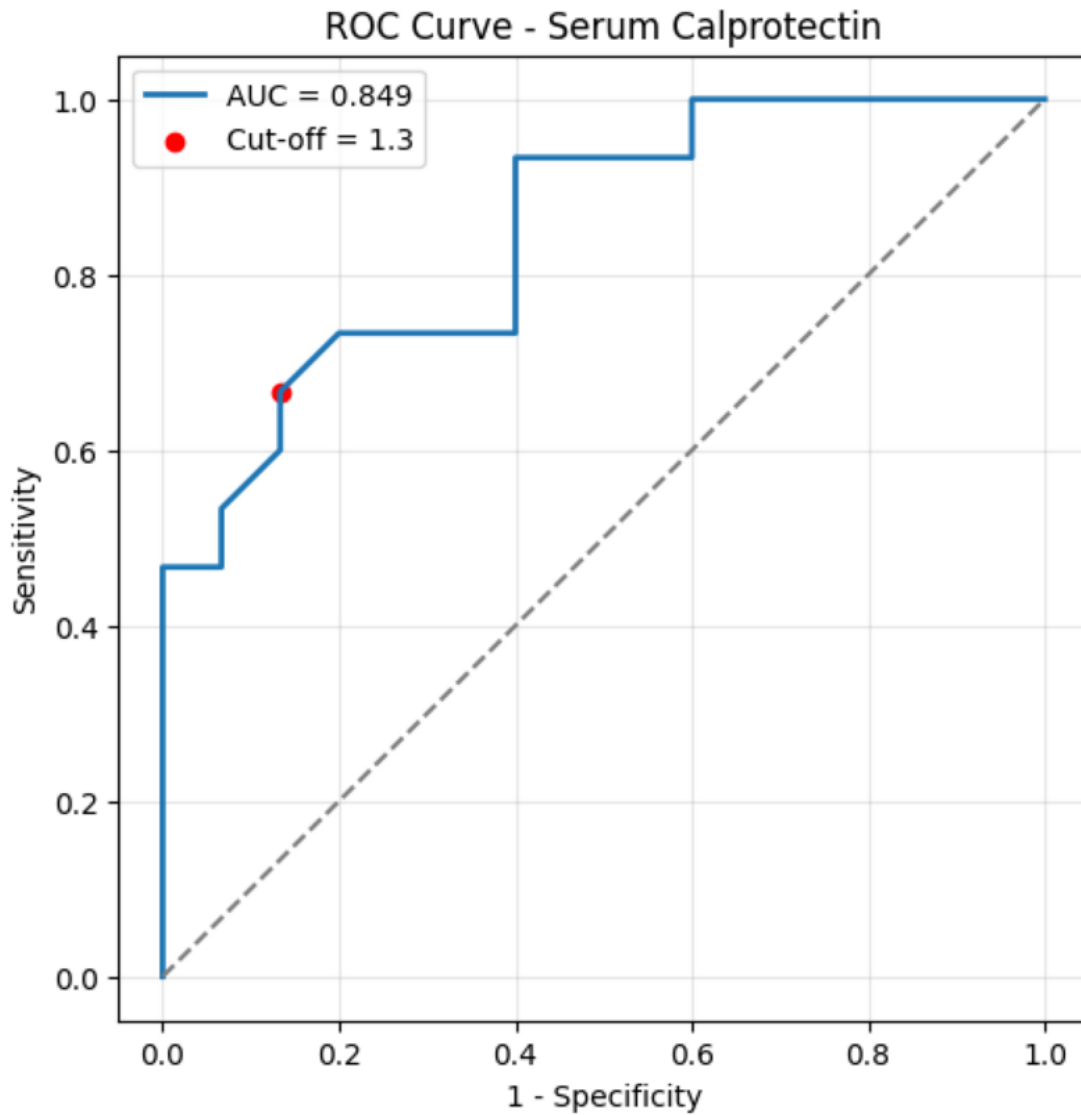


Figura 13 Curva ROC (Receiver Operating Characteristic) per i livelli basali di Calprotectina sierica (sC). AUC = 0.875; $p < 0.001$.

Regressione logistica multivariata

Dato che il campionamento iniziale presentava una discrepanza anagrafica significativa tra i due gruppi (età media maggiore nei casi), si è reso indispensabile verificare se il potere predittivo della sC risentisse di un bias anagrafico o se, al contrario, riflettesse un'autentica associazione biologica con lo stato di flogosi intestinale.

A tale scopo, è stato strutturato un modello di regressione logistica binomiale multivariata, impostando lo stato di salute (Caso vs Controllo) come variabile di outcome dicotomica e introducendo l'età attuale dei soggetti come co-variabile di aggiustamento.

I risultati del modello predittivo hanno confermato che il legame tra la concentrazione ematica di sC e la presenza di patologia infiammatoria cronica intestinale permane statisticamente solido e indipendente dall'effetto confondente dell'età. Per il biomarcatore sierico è stato infatti isolato un coefficiente di regressione positivo e significativo ($\beta = 2.194$, OR = 9.32, intervallo di confidenza IC 95% 1.05–82.81, $p = 0.045$); per l'età invece si è calcolato un OR = 1.77 (IC95% 1.08–2.89), $p = 0.023$.

Dal punto di vista clinico, questo dato indica che, a parità di età, ogni incremento unitario (1mg/L) nei livelli di sC si associa a una probabilità di circa nove volte superiore che il soggetto appartenga al gruppo dei pazienti affetti da IBD.

5.1.4 ANALISI DI CORRELAZIONE TRA SCAL E VARIABILI CLINICHE E LABORATORISTICHE

Analisi popolazione dei casi:

Tabella 14 analisi popolazione dei casi

VARIABILE	PAZIENTI CON IBD
Età (anni) → media ± DS	12.2 ± 3.6
Sesso (Maschi), n (%)	8 (53,3%)
Sesso (Femmine) n (%)	7 (46.7%)
Diagnosi	MC: 7 (46.7%), RCU: 8 (53.3%)
EIM presenti	3/15 (20.0%)
Remissione laboratoristica presente	5/15 (33.3%)
Remissione endoscopica presente	1/15 (6.7%)
Remissione clinica presente	4/15 (26.7%)

Analisi descrittiva variabili continue:

Questi valori descrivono la coorte dei casi al momento della partenza dello studio. La coorte è composta da preadolescenti e adolescenti. La mediana del tempo della diagnosi è di un anno e rappresenta una variabilità.

Tabella 15 analisi descrittiva variabili continue dei casi

PARAMETRI	MEDIANE	IQR	rho	<i>p</i>
Tempo dalla diagnosi (anni)	1 anno	Q1-Q3: 1-2 anni	0.266	0.338
Tempo dalla diagnosi (giorni)	57 giorni	Q1-Q3: 5.5-353.5 giorni; n=14	0.008	0.0977
Calprotectina sierica (sC)	2.00 mg/L	IQR 1.04-3.20		
Calprotectina fecale (fC)	500 mg/kg	IQR 96.5-500	0.254	0.360
Proteina C Reattiva (PCR)	0.39 mg/dL	IQR 0.33-1.045	0.239	0.390
Velocità di Eritrosedimentazione (VES)	28 mm/h	IQR 10.5-39	0.140	0.620

Come mostrato dalla tabella 15, il profilo laboratoristico ha confermato lo stato di attività di malattia e di severa flogosi attiva nella popolazione della coorte.

Correlazioni della sC con le variabili cliniche, laboratoristiche ed endoscopiche nell'analisi dei casi:

Lo studio delle relazioni mediante il coefficiente di Spearman (ρ) ha preso in esame l'associazione tra la sC e i restanti indici clinico-laboratoristici ed endoscopici. L'analisi ha isolato un'unica correlazione statisticamente significativa e biologicamente rilevante, ovvero quella positiva con l'indice di attività clinica specifico per la Malattia di Crohn, il PCDAI ($\rho = 0.775$, $p = 0.041$). Tale legame lineare dimostra come i livelli di calprotectina nel sangue siano uniformati alla gravità dei sintomi avvertiti dal paziente.

Al contrario, come risultano dalla tabella 15 e 16, non sono emerse associazioni statisticamente significative tra la sC e la durata della malattia, né con altri indici di laboratorio. La sC risulta indipendente anche dal MINI index e dagli score di attività clinica ed endoscopica; tra cui UCEIS, SES-CD e PUCAI.

Tabella 16 correlazioni sC

PARAMETRI	ρ	p
UCEIS	-0.421	0.289
SES-CD	0.573	0.179
MINI index	-0.009	0.984
PUCAI	0.667	0.102
PCDAI	0.775	0.41

Confronti sC tra MC e CU:

Infine, come riportato nella tabella 17, l'applicazione del test non parametrico U di Mann-Whitney ha valutato l'impatto dei diversi fenotipi clinici e degli stati di attività sulla concentrazione basale del biomarcatore sierico. Dai dati emersi, la Calprotectina sierica non ha mostrato variazioni statisticamente significative in base al tipo di patologia o alla presenza di complicanze sistemiche, confermandosi come un indicatore puro di flogosi della mucosa intestinale.

Da questi dati emerge che la calprotectina sierica non risente del tipo di patologia (MC o CU) o delle manifestazioni extra intestinali

Tabella 17 confronti sc MC e CU

PARAMETRI	Mann-Whitney:	MC	CU
Diagnosi	p=0.862	sC 1.6 mg/L (Q1-Q3 1.1-3.2)	sC 2.2 mg/L (Q1-Q3 1.07-2.85)
PARAMETRI	Mann-Whitney:	PRESENZA	ASSENZA
Manifestazioni extra intestinali EIM	p=1.000	sC: 2.5 mg/L (Q1-Q3 1.55-3.0)	sC: 1.8 mg/L (Q1-Q3 1.07-3.05)
Remissione clinica	p=0.647	sC: 1.65 mg/L (Q1-Q3 1.2-2.225)	sC: 2.4 mg/L (Q1-Q3 1.04-3.5)
Remissione laboratoristica	p=0.806	sC: 2.0 mg/L (Q1-Q3 0.98-2.5)	sC: 2.0 mg/L (Q1-Q3 1.15-3.35)
Remissione endoscopica (1 paziente in remissione endoscopica).	p=N/a	sC: 0.9 mg/L	sC: 2.2 mg/L (Q1-Q3 1.15-3.35)

5.2 ANALISI LONGITUDINALE

5.2.1 CARATTERISTICHE DEI PAZIENTI ARRUOLATI NELLO STUDIO

Per l'analisi cinetica e longitudinale del biomarcatore, è stato selezionato un sottogruppo omogeneo di 6 pazienti pediatrici che presentavano un monitoraggio seriale completo dal tempo T₀ (coincidente con l'avvio della terapia biologica con Infliximab) fino a T₁ (fine della fase di induzione) e T₆ (sei mesi dall'inizio del trattamento).

Le caratteristiche demografiche e il profilo clinico-terapeutico basale di questa sottocoorte sono rappresentate nella Tabella 14.

Tabella 18 descrizione popolazione T₀

CARATTERISTICHE DELLA POPOLAZIONE T₀	VALORE
Genere n (%)	4 maschi (66.7%) 2 femmine (33.3%)
Diagnosi	4 MC (66.7%), 2 RCU (33.3%)
Età attuale	mediana 12 anni, IQR 4.75
Tempo dalla diagnosi	mediana 177 giorni, IQR 314 giorni
Dose IFX	mediana 5 mg/kg
Remissione clinica	1/6 (16.7%)
Remissione laboratoristica	1/6 (16.7%)
Remissione endoscopica	0/6 (0%)
EIM	0/6 (0%)

5.2.2 ANDAMENTO DELLA CALPROTECTINA SIERICA NEI PAZIENTI IN TERAPIA CON INFLIXIMAB

L'andamento dei livelli di sC nel tempo è stato valutato longitudinalmente nel sottogruppo di pazienti affetti da IBD pediatriche sottoposti a terapia biologica con Infliximab (IFX) che presentava la completa disponibilità dei campioni seriali nei tre tempi stabiliti dallo studio: al tempo T0 di inizio della terapia (n=6), al tempo T1 di fine della fase di induzione della terapia (n=5) e al tempo T6, a sei mesi dall'avvio terapeutico (n=5).

L'analisi descrittiva mostra una netta contrazione dei valori mediani:

- al T0 la mediana della calprotectina sierica è alta, 3.200 mg/L;
- al T1, alla fine della fase di induzione con Infliximab, la mediana diminuisce a 0.700 mg/dl;
- Al T6, nella fase di mantenimento della terapia, la mediana della calprotectina sierica si stabilizza a 1.020 mg/L.

	sC_mg/L_T0	sC_mg/L_T1	sC_mg/L_T6
Valid	6	5	5
Missing	0	1	1
Median	3.200	0.700	1.020
Mean	2.917	0.874	1.240
Std. Deviation	0.952	0.308	0.719
IQR	0.975	0.430	0.560
Shapiro-Wilk	0.913	0.853	0.823
P-value of Shapiro-Wilk	0.457	0.205	0.124
Minimum	1.300	0.600	0.690
Maximum	3.900	1.300	2.450
25th percentile	2.525	0.670	0.740
50th percentile	3.200	0.700	1.020
75th percentile	3.500	1.100	1.300

Figura 14 Descriptive Statistics

5.2.3 ANALISI LONGITUDINALE ANOVA

L'analisi della varianza per misure ripetute (ANOVA) ha evidenziato una modifica complessiva dei livelli di sC altamente significativa nel corso del follow-up ($p=0.012$).

Il test post-hoc per confronti multipli (Paired t-test) hanno evidenziato i seguenti dati:

Si registra una significativa riduzione della sC tra T0 e T1 ($t=3.705$; $p=0.021$),

Il decremento osservato tra T0 e T6 non evidenzia una differenza significativa ($t=2.602$; $p=0.060$),

Non emerge una variazione o scostamento significativo tra T1 e T6 ($t=-1.008$; $p=0.370$).

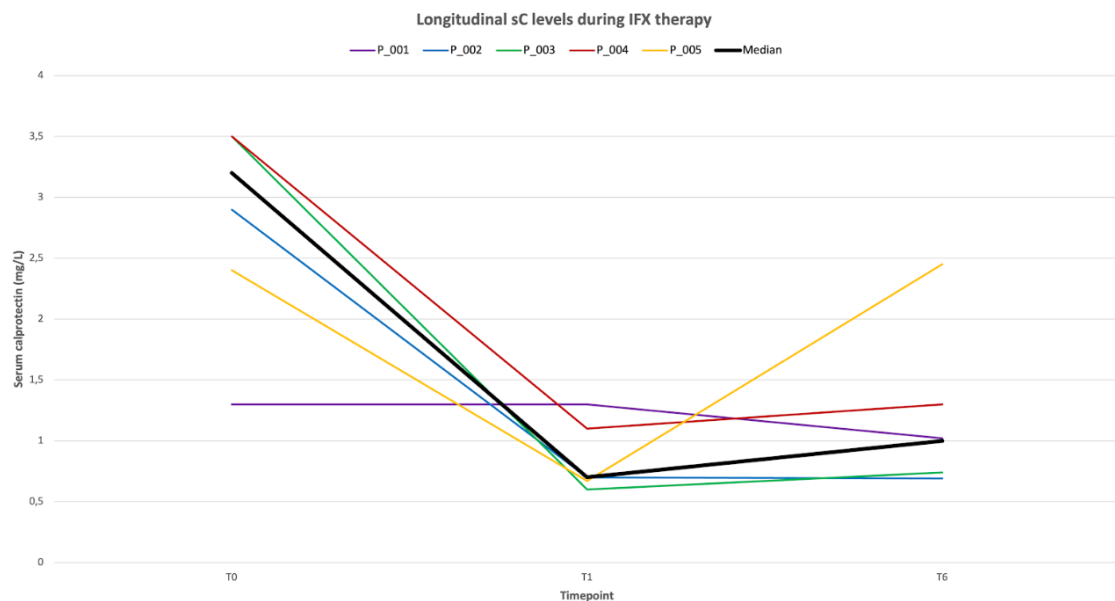


Figura 15 grafico relativo all'andamento longitudinale dei livelli di Calprotectina sierica (mg/L) nei tre time-points dello studio (T0, T1, T6).

La Figura 19 mostra una curva che va drasticamente verso il basso tra il primo e il secondo punto, e poi crea un "plateau" (una linea quasi piatta) fino al terzo punto.

5.2.4 ANALISI DELLE MATRICI DI CORRELAZIONE LONGITUDINALE

Al fine di valutare la presenza di associazioni stabili tra i livelli ematici di Calprotectina sierica (sC) e i parametri clinici, endoscopici e laboratoristici durante il follow-up terapeutico, è stata condotta un'analisi di correlazione per ranghi di Spearman (ρ) in ciascuno dei tre time-points stabiliti dal protocollo (T₀, T₁, T₆).

L'analisi statistica dei dati ha evidenziato l'assenza di correlazioni statisticamente significative in ognuno dei time-points considerati, delineando un profilo di indipendenza biochimica della sC rispetto agli altri marcatori di flogosi sistemica e locale, nonché rispetto ai livelli minimi circolati di farmaco.

- **Correlazioni sC al T₀:** al momento dell'avvio della terapia biologica con Infliximab, i livelli di sC non hanno mostrato alcuna associazione statisticamente significativa con i marcatori classici, infatti, i valori di Calprotectina fecale fC ($\rho=0.062$; $p=0.908$) e di PCR ($\rho=-0.087$; $p=0.870$) non indicano una associazione statisticamente significativa. Analogamente, non sono emerse associazioni significative con l'indice di attività clinica specifico per la malattia di Crohn, PCDAI ($\rho=0.632$; $p=0.368$); con lo score endoscopico SES-CD ($\rho=0.056$; $p=0.944$) o con il MINI index continuo ($\rho=-0.500$; $p=0.500$). dal punto di vista metodologico, gli indici clinico-endoscopici PUCAI e UCEIS sono stati necessariamente esclusi a causa di una per numerosità campionaria ridotta ($n=2$).

Frequencies for REMISSIONE CLINICA_T0

REMISSIONE CLINICA_T0	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
0	5	83.333	83.333	83.333
1	1	16.667	16.667	100.000
Missing	0	0.000		
Total	6	100.000		

Frequencies for REMISSIONE LABORATORISTICA_T0

REMISSIONE LABORATORISTICA_T0	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
0	5	83.333	83.333	83.333
1	1	16.667	16.667	100.000
Missing	0	0.000		
Total	6	100.000		

Frequencies for REMISSIONE ENDOSCOPICA_T0

REMISSIONE ENDOSCOPICA_T0	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
0	6	100.000	100.000	100.000
Missing	0	0.000		
Total	6	100.000		

Frequencies for MINI INDEX_categorica_T0

MINI INDEX_categorica_T0	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
3	4	66.667	100.000	100.000
Missing	2	33.333		
Total	6	100.000		

Figura 16 analisi al t0

- Correlazioni sC al T1:** la matrice di correlazione conferma l'assenza di legami significativi tra sC e le restanti variabili. Nello specifico, il marcatore sierico ha mostrato una tendenza id correlazione inversa, sebbene non significativo, con la Calprotectina fecale fC ($\rho=-0.410$; $p=0.493$), e un legame debole e positivo con la PCR ($\rho=0.200$; $p=0.783$). non è stata documenta una associazione significativa tra i livelli di sC e i Livelli sierici IFX ($\rho=-0.500$; $p=0.450$) o con il MINI index continuo ($\rho=-0.258$; $p=0.742$). Oltre alla persistente esclusione dei punteggi PUCAI e UCEIS per la già citata carenza di dati ($n = 2$), in questa fase è stato necessario escludere dall'analisi i parametri PCDAI e SES-CD. Tale esclusione è motivata da un vincolo matematico intrinseco ai dati, ovvero l'assenza di variabilità (*zero-variance*): l'efficacia immediata della terapia d'induzione ha determinato il raggiungimento della remissione clinica ed endoscopica nella quasi totalità dei soggetti del sottogruppo,

azzerando la dispersione dei punteggi e impedendo il calcolo del coefficiente di Spearman.

REMISSIONE CLINICA_T1	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
0	2	33.333	33.333	33.333
1	4	66.667	66.667	100.000
Missing	0	0.000		
Total	6	100.000		

Frequencies for REMISSIONE LABORATORISTICA_T1

REMISSIONE LABORATORISTICA_T1	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
0	2	33.333	33.333	33.333
1	4	66.667	66.667	100.000
Missing	0	0.000		
Total	6	100.000		

Frequencies for REMISSIONE ENDOSCOPICA_T1

REMISSIONE ENDOSCOPICA_T1	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Missing	6	100.000		
Total	6	100.000		

Frequencies for MINI INDEX_categorica_T1

MINI INDEX_categorica_T1	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
1	4	66.667	100.000	100.000
Missing	2	33.333		
Total	6	100.000		

Figura 17 analisi al T1

- **Correlazioni della sC al T6:** anche in questo caso la sC si mantiene indipendente dalla traiettoria della Calprotectina fecale fC ($\rho=0.100$; $p=0.950$) e dai Livelli circolanti di IFX ($\rho=0.400$; $p=0.517$). nonostante l'andamento descrittivo mostri coefficienti di correlazione apparentemente più marcati in senso inverso sia per la PCR ($\rho=-0.616$; $p=0.269$), sia per il MINI index continuo ($\rho=-0.738$; $p=0.262$), nessuno di essi ha raggiunto la soglia critica di significatività statistica. Anche al tempo T₆ la ridotta numerosità campionaria ha imposto l'esclusione delle metriche PUCAI e UCEIS (n = 2), mentre l'omogeneità clinica della coorte (ormai stabilmente in remissione completa) ha confermato l'assenza di variabilità interna per il PCDAI e il SES-CD, determinandone l'esclusione logica dalla matrice.

REMISSIONE CLINICA_T6	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
1	6	100.000	100.000	100.000
Missing	0	0.000		
Total	6	100.000		

Frequencies for REMISSIONE LABORATORISTICA_T6

REMISSIONE LABORATORISTICA_T6	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
0	1	16.667	16.667	16.667
1	5	83.333	83.333	100.000
Missing	0	0.000		
Total	6	100.000		

Frequencies for REMISSIONE ENDOSCOPICA_T6

REMISSIONE ENDOSCOPICA_T6	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Missing	6	100.000		
Total	6	100.000		

Frequencies for MINI INDEX_categorica_T6

MINI INDEX_categorica_T6	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
1	4	66.667	100.000	100.000
Missing	2	33.333		
Total	6	100.000		

Figura 18 analisi al T6

Nel complesso, l'andamento longitudinale suggerisce che nelle fasi successive all'inizio della terapia con IFX, la diminuzione degli indici clinici ed endoscopici indotta dal farmaco biologico satura verso il basso la variabilità dei punteggi standardizzati. Di conseguenza, l'indipendenza statistica dimostrata dalla Calprotectina sierica rispetto ai biomarcatori classici (fC e PCR) ne sottolinea l'autonomia biologica e cinetica, supportando l'ipotesi che essa esprima dinamiche flogistiche sistemiche distinte e non sovrapponibili a quelle dei monitoraggi biumorali tradizionali.

5.2.5 EVOLUZIONE DELLO STATO DI REMISSIONE

Il monitoraggio della sotto-coorte sottoposta a terapia biologica con Infliximab (n = 6) ha documentato un'evoluzione clinica e biochimica estremamente favorevole, riflettendo la solida efficacia del farmaco sia nella fase di induzione che in quella successiva di mantenimento. Lo stato di salute dei pazienti è stato valutato attraverso la transizione sequenziale verso la remissione clinica e laboratoristica lungo i tre *time-points* dello studio.

Evoluzione remissione:

- **Remissione clinica** T0: 16.7% → T1: 66.7% → T6: 100%. Al T0 la quasi totalità della coorte presentava una malattia in fase attiva conclamata, con una quota di remissione clinica confinata ad appena il 16.7% dei soggetti (1/6). Al T1, in corrispondenza del completamento della fase di induzione, l'efficacia clinica del trattamento ha determinato un drastico incremento della percentuale di pazienti in quiescenza sintomatologica, salita al 66,7% (4/6). Tale traiettoria positiva ha trovato conferma al T6, in cui il 100% dei pazienti monitorati (5/5) ha raggiunto lo stato di remissione clinica.
- **Remissione laboratoristica** T0: 16.7% → T1: 66.7% → T6: 83.3%. L'andamento della remissione laboratoristica ha ricalcato il successo clinico. La percentuale di pazienti in remissione laboratoristica al T0 era pari al 16,7% (1/6), al T1 è stato presente una normalizzazione degli indici di flogosi tradizionali, con la quota di remissione salita al 66,7% (4/6). Al T6 la remissione laboratoristica si è consolidata ulteriormente alzandosi all'83,3% della coorte analizzata.
- **Remissione endoscopica** → non disponibile a T1 e T6. Riguardo alla valutazione della guarigione mucosa mediante score endoscopici standardizzati, il dato descrittivo basale al T0 documentava l'assenza di remissione nella totalità dei

soggetti valutabili (0%). Nei successivi punti temporali di follow-up a T1 e a T6, le percentuali di remissione endoscopica sono risultate non disponibili. Tale carenza del dato non è imputabile a un drop-out metodologico, bensì riflette la buona pratica clinica gastroenterologica pediatrica. Data la natura invasiva delle procedure endoscopiche e la necessità di sottoporre il paziente pediatrico a sedazione o anestesia generale, l'esecuzione di colonscopie seriali di controllo viene evitata laddove vi sia un successo terapeutico testimoniato dalla completa remissione clinica e laboratoristica del bambino.

Nel complesso, questi dati descrittivi delineano il profilo di una coorte che risponde in modo rapido e duraturo all'Infliximab, confermando che il crollo longitudinale dei livelli di Calprotectina sierica precedentemente analizzato si modifica in modo equivalente alla remissione clinica e laboratoristica.

6 DISCUSSIONE

Le malattie infiammatorie croniche intestinali (IBD) a esordio pediatrico presentano un decorso clinico peculiare, caratterizzato da fenotipi spesso più estesi e aggressivi rispetto all'età adulta, e da complicanze uniche quali i disturbi della crescita e dello sviluppo puberale. Ad oggi, sebbene l'endoscopia con valutazione istologica rimanga il gold standard per la diagnosi e il monitoraggio dell'attività di malattia, la sua invasività e la necessità di anestesia profonda o generale nel paziente pediatrico ne limita fortemente la ripetibilità a breve termine ^{[52][53]}.

In questo scenario, la ricerca di biomarcatori non invasivi affidabili ^{[62][63]} è importante. La calprotectina fecale (fC) rappresenta ormai un caposaldo consolidato nella pratica clinica ^{[49][51][52][43]}, essa soffre di limitazioni non trascurabili ^[64], tra cui la significativa variabilità intra-giornaliera, la dipendenza dalla consistenza delle feci e, non ultimo, una bassa compliance da parte dei pazienti adolescenti nel fornire campioni biologici ^{[51][52][53]}.

Il presente studio pilota, prospettico e osservazionale, si è proposto di valutare il ruolo della calprotectina sierica (sC) come biomarcatore alternativo o complementare, analizzandone il valore diagnostico, la correlazione con gli score di severità clinico-endoscopici e la cinetica longitudinale nei pazienti pediatrici sottoposti a terapia biologica proattiva con anti-TNF α .

L'analisi statistica si è concentrata su due coorti, una caso-controllo e una longitudinale. L'analisi caso-controllo ha documentato un incremento statisticamente significativo ($p < 0.001$) dei livelli circolanti di sC nei pazienti affetti da IBD rispetto ai controlli sani. I pazienti del gruppo Casi hanno registrato una mediana di sC pari a 2.00 mg/L (Q1-Q3: 1.04–3.20) contro lo 0.75 mg/L (Q1-Q3: 0.54–1.03) dei Controlli, con un *effect size* estremamente forte (Rank-biserial correlation $r = 0.698$).

Questo dato trova riscontro nella letteratura internazionale ^{[49][52][53][51]}, confermando che l'intensa flogosi locale e la conseguente attivazione/migrazione dei neutrofili nella mucosa intestinale si riflettono in un rilascio sistemico misurabile di questa proteina della famiglia S100 ^{[60][61]}.

Nell'analisi delle correlazioni condotta sulla coorte complessiva, combinando i dati di casi e controlli, la sC ha mostrato associazioni statisticamente significative con i principali marker di flogosi comunemente impiegati nella pratica clinica:

1. **Calprotectina fecale (fC):** È stata riscontrata una correlazione lineare positiva e significativa ($\rho = 0.444$, $p = 0.039$). Questo dimostra che il rilascio sistemico e circolante di calprotectina riflette, almeno in parte, l'entità della migrazione dei neutrofili a livello del lume intestinale. La sC si propone quindi, non come un marker totalmente disgiunto dalla fC, bensì come un suo analogo speculare rilevabile nel compartimento ematico.
2. **Proteina C Reattiva (PCR):** è presente anche una correlazione significativa tra la sC e la PCR ($\rho = 0.386$, $p = 0.039$). Essendo la PCR prodotta principalmente dagli epatociti sotto lo stimolo dell'IL-6, la sua associazione con la sC (prodotta direttamente dai neutrofili attivati) suggerisce una sinergia nella quantificazione dell'inflammazione sistemica.

Nessuna correlazione statisticamente significativa nella coorte totale è stata invece evidenziata tra la sC e la VES ($p = 0.110$) o l'età ($p = 0.069$).

Un aspetto metodologico cruciale del nostro studio ha riguardato la discrepanza anagrafica riscontrata al reclutamento tra i due gruppi, con un'età media significativamente maggiore nel gruppo dei casi (12.2 ± 3.6 anni vs 6.0 ± 4.0 anni). Per escludere che i livelli di sC fossero influenzati da un bias di sviluppo o anagrafico, è stato applicato un modello di regressione logistica binomiale multivariata aggiustato per l'età. Il modello ha dimostrato che il legame tra sC e IBD permane solido e indipendente (OR = 1.77, IC95% 1.08–2.89, $p = 0.023$), indicando che, a parità di età, ogni incremento unitario di 1 mg/L di sC associa una probabilità di circa nove volte superiore di appartenere al gruppo IBD.

L'accuratezza globale del biomarcatore è stata ulteriormente confermata dall'analisi della curva ROC, che ha mostrato un'eccellente Area Sotto la Curva (AUC =0.849, IC95%: AUC 0.688–0.962). Il cut-off ottimale identificato mediante indice di Youden a 1.3 mg/L ha espresso un bilanciamento ottimale tra sensibilità (66.7%) e specificità (86,7%), proponendo la sC come un test di screening discriminante.

L'accuratezza diagnostica della calprotectina sierica (sC) emersa dall'analisi della curva ROC (AUC=0.849) concorda ampiamente con quanto descritto nello studio pilota di Carlsen et al.^[51] condotto su una popolazione di adolescenti affetti da IBD.

Anche nel loro lavoro, i livelli ematici del biomarcatore si sono dimostrati significativamente più elevati nei pazienti con malattia attiva rispetto ai soggetti sani o in remissione, supportando l'ipotesi che la sC rifletta in modo sensibile il carico infiammatorio sistemico indotto dalla patologia. Tuttavia, è interessante notare una parziale discrepanza nei valori assoluti e nei cut-off ideali: mentre la nostra analisi ha identificato una soglia discriminante ottimale a 1.3 mg/L (Sensibilità 66.7%, Specificità 86.7%), la variabilità metodologica nei test ELISA commerciali impiegati nei diversi studi sottolinea la necessità di standardizzare i range di riferimento laboratoristici prima di un trasferimento definitivo della sC nella routine clinica.

Analizzando specificamente la coorte dei Casi al baseline, i dati bioumorali hanno confermato lo stato di acuzie e severa flogosi attiva (fC mediana a 500 mg/kg, PCR ed ematocrito mossi). Nell'esplorazione delle relazioni biologiche mediante il coefficiente di Spearman, la sC ha mostrato un'unica correlazione statisticamente significativa e rilevante, ovvero quella positiva con l'indice di attività clinica specifico per la Malattia di Crohn (PCDAI; $\rho = 0.775$, $p = 0.041$). Questo risultato suggerisce che la sC sia strettamente uniformata alla gravità sintomatologica avvertita dal paziente.

Al contrario, non sono emerse correlazioni significative con gli indici di flogosi classici (PCR, VES) o con la calprotectina fecale stessa. Questa indipendenza biologica supporta l'ipotesi che la sC rifletta una cinetica differente e potenzialmente più dinamica dello stato

infiammatorio attuale, legata alla sua breve emivita (circa 5 ore rispetto alle 18 ore della PCR)^{[51][52]} e al rilascio diretto da parte dei neutrofili attivati circolanti e tissutali.

Inoltre, il test U di Mann-Whitney ha evidenziato che la sC non risente del tipo di patologia (livelli sovrapponibili tra MC e RCU, $p = 0.862$) né della presenza di manifestazioni extraintestinali (EIM, $p = 1.000$), confermandosi come un indicatore di flogosi immunomediata.

Un dato di forte interesse scientifico emerso dal nostro studio risiede nell'assenza di una correlazione lineare statisticamente significativa tra i livelli di sC e quelli di calprotectina fecale (fC) nei vari time-points longitudinali ($p > 0.03$). Questo fenomeno, apparentemente paradossale, trova in realtà un solido riscontro in letteratura, in particolare nei lavori di Carlsen et al.^[51].

Gli autori hanno infatti evidenziato come la calprotectina misurata nel siero o nel plasma tenda a comportarsi in modo differente rispetto alla controparte fecale: mentre la fC è un indicatore locale e specifico della migrazione neutrofila nel lume intestinale (mostrando talvolta una forte variabilità intra-giornaliera), la calprotectina ematica esprime la quota di attivazione leucocitaria sistemica.

La riduzione della sC da noi osservata tra T0 e T1 ($p = 0.021$) conferma l'efficacia del blocco sistemico operato dall'Infliximab, ma la successiva cinetica a 'plateau' indipendente dalla fC ribadisce il concetto introdotto da Carlsen sulla complementarità, e non sostituibilità, dei due biomarcatori nel tight control del paziente pediatrico.

I dati riportati e descritti sulla remissione dei pazienti analizzati nello studio longitudinale delineano il profilo di una coorte che risponde in modo rapido e duraturo all'Infliximab. Il crollo longitudinale dei livelli di calprotectina sierica, precedentemente analizzato, si modifica infatti in modo equivalente al raggiungimento delle diverse dimensioni della remissione (clinica, laboratoristica ed endoscopica). L'omogeneità e la rapidità con cui i pazienti sono progrediti verso uno stato di remissione stabile giustificano, inoltre, la stabilità dei valori osservata nelle fasi successive al T0. Questo fenomeno di omogeneizzazione clinica verso la remissione stabile (effetto *zero-variance* o *plateau* a T1 e T6) spiega la difficoltà nell'evidenziare correlazioni nei tempi di follow-up.

Limiti:

I limiti principali di questo studio risiedono nella numerosità campionaria ridotta (legata alla natura pilota del protocollo) e nella necessità, dovuta a vincoli temporali istituzionali, di limitare l'analisi longitudinale della coorte in terapia biologica (6 pazienti valutati a T0, T1 e T6) escludendo il time-point tardivo a 12 mesi (T12), i cui dati sono tuttora in corso di raccolta.

Nonostante il protocollo prevedesse un campionamento appaiato per sesso ed età (*matching*), le limitazioni intrinseche nel reclutamento ambulatoriale della coorte di controllo non hanno permesso di ottenere un perfetto appaiamento statistico con il gruppo dei pazienti IBD. Tuttavia, nella regressione multipla l'età non sembra impattare i valori di Scal.

7 CONCLUSIONE

In conclusione, i risultati ottenuti in questo studio pilota supportano fortemente l'utilità clinica della calprotectina sierica (sC) nel panorama della gestione delle malattie infiammatorie croniche intestinali pediatriche. Infatti, i dati emersi da questo studio supportano l'utilizzo della calprotectina sierica (sC) come biomarcatore affidabile e non invasivo nella gestione del paziente pediatrico affetto da IBD.

Questo biomarcatore si è dimostrato uno strumento diagnostico accurato, robusto e indipendente dall'età, capace di discriminare con elevata sensibilità e specificità i pazienti affetti da IBD rispetto ai soggetti sani. Infatti, grazie all'adozione del cut-off di 1.3 mg/L si garantisce una buona specificità nel differenziare i soggetti sani da quelli malati, minimizzando i falsi positivi.

La sua forte correlazione con l'indice clinico PCDAI nella malattia di Crohn e la sua stabilità indipendentemente dal fenotipo di malattia (MC o RCU) e dalle manifestazioni extraintestinali lo configurano come uno strumento fedele del carico infiammatorio sistemico e clinico del piccolo paziente.

L'integrazione del dosaggio della sC nei normali controlli ematici routinari rappresenta una strategia per superare i limiti di compliance e di variabilità legati alla raccolta della calprotectina fecale, specialmente nella popolazione adolescente.

Sarà necessario attendere il completamento della raccolta dati a 12 mesi (T12) e ampliare la numerosità della coorte longitudinale per confermare definitivamente il valore prognostico della sC e la sua capacità di predire la remissione profonda a lungo termine, ponendo le basi per un monitoraggio sempre meno invasivo del paziente pediatrico con IBD. Inoltre, saranno necessari ulteriori studi prospettici su coorti più ampie per validare su larga scala il cut-off identificato e standardizzare l'impiego della sC nella pratica clinica routinaria all'interno degli algoritmi di monitoraggio "treat-to-target".

8 BIBLIOGRAFIA

- [1] Rugarli C.: *Medicina interna sistematica*. 2023. Trento: Edra, vol. 1, Malattie del colon, malattie infiammatorie intestinali, pp. 725-746.
- [2] Ouahed J. et al.: Very early onset inflammatory bowel disease: a clinical approach with a focus on the role of genetics and underlying immune deficiencies. 2020. *Inflammatory Bowel Diseases*, 26(6) pp. 820–842.
- [3] Khan R., Kuenzig M.E., Benchimol E.I.: Epidemiologia della malattia infiammatoria intestinale pediatrica. 2023. *Gastroenterology Clinics of North America*, 52(3), pp. 483-496.
- [4] Wilson D.C., Russell R.K.: Overview of paediatric IBD. 2017. *Seminars in Pediatric Surgery*, 26(6), pp. 344-348.
- [5] Kuenzig M. et al.: Tendenze del ventunesimo secolo nell'epidemiologia globale della malattia infiammatoria intestinale pediatrica: revisione sistematica. 2022. *Gastroenterology*, 162, pp. 1147-1159.e4.
- [6] Benchimol E.I., Bernstein C.N., Bitton A. et al.: Trends in epidemiology of pediatric inflammatory bowel disease in Canada: distributed network analysis of multiple population-based provincial health administrative databases. 2017. *American Journal of Gastroenterology*, 112, pp. 1120-1134.
- [7] Griffiths A.M.: Specificità della malattia infiammatoria intestinale nell'infanzia. 2004. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 18(3), pp. 509-523.
- [8] Castro M., Papadatou B., Baldassare M. et al.: Malattia infiammatoria intestinale nei bambini e adolescenti in Italia: dati dal registro nazionale pediatrico IBD (1996–2003). 2008. *Inflammatory Bowel Diseases*, 14(9), pp. 1246-1252.
- [9] Jans D., Cleynen I.: La genetica della IBD non monogenica. 2023. *Human Genetics*, 142(5), pp. 669-682.
- [10] Kayali S., Fantasia S., Gaiani F., Cavallaro L.G., de'Angelis G.L., Laghi L.: NOD2 e la pratica clinica della malattia di Crohn: dall'epidemiologia alla diagnosi e terapia. 2025. *Inflammatory Bowel Diseases*, 31(2), pp. 552-562.
- [11] Nayar S., Morrison J.K., Giri M., Gettler K., Chuang L.S., Walker L.A., Ko H.M., Kenigsberg E., Kugathasan S., Merad M., Chu J., Cho J.H.: Una nicchia mieloide-stromale e un salvataggio gp130 nel morbo di Crohn causato da NOD2. 2021. *Nature*, 593(7858), pp. 275-281.

- [12] Ashton J.J., Seaby E.G., Beattie R.M. et al.: NOD2 in Crohn's disease—unfinished business. 2022. *Journal of Crohn's and Colitis*, 17(3), pp. 450-458.
- [13] Abreu M.T., Taylor K.D., Lin Y.C., Hang T., Gaiennie J., Landers C.J., Vasiliauskas E.A., Kam L.Y., Rojany M., Papadakis K.A., Rotter J.I., Targan S.R., Yang H.: Le mutazioni in NOD2 sono associate alla malattia fibrostenosante nei pazienti con morbo di Crohn. 2002. *Gastroenterology*, 123(3), pp. 679-688.
- [14] Tomer G., Ceballos C., Concepcion E., Benkov K.J.: Le varianti NOD2/CARD15 sono associate a un peso inferiore alla diagnosi nei bambini con morbo di Crohn. 2003. *American Journal of Gastroenterology*, 98(11), pp. 2479-2484.
- [15] Annese V., Piepoli A., Latiano A., Lombardi G., Napolitano G., Caruso N., Cocchiara E., Accadia L., Perri F., Andriulli A.: Gli alleli HLA-DRB1 possono influenzare il fenotipo della malattia nei pazienti con malattia infiammatoria intestinale: una rivalutazione critica con revisione della letteratura. 2005. *Diseases of the Colon & Rectum*, 48(1), pp. 57-64.
- [16] Nambu R., Warner N., Mulder D.J., Kotlarz D., McGovern D.P.B., Cho J., Klein C., Snapper S.B., Griffiths A.M., Iwama I., Muise A.M.: Una revisione sistematica della malattia infiammatoria intestinale monogenica. 2022. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 20(4), pp. e653-e663.
- [17] Zenewicz L.A., Antov A., Flavell R.A.: Differenziazione delle cellule T CD4 e malattia infiammatoria intestinale. 2009. *Trends in Molecular Medicine*, 15, pp. 199-207.
- [18] Asquith M., Powrie F.: Un equilibrio intrinsecamente pericoloso: omeostasi intestinale, infiammazione e cancro associato alla colite. 2010. *Journal of Experimental Medicine*, 207, pp. 1573-1577.
- [19] Lee S.H., Kwon J.E., Cho M.L.: Patogenesi immunologica della malattia infiammatoria intestinale. 2018. *Intestinal Research*, 16(1), pp. 26-42.
- [20] Lee C.H., Hsu P., Nanan B., Nanan R., Wong M., Gaskin K.J., Leong R.W., Murchie R., Muise A.M., Stormon M.O.: Nuove mutazioni de novo del gene del recettore dell'interleucina-10 portano all'insorgenza infantile della malattia infiammatoria intestinale. 2014. *Journal of Crohn's and Colitis*, 8(11), pp. 1551-1556.
- [21] Quitadamo P., De Brasi D.: Le malattie infiammatorie croniche intestinali: aspetti clinici. 2023. *Quaderni ACP*, 30(6), pp. 271-274.

- [22] Kavcar Z., Civan H.A., Taskin D.G., Hatipoglu S.S.: Manifestazioni extraintestinali nei bambini diagnosticati con malattia infiammatoria intestinale. 2023. *Sisli Etfal Hastanesi Tip Bulteni*, 57(1), pp. 73-78.
- [23] Jose F.A., Garnett E.A., Vittinghoff E., Ferry G.D., Winter H.S., Baldassano R.N. et al.: Sviluppo di manifestazioni extraintestinali in pazienti pediatriche con malattia infiammatoria intestinale. 2009. *Inflammatory Bowel Diseases*, 15, pp. 63-68.
- [24] Yu Y.R., Rodriguez J.R.: Presentazione clinica di Crohn, colite ulcerosa e colite indeterminata: sintomi, manifestazioni extraintestinali e fenotipi di malattia. 2017. *Seminars in Pediatric Surgery*, 26(6), pp. 349-355.
- [25] Vuijk S.A., Camman A.E., de Ridder L.: Considerazioni sulla malattia infiammatoria intestinale pediatrica e adolescenziale. 2024. *Journal of Crohn's and Colitis*, 18(Suppl. 2), pp. ii31-ii45.
- [26] Maaser C., Sturm A., Vavricka S.R., Kucharzik T., Fiorino G., Annese V., Calabrese E., Baumgart D.C., Bettenworth D., Borralho Nunes P., Burisch J., Castiglione F., Eliakim R., Ellul P., González-Lama Y., Gordon H., Halligan S., Katsanos K., Kopylov U., Kotze P.G., Krustiņš E., Laghi A., Limdi J.K., Rieder F., Rimola J., Taylor S.A., Tolan D., van Rheenen P., Verstockt B., Stoker J.: Linea guida ECCO-ESGAR per la valutazione diagnostica nella IBD Parte 1: diagnosi iniziale, monitoraggio della IBD nota, rilevamento di complicanze. 2019. *Journal of Crohn's and Colitis*, 13(2), pp. 144-164.
- [27] Gomollón F., Dignass A., Annese V. et al.: Third European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease 2016. Part 1: diagnosis and medical management. 2017. *Journal of Crohn's and Colitis*, 11, pp. 3-25.
- [28] Ozoya Angulo M.E., de Las Heras Gómez I., Martinez Villanueva M., Noguera Velasco J.A., Avilés Plaza F.: Faecal calprotectin, a useful marker in discriminating between inflammatory bowel disease and functional gastrointestinal disorders. 2017. *Gastroenterología y Hepatología*, 40, pp. 125-131.
- [29] Qiu Y., Mao R., Chen B.L. et al.: Systematic review with meta-analysis: magnetic resonance enterography vs. computed tomography enterography for evaluating disease activity in small bowel Crohn's disease. 2014. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 40, pp. 134-146.

- [30] Paolantonio P., Ferrari R., Vecchietti F., Cucchiara S., Laghi A.: Stato attuale dell'imaging RM nella valutazione della IBD in una popolazione pediatrica di pazienti. 2009. *European Journal of Radiology*, 69(3), pp. 418-424.
- [31] Uhlig H.H., Charity-Henrion F., Kotlarz D., Shouval D.S., Schwerd T., Strisciuglio C., de Ridder L., van Limbergen J., Macchi M., Snapper S.B., Ruemmele F.M., Wilson D.C., Travis S.P.L., Griffiths A.M., Turner D., Klein C., Muise A.M., Russell R.K. et al.: Genomica clinica per la diagnosi delle forme monogeniche di malattia infiammatoria intestinale: un documento di posizione del gruppo pediatrico IBD Porto della European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. 2021. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 72(3), pp. 456-473.
- [32] Levine A., Koletzko S., Turner D., Escher J.C., Cucchiara S., de Ridder L., Kolho K.L., Veres G., Russell R.K., Paerregaard A., Buderus S., Greer M.L., Dias J.A., Veereman-Wauters G., Lionetti P., Sladek M., Martin de Carpi J., Staiano A., Ruemmele F.M., Wilson D.C. et al.: ESPGHAN ha rivisto i criteri di Porto per la diagnosi della malattia infiammatoria intestinale in bambini e adolescenti. 2014. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 58(6), pp. 795-806.
- [33] Levine A. et al.: Pediatric modification of the Montreal classification for inflammatory bowel disease: the Paris classification. 2011. *Inflammatory Bowel Diseases*, 17(6), pagine 1314–1321.
- [34] Hyams J.S.: Registrazione standardizzata dei parametri relativi alla storia naturale della malattia infiammatoria intestinale: da Montreal a Parigi. 2014. *Digestive Diseases*, 32(4), pp. 337-344.
- [35] Assa A., Rinawi F., Shamir R.: Le proprietà predittive a lungo termine della classificazione di Paris nei pazienti pediatrici con malattia infiammatoria intestinale. 2018. *Journal of Crohn's and Colitis*, 12(1), pp. 39-47.
- [36] Best W.R., Bectel J.M., Singleton J.W., Kern F.: Sviluppo di un indice di attività per la malattia di Crohn. 1976. *Gastroenterology*, 70, pp. 439-444.
- [37] Shaoul R., Day A.S.: Panoramica degli strumenti per valutare la gravità nella malattia infiammatoria intestinale pediatrica. 2021. *Frontiers in Pediatrics*, 9, pp. 615216.

- [38] Harvey R.F., Bradshaw J.M.: Un semplice indice dell'attività del morbo di Crohn. 1980. *The Lancet*, 1, pp. 514.
- [39] Hyams J.S., Ferry G.D., Mandel F.S., Gryboski J.D., Kibort P.M., Kirschner B.S. et al.: Sviluppo e validazione di un indice di attività pediatrica per la malattia di Crohn. 1991. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 12, pp. 439-447.
- [40] Turner D., Griffiths A.M., Walters T.D., Seah T., Markowitz J., Pfefferkorn M. et al.: Ponderazione matematica dell'indice di attività pediatrica per la malattia di Crohn (PCDAI) e confronto con le sue altre versioni brevi. 2012. *Inflammatory Bowel Diseases*, 18, pp. 55-62.
- [41] Crohn's & Colitis Foundation: *Standardized assessment tools for pediatric IBD patients*. 2023. Consultato il 17/04/2023 [Pediatric Assessment Tools - Feb. 2023_KC.pdf](#)
- [42] Kerur B., Litman H.J., Stern J.B., Weber S., Lightdale J.R., Rufo P.A. et al.: Correlazione della gravità della malattia endoscopica con il punteggio dell'indice di attività della colite ulcerosa pediatrica in bambini e giovani adulti con colite ulcerosa. 2017. *World Journal of Gastroenterology*, 23, pp. 3322-3329.
- [43] Zallot C., Peyrin-Biroulet L.: Remissione profonda nella malattia infiammatoria intestinale: andare oltre i sintomi. 2013. *Current Gastroenterology Reports*, 15(3), pp. 315.
- [44] van Rheenen P.F., Aloï M., Assa A., Bronsky J., Escher J.C., Fagerberg U.L., Gasparetto M., Gerasimidis K., Griffiths A., Henderson P., Koletzko S., Kolho K.L., Levine A., van Limbergen J., Martín de Carpi F.J., Navas-López V.M., Oliva S., de Ridder L., Russell R.K., Shouval D., Spinelli A., Turner D., Wilson D., Wine E., Ruemmele F.M.: La gestione medica della malattia di Crohn pediatrica: aggiornamento delle linee guida ECCO-ESPGHAN. 2021. *Journal of Crohn's and Colitis*, 15(2), pp. 171-194.
- [45] Ruemmele F.M., Veres G., Kolho K.L., Griffiths A., Levine A., Escher J.C., Amil Dias J., Barabino A., Braegger C.P., Bronsky J., Buderus S., Martín-de-Carpi J., De Ridder L., Fagerberg U.L., Hugot J.P., Kierkus J., Kolacek S., Koletzko S., Lionetti P., Miele E., Navas López V.M., Paerregaard A., Russell R.K., Serban D.E., Shaoul R., van Rheenen P., Veereman G., Weiss B., Wilson D., Dignass A., Eliakim A., Winter H., Turner D.: Linee guida consensuali ECCO/ESPGHAN sulla gestione

- medica della malattia di Crohn pediatrica. 2014. *Journal of Crohn's and Colitis*, 8(10), pp. 1179-1207.
- [46] Ruemmele F.M., Turner D.: Differenze nella gestione della colite ulcerosa pediatrica e adulta — lezioni dalle linee guida congiunte ECCO ed ESPGHAN per la gestione della colite ulcerosa pediatrica. 2014. *Journal of Crohn's and Colitis*, 8(1), pp. 1-4.
- [47] Herman R.B., Pieczarkowski S., Dumnicka P., Wyżgowska A., Fyderek K.: Utilità clinica dell'indice di infiammazione mucosale non invasiva nei pazienti con neodiagnostica malattia di Crohn pediatrica. 2022. *Przegląd Gastroenterologiczny*, 17(3), pp. 213-218.
- [48] Aloï M., Nuti F., Stronati L., Cucchiara S.: Advances in the medical management of paediatric IBD. 2014. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 11(2), pp. 99–108.
- [49] Lundgren D., Widbom L., Hultdin J., Karling P.: Preclinical Markers in Inflammatory Bowel Disease. A Nested Case–Control Study. 2021. *Crohn's & Colitis* 360, 3(4), pp. 1-7.
- [50] Sands B.E.: Biomarcatori dell'infiammazione nella malattia infiammatoria intestinale. 2015. *Gastroenterology*, 149(5), pp. 1275-1285.e2.
- [51] Carlsen K., Malham M., Hansen L.F., Petersen J.J.H., Paerregaard A., Houen G., Wewer V.: Calprotectina sierica in adolescenti con malattia infiammatoria intestinale: indagine pilota. 2019. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 68(5), pp. 669-675.
- [52] Kalla R., Kennedy N.A., Ventham N.T., Boyapati R.K., Adams A.T., Nimmo E.R., Visconti M.R., Drummond H., Ho G.T., Pattenden R.J., Wilson D.C., Satsangi J.: Calprotectina: un nuovo marcatore diagnostico e prognostico nelle malattie infiammatorie intestinali. 2016. *American Journal of Gastroenterology*, 111(12), pp. 1796-1805.
- [53] Meuwis M.A., Vernier-Massouille G., Grimaud J.C., Bouhnik Y., Laharie D., Piver E., Seidel L., Colombel J.F., Louis E. et al.: Calprotectina sierica come biomarcatore per il morbo di Crohn. 2013. *Journal of Crohn's and Colitis*, 7(12), pp. e678-e683.

- [54] Ray S., Mawdsley J., Anderson S., Sanderson J.D., Gecse K., Ponsioen C.Y., D'Haens G.R., Irving P.M., Samaan M.A.: Validazione e indagine delle caratteristiche operative dell'indice endoscopico di gravità nella colite ulcerosa. 2019. *Inflammatory Bowel Diseases*, 25(5), pp. 937-944.
- [55] Travis S.P., Schnell D., Krzeski P., Abreu M.T., Altman D.G., Colombel J.F., Feagan B.G., Hanauer S.B., Lémann M., Lichtenstein G.R., Marteau P.R., Reinisch W., Sands B.E., Yacyshyn B.R., Bernhardt C.A., Mary J.Y., Sandborn W.J.: Sviluppo di uno strumento per valutare la gravità endoscopica della colite ulcerosa: l'Indice di Gravità Endoscopica della Colite Ulcerosa (UCEIS). 2012. *Gut*, 61(4), pp. 535-542.
- [56] Lee J.S., Kim E.S., Moon W.: Revisione cronologica degli indici endoscopici nelle malattie infiammatorie intestinali. 2019. *Clinical Endoscopy*, 52(2), pp. 129-136.
- [57] Peraza J., Kaper M.E., Bargas A., Kim I., Agrawal M., Larsen L., Jacobsen H.A., Jess T., Colombel J.F., Torres J., Ungaro R.C., Ananthakrishnan A.N.: Un semplice punteggio endoscopico per la malattia di Crohn (SES-CD) ≥ 7 prevede la progressione della malattia. 2025. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 61(6), pp. 1011-1018.
- [58] Turner, D. *et al.* Development, Validation, and Evaluation of a Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index: A Prospective Multicenter Study. *Gastroenterology* **133**, 423–432 (2007).
- [59] Akutko K, Pytrus T. Clinical Usefulness of the MINI (Mucosal Inflammation Noninvasive Index) Score as a Non-Invasive Indicator for Assessing Mucosal Healing in Pediatric Patients with Crohn's Disease. *J Clin Med*. 2025;14(23):8331.
- [60] Lasso A, Stotzer PO, Ohman L, et al. The intra-individual variability of faecal calprotectin: a prospective study in patients with active ulcerative colitis. *J Crohn's Colitis* 2015;9:26–32.
- [61] Calafat M, Cabré E, Manósa M, et al. High within-day variability of fecal calprotectin levels in patients with active ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2015;21:1072–6.
- [62] Zittan E, Kelly OB, Kirsch R, et al. Low fecal calprotectin correlates with histological remission and mucosal healing in ulcerative colitis and colonic Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2016;22:623–30.

- [63] D’HaensG, FerranteM,VermeireS, et al. Fecal calprotectin is a surrogatemarkerforendoscopic lesionsin inflammatorybowel disease. *InflammBowelDis*2012;18:2218–24.
- [64] Nordal HH, Fagerhol MK, Halse AK, et al. Calprotectin (S100A8/A9) should preferably be measured in EDTA-plasma; results from a long itudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Clin Lab Invest* 2018;78:102–8.
- [65] van Rheenen PF, Van de Vijver E, Fidler V. Faecal calprotectin for screening of patients with suspected infl ammatory bowel disease: diagnostic meta-analysis. *BMJ* 2010; 341: c3369
- [66] Costa F, Mumolo MG, Ceccarelli L et al. Calprotectin is a stronger predic tive marker of relapses in ulcerative colitis than in Crohn’s disease. *Gut* 2005; 54: 364 – 8
- [67] Beaugerie L, Seksik P, Nion-Larmurier I et al. Predictors of crohn’s disease. *Gastroenterology* 2006; 130: 650 – 6.