

Pomen in določanje kalprotektina v blatu

Importance and determination of calprotectin in stool

Evgenija Homšak^{1,2}, Marjeta Dugonik¹

¹Univerzitetni klinični center Maribor, Oddelek za laboratorijsko diagnostiko

²Univerza v Mariboru, Medicinska fakulteta, Katedra za Klinično biokemijo

Avtor za korespondenco:

Doc. dr. Evgenija Homšak, mag. farm., spec. med. biokem.

Univerzitetni klinični center Maribor, Oddelek za laboratorijsko diagnostiko, Ljubljanska ulica 5, 2000 Maribor
e-pošta: evgenija.homsak@ukc-mb.si

POVZETEK

Kronična vnetna črevesna bolezen predstavlja eno pomembnejših gastrointestinalnih bolezni, ki prizadene tako otroke kot odrasle. Njena pojavnost in pogostnost v svetu z leti strmo narašča. Zanj je značilen kompleksen vnetni imunski odziv, ki vodi do bolezenskih simptomov in patoloških vnetnih sprememb v črevesju. Za Crohnovo bolezen in ulcerozni kolitis kot pomembni obliki kronične vnetne črevesne bolezni so značilna obdobja aktivnih (vnetnih) in neaktivnih (nevnetnih) potekov bolezni. Pri odkrivanju, oceni stanja in spremljanju kronične vnetne črevesne bolezni je zato pomembno uporabiti vse razpoložljive diagnostične možnosti, vključno z anamnezo bolnika, neinvazivno in invazivno diagnostiko (endoskopija) ter izsledke histoloških analiz. Med pomembne neinvazivne metode odkrivanja in spremljanja kronične vnetne črevesne bolezni sodi določanje kalprotektina v blatu, biološkega označevalca vnetnega procesa v črevesni sluznici, ki dobro sovпада z izvidi endoskopije in histologije. Prav tako omogoča razlikovanje organskih gastrointestinalnih bolezni, kot je kronična vnetna črevesna bolezen, od funkcionalnih gastrointestinalnih bolezni, kot je sindrom razdražljivega črevesja, ki jih povezujejo sorodni znaki in simptomi. Je pomembno orodje za oceno aktivnosti bolezni ter odgovora na zdravljenje in za napoved ponovitve bolezni. Njegove velike prednosti so neinvazivnost in enostavnost določanja, dobra stabilnost v vzorcih blata ter dobra ponovljivost in nizka cena metod do-

ločanja oziroma testov. Za ustrezno pridobljene rezultate in njihovo interpretacijo je pomembno poznati in upoštevati možne predanalitične, analitične in poanalitične dejavnike, ki lahko vplivajo na izmerjene vrednosti koncentracij in diagnostično vrednost kalprotektina.

Ključne besede: kronična vnetna črevesna bolezen, biološki označevalec, kalprotektin, blato

ABSTRACT

Chronic inflammatory bowel disease is one of the most important gastrointestinal diseases affecting both children and adults. Its incidence and prevalence has increased worldwide in the years. It is characterized by a complex inflammatory immune response that leads to characteristic symptoms and pathological inflammatory changes in the intestine. Crohn's disease and ulcerative colitis as major forms of chronic inflammatory bowel disease are characterised by phases of active (inflammatory) and inactive (non-inflammatory) disease courses. In the diagnosis, assessment and monitoring of chronic inflammatory bowel disease, it is therefore essential to use all available diagnostic options, including the patient's history, non-invasive and invasive imaging diagnostics (endoscopy), and the results of histological analyzes. One of the most important non-invasive methods for detecting and monitoring chronic inflam-

matory bowel disease is the determination of calprotectin in stool, a biomarker for the inflammatory process in the intestinal mucosa that correlates well with endoscopic and histological findings. It also enables the differentiation of organic gastrointestinal diseases such as chronic inflammatory bowel disease from functional gastrointestinal diseases such as irritable bowel syndrome, which are associated with similar signs and symptoms. It is an important tool for assessing disease activity and response to therapy as well as predicting disease recurrence. Its main advantages are the non-invasive and simple determination, the good stability in stool samples as well as the good reproducibility and the low cost of the determination/test methods. In order to obtain and correctly interpret the results, it is important to know and consider possible pre-analytical, analytical and post-analytical factors that may influence the measured concentration values and the diagnostic value of calprotectin.

Keywords: inflammatory bowel disease, biomarker, calprotectin, stool

UVOD

Kronična vnetna črevesna bolezen (KVČB) je kronična bolezen, ki prizadene sluznico in steno črevesja ter v sodobnem času predstavlja eno pomembnejših gastrointestinalnih bolezni. Značilna je predvsem za razviti svet. Njena pogostnost in pojavnost z leti naraščata, še posebej v hitro se razvijajočih se in industrializiranih državah, ki so v preteklosti beležile nizko pojavnost te bolezni (1, 2). Pojavlja se tako pri otrocih kot pri odraslih, pri čemer jo najpogosteje odkrijemo v obdobju med 15. in 30. letom starosti. Kar 20–25 % vseh KVČB se pojavi v otroštvu ali adolescenci (<20 let) (2–4). V svetu, po do zdaj znanih podatkih, za to boleznijo oboleva okoli 4,9 milijona ljudi, pri čemer sta tako prevalenca kot incidenca odvisni od geografske regije, države in njene razvitosti (2–6). Naše epidemiološke raziskave so pokazale, da je pojavnost KVČB v Sloveniji primerljiva z drugimi razvitimi zahodnoevropskimi državami. V Evropi je prevalenca KVČB okvirno 187–832/100.000 prebivalcev in incidenca 10–46/100.000 odraslih prebivalcev; pri otrocih pa je na novo odkritih primerov KVČB 10–23/100.000 otrok na leto (4–6). Prevalenca kot posledica nizke smrtnosti in kroničnosti bolezni zato vztrajno in počasi narašča.

KVČB najpogosteje spremljajo značilni simptomi, kot so bolečine v trebuhu, težave z odvajanjem blata (zaprtje ali driska), prisotnost krvi v blatu in izguba telesne teže, bolezni pa v zgodnjem obdobju lahko poteka tudi brez simptomov. Bolniki s KVČB se soočajo z doživljenjskim spremljanjem in zdravljenjem bolezni (1, 2).

Etiologija KVČB ni povsem pojasnjena, je pa močno v povezavi s sodobnim načinom življenja, prehrano in s stresom kot sprožitelj te imunske pogojene bolezni (1, 7, 8). Na razvoj bolezni vplivajo dejavniki okolja, mikrobi (tuji in lastna mikrobiota), genetika in imunski sistem z naravno in pridobljeno imunostjo posameznika, ki so med seboj kompleksno povezani (1, 7, 8). Najbolj splošno sprejeta teorija je, da bolezen pod vplivom različnih okoljskih dejavnikov (izpostavljenost antibiotikom, mikrobi, stres, kajenje, onesnaženost zraka in vode) povzroča nenormalen ali nepravilno uravnan imunski odziv, usmerjen proti črevesni mikrobioti pri genetsko dovzetnih posameznikih. Znano je, da imajo bolniki s KVČB moteno ali porušeno črevesno mikrobioto, ki se kaže v zmanjšani raznolikosti in porastu patogenih bakterij (disbioza), kar lahko vodi v vnetje in poškodovanje črevesja. Vendar pa ostaja nejasno, ali je ta disbioza vzrok bolezni ali njena posledica (1, 7). Za KVČB je značilno prisoten kompleksen vnetni imunski odziv, pri katerem se po različnih mehanizmi aktivirajo imunske celice (aktivacija makrofagov, T-celične poti Th17, Th1 in Th2), sicer v vlogi in z namenom zaščite gostitelja pred patogenimi povzročitelji in vplivi. Še posebej je opazena subpopulacija ILC3 (angl. *innate lymphoid cells*), prirojene limfoidne celice, ki producirajo in sproščajo citokine, značilne za populacijo Th17 limfocitov pomagalk. Njihove ključne vloge so obramba pred zunajceličnimi paraziti in vzdrževanje črevesne homeostaze, prav tako sodelujejo v učinkoviti protimikrobni obrambi s proizvodnjo IL-17 in IL-22. ILC3 so zaznane v povečani količini pri bolnikih s KVČB in jim pripisujejo vlogo pri sproženju in vzdrževanju vnetnega odziva (1, 7). Zato lahko tudi kakršne koli genetske motnje na ravni le-teh in njihova pretirana aktivacija kot motena interakcija z epitelijem in epiteljsko bariero, ki ji sicer z normalno tvorbo IL-22 pomagajo vzdrževati epiteljsko celovitost, vodijo k trajnemu vnetju in spremembam mikrobiote ter posledičnem razvoju bolezni (7). ILC3 niso »genetski označevalec« same po sebi, vendar so ključni efektorji poti, ki jih uravnavajo številni geni tveganja za KVČB (*IL23R*, *STAT3*, *TYK2*, *RORC*, *FUT2*). Genetska predispozicija pogosto deluje prav preko sprememb v razvoju, signalizaciji ali funkciji teh celic (7). »

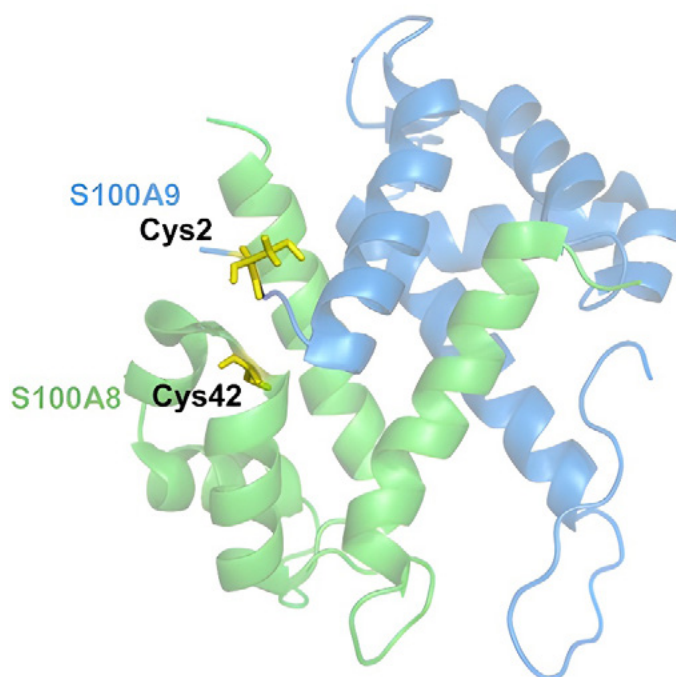
Ko se takšen neustrezen imunski odziv izmuzne iz nadzora, kronično vnetje preide v škodljivo stanje, ki se izraža kot bolezen (1, 7, 8).

Najpomembnejši klinično prepoznavni podskupini (podtipa) KVČB sta Crohnova bolezen (CB) in ulcerozni kolitis (UK) (1, 9, 10). Za obe je značilno vnetje črevesne sluznice, ki v primeru CB lahko poteka od ust do anusa in prizade ne vse strukture črevesne stene, medtem ko pri UC vnetni proces poteka predvsem na površini sluznice in zajema le debelo črevo (1). Za obe obliki so značilna obdobja aktivnih (vnetnih) in neaktivnih (nevnetnih) potekov bolezni v prebavilih in zunaj njih (1, 9, 10). Prav tako je v 10–20 % primerov težko opredeliti eno od obeh oblik bolezni (1, 9). Za odkrivanje CB in UC ne obstaja diagnostična metoda kot zlati standard, ki bi omogočala pravočasno odkritje in pravilno opredelitev bolezni. Zato je za prepoznavanje, oceno stanja in spremljanje KVČB zelo pomembno uporabiti celoten nabor diagnostičnih postopkov, vključno z anamnezo bolnika (prepoznavna simptomov), neinvazivne biokemijske preiskave (krvi in blata), mikrobiološke preiskave za izključitev bakterijskih okužb kot povzročiteljev vnetja, slikovne diagnostike (magnetna resonanca, kompjuterska tomografija, ultrazvok) in invazivne preiskave

(endoskopija z biopsijo) ter izsledke histoloških analiz po opravljeni biopsiji (1, 9, 10). Med pomembne neinvazivne metode odkrivanja/presejanja in spremljanja KVČB ter zgodnje prepoznavne ponovitve bolezni sodi določanje prisotnosti kalprotektina v blatu kot biološkega označevalca vnetnega procesa v črevesni sluznici (9–15).

KALPROTEKTIN

Kalprotektin je beljakovina iz družine proteinov S100, znana tudi kot MRP8/14 in S100A8/A9, ki se nahaja predvsem v citoplazmi granulocitov (nevtrofilcih), makrofagov in na površini monocitov (16, 17). S100 protein obsega skupino več kot 20 kalcij vezajočih proteinov, za katere je značilen tkivnospecifični odgovor. Proteini S100A8 (imenovani tudi: calgranulin A; mieloid povezani protein 8) in proteini S100A9 (calgranulin B; MRP14) predstavljajo glavni kalcij vezajočih proteinov v fagocitih. S100A9 obstaja v različnih oblikah in skupaj s S100A8 ob vezavi s kalcijem sestavljajo različne heterodimere in tetradimere, ki so poznane z izrazom kalprotektin (17) (Slika 1).



Slika 1: Struktura kalprotektina (povzeto po Korndörfer in sodelavci (17)).

Figure 1: Structure of calprotectin (adapted from Korndörfer et al. (17)).



Ob vnetnih procesih pride do aktivacije omenjenih imunskih celic naravne imunosti in sproščanja kalprotektina kot obrambnega odgovora na povzročitelje vnetja z antimikrobnim učinkom in sodelovanja pri celjenju nastalih poškodb tkiva pri različnih bolezenskih stanjih (pri KVČB, revmatskih boleznih, bakterijskih, nekaterih parazitskih okužbah in pri kolorektalnem raku). Vloga humanega kalprotektina pri antimikrobnem delovanju je keliranje metalov (Mn, Fe in Ca) v prisotnih mikrobih, kar onemogoči njihovo delovanje (15, 16).

KLINIČNI POMEN DOLOČANJA KALPROTEKTINA V BLATU

Kalprotektin je pomemben kazalnik vnetja, tako sistemskega kot lokalnega, in ga lahko zaznamo in določamo v različnih bioloških materialih. Povišane koncentracije kalprotektina v serumu oz. plazmi lahko zaznamo pri različnih boleznih (sistemske revmatske bolezni, infektivne bolezni), kjer je prisoten sistemski vnetni proces z udeležbo omenjenih imunskih celic (15). Posledično je diagnostična vrednost (specifičnost) kalprotektina kot biološkega označevalca KVČB v serumu v primerjavi z določanjem in uporabo kalprotektina v blatu manjša in se zato pri teh bolnikih kalprotektin v serumu ne določa.

Čeprav vzroki KVČB še danes niso čisto pojasnjeni, pa so številne raziskave omogočile boljše razumevanje nastanka bolezni, odkrivanja in spremljanja teh bolnikov. Dosedanje poznavanje patogeneze KVČB vključuje spoznanje o medsebojnem vplivu genov, okolja in imunskega sistema. Prisotni vnetni procesi vključujejo mehanizme prirojene in pridobljene imunosti in vplivajo na patološke spremembe črevesne sluznice (1, 7). Biološka zdravila, usmerjena proti citokinom, kot je dejavnik tumorske nekroze α (angl. *tumor necrosis factor α* , TNF α), ki se sprošča iz monocitov in makrofagov, ublažijo klinični potek bolezni KVČB, kar kaže, da so fagociti ključni v patofiziologiji bolezni (15, 16).

Različni sprožitelji vnetja, kot so citokini (npr. interleukin (IL)-1) ali bakterijski produkti (lipopolisaharidi), aktivirajo nevtrofilce, monocite in črevesne epitelne celice. S tem sti-

mulirajo specifično izločanje S100A8/S100A9 (kalprotektina) že med začetno fazo KVČB. Zlasti S100A8/S100A9, ki jih izločajo epitelne celice, lahko prispevajo k povišani koncentraciji kalprotektina v blatu že v začetni fazi KVČB. Vzporedno S100A8/S100A9 tudi sprožijo pozitiven mehanizem aktivacije makrofagov preko interakcije z receptorjem 4 (angl. *tool like receptor 4*, TLR4) ter endotelnih celic preko doslej neidentificiranega receptorja, kar povzroča ekspresijo endotelnih adezijskih molekul in pospešuje levkocite, da migrirajo in vnamejo črevesno tkivo. Aktivacija TLR4 na nevtrofilcih poveča vnetje s sproščanjem citokinov (IL-1, TNF α) in reaktivira kisikove molekule (1, 15, 16).

Zato kalprotektin s proteinskimi molekulami S100A8/S100A9 odraža vnetni odgovor imunskega sistema pri KVČB. Prav tako se pri vnetni aktivaciji granulocitov sprostijo proteini S100A12, ki dodatno stimulirajo aktivacijo granulocitov, kar vodi do sproščanja citokinov, kot so IL-1 in TNF α , in posledično do dodatnega sproščanja S100A12 iz granulocitov črevesne sluznice. Zato protein S100A12, ki prav tako veže kalcij, baker in cink, uravnava vnetje in imunski odziv ter se je v raziskavah potrdil kot visoko občutljiv in specifičen označevalec za ugotavljanje granulocitne aktivacije pri KVČB (1, 15, 16).

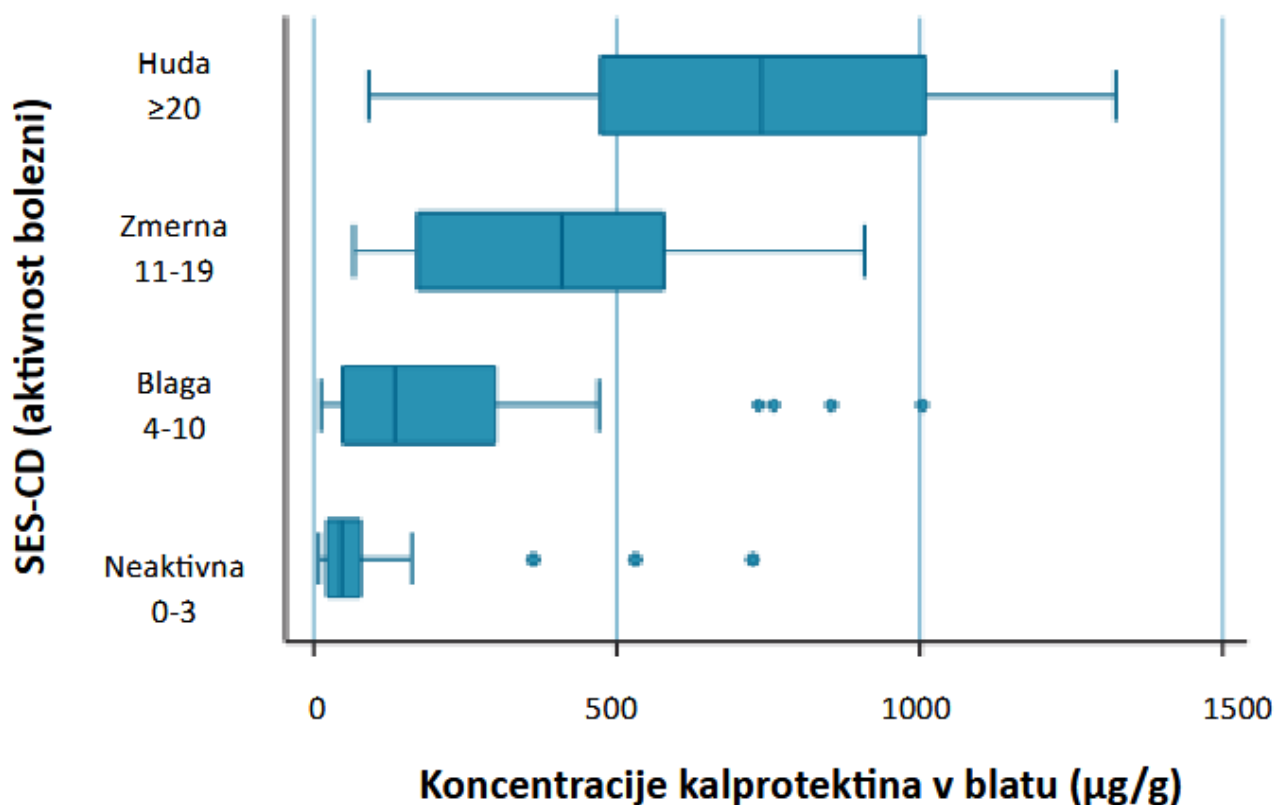
Določanje kalprotektina v blatu je zaradi dokazane neposredne povezave z vnetnim procesom v črevesju pomembnejše za odkrivanje in spremljanje KVČB kot njegovo določanje v serumu. Pri KVČB in ob prisotnem vnetju črevesne sluznice pride, poleg omenjenega sproščanja kalprotektina iz granulocitov, tudi do povečane prepustnosti črevesne sluznice zaradi vnetja in dodatnega prehajanja nevtrofilcev, makrofagov in monocitov v tkivo gastrointestinalnega trakta (GIT), zaradi česar pride do dodatnega povečanega sproščanja kalprotektina v lumen črevesja in v blato (1, 15, 16).

Koncentracija kalprotektina v blatu kaže dobro korelacijo s črevesnim vnetjem (aktivnostjo bolezni) in izsledki endoskopskih in histoloških preiskav (Slika 2) (18–23). Zato omogoča pomembno razlikovanje KVČB od sindroma razdražljivega črevesja (angl. *inflammatory bowel syndrome*, IBS) in od drugih boleznih GIT brez prisotnega vnetja črevesne stene in sluznice, in sicer pri enakih ali podobnih simptomih. KVČB je zaradi vnetja črevesne stene organska bolezen, medtem ko ima IBS funkcionalno patologijo zaradi motenj gibljivosti črevesja kot posledica najpogo-

steje psihičnih vzrokov (stres) (9, 10). Rezultati meta-analize, ki je zajemala 25 raziskav s skupno vključenimi 2822 bolniki s KVČB, so pokazali, da je ob upoštevanju mejni vrednosti 50 µg/g diagnostična občutljivost kalprotektina 85 %, njegova diagnostična specifičnost 75 % ter površina pod krivuljo ROC (angl. *receiver operating characteristic curve*), ki prikazuje razmerje med resnično in lažno pozitivnimi rezultati pri različnih mejnih vrednostih klasifikacijskega modela in je podana s kratico AUC (angl. *area under the curve*) 0,88. Dodatno so ugotovili, da je njegova diagnostična vrednost pri UC še višja (občutljivost 87,3 % in specifičnost 77,1 %) (21). Njegova diagnostična vrednost je pri UC višja, ker je vnetje omejeno na kolon in prihaja do intenzivnejše aktivnosti granulocitov na površini sluznice in neposrednega prehoda kalprotektina v

blato, medtem ko je pri CB vnetni proces lahko pri določenih podtipih omejen le na tanko črevo in v globino celične stene, kjer je sproščanje kalprotektina zaradi slabše aktivacije nevtrofilcev in prehoda v blato v manjšem obsegu (9, 10, 21). V teh primerih imamo zato lahko lažno nizko vrednost označevalca (kalprotektina v blatu), kljub prisotnemu vnetnemu procesu.

Zaradi dokazane klinične uporabnosti in odzivnosti na vnetni proces v črevesju je kalprotektin med biološkimi označevalci pridobil pomembno vlogo. Tako različne smernice priporočajo določanje kalprotektina v blatu kot del diagnostičnega postopka za CB in UK ter za njuno spremljanje in zdravljenje (9, 10).



Slika 2: Koncentracije kalprotektina v blatu v odvisnosti od aktivnosti Crohnove bolezni (povzeto po Schoepfer in sodelavci (8)).

Figure 2: Fecal calprotectin concentrations in relation to Crohn's disease activity (adapted from Schoepfer et al. (8)).



PREDNOSTI DOLOČANJA BIOLOŠKIH OZNAČEVALCEV (KALPROTEKTINA) V BLATU

Pri črevesnih simptomih sta ključna zgodnje prepoznavanje in ločevanje med organskimi vnetnimi boleznimi, kot je KVČB, in nevnetnimi funkcionalnimi boleznimi, kot je IBS. Večina bolnikov s KVČB ima ponavljajoča se obdobja zagona bolezni ali je bolezen ves čas aktivna (1, 9, 10). Ponovitve črevesnega vnetja je bilo v preteklosti možno ugotoviti le z endoskopijo. Zaradi invazivnosti, potrebe po pripravi črevesa in slabše sprejemljivosti za bolnika, še zlasti v populaciji otrok, endoskopija v današnjem času ni najprimernejša metoda za rutinsko ugotavljanje zagonov.

V ta namen so zato primernejše neinvazivne laboratorijske metode določanja občutljivih bioloških označevalcev v krvi ali v blatu. Uporaba vnetnih bioloških označevalcev je še posebej pomembna v obdobju sicer kliničnega mirovanja bolezni, ko je ključnega pomena prav zgodnja napoved ponovnega zagona bolezni, ki se lahko kaže samo na molekularni ravni v povišanih koncentracijah bioloških označevalcev (kalprotektina) (9–11).

Pomembna laboratorijska vnetna parametra, med drugim tudi za spremljanje vnetja GIT, sta C-reaktivni protein (CRP) in sedimentacija eritrocitov (ESR, angl. *erythrocyte sedimentation rate*), ki ju določamo iz seruma oz. iz krvnih vzorcev. Vendar sta značilno zvišana le v akutnem stanju bolezni; zanju pa je značilna tudi manjša diagnostična specifičnost, saj se odzivata na prisotne druge vnetne procese (bakterijske okužbe, revmatske bolezni) v telesu (18). Zato so seveda potrebni za črevesje bolj specifični označevalci, ki omogočajo opredelitev in spremljanje vnetja le v črevesju. Biološki označevalci, ki se iz prizadete vnetne črevesne sluznice neposredno in kontinuirano izločajo v blato, omogočajo boljše spremljanje vnetnega procesa v črevesni steni in so zato bolj primerni tudi za opredelitev stanja in spremljanja ponovitve bolezni ter uspešnosti zdravljenja.

Številne raziskave dokazujejo pomembno klinično uporabnost bioloških označevalcev (kalprotektina, laktoferina) v blatu (15–24). Pri črevesnih simptomih je nujno prepoznati vzroke ter prisotnost vnetja. Proteini, ki se izločajo iz nevtrofilcev, monocitov in epitelnih celic v črevesju, so pomembni označevalci črevesnih vnetij in poškodb na sluznici. Zato je kalprotektin v blatu lahko učinkovito orodje za zgodnjo prepoznavo bolezni, še preden se vnetje dokončno razvije in izrazi z značilnimi histološkimi spremembami in kliničnimi znaki. Zaradi svoje visoke negativne napovedne vrednosti se lahko uporablja kot presejalni test za izključitev KVČB. Rezultati metaanalize 30 prospektivnih študij so pokazali, da ima koncentracija kalprotektina, nižja od 50 µg/g, 95 % občutljivost, 91 % specifičnost in 99 % negativno napovedno vrednost za izključitev KVČB, pri čemer je bila občutljivost višja od ostalih bioloških označevalcev vnetja (14). Uporaba kalprotektina pri prepoznavi KVČB in ločevanju od IBS je zlasti pomembna pri otrocih, saj je določitev fekalnega kalprotektina neinvazivna, hkrati pa se prepreči potreba po hospitalizaciji in se izogne tveganjem pri splošni anesteziji, ki je praviloma potrebna pri endoskopiji. Koncentracija kalprotektina v blatu je pomembna pri določanju aktivnosti bolezni, kar potrjujejo številne študije, ki so dokazale, da izmerjene koncentracije pri bolnikih dobro sovpadajo z indeksi aktivnosti bolezni in z izsledki bolj invazivnih endoskopskih preiskav (18–22). Prav tako pa lahko z določitvijo koncentracije kalprotektina v blatu posredno opredelimo obseg prizadete črevesne sluznice in s tem z zgodnejšo obravnavo bolnika ter z ustreznim zdravljenjem zmanjšamo tveganje za hospitalizacijo ali celo operacijo (18–23).

Kalprotektin, ki ga določamo na neinvaziven način v vzorcih blata, je zato odličen označevalec črevesnih vnetnih bolezni, saj zrcali aktivnost vnetja v črevesju z visoko diagnostično specifičnostjo in občutljivostjo (13, 14, 18–24). Pomembno pa je, da ga lahko določamo s testi in metodami, ki so enostavne za izvedbo, natančne in ponovljive. Prav zaradi tega je bila v zadnjem obdobju uvedena vrsta imunskih testov za merjenje kalprotektina; od hitrih testov, POCT in ELISA vse do avtomatiziranih metod določanja (25–30).



METODE DOLOČANJA KALPROTEKTINA V BLATU

Hitri test POCT (angl. *point of care testing*) ali testiranje ob pacientu

Hitri test POCT je uporaben tako za zdravnike za neposredno izvedbo testa ob bolniku, ob postelji ali v ambulanti kot za (kronične) bolnike, ki lahko sami izmerijo vrednost kalprotektina doma (9, 10, 26, 28). Test je enostaven za uporabo, vendar je nujno, da je nelaboratorijsko osebo s strani laboratorijskih strokovnjakov ustrezno poučeno o izvajanju v skladu z navodili proizvajalca, o kontroli kakovosti ter o interpretaciji in omejitvah testa (31). Izvedba testa POCT zahteva vzorec blata, ki ga je pred nanosom na kromatografske ploščice treba ustrezno ekstrahirati s pomočjo ustreznih pripomočkov in epruvet, ki vsebujejo pufer. Metoda je imunokromatografska, ki temelji na t. i. »sendvič« principu. Prisotna protitelesa proti antigenim komponentam kalprotektina, nanesena na reagentni kromatografski ploščici, reagirajo s kalprotektinom, prisotnim v ekstrahiranem vzorcu, in tvorijo imunski kompleks, ki ob dodatku z barvilom označenih sekundarnih protiteles tvori obarvan trojni imunski kompleks in prisotno vidno barvno linijo. Rezultati so običajno kvalitativni ali semikvantitativni ter so na voljo v nekaj minutah. Hitri testi, ob ustreznih zagotovljeni kakovosti in izvedbi, lahko služijo kot orientacijska presejalna metoda, namenjena predvsem za spremljanje KČVB bolnikov na domu (možne ponovitve aktivne bolezni) oz. za hitro diagnosticiranje oz. razlikovanje med KČVB in nevnetnimi procesi, kot je IBS v ambulantah (29, 30).

ELISA test (encimsko-immunski test na trdnem nosilcu)

ELISA je najbolj pogosto uporabljen kvantitativen test za merjenje koncentracije kalprotektina v laboratorijih. Odlikujeta ga dobra analitična natančnost in točnost, vendar je izvedba dolgotrajnejša (več ur) in se zaradi izkoristka testa običajno izvaja serijsko (25, 29). Kalprotektin, prisoten v razredčenih vzorcih ekstrakta blata, se veže s specifični-

mi poliklonskimi protitelesi, usmerjenimi proti antigenom kalprotektina, ki so naneseni na površino plastične mikrotiterne plošče ELISA. Na ta kompleks se nato veže protitelo, označeno z encimom, ki katalizira spremembo dodanega substrata v obarvani produkt. Nastala intenziteta barve je sorazmerna koncentraciji vezanega kalprotektina. Koncentracija kalprotektina v blatu se ob uporabi priloženih kalibratorjev–standardov izračuna iz umeritvene krivulje. Neprimerna izvedba ekstrakcije in testa (pipetiranje, inkubacijski časi, neprimerna temperatura) ter kontaminacija reagentov lahko vplivajo na napačne rezultate (25, 29).

Avtomatizirane metode določanja

Zaradi ustrezne klinične uporabnosti kalprotektina in potreb po pogostem določanju njegovih koncentracij v vzorcih blata bolnikov so različni proizvajalci razvili tudi različne avtomatizirane metode. Večina jih temelji na principu imunskih testov in nastanka imunskih kompleksov, ki jih lahko merimo turbidimetrično, z merjenjem fluorescenca ali kemiluminiscence (32, 33, 34). Metoda, ki je trenutno med pomembnejšimi in zagotavlja ustrezne rezultate v primerjavi z že uveljavljenimi ELISA testi, je direktna sendvič kemiluminiscenčna imunska metoda (CLIA), ki ob uporabi dveh vrst monoklonskih protiteles omogoča kvantitativno merjenje kalprotektina v blatu. Metoda zahteva ustrezno predpripravo vzorcev blata. Kalprotektin je treba v skladu z navodili proizvajalca po odvzemu blata s pomočjo ustreznih in v ta namen razvitih aplikatorjev najprej iz blata ekstrahirati z uporabo ustreznih ekstrakcijskih epruvet s pufrom in pri določenih testih tudi z ustreznim stresalnikom (33). Tako ekstrahiran vzorec se vstavi v analizator, kjer potekajo stopenjske reakcije. Med prvo inkubacijo se kalprotektin iz vzorca veže s paramagnetnimi delci, prevlečenimi z monoklonskimi protitelesi, ki specifično prepoznajo heterokompleksni antigen kalprotektina. Sledi spiranje, ki odstrani vse nevezane delce. Nato se dodajo sekundarna monoklonska protitelesa, konjugirana z izoluminolom, ki med inkubacijo označijo predhodno nastali primarni imunski kompleks. Nevezani konjugat se odstrani pri drugem koraku spiranja. Po dodajanju aktivacijskega reagenta steče kemiluminiscenčna reakcija, ki omogoča razvoj kemiluminiscenčnega-svetlobnega »

signala, katerega meritev je premo sorazmerna s koncentracijo kalprotektina v blatu (33). Prednosti avtomatiziranega postopka v primerjavi z ELISA so hitrejša določitev, boljša ponovljivost in točnost meritev, možnost sprotnega določanja, tudi posamično in brez nujne izvedbe v seri-

ji, pri čemer je izvedba testov v primerjavi z ELISA stroškovno primerljiva, odvisno od izbranih proizvajalcev na trgu. Razlike in primerjava metod za določanje kalprotektina v blatu so podane v Tabeli 1.

Tabela 1: Primerjava metod določanja kalprotektina v blatu.

Table 1: Comparison of methods for determining calprotectin in feces.

Metoda	POCT	ELISA	Avtomatizirani testi
Določitev (Kvali/kvanti)	(Semi) kvantitativen test (merilno območje)	Kvantitativen test	Kvantitativen test (merilno območje)
Princip metode	Imunokromatografski test	Encimsko imunski test (ELISA)	Imunokemijski test
Vzorčenje blata	Uporaba aplikatorjev	Tehtanje blata s postopkom predpriprave, uporaba aplikatorjev	Uporaba aplikatorjev, direkten prenos na analizator
Merjenje	Vizuelno odčitavanje ali s pomočjo čitalcev	Spektrofotometrična določitev	Turbidimetrična, CLIA metoda
Čas izvedbe	Krajši čas izvedbe (10 min)	Daljši čas izvedbe (3h), določanje v serijah	Krajši čas izvedbe (30 min, možno sprotno določanje)
Analitična vrednost	Slabša točnost, ponovljivost	Točnost in ponovljivost odvisna od analitika, testa	Večja točnost in ponovljivost, neodvisna od analitika

VPLIVI NA REZULTATE

Analitična in diagnostična zanesljivost posameznega parametra, kot je kalprotektin, je odvisna od več dejavnikov, ki jih je treba poznati in obvladovati ter z ustreznimi verifikacijskimi postopki tudi preveriti, določiti in spremljati. Diagnostično točnost parametra opredelimo z diagnostično specifičnostjo in občutljivostjo, ki definirata moč parametra za ločitev obolelih od zdravih preiskovancev. Analitično zanesljivost pa opredelimo z analitično občutljivostjo, natančnostjo in ponovljivostjo meritev, ki jih lahko spremljamo z izvajanjem notranje in zunanje kontrole kakovosti (z

merjenjem znanih koncentracij kalprotektina v okviru pričakovanih odstopanj).

Prav tako se je treba zavedati drugih vplivov na dobljene rezultate, ki so zelo kompleksni in lahko vodijo do odstopanj od realnih vrednosti (25–27). Na ustreznost rezultatov in določitev kalprotektina v blatu lahko vplivajo vnos hrane in morebitnih zdravil, (ne)ustrezni postopki odvzema vzorca, izbor analitske metode in izvedba analize ter interpretacija dobljenih rezultatov. Dejavnike vpliva uvrščamo glede na fazo diagnostičnega postopka, v katerega so vpleteni, na predanalitične, analitične in poanalitične dejavnike.



Predanalitična faza

Vzorec blata in zbiranje

Vzorec blata se mora zbrati v čisto posodico brez konzervansov in jo neprodušno zapreti, da se prepreči kakršna koli kontaminacija. V ta namen se morajo uporabiti standardizirane posodice (vsebniki) za odvzem blata z žličko, kar omogoča ravnanje z blatom na higienečen in varen način. Z žličko se običajno nanese manj kot 5 g blata, medtem ko v posodico lahko zberemo do 60 g blata. Količina vzorca, ki je potrebna za analizo, pa je običajno manjša, in sicer do 100 mg. Najpomembnejše pri zbiranju blata je preprečiti kakršno koli kontaminacijo s tekočinami (npr. vodo, urinom ...), da ne bi prišlo do neželenega redčenja vzorca. Ugotovljeni so bili celo vplivi konsistence blata na samo analizo in na vrednost kalprotektina, pri čemer zelo trdega blata sploh ni priporočljivo analizirati. Bolj kot je nativni vzorec tekoč (driska), z več prisotne sluzi, višja je koncentracija kalprotektina. Pomembno je poudariti, da je omenjena tekoča konsistenca blata pogosta pri bolnikih z aktivno obliko bolezni (25, 26).

Čas odvzema vzorca pri spremljanju bolezni

Številne raziskave so proučevale vpliv časa odvzema vzorca blata na izmerjeno koncentracijo kalprotektina. Primerjali so dobljene vrednosti v vzorcih, ki so jih bolniki zbirali tudi do 4-krat v roku 24 ur. V enem dnevu lahko vrednosti kalprotektina zanihajo do 50 %. Večja nihanja so opazna pri posameznikih z višjimi izmerjenimi koncentracijami kalprotektina. V večini primerov (44 %) je najvišjo vrednost koncentracije dosegel vzorec, ki je bil zbran drugič v dnevu; prav tako je bila pri teh vzorcih zaznana najvišja variabilnost izmerjenih koncentracij, ki pa ni vplivala na opredelitev stanja (aktivnosti) bolezni. Prav tako so ugotovili, da čim daljši je čas med enim in drugim odvzemanjem, tem višja je vrednost koncentracije kalprotektina v naslednjem (drugem) vzorcu, saj je s tem bilo omogočeno daljše kontinuirano sproščanje kalprotektina v lumen črevesja in v blato (25). Zato je priporočljivo, da se pri spremljanjih in nadzoru bolezni bolnika odvzem vzorca opravi vedno ob približno enakih urah. Za analizo je najbolje upora-

biti vzorec prvega jutranjega blata. Tako pridobimo vzorec z višjo koncentracijo kalprotektina in s tem zmanjšamo možnost lažno negativnega rezultata.

Stabilnost vzorca

Čas med vzorčenjem blata in izvedbo analize ter pravilno shranjevanje vzorcev pomembno vplivata na dobljene rezultate. Zato je vzorce blata, kljub sorazmerni stabilnosti molekule kalprotektina (odporen na bakterijsko razgradnjo), treba hraniti v hladilniku pri 2–8 °C in testirati čim prej po njihovem prejemu. Za zagotovitev ustreznih rezultatov je sprejemljivo shranjevanje pri sobni temperaturi do 6 ur ali pri 2–8 °C do 72 ur. Če vzorci ne bodo testirani v roku 72 ur, pa jih je treba hraniti pri temperaturi –20 °C, pri kateri so obstojni do 12 tednov (25).

Analitična in poanalitična faza

Za zanesljive rezultate je treba dosledno upoštevati navodila za delo in rokovanje s testom ali avtomatiziranimi metodami/sistemom po navodilu proizvajalca. Prav tako je nujno potrebno zagotavljanje notranje in zunanje kontrole kakovosti izvajanja analiz in uporabljenih testov. Upoštevati pa je treba tudi možne neposredne ali posredne vplive na analizo in dobljene rezultate, kar omogoči ustrezno interpretacijo rezultatov.

Bolniki, ki jemljejo nesteroidna protivnetna zdravila, imajo lahko povišane vrednosti kalprotektina. Ker je kalprotektin prisoten v citoplazmi nevtrofilcev, obstaja možnost povišanih rezultatov pri merjenju vzorcev blata, v katerih je prisotna večja količina krvi (35). Lažno negativni rezultati se lahko pojavijo pri bolnikih, ki imajo granulocitopenijo in pri razredčenih tekočih vzorcih blata (26).

V Tabeli 2 so navedeni dejavniki/stanja, ki vplivajo na sproščanje kalprotektina v blato in pričakovane koncentracije kalprotektina glede na stanje/bolezen bolnika.



Tabela 2: Dejavniki vpliva in okvirne pričakovane zvišane vrednosti kalprotektina v blatu (26).

Table 2: Influencing factors and approximate expected elevated fecal calprotectin levels (26).

Bolezni prebavil	Pričakovane vrednosti kalprotektina [$\mu\text{g/g}$]
Polipi debelega črevesja	1–118
Divertikularna bolezen debelega črevesja	15–60
Krvavitev iz prebavil	20–429
Ciroza jeter	21–357
Sindrom razdražljivega črevesja	16–294
Mikroskopski kolitis	130–480
ZDRAVILA	
Nesteroidna protivnetna zdravila	5–520
ŽIVLJENJSKI SLOG	
Debelost	5–185
Telesna nedejavnost	25–60
DRUGO	
Starost < 9 let	18–213
Starost > 65 let	14–118
Revmatološke bolezni	14–513
Stoma	15–1130

Zvišana kalprotektina v blatu ni specifična za KVČB in jo najdemo tudi pri drugih boleznih ali stanjih:

- driske (višje koncentracije so bile ugotovljene večkrat pri bakterijski kot pri virusni driski) (25);
- celiakija kot še en primer bolezni, pri kateri opazamo višje koncentracije kalprotektina, vrednost pa je odvisna od stopnje bolezni, pri čemer so najvišje koncentracije ugotovljene pri na novo ugotovljeni celiakiji (27);
- divertikularna bolezen debelega črevesa (Tursi in sodelavci so poročali o visokih vrednostih kalprotektina v primerjavi z zdravimi posamezniki (36), poleg tega pa so poročali, da so vrednosti > 60 $\mu\text{g/g}$ povezane z akutnimi zapleti divertikularne bolezni (37);

- razraščanje bakterij v tankem črevesju (9, 10, 26);
- neoplazme (9, 10, 26).

INTERPRETACIJA REZULTATOV

Interpretacija izmerjenih vrednosti kalprotektina v blatu bi morala upoštevati vse dejavnike, ki lahko vplivajo na dobljene rezultate. Prav tako je potrebno oceniti usklajenost rezultatov kalprotektina z morebitnimi endoskopskimi in histološkimi izsledki. Če te usklajenosti ne moremo potrditi ali če obstajajo morebitni dejavniki (npr. zdravila), ki lahko vplivajo na raven koncentracije kalprotekti- »

na, je smiselno čez nekaj tednov meritve ponoviti (9, 10). Do danes še ni splošno sprejete mejne vrednosti kalprotektina za razlikovanje med aktivnostjo in remisijo bolezni. Prav tako je problem pomanjkljive standardizacije metod/testov, ki bi omogočali enake/primerljive rezultate ne glede na uporabljeno metodo (38). Harmonizacija testov in uporaba enakih primarnih standardov za kalprotektin bi omogočila lažjo interpretacijo dobljenih rezultatov, še posebej pri prehajanju bolnikov med ustanovami, ki uporabljajo različne teste (25, 30). Ker bolniki s KVČB nihajo med aktivno in neaktivno fazo bolezni, je pri interpretiranju dobljenih rezultatov to treba tudi upoštevati. Pri tem orientacijske referenčne vrednosti, priporočene od proizvajalca, služijo le kot okvirno vodilo, interpretacija pa se prepušča zdravniku, ki posameznika spremlja dolgo, ob upoštevanju njegovih kliničnih znakov in zgodovine rezultatov teh ter drugih preiskav. Pomembno je upoštevati tudi specifičnost populacije, ki ji določamo kalprotektin. Tako so na osnovi izsledkov raziskav ugotovili določene omejitve pri otrocih, starih do 2 let, ki imajo pričakovano rahlo povečano koncentracijo kalprotektina v blatu (11, 26). V eni od raziskav priporočajo mnogo višje mejne vrednosti pri starosti od 1 do 6 mesecev 538 $\mu\text{g/g}$, od 6 mesecev do 3 let 214 $\mu\text{g/g}$ in 75 $\mu\text{g/g}$ za otroke, stare 3 do 4 leta. Za starejše otroke se upošteva mejna vrednost 50 $\mu\text{g/g}$ kot za odrasle (39).

Treba se je zavedati, da rezultat kalprotektina lahko pomembno vpliva na nadaljnjo obravnavo bolnika. Pri pozitivnem rezultatu (zvišani vrednosti) lahko sledi napotitev bolnika na nadaljnje preiskave (endoskopijo) ali pa se predpiše zdravljenje z zdravili. Negativen rezultat (znižana koncentracija) pa lahko pomeni izključitev organske GIT bolezni ali nakazuje remisijo bolezni. Za oceno bolnikovega stanja, še posebej KVČB, so zato pomembni kvantitativni rezultati, ki jih dobimo z uporabo zanesljivejših testov ELISA in avtomatiziranih metod. Pri večini hitrih POCT testov namreč dobimo zgolj kvalitativni (pozitiven ali negativen) rezultat ali le semi-kvantitativen rezultat, ki ga vrednotimo ob upoštevanju predvidenih mejnih vrednosti, priporočenih s strani proizvajalcev (28–30). Ker lahko obstaja velika raznolikost rezultatov glede na uporabljene različne analizne metode in teste ter tudi glede na s strani proizvajalcev priporočene različne mejne vrednosti, je vsekakor priporočljivo, da se pri posameznem bolniku za namen spremljanja

poteka bolezni izvajajo serijske meritve kalprotektina vedno z enako metodo in na istih analizatorjih oz. testih ELISA, po možnosti v istem laboratoriju (16, 25, 34, 38).

Referenčne vrednosti

Referenčna območja in orientacijske vrednosti za vrednotenje rezultatov izmerjenih koncentracij kalprotektina se lahko razlikujejo tako od namena uporabe (presejanje populacije za izključitev ali odkrivanje KVČB, postavitve diagnoze bolezni, spremljanje akutne faze ali remisije bolezni, odkrivanje drugih bolezni), kot tudi od izbrane metode in od proizvajalca.

Kljub pomanjkljivi harmonizaciji testov in razlikam v izmerjenih vrednostih kalprotektina z različnimi kvantitativnimi metodami pa so priporočene orientacijske vrednosti s strani različnih proizvajalcev, vsaj za opredelitev ključnih stanj, podobne. Tako je okvirna mejna vrednost z visoko negativno napovedno vrednostjo za razlikovanje IBS od KVČB, ki jo navaja večina proizvajalcev, 50 $\mu\text{g/g}$. To velja tako za odrasle kot za pediatrično populacijo nad 3 leti (9, 10). Kot že omenjeno, pa so pričakovane vrednosti pri otrocih, mlajših od 3 let, lahko višje (11, 26, 39). Pri bolnikih z značilnimi vnetnimi procesi v črevesju je pri večini razpoložljivih testov koncentracija večja od 120 $\mu\text{g/g}$ (10–12). Po evropskih smernicah (ECCO-ESGAR Guideline for Diagnostic Assessment in IBD) in na osnovi opravljenih meta analiz je priporočena mejna vrednost za doseg visoke diagnostične vrednosti za opredelitev KVČB tako pri odraslih kot pri otrocih 150 $\mu\text{g/g}$ (9, 10, 11, 12). Vrednosti nad 150–250 $\mu\text{g/g}$ so pogosto povezane z aktivnim KVČB, vrednosti 50–150 $\mu\text{g/g}$ so pogoste v remisiji ali ob začetnem ponovnem poslabšanju in predstavljajo sivo cono, kjer je treba meritve ponoviti ter interpretirati rezultate v povezavi s klinično sliko (9, 10).

Treba se je zavedati, da so dejanske vrednosti, ki pri posameznem kroničnem bolniku nakazujejo stanje bolezni (akutna oblika KVČB, remisija) ali ustreznost terapije, zelo odvisne od samega bolnika in njegovega imunskega odziva, zato je interpretacija dobljenih rezultatov v tem oziru prepuščena zdravniku, ki bolnika pozna (klinično kot izsledke drugih preiskav) in spremlja njegove koncentracije kalprotektina skozi daljše obdobje.



ZAKLJUČEK

Zaradi visoke prevalence in naraščajoče incidence GIT bolezni, še posebej KVČB, ter zniževanja povprečne starosti teh bolnikov, ki smo ji priča v današnji dobi, sta odkrivanje in uporaba enostavnih in neinvazivnih diagnostičnih metod ključnega pomena. Kalprotektin v blatu se je kot kazalnik vnetnega procesa v črevesju izkazal kot odličen parameter, ki podpira invazivne diagnostične postopke. Je pomembno orodje pri ločevanju organskih črevesnih bolezni od funkcionalnih, pri spremljanju aktivnosti ali ponovitev bolezni ter za oceno uspešnosti zdravljenja. Za določanje so bili razviti različni testi in metode določanja. V laboratorijih se uporabljajo predvsem testi ELISA, avtomatizirane turbidimetrične in kemiluminiscenčne imunске metode (CLIA), ki ob zagotavljanju ustrezne kontrole kakovosti omogočajo zanesljive kvantitativne rezultate. V porastu pa je tudi razvoj hitrih testov, ki so uporabni tako pri neposredni klinični obravnavi v ambulantah kot v domačem okolju za spremljanje kronične bolezni.

Ob uporabi kalprotektina kot biološkega označevalca so izrednega pomena tudi poznavanje pred-analitičnih dejavnikov (ustrezno vzorčenje in shranjevanje vzorcev blata), poznavanje in upoštevanje omejitev uporabljenih metod za določanje in različnih vplivov na dobljene rezultate, ki omogočajo ustrezno interpretacijo ter tako zagotavljajo pravo diagnostično vrednost kalprotektina.

Določanje kalprotektina v blatu v današnjem času predstavlja veliko pomoč tako zdravnikom kot pacientom pri obravnavi in obvladovanju KVČB.

LITERATURA

- Calvez V, Puca P, Di Vincenzo F, Del Gaudio A, Bartocci B, Murgiano M, et al. Novel insights into the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Biomedicines*. 2025; 13(2):305.
- Rosen MJ, Dhawan A, Saeed SA. Inflammatory bowel disease in children and adolescents. *JAMA Pediatr*. 2015;169(11):1053–60.
- Wang R, Li Z, Liu S, Zhang D. Global, regional and national burden of inflammatory bowel disease in 204 countries and territories from 1990 to 2019: a systematic analysis based on the Global Burden of Disease Study 2019. *BMJ Open*. 2023;13(3):e065186.
- Khan R, Kuenzig ME, Benchimol EI. Epidemiology of pediatric inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am*. 2023;52(3):483–496.
- Caron B, Honap S, Peyrin-Biroulet L. Epidemiology of inflammatory bowel disease across the ages in the era of advanced therapies. *J Crohns Colitis*. 2024;18(Supplement_2):ii3–15.
- Kaplan GG, Windsor JW. The four epidemiological stages in the global evolution of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2021;18(1):56–66.
- Yao X, Ma K, Zhu Y, Cao S. Innate lymphoid cells in inflammatory bowel disease. *Cells*. 2025;14(11):825.
- Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2007;448(7152):427–34.
- Maaser C, Sturm A, Vavricka SR, Kucharzik T, Fiorino G, Annese V, et al. ECCO-ESGAR guideline for diagnostic assessment in IBD Part 1: Initial diagnosis, monitoring of known IBD, detection of complications. *J Crohns Colitis*. 2019;13(2):144–64.
- Turner D, Ruemmele FM, Orlanski-Meyer E, Griffiths AM, de Carpi JM, Bronsky J, et al. Management of paediatric ulcerative colitis, Part 1: Ambulatory care-an evidence-based guideline from European Crohn's and Colitis Organization and European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2018;67(2):257–91. Erratum in: *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2020;71(6):794.
- Heida A, Park KT, van Rhee PF. Clinical utility of fecal calprotectin monitoring in asymptomatic patients with inflammatory bowel disease: a systematic review and practical guide. *Inflamm Bowel Dis*. 2017;23(6):894–902.
- Fengming Y, Jianbing W. Biomarkers of inflammatory bowel disease. *Dis Markers*. 2014;2014:710915.
- Caviglia GP, Pantaleoni S, Touscoz GA, Adriani A, Rosso C, Smedile A, et al. Fecal calprotectin is an effective diagnostic tool that differentiates inflammatory from functional intestinal disorders. *Scand J Gastroenterol*. 2014; 49(12):1419–24.
- Lin JF, Chen JM, Zuo JH, Yu A, Xiao ZJ, Deng FH, et al. Meta-analysis: fecal calprotectin for assessment of inflammatory bowel disease activity. *Inflamm Bowel Dis*. 2014;20(8):1407–15.
- Jukic A, Bakiri L, Wagner EF, Tilg H, Adolph TE. Calprotectin: from biomarker to biological function. *Gut*. 2021;70(10):1978–1988.
- Pathirana WGW, Chubb SP, Gillet MJ, Vasikaran SD. Faecal Calprotectin. *Clin Biochem Rev*. 2018;39(3):77–90.
- Korndörfer IP, Brueckner F, Skerra A. The crystal structure of the human (S100A8/S100A9)₂ heterotetramer, calprotectin, illustrates how conformational changes of interacting alpha-helices can determine specific association of two EF-hand proteins. *J Mol Biol*. 2007;370(5):887–98.
- Schoepfer AM, Beglinger C, Straumann A, Trummel M, Vavricka SR, Bruegger LE, et al. Fecal calprotectin correlates more closely with the Simple Endoscopic Score for Crohn's disease (SES-CD) than CRP, blood leukocytes, and the CDAI. *Am J Gastroenterol*. 2010;105(1):162–9.
- Nakov R, Nakov V, Gerova V, Tankova L. Fecal calprotectin correlates well with endoscopic activity in ulcerative colitis patients. *J Gastrointest Liver Dis*. 2018;27(4):473–4.



20. Rokkas T, Portincasa P, Koutroubakis IE. Fecal calprotectin in assessing inflammatory bowel disease endoscopic activity: a diagnostic accuracy meta-analysis. *J Gastrointest Liver Dis.* 2018;27(3):299–306.
21. Levine A, Koletzko S, Turner D, Escher JC, Cucchiara S, et al. ESPGHAN revised porto criteria for the diagnosis of inflammatory bowel disease in children and adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2014;58(6):795–806.
22. Lin JF, Chen JM, Zuo JH, Yu A, Xiao ZJ, Deng FH, et al. Meta-analysis: fecal calprotectin for assessment of inflammatory bowel disease activity. *Inflamm Bowel Dis.* 2014;20(8):1407–15.
23. Lozoya Angulo ME, de Las Heras Gómez I, Martínez Villanueva M, Noguera Velasco JA, Avilés Plaza F. Faecal calprotectin, a useful marker in discriminating between inflammatory bowel disease and functional gastrointestinal disorders. *Gastroenterol Hepatol.* 2017;40(3):125–31.
24. Lasson A, Stotzer PO, Öhman L, Isaksson S, Sapnara M, Strid H. The intra-individual variability of faecal calprotectin: a prospective study in patients with active ulcerative colitis. *J Crohns Colitis.* 2015;9(1):26–32.
25. D'Amico F, Rubin DT, Kotze PG, Magro F, Siegmund B, Kobayashi T et al. International consensus on methodological issues in standardization of fecal calprotectin measurement in inflammatory bowel diseases. *United European Gastroenterol J.* 2021;9(4):451–60.
26. Lężyk-Ciemniaka E, Tworkiewicz M, Wilcsynska D, Szaflarska-Poplawskab A, Krogulskaa A. Usefulness of testing for fecal calprotectin in pediatric gastroenterology clinical practice. *Med Princ Pract.* 2021;30(4):311–9.
27. Balamtekin N, Baysoy G, Uslu N, Orhan D, Akçören Z, Özen H, et al. Fecal calprotectin concentration is increased in children with celiac disease: relation with histopathological findings. *Turk J Gastroenterol.* 2012;23(5):503–8.
28. Damms Machado A, Bischoff SC. Validation and clinical significance of a new calprotectin rapid test for the diagnosis of gastrointestinal diseases. *Int J Colorectal Dis.* 2008;23(10):985–92.
29. Coorevits L, Baert FJ, Vanpoucke HJ. Faecal calprotectin: Comparative study of the Quantum Blue rapid test and an established ELISA method. *Clin Chem Lab Med.* 2013;51(4):825–31.
30. Rogler G, Aldeguer X, Kruis W, Lasson A, Mittmann U, Nally K, et al. Concept for a rapid point-of-care calprotectin diagnostic test for diagnosis and disease activity monitoring in patients with inflammatory bowel disease: Expert clinical opinion. *J Crohns Colitis.* 2013;7(8):670–7.
31. Prezelj M, Bratož S. Priporočila za organiziranje in izvajanje laboratorijskih testov ob pacientu (POCT - Point of Care Testing). Ljubljana: Slovensko združenje za klinično kemijo in laboratorijsko medicino (SZKKLM); 2014.
32. Fukunaga S, Kuwaki K, Mitsuyama K, Takedatsu H, Yoshioka S, Yamasaki H, et al. Detection of calprotectin in inflammatory bowel disease: Fecal and serum levels and immunohistochemical localization. *Int J Mol Med.* 2018;41(1):107–18.
33. Castiglione V, Berodes M, Lukas P, Louis E, Cavalier E, Lutteri L. New faecal calprotectin assay by IDS: Validation and comparison to DiaSorin method. *Diagnostics (Basel).* 2022;27;12(10):2338.
34. Maesa JM, Martin S, Elena C, Gallego AM, Perez-Perez A. Comparison of fecal calprotectine determination with turbidimetry and chemiluminescence. *Clin Chim Acta.* 2019;493:S30.
35. Vavricka SR, Heinrich H, Buetikofer S, Breitenmoser F, Burri E, Schneider-Yin X, et al. The Vampire Study: Significant elevation of faecal calprotectin in healthy volunteers after 300 ml blood ingestion mimicking upper gastrointestinal bleeding. *United European Gastroenterol J.* 2018;6(7):1007–14.
36. Tursi A, Brandimarte G, Elisei W, Inchingolo CD, Danese S, Aiello F. Fecal calprotectin in colonic diverticular disease: a case control study. *Int J Colorectal Dis.* 2009;24(1):49–55.
37. Tursi A. Biomarkers in diverticular diseases of the colon. *Dig Dis.* 2012;30(1):12–8.
38. Whitehead SJ, French J, Brookes MJ, Ford C, Gama R. Between-assay variability of faecal calprotectin enzyme-linked immunosorbent assay kits. *Ann Clin Biochem.* 2013;50(Pt 1):53–61.
39. Oord T, Hornung N. Fecal calprotectin in healthy children. *Scand J Clin Lab Invest.* 2014; 74(3):254–8.