



Universidad
Católica
de Valencia
San Vicente Mártir



UTILIDAD DE LA CALPROTECTINA FECAL EN LA ENFERMEDAD CELIACA EN PEDIATRIA

Fernando Clemente Bellido

Trabajo Fin de Grado

6º Medicina

Curso 2013-2014

INDICE

ABREVIATURAS	2
INTRODUCCIÓN	3
La calprotectina	4
Papel biológico de la calprotectina	7
Utilidades de la calprotectina fecal en la clínica	12
La enfermedad celiaca	14
OBJETIVOS	18
MATERIAL Y MÉTODOS	19
Determinación de la calprotectina en heces	21
Diagnóstico de celiaquía	22
Pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal	23
RESULTADOS	26
Resultados grupo de pacientes celiacos	26
Resultados grupo de enfermedad inflamatoria intestinal	29
Resultados del grupo control	33
Comparación de las cifras de calprotectina entre los distintos grupos	36
DISCUSIÓN	38
A.- Datos demográficos.	38
B.- Calprotectina Grupo Celiacos.	38
C.- Calprotectina grupo Enfermedad Inflamatoria Intestinal.	41
D.- Calprotectina en resto de patología digestiva.	45
CONCLUSIONES	47
BIBLIOGRAFÍA	49

ABREVIATURAS

- **Ac AGA** Ac anti gliadina
- **Ac TGTt** Ac anti trans glutaminasa tisular
- **AINES** Antiinflamatorio no esteroideo
- **CU** Colitis ulcerosa
- **EC** Enfermedad de Crohn
- **EII.** Enfermedad Inflamatoria Intestinal
- **ELISA** Enzimo inmuno ensayo
- **FGF2** Factor de Crecimiento Fibroblástico 2
- **HLA** Antígeno de histocompatibilidad
- **IL1B** Interleucina 1B
- **Kd** Kilodaltons
- **LCR** Líquido cefalorraquídeo.
- **mRNA** Ácido ribonucleico mensajero
- **PCDAI** Pediatric Crohn's Disease Activity Index
- **PCR** Proteína C reactiva
- **PUCAI** Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index
- **TGFβs** Factores de Crecimiento Transformante Beta
- **TNFα** Factor necrosis tumoral alfa
- **VSG** Velocidad de sedimentación globular
- **VPN** Valor predictivo negativo
- **VPP** Valor predictivo positivo

INTRODUCCIÓN

El diagnóstico diferencial entre la patología funcional y orgánica del aparato digestivo constituye un reto importante de la práctica diaria tanto del médico y del pediatra de atención primaria como del gastroenterólogo. Estos procesos suelen cursar en la mayoría de los casos, de una forma crónica e insidiosa sin asociarse a ninguna manifestación clara de afectación orgánica. La endoscopia digestiva, tanto alta (gastroscoopia) como baja (colonoscopia) es el método de referencia para el diagnóstico del proceso orgánico del aparato digestivo, y además, en el caso de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), permite determinar el grado de actividad inflamatoria así como la extensión de la inflamación intestinal. Sin embargo, estas son unas técnicas que tienen una serie de desventajas: son caras, invasivas y no se pueden repetir frecuentemente en los pacientes, especialmente en los pediátricos¹.

En los últimos años, se está asistiendo a una demanda cada vez mayor de estas exploraciones, sin encontrar en la mayoría de ellas un proceso orgánico que explique la sintomatología de los pacientes. Este hecho genera una gran carga asistencial, con la creación de largas listas de espera, un gasto económico elevado y, lo más importante, el retraso en el diagnóstico y el tratamiento de pacientes con enfermedad relevante¹.

Clásicamente se han utilizado como ayudas diagnósticas pruebas de laboratorio como los reactantes de fase aguda, la alfa glicoproteína ácida, la alfa antitripsina, la albúmina plasmática², la determinación de sangre oculta en heces, así como técnicas de imagen como el enema opaco y la gammagrafía con leucocitos marcados, todos ellos han demostrado una sensibilidad y especificidad bajas, fundamentalmente para el diagnóstico del cáncer colorrectal y la enfermedad inflamatoria intestinal EII³. Recientemente, se ha introducido la determinación de calprotectina fecal como marcador de patología inflamatoria intestinal, cuya utilidad se va a intentar explicar este artículo².

LA CALPROTECTINA

La determinación de calprotectina en heces se está afianzando en los últimos años como un nuevo marcador útil de patología gastrointestinal, incluyendo la enfermedad inflamatoria intestinal, el cáncer colorrectal, la cirrosis hepática, la enteropatía alcohólica, y la pancreatitis crónica. Diversos estudios (Tabla I) demuestran que existe una asociación entre los niveles de calprotectina y el grado de inflamación, en consecuencia puede usarse para monitorizar la respuesta al tratamiento y predecir el riesgo de recidivas^{4,5}.

Tabla I				
Valores de calprotectina fecal ($\mu\text{g/g}$) en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII), patología gastrointestinal orgánica (no EII), patología gastrointestinal funcional y en el grupo de control.				
	EII	Orgánica (no EII)	Funcional	Control
N	12	18	13	13
Mediana	1218,9	112,6	20,0	25,0
Rango intercuartil	321,8 - 2.966,8	36,5 - 193,1	15,6 - 25,4	19,2 - 32,5
Percentil 95	3797	4011,1	137,5	61,3
Tomado de García Sánchez ¹				

La calprotectina es una proteína heteromérica fijadora de calcio y zinc que pertenece a la familia de proteínas S-100. Su estructura molecular consiste en un heterotrímero de 36,5 kD formada por dos cadenas pesadas de 14KDa y una cadena liviana de 8KDs todas no glicosiladas^{6,7}. Cada cadena une dos iones de calcio, y un ion de zinc. La unión del calcio permite que la proteína forme complejos no covalentes tipo di-, tri- y tetrámeros, formación que le confiere resistencia a la proteólisis⁷

Familia S-100

Las proteínas S100 forman una familia de 25 proteínas todas ellas muy relacionadas estructuralmente y evolutivamente entre sí. Presentan como características: tener bajo peso molecular, ser ácidas y ofrecer gran capacidad para unirse al calcio. Las proteínas S100 son expresadas en células y tejidos específicos, donde realizan funciones intracelulares, extracelulares, o ambas. Las proteínas S100 están implicadas en la regulación de la fisiología hematológica, inmune y neural, la proliferación y división celular, la supervivencia celular y apoptosis, dinámica celular, actividad enzimática y homeostasis del calcio.

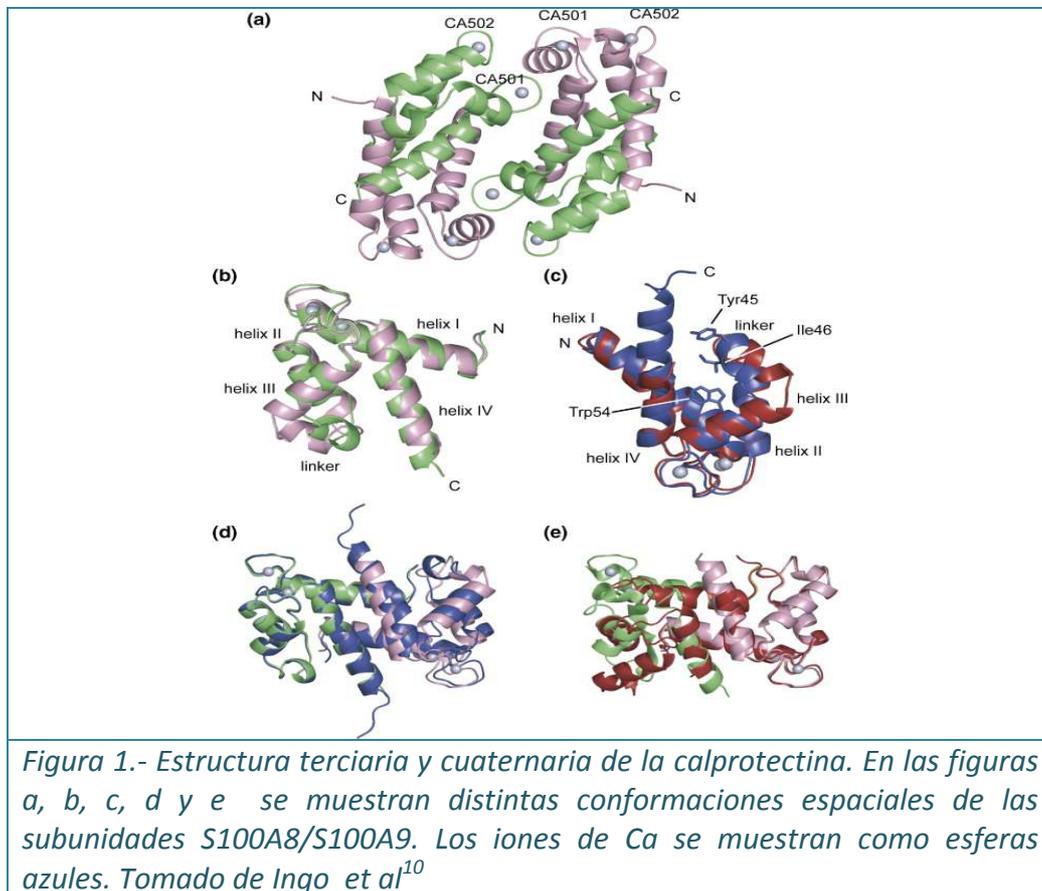
Las S100 son codificadas por una familia génica exclusiva de los animales vertebrados y estructuralmente todas tienen la habilidad de unir calcio a través de sus dos dominios EF. Por otra parte, algunos miembros de la familia s100, pueden unir y ser regulados por otros cationes divalentes como el zinc y magnesio, por ejemplo, la unión de zinc parece ser clave para la actividad de las Calprotectinas S100A1 y S100A3⁸.

Las proteínas S100 se subdividen en dos grandes subfamilias, la familia tipo S100A donde se han descubierto varios miembros, y la tipo S100B que corresponde a un solo miembro.

Las proteínas S100 forman complejos entre sí, generándose usualmente dímeros empaquetados antiparalelamente en una forma tal que se habla de los dímeros a\cero (S100a\0) cuando son dos proteínas S100A asociadas, dímeros tipo S100a cuando está presente la asociación entre una cadena S100A y la S100B, y dímeros tipo S100b si el homodímero está compuesto de dos cadenas S100B⁹.

Estructura de la calprotectina

La calprotectina constituye entre el 40% y el 60% de las proteínas citosólicas de los neutrófilos y se distribuye entre una fracción localizada en los gránulos primarios y secundarios y otra localizada libre en el citosol y asociada a los fosfolípidos de la membrana celular. También se encuentra, en menor proporción, en monocitos, macrófagos, queratinocitos, líneas celulares pancreáticas, células glandulares traqueales, y en los epitelios estratificados como el que recubre la lengua, el esófago y la cavidad bucal.



Se ha demostrado in vitro que tiene efecto bacteriostático (fig2), fungistático y anti proliferativo de células tumorales^{7, 11}. Su actividad inmunológica es de tipo directo antimicrobiano y movilizadora y activadora de los leucocitos granulocítico (especialmente de los neutrófilos). También tiene efectos sobre la activación endotelial,

estimulación de la producción de anticuerpos, estimulación del metabolismo de lípidos autocoides eicosanoides derivados del ácido araquidónico e incluso posee actividad anti-neoplásica.

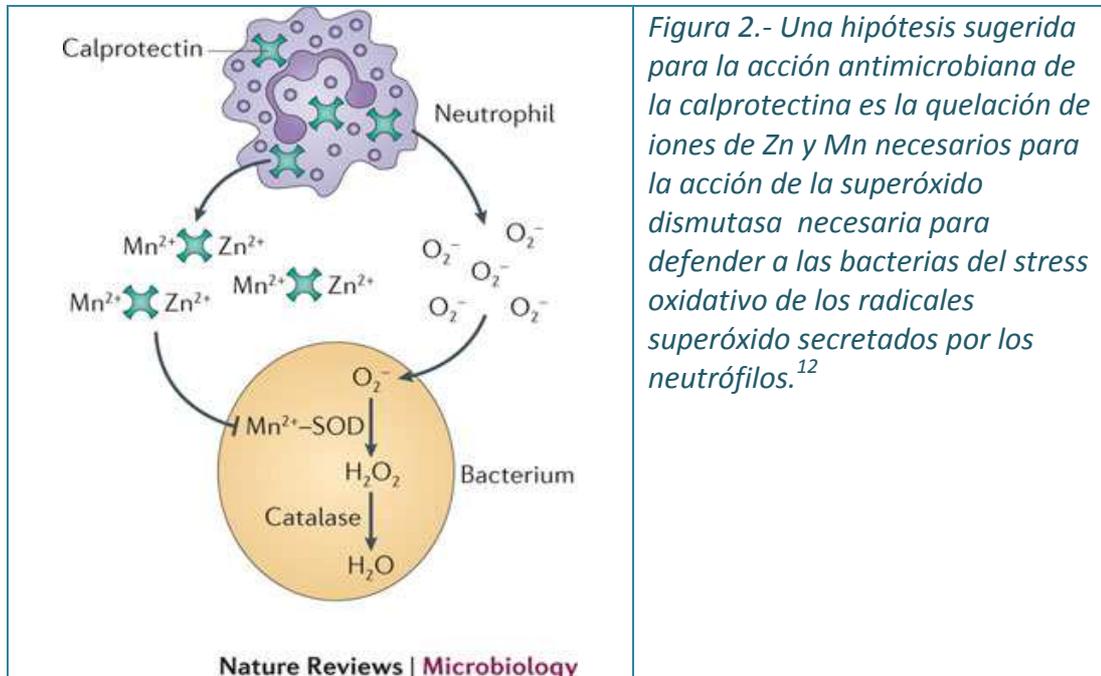


Figura 2.- Una hipótesis sugerida para la acción antimicrobiana de la calprotectina es la quelación de iones de Zn y Mn necesarios para la acción de la superóxido dismutasa necesaria para defender a las bacterias del stress oxidativo de los radicales superóxido secretados por los neutrófilos.¹²

Estudios publicados recientemente defienden el papel de la calprotectina como reguladora de la flora intestinal, especialmente en la prevención de la translocación bacteriana y controlando la aparición de la displasia epitelial². También parece que ejerce una función protectora en procesos inflamatorios e infecciosos y también presenta actividad anti proliferativa, sin embargo un incremento excesivo podría inducir daño celular⁴. Se ha medido su concentración en plasma y otros fluidos biológicos (saliva, LCR, sinovial) y en heces, donde se halla más concentrada que en el resto. Sus valores en heces se encuentran elevados en múltiples estados patológicos tanto inflamatorios (fibrosis quística, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa e infecciones bacterianas) como neoplásicos (cáncer colorrectal)^{4,10}.

PAPEL BIOLÓGICO DE LA CALPROTECTINA

Los leucocitos polimorfo nucleares, o también llamados neutrófilos juegan un importante papel en el mantenimiento de la homeostasis del

aparato digestivo. Ellos tienen un sofisticado sistema de defensa para eliminar los microbios que han atravesado la barrera mucosa, que es un punto débil en la barrera que defiende el organismo de los agentes externos. Durante la respuesta inflamatoria, los neutrófilos contribuyen al reclutamiento de otras células del sistema inmune para facilitar la curación de la mucosa y la liberación de los mediadores necesarios para la resolución de la inflamación (fig. 3a). A pesar de que esta respuesta es claramente beneficiosa para el organismo, una excesiva acumulación de neutrófilos activos en el intestino patológico se ha asociado a una enfermedad inflamatoria crónica con un daño de la mucosa. Debido a esto, la acumulación de neutrófilos en el organismo puede ser algo bueno, o algo malo¹³.

El complejo de Calprotectina tras su liberación a partir de los leucocitos se asocia al endotelio vascular en los sitios donde se está produciendo la asociación de monocitos y neutrófilos que están en fase de adhesión y trans migración (diapédesis) induciendo una respuesta pro-inflamatoria y pro-trombogénica, al incrementar la expresión y la secreción de citoquinas y la expresión de moléculas de adhesión celular (fig. 3b)^{7,14}.

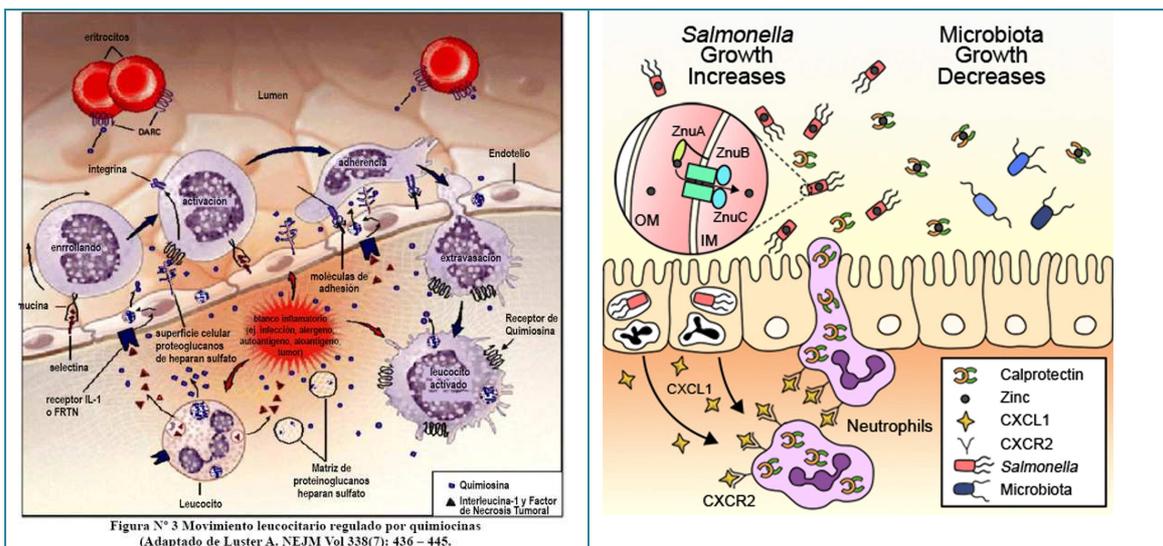


Fig. 3.- a) Esquema general de la inflamación. En respuesta a un blanco inflamatorio se produce liberación de interleucinas que inducen la quimiotaxis y diapédesis de leucocitos al foco inflamatorio. Tomado de Luster¹⁵. B) Liberación de calprotectina en la luz intestinal en respuesta a inflamación intestinal.

El componente S100A8 de la Calprotectina es sobre expresado durante inflamación por fibroblastos activados en una inducción dependiente de FGF2 (Factor de Crecimiento Fibroblástico 2) en presencia o no de heparina e IL1B. La producción fibroblástica es inhibida por TGFβs (Factores de Crecimiento Transformante Beta) en una forma tal vez dependiente de la estabilidad y vida media, del mRNA codificante⁷.

A nivel del tracto gastrointestinal, patologías inflamatorias con distinta etiología provocan un aumento de la permeabilidad de la mucosa que induce la migración de granulocitos y monocitos hacia el lumen intestinal.

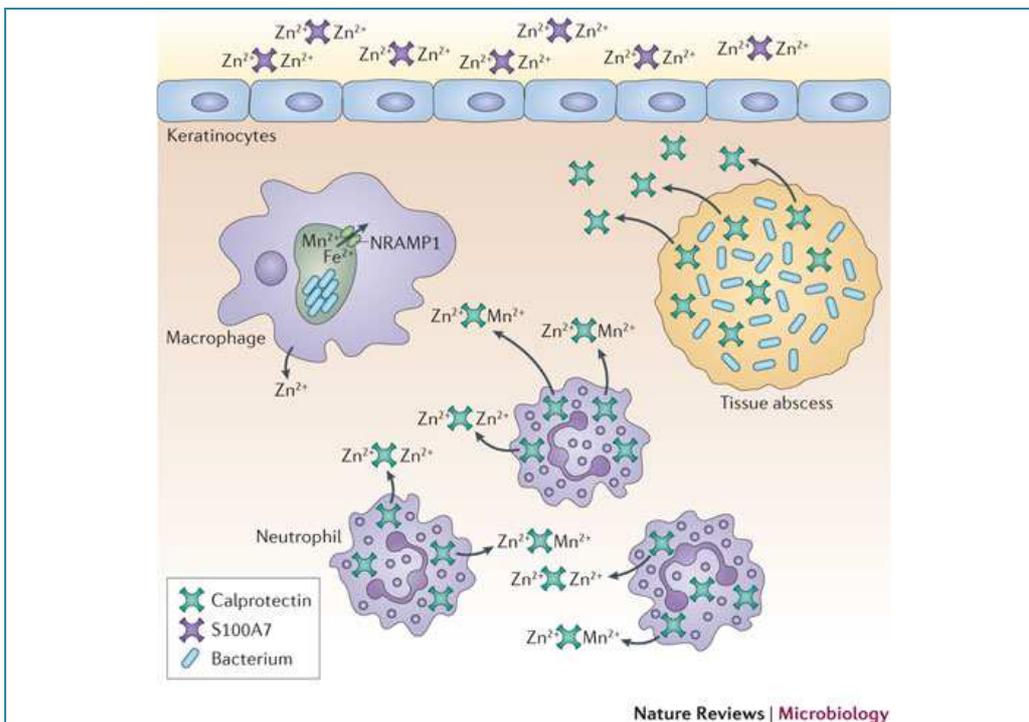


Figura 3.- La figura representa el secuestro de Zn²⁺ y Mn²⁺ por las proteínas de la familia S100 en la superficie epitelial ante un absceso infeccioso. S100A7 se libera en la superficie epitelial, donde inhibe la invasión bacteriana debido a la quelación de Zn²⁺. En tejidos más profundos, la infección se enfrenta mediante el reclutamiento de neutrófilos, que liberarán calprotectina (S100A8 y S100A9) al tejido infectado. La calprotectina inhibe el crecimiento bacteriano gracias a la quelación de Mn²⁺ y Zn²⁺¹²

La subsiguiente activación y muerte de estas células libera gran cantidad de calprotectina, que es excretada en las heces. La determinación de calprotectina en heces, presenta buena correlación con la excreción fecal de leucocitos marcados con Indio¹¹¹, considerada como técnica de referencia para medir la actividad inflamatoria del intestino.

Localización Genómica

Recientemente se ha descrito la localización genética de esta familia de proteínas en la región del cromosoma 1q21 y existen nueve genes diferentes que codifican la proteína S100^{16, 17}. Las proteínas S100 presentan una evolución en bloque por medio del mecanismo de “Duplicación Génica”, de ahí que en dicha región cromosómica 1q21, se encuentren 13 de sus miembros¹⁸. Otros representantes de la familia S100 son codificados por genes localizados en los cromosomas 4, 5, 7, 21 y X además de distintas regiones del cromosoma 1 (tabla II).

Tabla II
Familia S100¹⁹

MIEMBRO S100	NOMENCLATURA ALTERNA	OCALIZACIÓN CROMOSÓMICA
S100A1	S100 alfa	1q21
S100A2	S100 L, CAN19	1q21
S100A3	S100 E	1q21
S100A4	CAPL(proteína calcioplacentaria), Mts1(Gen asociado a Metástasis 1), P9KA, 18A2, PEL98, 42 A, Calvasculina, Metastasina	1q21
S100A5	S100 D, Calbindina 9K	1q21
S100A6	Calcyclina(CACY), PRAP (proteína asociada a la versión corta del receptor para prolactina), MLN4, GFIP 2A9, 5B10	
S100A7	Psoriasina, S100A7c	1q21
S100A7L1	S100A15, S100A7f, S100A7a	1q22
S100A7L2	S100A7b	1q22
S100A7L3	S100A7d	
S100A7L4	S100A7e	
S100A8	Calprotectina, CFAG(Antígeno A de la Fibrosis Quística), CAGA/CGLA(Calgranulina A), P8, MRP8, 60B8AG	1q21
S100A9	Calprotectina, CFBG(Antígeno B de la Fibrosis Quística), CAGB/CGLB(Calgranulina B), P14, MIF, NIF, LIAG, MRP14, MAC387	1q21
S100A11P	Pseudogén. Previamente denominado S100A14.	7q22-31.1
S100 B	No definido aún	21q22.2-22.3
S100G	CABP9K, CABP1, CD9K, CALB3(Calbindina 3)	Xp22.2
S100 P	No definido aún	4p16
S100Z	Gm625	5q13.3

UTILIDADES DE LA CALPROTECTINA FECAL EN LA CLÍNICA

Cuando la calprotectina se encuentra unida a calcio presenta una elevadísima resistencia al calor y a la degradación metabólica ejercida por enzimas bacterianas y por las propias proteasas intestinales^{2,10}. Estas propiedades permiten que se elimine intacta por las heces y le confieren ventaja como marcador bioquímico, no invasivo, para el despistaje de inflamación intestinal⁴. Es una proteína muy estable, lo cual permite su determinación en heces varios días después de su recogida. Puede mantenerse una semana a temperatura ambiente y varios meses congelando la muestra⁸. La estabilidad frente a la degradación bacteriana es la principal ventaja que ha permitido el desarrollo de test diagnósticos frente a otros marcadores como la lactoferrina, la elastasa neutrofílica, la esterasa leucocitaria, la IL-1b, el TNFa y la proteína catiónica eosinófila entre otros²⁰.

Actualmente está disponible un ensayo mejorado para la determinación de calprotectina mediante la técnica ELISA que, como principales ventajas respecto al original, requiere menor cantidad de muestra y aumenta el rendimiento de la solución de extracción. Se trata de una técnica simple, sensible, exacta, reproducible y más económica.

La determinación de la calprotectina en heces es útil en las siguientes enfermedades:

1. Enfermedad inflamatoria intestinal. Es la patología en la que está más extensamente estudiado este marcador, al ser la enfermedad con mayor grado de lesión. Se ha demostrado una excelente sensibilidad en el diagnóstico de la misma, tiene buena correlación con los índices de severidad histológica, colonoscópica, de medicina nuclear (gammagrafía con leucocitos marcados) y clínicos (Lloyd-Still Score). Es proporcional a la gravedad de las lesiones y a la extensión de las mismas. Sus niveles aumentan antes de presentar clínica en el

brote agudo. Se ha usado para monitorizar la respuesta al tratamiento. Datos recientes sugieren que la eficacia de la calprotectina, al contrario que la PCR, presenta una mayor sensibilidad diagnóstica en pacientes con CU, que con EC¹⁰.

2. Dolor abdominal recurrente, diarrea crónica inespecífica y cólico del lactante. Las alteraciones funcionales presentan valores de calprotectina en el rango de la normalidad para su edad y siempre inferiores a los procesos inflamatorios. En adultos la calprotectina tiene una sensibilidad del 100% y una especificidad del 97% para discriminar entre enfermedad de Crohn y el síndrome del colon irritable.
3. Cáncer colorrectal. Distintos estudios en adultos corroboran el uso de la calprotectina como screening del mismo. Ésta es una patología poco frecuente en pediatría y en las formaciones polipoideas es de utilidad limitada al detectarse mínimas elevaciones no significativas.
4. Enteropatía inducida por AINES. Se ha documentado niveles anormales de calprotectina fecal en pacientes con daño intestinal por consumo de AINES, presentando una buena correlación con la eliminación en heces de leucocitos marcados con ¹¹¹In. La calprotectina fecal es útil para el diagnóstico de las lesiones subclínicas.
5. Diversas patologías cursan con inflamación intestinal entre las que destacan fibrosis quística, enteritis infecciosas, quimioterapia, inmunosupresión, pero en general en éstas se observan valores anormales pero inferiores que en la E.I.I.
6. Enfermedad celiaca. Aún no existen estudios que describan el comportamiento de ésta en las distintas etapas de la celiaquía pero se espera que existan diferencias significativas al tratarse de una

patología con gran desestructuración intestinal², y ese es el objetivo de este estudio.

LIMITACIONES

1.- Falta de especificidad. Como se ha explicado anteriormente, la calprotectina refleja la inflamación intestinal sea cual sea su causa. Estos valores analíticos deben integrarse con los datos clínicos para el diagnóstico del proceso causante y proceder a estudios histológicos para la confirmación de los mismos.

2.- Edad. En niños sanos con edades comprendidas entre los 2 y los 15 años, los rangos de normalidad varían entre 0,5 mg/L – 6,3 mg/L , comparables con los rangos en adultos (0,5 mg/ L – 11 mg/ L). Sin embargo, existen grandes variaciones en los primeros meses de vida por lo que serán necesarios establecer valores de referencia para cada segmento de edad. Los valores máximos se alcanzan las primeras 10 semanas de vida, relacionándose éstos con el desarrollo del sistema inmune intestinal y el establecimiento de la flora normal bacteriana. Se observan niveles inferiores en neonatos con lactancia materna en comparación con la lactancia artificial. Se carece de valores para recién nacidos pretérmino por lo que aún no es una técnica aplicable para el diagnóstico de procesos inflamatorios como la enterocolitis necrotizante.

LA ENFERMEDAD CELIACA

La enfermedad celiaca es una enfermedad sistémica de mecanismo inmune desencadenada por el gluten y otras prolaminas relacionadas con él que afecta a individuos susceptibles genéticamente caracterizados por la presencia de determinados haplotipos del sistema mayor de histocompatibilidad, concretamente los fenotipos HLA DQ2 y DQ8. La enfermedad celiaca se diagnostica por la presencia en pacientes con más o menos síntomas de anticuerpos contra la enzima transglutaminasa2 presente en muchos tejidos y anticuerpos contra las formas deaminadas

de péptidos de la gliadina (fracción tóxica del gluten rica en glutamina) más la demostración de la existencia de una enteropatía sensible al gluten.

El diagnóstico de la Enfermedad Celiaca en la población pediátrica se ha basado desde 1969 en los criterios establecido por la ESPGHAN (European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition) ²¹. Inicialmente se requería la realización de al menos 3 biopsias intestinales: La primera ante la sospecha diagnóstica y estando el niño consumiendo gluten. Tras comprobar la existencia de atrofia vellositaria, se instauraba una dieta exenta de gluten durante al menos 2 años realizándose posteriormente una segunda biopsia con objeto de comprobar la curación de lesión intestinal. Se iniciaba entonces una prueba de provocación, reintroduciendo el gluten en la dieta, bajo vigilancia clínica y analítica, seguido de una tercera biopsia para confirmar la recaída histológica. Solo al comprobar la reaparición de la atrofia vellositaria tras reintroducción del gluten se establecía el diagnóstico de Enfermedad Celiaca.

La lesión histológica esperada en la biopsia intestinal no es específica de celiaquía limitándose al hallazgo de distintos grados de atrofia de vellosidades junto a hiperplasia de criptas e infiltrado linfocitario. La clasificación seguida actualmente fue establecida por Marsh y Oberhuber (fig. 4)

En 1989, basados en la experiencia acumulada en los años previos, y en amplios estudios multicéntricos, se modificaron estos criterios, reduciendo la obligatoriedad de la prueba de provocación, es decir de la realización de tres biopsias, a aquellos casos en que la 1ª biopsia se había realizado antes de 2 años de edad o si había dudas respecto al diagnóstico final²². En los casos restantes, con una mucosa intestinal claramente patológica al debut, el diagnóstico quedaba establecido tras la realización de la 1ª biopsia, sin necesidad de repetir las biopsias intestinales.

Clasificación histológica de Marsh-Oberhuber

	Marsh 0	Marsh 1	Marsh 2	Marsh 3a	Marsh 3b	Marsh 3c	Marsh 4
ILE*	<30/100	>30/100	>30/100	>30/100	>30/100	>30/100	<30/100
							
Hiperplasia de criptas	-	-	+	+	+	+	-
Atrofia vellositaria	Preinfiltrativa	Infiltrativa	Infiltrativa hiperplásica	Aplanamiento parcial	Subtotal	Total	Total (atrófica hipoplásica)

ILE*: linfocitos intraepiteliales por cada 100 enterocitos

Figura 4. Clasificación de las lesiones histológicas de la mucosa intestinal de la enfermedad celíaca. Tomada de Marsh²³ y Oberhuber²⁴.

En los últimos años la alta eficacia de nuevos marcadores serológicos, el descubrimiento de la estrecha asociación demostrada de la Enfermedad Celíaca con determinados haplotipos HLA (DQ2, DQ8) y un mejor conocimiento del espectro de lesiones histológicas que pueda presentarse, ha propiciado importantes cambios en el concepto de la enfermedad y en el enfoque diagnóstico²⁵.

Por todo ello surgió la demanda por parte de los gastroenterólogos pediátricos de revisar los criterios de 1989, y de simplificar y agilizar el proceso diagnóstico de la enfermedad, tal como recoge una encuesta realizada entre miembros de la ESPGHAN recientemente publicada²⁶.

Atendiendo a todos estos motivos un grupo de trabajo de la ESPGHAN, ha formulado una nueva definición de la enfermedad y elaborando una serie de afirmaciones y de recomendaciones, que han sido

recientemente publicadas como nueva guía de diagnóstico de la ESPGHAN para la Enfermedad Celiaca²⁷.

Así, los nuevos criterios diagnósticos propuestos, contemplan la posibilidad de omitir la biopsia intestinal en casos que cumplan unos requisitos muy concretos (Tabla III)

Tabla III Criterios revisado para diagnóstico de enfermedad celiaquía sin biopsia intestinal
<ul style="list-style-type: none">• Pacientes sintomáticos.• Con valores de Anticuerpos Antitrasglutaminasa superiores a 10 veces el valor de referencia.• Y con Anticuerpos Antiendomiso, como test confirmatorio, positivos.• Y que además presenten un haplotipo HLA asociado a EC (DQ2 y/o DQ8).

En todos los demás casos sigue siendo imprescindible la realización de al menos una biopsia antes de excluir el gluten de la dieta.

Por otra parte el seguimiento de los pacientes celíacos se realiza además de con los controles clínicos y somatométricos adecuados con la monitorización de los marcadores serológicos descritos. Como ya se ha dicho, existen múltiples estudios que hablan de la calprotectina fecal y sus valores en las enfermedades inflamatorias intestinales, pero ninguno que trate en concreto la enfermedad celíaca y que tenga unos resultados esclarecedores⁵.

OBJETIVOS

- 1- Estudiar los valores de calprotectina fecal en las distintas fases de la enfermedad celiaca (contacto con gluten y fase de supresión)
- 2- Valorar el uso de los niveles de calprotectina fecal en la trasgresión con gluten en los celíacos
- 3- Comparar los valores de calprotectina fecal en pacientes celíacos con y sin ingesta de gluten con sus niveles en otras enfermedades digestivas inflamatorias y no inflamatorias.
- 4- Establecer valores de normalidad de calprotectina fecal en niños sin patología digestiva.

MATERIAL Y METODOS.

El estudio ha sido llevado a cabo en la Unidad de Medicina Digestiva Infantil del Hospital General Universitario de Alicante entre julio del 2012 y septiembre del 2013. El estudio se ha realizado con un total de 259 muestras de heces recogidas en 223 niños, los cuales se han repartido en los siguientes grupos:

- Grupo A. Pacientes celíacos. Se han incluido los pacientes en seguimiento en la Unidad diagnosticados de enfermedad celíaca de acuerdo con los criterios de Praga modificados en 2012²² todos tenían al menos una biopsia compatible. Se subdividió en dos grupos: A1 pacientes celíacos recibiendo dieta sin gluten, asintomáticos, con buen control de la enfermedad y con marcadores serológicos normales. Grupo A2 donde se incluyó los pacientes con ingesta de gluten al ser diagnósticos de novo o con evidencia de trasgresión con gluten diagnosticada por elevación de marcadores serológicos de la enfermedad celíaca (anticuerpos antigliadina, antitransglutaminasa tisular y/o antiendomiso) respecto a los valores previos.
- Grupo B. Pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal. Se han incluido los pacientes en seguimiento en la Unidad por dicha enfermedad. Se han establecido dos subgrupos: BC para pacientes con enfermedad de Crohn y BCU con colitis ulcerosa. Durante el periodo de recogida de datos se han incluido episodios de diagnóstico de novo, brotes y periodos intercrisis.
- Grupo C o grupo control, también subdividido en dos subgrupos: CD donde se incluyeron pacientes seguidos en la unidad de digestivo infantil por problemas digestivos no incluidos en los dos grupos anteriores y grupo CS compuesto por pacientes pediátricos de los

servicios de cirugía y traumatología infantil sin evidencia de enfermedad gastrointestinal.

El número de pacientes de cada grupo aparece en la tabla IV.

Tabla IV Grupos de estudio		
Descripción	Grupo	Núm. Pacientes ¹
Celíacos	A	59
Sin gluten	A1	44
Con gluten	A2	15
E.I.I.	B	28 (61)
Enf. Crohn	BC	19 (39)
Colitis ulcerosa	BCU	9 (22)
CONTROL	C	139
Otras patologías digestivas	CD	106
Sanos	CS	33

1 (Número de muestras)

A todos los pacientes incluidos en el estudio se revisó su historia clínica buscando patologías no digestivas o consumo de medicamentos que pudieran alterar los resultados de la calprotectina fecal. En caso de presentar alguna de estas circunstancias se eliminó del estudio.

Se recogieron de cada paciente los datos de edad, sexo, niveles de calprotectina en heces, valores de los parámetros de inflamación mediante la determinación de PCR y Velocidad de sedimentación y serología de celiaquía mediante los anticuerpos antigliadina y antitransglutaminasa tisular.

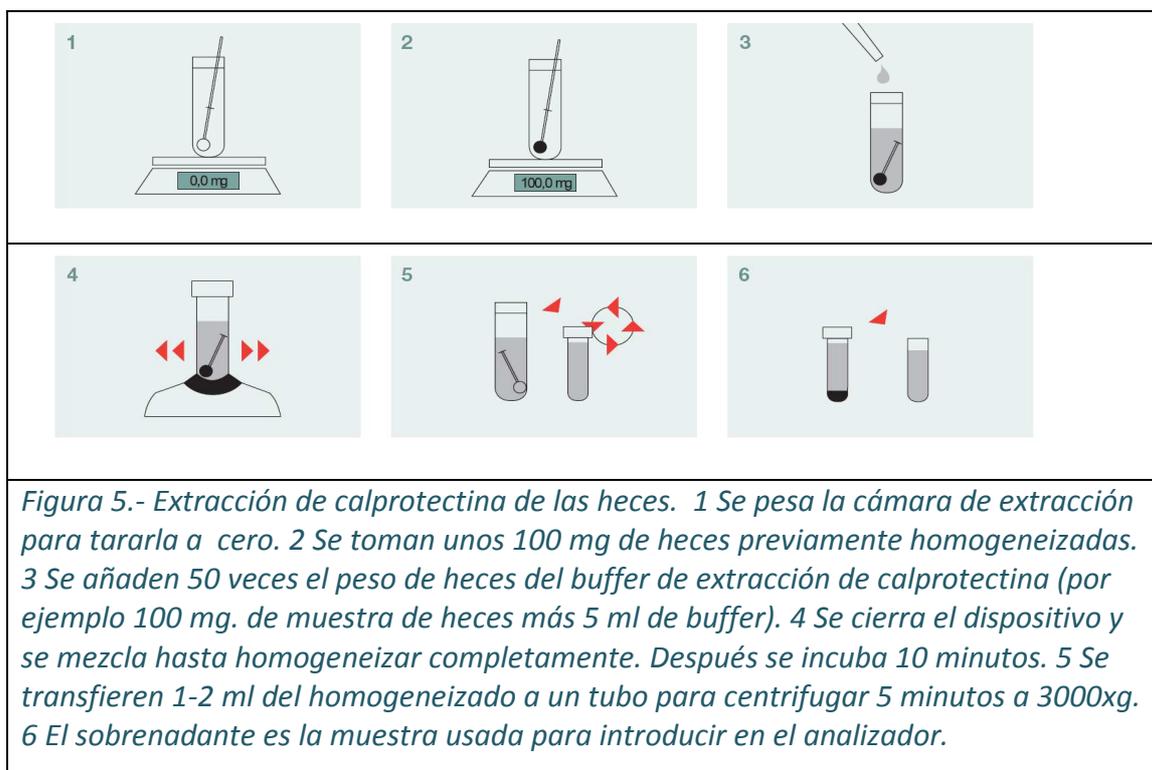
Los parámetros de cada caso se pasaron a una tabla de Excel y los datos estadísticos se analizaron con el programa SPSS. Se han

determinado medias y desviación estándar de los parámetros estudiados y se aplicaron los test de la t de Student y ANOVA.

Determinación de la calprotectina en heces

La calprotectina tiene la ventaja que es muy estable incluso hasta una semana recogida en contenedores de polivinilo de uso habitual en la clínica²⁸. La determinación se realiza por medio de un método de inmunoensayo fluorométrico automatizado en el aparato Phadia 250 (Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Suecia).

Previo a la determinación, la calprotectina es extraída de 100 mg de la muestra de heces según el protocolo establecido por el fabricante. (Fig. 5). Posteriormente, el sobrenadante es introducido en el analizador para la determinación, siguiendo también las indicaciones del fabricante.



Los niveles de detección de la técnica se sitúan según recomendaciones del fabricante entre 15 y 4990 $\mu\text{g/g}$, siguiendo un

patrón lineal entre dichos límites. Por debajo de 15 la técnica empleada no es capaz de distinguir valores y se consideran como niveles indetectables.

Diagnóstico de celiaquía

En el presente estudio se han aplicado los criterios diagnósticos de la enfermedad celiaca de la E.S.P.G.H.A.N. revisados de 2012. Todos los pacientes incluidos como celíacos tenían al menos una biopsia duodenal obtenida por endoscopia digestiva alta o por medio de biopsia por succión mediante cápsula de Watson-Crosby. Se incluyó en el estudio con diagnóstico de enfermedad celiaca aquellos pacientes con biopsia al menos Marsh 1 o superiores (Fig. 4).

Los marcadores serológicos de celiaquía utilizados en el presente estudio: anticuerpos antigliadina y antitransglutaminasa se determinaron por técnica estándar de laboratorio clínico concretamente por Elisa marca EliaA Gliadin DP IgA e IgG para los anticuerpos antigliadina y Phadia Celiakey IgG e IgA para los anticuerpos antitransglutaminasa tisular, determinados ambos mediante el auto analizador Phadia 250 (Fig. 6).



Figura 6.- Autoanalizador Phadia 250 empleado en las determinaciones de calprotectina fecal, y serología de celiaquía.

Pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal

Los pacientes con EII se incluyeron en el grupo B, tanto con enfermedad de Crohn (BC) como con Colitis Ulcerosa (BCU). A dichos pacientes se recogieron muestras de heces y suero pareadas para determinación por una parte de la calprotectina fecal y en sangre de parámetros de inflamación: velocidad de sedimentación (VSG) y proteína C reactiva (PCR), ambas fueron determinados por procedimientos estándar de laboratorio clínico. Los pacientes incluidos en este estudio estaban todos diagnosticados de EII en sus dos tipos siguiendo los criterios de Oporto²⁹.

Los pacientes incluidos en ambos subgrupos fueron a su vez subdivididos según la consideración de que estuvieran en brote agudo de la enfermedad o no. Para ellos se valoraron parámetros clínicos subjetivos y objetivos y los reactantes inflamatorios arriba indicados (pcr y vsg) unificados en los scores de actividad clínica. Se han empleado para la enfermedad de Crohn el índice PCDAI (fig. 7) desarrollado por Silverberg et al³⁰. Se consideró ausencia de brote una puntuación por debajo de 10.

Para la colitis Ulcerosa se ha utilizado el índice PUCAI³¹ (fig. 8) considerándose el paciente en situación de brote con una puntuación por encima de 10.

				Puntos		Puntos
1. Historia clínica (recuerdo de una semana)						3. Exploración
<i>Dolor abdominal</i>						<i>Peso</i>
Ninguno				0		Aumento de peso, peso estable voluntario o adelgazamiento
Leve, de corta duración, no interfiere con la actividad normal				5		Peso estable involuntario, adelgazamiento del 1 al 9%
Intenso, de larga duración, afecta a la actividad normal, nocturno				10		Adelgazamiento > 10%
<i>Deposiciones (por día)</i>						<i>Abdomen</i>
0-1 deposiciones líquidas, con ausencia de sangre				0		No se observan masas abdominales ni dolor con la palpación
Hasta 2 deposiciones semiblandas con sangre o 2-5 deposiciones líquidas				5		Dolor con la palpación o masas abdominales sin dolor con la palpación
Sangrado abundante o > 6 deposiciones líquidas o diarrea nocturna				10		Dolor con la palpación, contractura abdominal o masa abdominal definida
<i>Estado general y capacidad funcional</i>						<i>Talla (completar sólo en el momento del diagnóstico)</i>
Bueno. Actividad no limitada				0		Disminución de menos de 1 escala (1 escala = 2 percentiles)
Regular. Dificultades ocasionales para mantener las actividades habituales				5		Disminución de 1 a 2 escalas
Muy deficiente. Limitaciones frecuentes de las actividades				10		Disminución de más de 2 escalas
2. Analítica						<i>Talla (completar sólo durante el seguimiento)</i>
<i>Velocidad de sedimentación globular (mm/h)</i>						Velocidad de crecimiento > -1 DE
< 20				0		Velocidad de crecimiento < -1 DE o > -2 DE
20-50				2,5		Velocidad de crecimiento > -2 DE
> 50				5		<i>Enfermedad perirrectal</i>
<i>Albumina (g/l)</i>						Número de colgajos o papilomas cutáneos asintomáticos
> 35				0		1-2 fistulas indoloras, drenaje, sin dolor con la palpación
31-34				5		Fistulas activas, drenaje, dolor con la palpación o absceso
< 30				10		<i>Manifestaciones extraintestinales</i>
<i>Hematocrito (%)</i>						No
< 10 años						1
	<i>Varón</i>	<i>Varón</i>	<i>Mujer</i>			2 o más
	<i>11-14 años</i>	<i>15-19 años</i>	<i>11-19 años</i>			
	> 33	> 35	> 34	0		
	28-32	30-34	29-33	2,5		
	< 28	< 30	< 29	5		

Puntuación total (0 a 100): PCDAI \geq 30: enfermedad moderada o grave; PCDAI > 11 e < 30: enfermedad leve; PCDAI \leq 10: remisión clínica.
DE: desviación estándar; PCDAI: índice de actividad de la enfermedad de Crohn pediátrica.

Figura 7.- Índice de actividad de la enfermedad de Crohn en niños (PCDAI) Tomado de Navas y cols³².

Variable	Puntuación
1. Dolor abdominal	
– Sin dolor	0
– Dolor que puede ser ignorado	5
– Dolor que no puede ser ignorado	10
2. Rectorragia	
– Ausente	0
– Pequeño sangrado, en < 50% de las deposiciones	10
– Pequeño sangrado en la mayoría de las deposiciones	20
– Sangrado abundante (> 50% de las deposiciones)	30
3. Consistencia de la mayor parte de las deposiciones	
– Formes	0
– Parcialmente formes	5
– Completamente deshechas	10
4. Número de deposiciones en 24 h	
– 0-2	0
– 3-5	5
– 6-8	10
– > 8	15
5. Deposiciones nocturnas (cualquier episodio que despierta)	
– Ausentes	0
– Presentes	10
6. Grado de actividad	
– Sin limitación de la actividad	0
– Limitación ocasional de la actividad	5
– Restricción importante de la actividad	10
Suma de PUCAI (0-85)	

*PUCAI < 10: remisión; PUCAI 10-34: brote leve; PUCAI 35-64: brote moderado; PUCAI > 65: brote grave.
 Modificada de Turner D, et al. Gastroenterology. 2007;133:423-32.

Figura 8.- Índice PUCAI de actividad de colitis ulcerosa pediátrica. Tomado de Marti de Carpi et al³³.

RESULTADOS

Resultados grupo de pacientes celíacos

Se incluyeron 59 pacientes en este grupo 40 mujeres y 19 varones (tabla V), la edad media de los pacientes fue de 6,8 años con un rango de 1,8 a 14,7 años. Todos ellos tenían al menos una biopsia intestinal con lesión de la mucosa intestinal compatible con el diagnóstico de enfermedad celíaca de acuerdo a lo previamente descrito en material y métodos. De ellos 15 pacientes (12 mujeres) fueron incluidos en el grupo de celíacos en contacto con gluten al ser pacientes de nuevo diagnóstico (subgrupo A2). Estos pacientes presentaron una edad media de 5,5 años con un rango entre 1,8 y 12 años. Los restantes 40 pacientes, también con predominio de mujeres (28 frente a 16 varones) eran celíacos ya diagnosticados y presentaban un estado clínico, somatométrico y analítico normal y constituyeron el grupo A1. Sus edad media resulto ligeramente mayor: 7,3 años (t test: 0.06 ns)

Tabla V
Datos demográficos de los grupos de estudio

Grupo	Núm. Pacientes ¹	Edad media ² (años)	Mediana (años)	Rango edad (meses)	Sexo V/M
A	59	6,8 (2,1)	6,2	1,8-14,7	19/40
A1	44	7,3 (2,9)	6,3	4,2-8,9	16/28
A2	15	5,5 (3,3)	3,8	1,8-12,0	3/12
B	28 (61)	12,1 (3,1)	13,6	1,2-15,2	15/13
BC	19 (39)	11,4 (3,1)	12,8	5,7-15,0	11/8
BCU	9 (22)	13,4 (2,9)	14,1	1,2-15,2	4/5
C	139	8,6 (4,3)	9,2	0,6-15,2	65/74
CD	106	9,1 (4,3)	10,1	0,6-15,2	50/56
CS	33	7,2 (3,7)	5,9	1,4-15,1	15/18

1 (Número de muestras)

2 (DS)

En la siguiente tabla (tabla VI) aparecen los resultados de la calprotectina fecal en ambos subgrupos. Se observa que los pacientes en contacto con gluten (A2) presentan valores de calprotectina significativamente más altos que los pacientes con buen control de la enfermedad. En la tabla aparecen también los valores de la serología de celiaquía en ambos grupos.

Tabla VI				
Resultados calprotectina grupo celiacos				
Grupo	Edad (años)	Calprotectina (µg/g heces)	Ac anti TGTt (UI/100 ml)	Ac antigliadina (UI/100 ml)
A	6,8 (2,1)	46,8 (72,4)	48,8 (72,3)	30,4 (57,5)
A1	7,3 (2,9)	21,5 (24,7)	13,8 (45,1)	4,4 (11,7)
A2	5,5 (3,3)	119,2 (122,6)	102,7 (70,4)	75,3 (76,7)
t-test	0,06 (ns)	0,008	0,0005	0,006
Media (DS)				

Los pacientes celiacos que ingerían gluten presentaron unos valores medios de anticuerpos antitransglutaminasa tisular de 102,7 UI/100 ml significativamente más altos que los 13,8 UI/100 ml de los pacientes que seguían dieta sin gluten. Los Ac antigliadina mostraron también diferencias significativas entre ambos grupos: 4,4 frente a 75,3 UI/100 ml.

En las figuras 9 y 10 se ilustran mediante gráficos de barras con desviación estándar los resultados anteriormente expuestos.

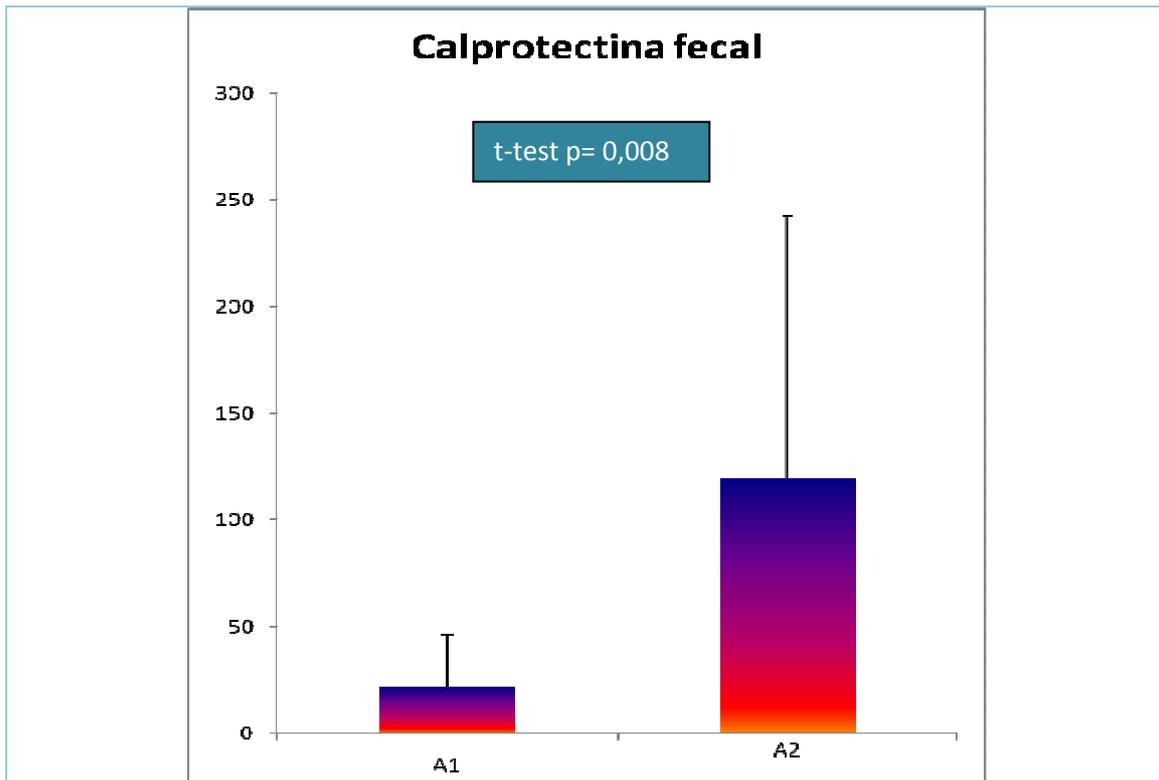


Figura 9.- Grafica comparativa con media y desviación estándar de los resultados de calprotectina en los grupos sin (A1) y con gluten (A2) de pacientes celíacos.

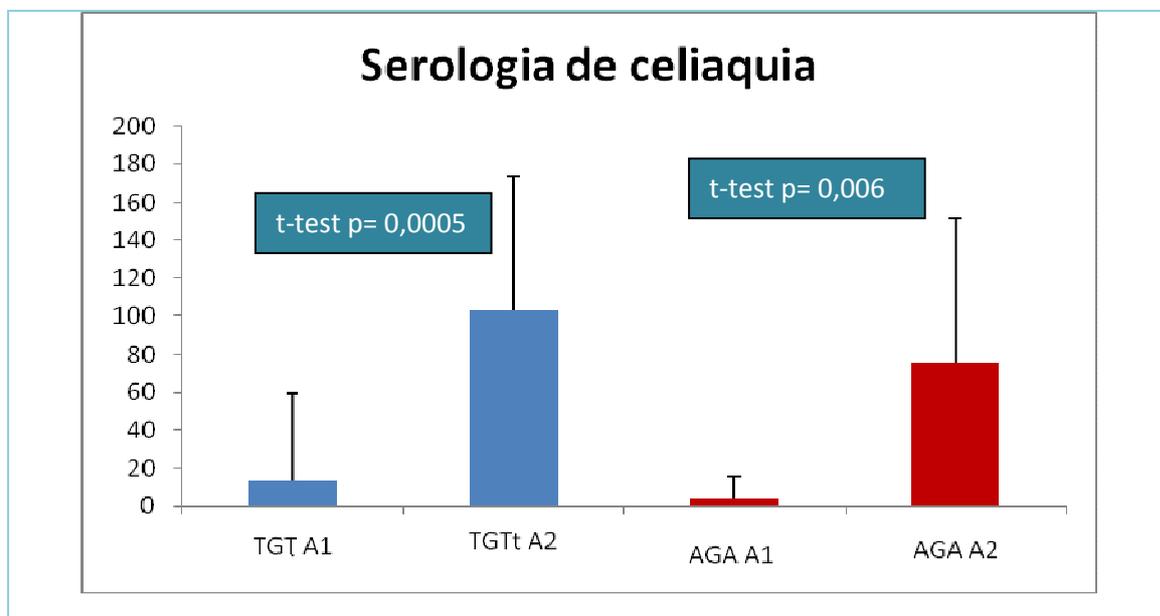


Figura 10.- Gráficos de barras de media y desviación estándar de los valores de la serología de celiacua en los dos subgrupos de pacientes celíacos

Finalmente se ha realizado el test de capacidad predictiva de la calprotectina fecal mediante la construcción de una tabla de contingencia. Dado que el grupo de control sano presentó un valor de calprotectina fecal de 16,3 (DS=3,5) $\mu\text{g/g}$ de heces, por tanto el valor considerado límite superior de lo normal o punto de corte (media + 2DS) sería de 23,3 $\mu\text{g/g}$. Con este límite se construyó la siguiente tabla de contingencia:

Tabla VII			
Tabla de contingencia			
	Ingesta gluten		Total
	no	si	
Calprotectina fecal <23 $\mu\text{g/g}$	39	4	43
Calprotectina fecal >23 $\mu\text{g/g}$	5	11	16
Total	44	15	59
		Intervalo confianza 95 %	
Sensibilidad	88,64%	74,65%	95,74%
Especificidad	73,33%	44,83%	91,09%
Valor predictivo positivo	90,70%	76,95%	96,98%
Valor predictivo negativo	68,75%	41,48%	87,87%

Por tanto la presencia de un valor de calprotectina fecal superior a 23 $\mu\text{g/g}$, en ausencia de otra enfermedad digestiva, tiene una probabilidad del 90 % de indicar que el paciente este tomando gluten.

Resultados grupo de enfermedad inflamatoria intestinal

Se incluyeron en este grupo un total de 28 pacientes a los cuales se obtuvieron 61 muestras de heces junto a sus correspondientes análisis de sangre extraídos en distintos estadios evolutivos de la enfermedad. Estos 28 pacientes mostraron un ligero predominio en varones (15 frente a 13 mujeres) y sus edades fueron más elevadas que el grupo anterior: media de 12,1 años con un rango de 1,2 a 15 años. Revisadas las historias de los pacientes, 19 cumplían los criterios de Oporto de enfermedad de Crohn (relación V / M= 11 / 8) y formaron el grupo BC y los 9 restantes padecían

una colitis ulcerosa incluyéndose en el grupo BCU. En este subgrupo se apreció un ligero predominio en mujeres, 5 frente a 4 varones.

Las edades medias y rangos de edad de ambos subgrupos aparecen en la tabla V. Se aprecia una edad media algo más alta en el grupo BCU siendo esta diferencia estadísticamente significativa (t test $p=0,01$).

En la tabla VIII se exponen los resultados de la calprotectina y marcadores séricos de inflamación del grupo B.

Tabla VIII				
Resultados calprotectina grupo E.I.I.				
Grupo	Edad (años)	Calprotectina ($\mu\text{g/g}$ heces)	PCR ($\text{mg}/100\text{ ml}$)	VSG
B	12,1 (3,1)	1312,5 (1087,1)	2,0 (3,9)	32,9 (22,7)
BC	11,4 (3,1)	1113,6 (1016,1)	2,8 (4,8)	36,9 (24,9)
BCU	13,4 (2,9)	1713,5 (1113,7)	0,6 (0,5)	24,5 (14,5)
t-test (BC/BCU)	0,01	0,03	0,01	0,04
Media (DS)				

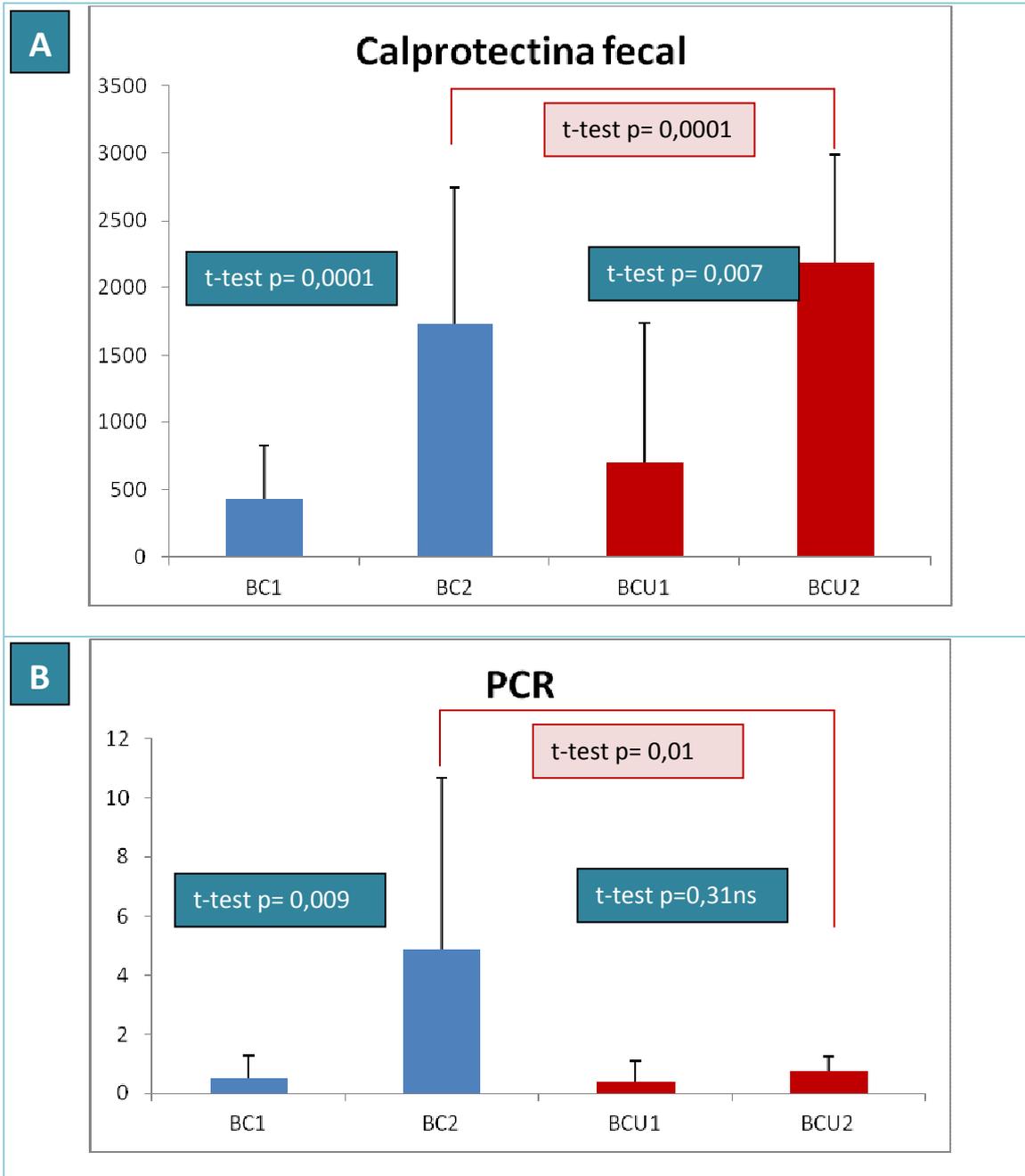
Se aprecian cifras más altas de calprotectina fecal con significación estadística en el subgrupo de colitis ulcerosa mientras los parámetros de inflamación general (PCR y VSG) fueron más altos en los pacientes con enfermedad de Crohn.

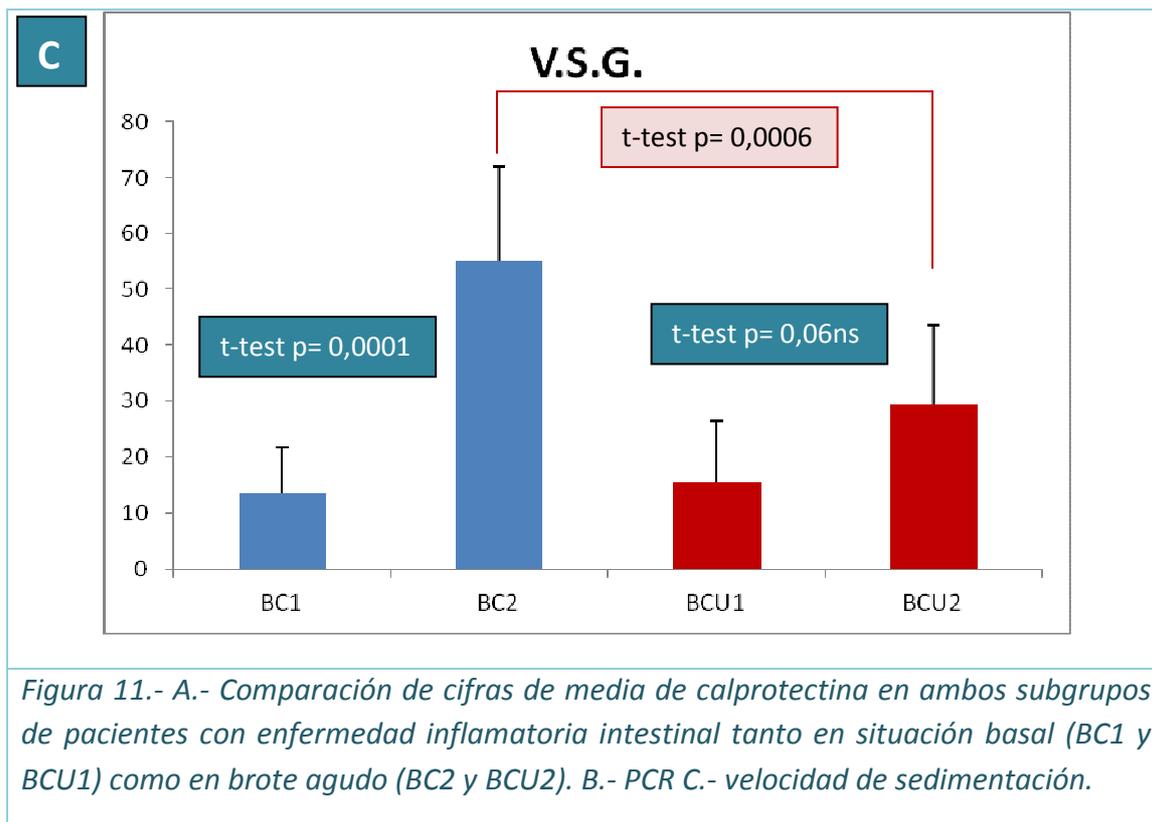
Por otra parte, los pacientes de cada subgrupo de EII fueron catalogados en función de su estado clínico y aplicando los índices de actividad referidos en el apartado correspondiente de material y métodos (PCDAI y PUCAI) en estado de situación basal o con actividad inflamatoria sugestiva de brote agudo. Con estas premisas se subdividió a los grupos en subgrupos sin brote o situación basal de la enfermedad (BC1 y BCU1) y

subgrupo con actividad inflamatoria o en brote agudo de EII (BC2 y BCU2). Los resultados de edad, calprotectina y reactantes de fase aguda de todos los subgrupos aparecen en la tabla IX.

Todos los parámetros de inflamación analizados fueron más elevados en el grupo BC2 respecto a los pacientes sin brote (BC1) de forma significativa. Sin embargo en el grupo de la colitis ulcerosa aunque la calprotectina fecal fue superior en presencia de actividad inflamatoria: 2185 µg/g frente a 701 que promedio en los pacientes con PUCAI bajo, los marcadores de inflamación sistémicos no se elevaron de forma estadísticamente significativa en el grupo BCU2 mostrando una actividad inflamatoria más local.

Tabla IX Resultados calprotectina subgrupos E.I.I.				
Grupo	Edad (años)	Calprotectina (µg/g heces)	PCR (mg/100 ml)	VSG
BC	11,4 (3,1)	1113,6 (1016,1)	2,8 (4,8)	36,9 (24,9)
BC1	11,9 (2,7)	429,7 (397,6)	0,5 (0,7)	13,5 (8,1)
BC2	11,3 (3,1)	1729,2 (1013,6)	4,8 (5,8)	55,1 (16,9)
t test	0,49 ns	0,0001	0,009	<0,0001
BCU	13,4 (2,9)	1713,5 (1113,7)	0,6 (0,5)	24,5 (14,5)
BCU1	12,4 (4,9)	701,4 (1035,4)	0,3 (0,7)	15,6 (10,8)
BCU2	13,9 (1,3)	2185,8 (806,2)	0,7 (0,4)	29,4 (14,3)
T test	0,44 ns	0,007	0,31 ns	0,06 ns
t-test BC2/BCU2	0,004	<0,0001	0,01	0,0006
Media (DS)				





Resultados del grupo control

Se han establecido dos grupos de controles para la comparación de los resultados obtenidos. Por una parte se incluyó un total de 33 niños sanos reclutados en la consultas de cirugía y traumatología infantil con ausencia de enfermedad digestiva de cualquier tipo. Este grupo denominado como CS o de control sanos mostró una edad media de 7,2 años comparable a la del grupo celiaco, el resto de características del grupo aparece en la tabla V. La calprotectina media obtenida en estos pacientes fue de 16,3 (DS=3,5) $\mu\text{g/g}$ de heces, como ya se indicó más arriba, por tanto el valor considerado como límite superior de lo normal o punto de corte (media + 2DS) sería de 23,3 $\mu\text{g/g}$.

Por otra parte se solicitó la determinación de calprotectina a un grupo de pacientes en seguimiento en la Unidad de Medicina Digestiva Infantil del Hospital General Universitaria con diagnósticos distintos a los de enfermedad celiaca y de enfermedad inflamatoria intestinal (tabla X y fig. 12). Estos pacientes formaron el grupo CD o de control digestivo.

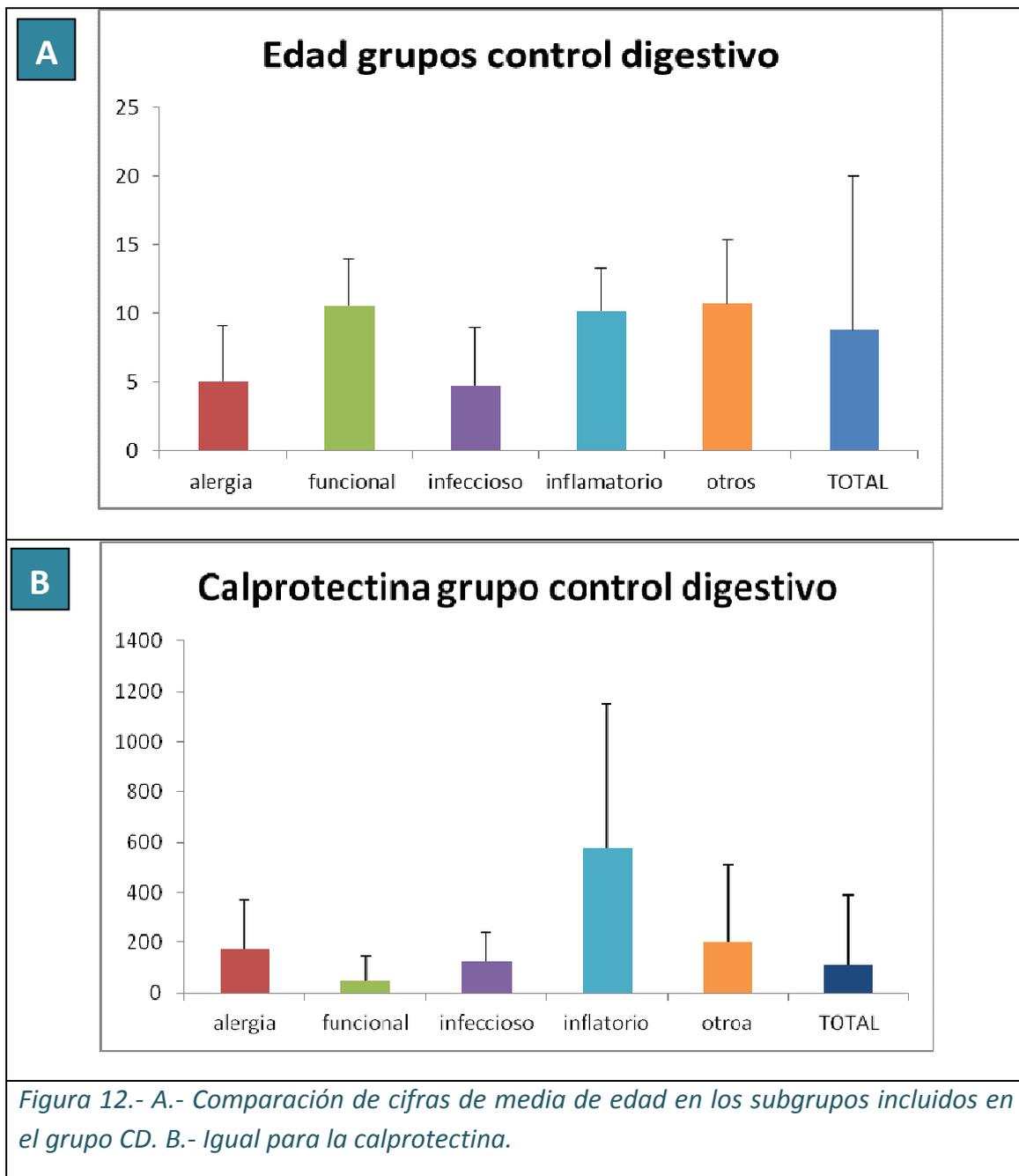
Finalmente se recuperaron datos de 106 pacientes que se agruparon por diagnósticos en las categorías que aparecen en la tabla X.

Tabla X			
Valores de calprotectina en los distintos grupos por diagnósticos del grupo de control digestivo			
Grupo	Número casos	Edad (meses)	Calprotectina (µg/g heces)
Total	106	9,1 (4,3)	134,2 (283,4)
Alergias	9	5,1 (4,1)	172,1 (199,7)
Funcional	62	10,6 (3,4)	47,7 (109,3)
Infeccioso	18	4,8 (4,3)	121,4 (119,2)
Inflamatorio no EII	11	10,2 (3,2)	576,5 (632,7)
Otros	6	10,7 (4,7)	198,5 (311,3)
Media (DS)			

Se identificaron en función del estudio retrospectivo de las historias clínicas 9 pacientes afectados de alergia alimentaria con manifestaciones digestivas (vómitos, diarrea, dolor abdominal, etc.). El grupo más numeroso de pacientes fue el de aquellos que cumplían los criterios de trastornos digestivos funcionales de acuerdo con el consenso Roma III³⁴. Los pacientes fueron diagnosticados de dolor abdominal crónico o recurrente funcional, estreñimiento crónico funcional, dispepsia funcional o vómitos funcionales. Estos niños en total 62 se agruparon bajo el epígrafe "funcional". En tercer lugar se recogieron 18 resultados de calprotectina recogidos de casos de gastroenteritis o enterocolitis infecciosas. Se clasificaron como subgrupo "infeccioso". Por otra parte hubo 11 casos con cuadros de ileitis o enteritis que no cumplían criterios de enfermedad inflamatoria intestinal como se comentó previamente en material y métodos y que se sacaron del grupo B y se incluyeron en este como el subgrupo inflamatorio no EII. Los 6 casos restantes que no se pudieron englobar en ninguno de los anteriores quedaron como "otros" siendo dos gastritis antrales, una gastritis crónica helicobacter pylori

positiva, un pólipo colónico, una gingivostomatitis herpética que mostró unas cifras de calprotectina fecal muy elevadas (822 $\mu\text{g/g}$) que se normalizaron en paralelo con la mejoría de la afectación oral y una duodenitis inespecífica.

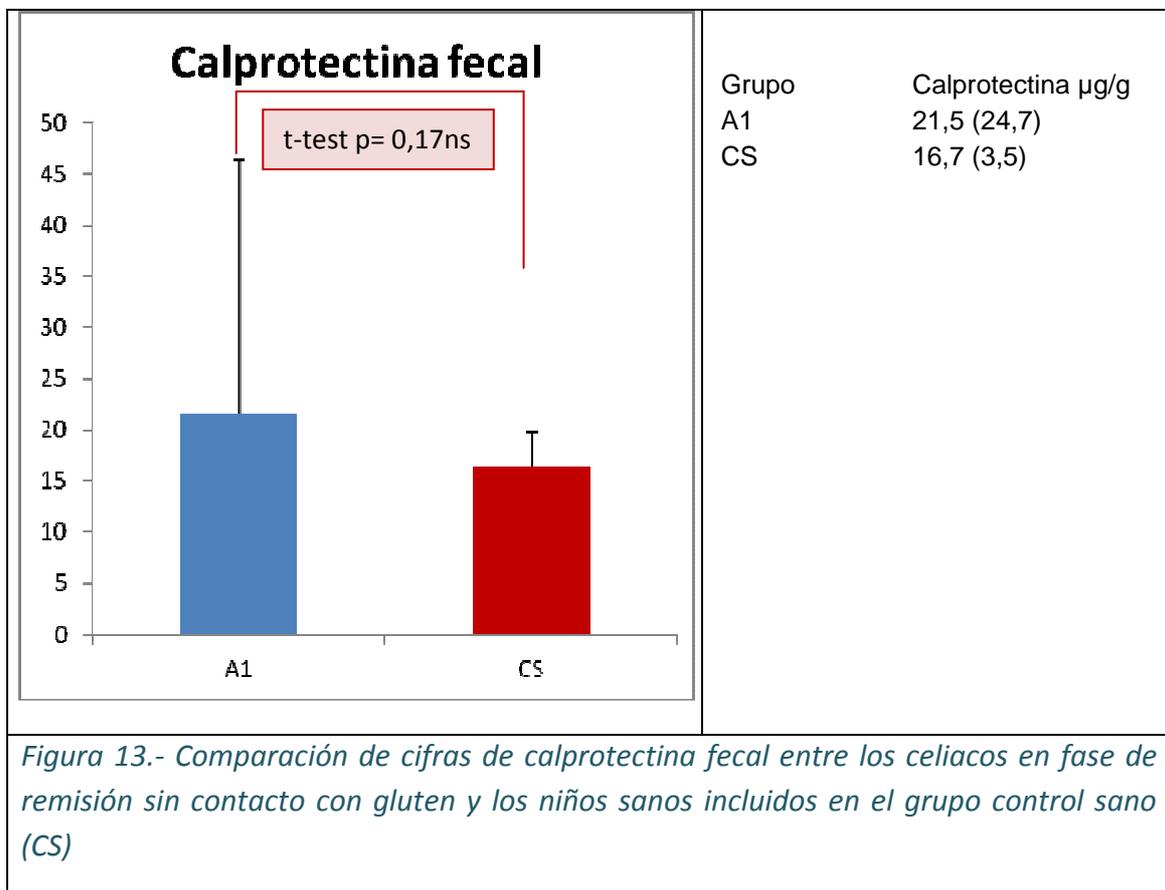
Aplicando el test ANOVA de análisis de varianza de un factor entre los distintos subgrupos ofrece un valor f de 11,5 lo cual resulta estadísticamente significativo con $p < 0,0001$ rechazándose por tanto la hipótesis de que las medias son iguales.



Comparación de las cifras de calprotectina entre los distintos grupos

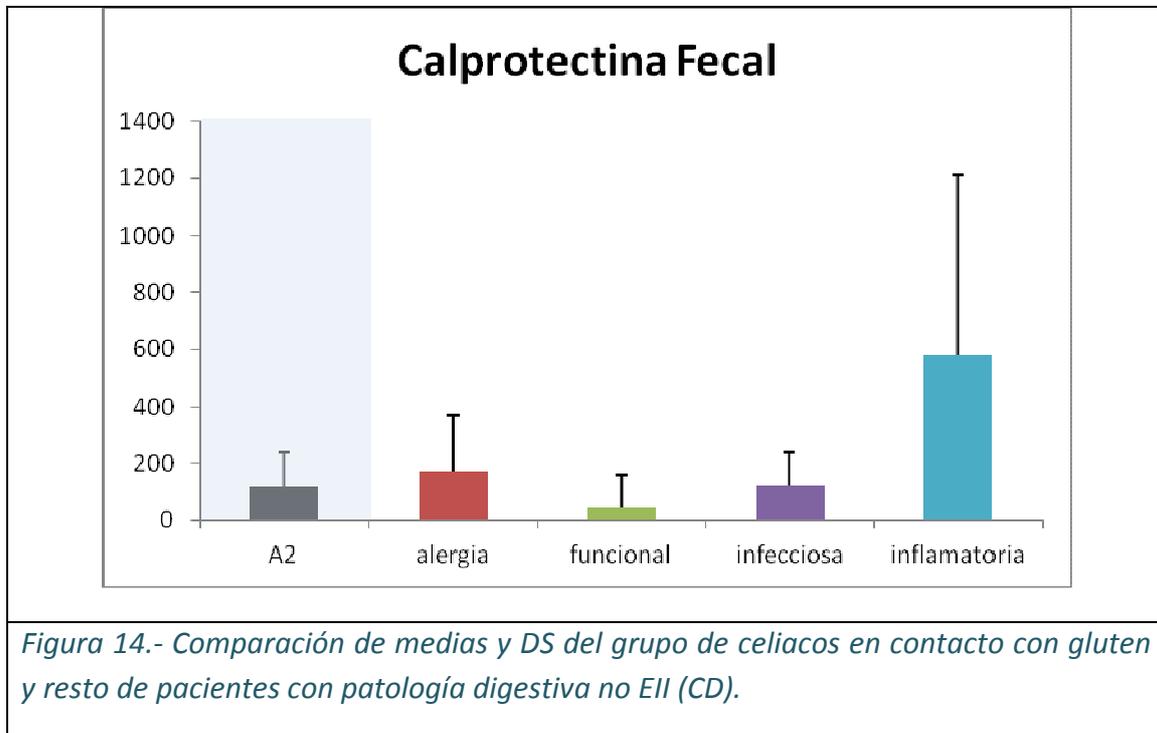
Para conocer la significatividad de las cifras de calprotectina obtenidas en los grupos de estudio, especialmente en el grupo de pacientes celiacos y su comparación con los grupos control se aplicó el test de comparación de medias mediante la t de Student entre los mismos.

No se encontró diferencias entre la calprotectina fecal del grupo de celiacos sin ingesta de gluten con el grupo de controles sin patología digestiva (CS) (fig. 13).



Por otra parte se ha comparado los resultados de calprotectina en el grupo de celiacos con ingesta de gluten (A2) con los otros pacientes del grupo de control digestivo (fig. 14). En este caso se ha excluido al subgrupo de otros por tratarse de pacientes de etiología diversas.

Aplicado el test de análisis de varianza (Anova) en este caso también indica que las medias de cada grupo son diferentes de forma estadísticamente significativa (fig. 14).



DISCUSION

A.- Datos demográficos.-

Durante el periodo de estudio del presente trabajo se fueron recogiendo muestras de forma secuencial a los pacientes citados a la consulta externa de la Unidad de Medicina Digestiva Infantil del Hospital General Universitario de Alicante. De las pruebas solicitadas se obtuvieron finalmente resultados de 259 siendo asignadas a los distintos grupos de estudio en función de sus características clínicas como se describió en el apartado de material y métodos.

Los pacientes del grupo celíaco han mostrado una edad media menor al grupo de pacientes con enfermedad inflamatoria y al grupo de patología digestiva (CD). Sorprendentemente los pacientes con debut celíaco (grupo A2) mostraron una edad media de 5.5 años cuando se venía considerando que la mayoría de los pacientes presentaban su inicio antes de los 5 años. Si se ha encontrado una mayor preponderancia en el sexo femenino como está ampliamente descrito en la literatura³⁵.

Respecto al grupo con enfermedad inflamatoria intestinal, las series publicadas en general hablan de edades medias al diagnóstico entre 10-14 años con leve predominio del sexo femenino en la colitis ulcerosa y del sexo masculino en el Crohn siendo estos levemente más jóvenes^{36,37}. Estos datos concuerdan con los encontrados en el presente trabajo en el que aunque no es un estudio de incidencia/prevalencia, se encontró que los pacientes con Crohn tenían una edad media más baja que los de colitis ulcerosa (11,4 vs 13,4 años) manteniendo la relación varón/mujer como lo descrito más arriba.

B.- Calprotectina Grupo Celíacos.

Los resultados de la calprotectina fecal obtenidos en los pacientes celíacos muestran unos valores significativamente más altos en los niños con ingesta de gluten al tratarse de casos recientemente diagnosticados.

Así el subgrupo A2 mostró una calprotectina media de 119,2 $\mu\text{g}/\text{gr}$ frente a los 21,7 de los niños sin gluten, siendo la t Student rechazando la hipótesis nula de igualdad de medias con una $p=0,008$. Estos resultados concuerdan con los escasos trabajos publicados en la literatura. Así Balamtekin et al³⁸ publicaron unos valores de 117 $\mu\text{g}/\text{g}$ de calprotectina en 31 pacientes recién diagnosticados de enfermedad celiaca frente a una media 3,7 $\mu\text{g}/\text{g}$ en los celíacos en seguimiento con dieta sin gluten. Las cifras del grupo sin tratar son prácticamente superponibles a las presentadas en el presente estudio. El grupo control de celíacos sin gluten y de controles sanos (media de calprotectina de 9,7 $\mu\text{g}/\text{g}$) son ligeramente inferiores a las de nuestro estudio probablemente por cuestiones metodológicas de la técnica de detección de la calprotectina.

Otro estudio pediátrico fue publicado por Berni Canani en 2004³⁹ en el que se incluyó un total de 38 niños celíacos encontrando cifras elevadas de calprotectina fecal en pacientes recién diagnosticados, que se normalizaban al cabo de 4 semanas de dieta sin gluten. Estos resultados también fueron encontrados por Ertekin et al en celíacos de nuevo diagnóstico con cifras de calprotectina más altas de forma significativa en los pacientes en contacto con gluten: 13,4 $\mu\text{g}/\text{g}$ frente a 4,6 $\mu\text{g}/\text{g}$ con dieta libre de gluten ($p>0.001$). Ellos también encontraron que las cifras de calprotectina en los pacientes celíacos sin gluten eran similares al grupo control (4,3 $\mu\text{g}/\text{g}$, $p=0,8$ ns)⁴⁰.

Por el contrario, en dos estudios publicados en adultos, solo alrededor de la mitad de los casos: 12 de 22 pacientes con enfermedad celiaca activa en uno⁴¹ y 7 de 13 en otro⁴² presentaban cifras altas de calprotectina fecal, aunque en este caso la media sí resultó significativamente mayor que el grupo control de adultos con trastornos funcionales.

En este sentido también apuntan los resultados de otro estudio publicado por Montalto en 2006 en pacientes celíacos adultos de nuevo diagnóstico cuya calprotectina media fue de 45,02 $\mu\text{g}/\text{g}$, que no difería de

forma estadísticamente significativa del grupo control (calprotectina fecal de 36,51 µg/g)⁴³.

En resumen, los resultados de calprotectina fecal aquí presentados son concordantes con los artículos publicados en la literatura (tabla XI) en el sentido que los pacientes celíacos en contacto con gluten presenta valores más altos de calprotectina fecal que el grupo control. Estos datos implican la posible utilización de la calprotectina como marcador precoz de transgresión con gluten en los pacientes celíacos ya diagnosticados y bajo tratamiento con dieta exenta del mismo. Es conocido que en estos casos los anticuerpos usados en clínica (antigliadina, antitransglutaminasa y antiendomiso) pueden tardar algunas semanas o meses para hacerse positivos. Estos resultados no se encuentran en adultos donde las cifras medias de calprotectina no se elevan respecto a los pacientes controles. No obstante de la revisión de los dos trabajos publicados en uno de Tibble aunque lo da como no significativo al solo elevarse en la mitad de los casos, las cifras medias de calprotectina son similares a lo de los estudios pediátricos. Es importante resaltar que en todos los estudios muestran una amplia dispersión de los valores en los grupos de estudio con rangos muy amplios y/o desviaciones estándar que igualan la magnitud de la media. Probablemente por ello se le da poco valor a este marcador en las publicaciones de adultos para indicar ingesta de gluten en pacientes celíacos⁴⁴.

Tabla XI					
Comparación de resultados de calprotectina fecal en la celiaquía en los distintos estudios publicados					
Estudio (año)	Núm. casos	Edad media	Calprotectina celíacos	Calprotectina control	t-test
Presente (2013)	15	5,5 (3,3) a.	119,2 (122,6)	16,3 (3,5)	p<0,001
Balamtek (2012)	31	6,1 (3,8) a.	117,2 (3,2-306)	9,6 (1-70)	p<0,001
Berni Canani (2004)	38	37,4 (15–81) m.	120	28	p<0,001
Ertekin (2010)	29	6,6 (0,6) a.	13,4 (8,5) mg/L	4,3±3,3 mg/L	p<0,05
Tibble (2002)	12	Adultos	13 (1–141) mg/L	4 mg/L	p`<0,01
Montalto (2007)	28	37,1 (9,7) a.	45,03 (24,2)	36,5 (21,7)	ns

C.- Calprotectina grupo Enfermedad Inflamatoria Intestinal.

Al tratarse de un marcador de inflamación intestinal, desde la aparición de la determinación de calprotectina fecal en el arsenal de pruebas diagnósticas de la patología gastroduodenal se invocó su utilidad para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad inflamatoria intestinal. Hay múltiples estudios que analizan el papel de la calprotectina en la E.I.I.^{45, 46, 47, 48, 49, 50,51}. En general se acepta que la elevación de las cifras de calprotectina fecal por encima del punto de corte 50 µg/g era sugestiva de enfermedad orgánica especialmente de E.I.I...

En un metanálisis reciente que analiza algunas de estas revisiones⁵² encuentran una sensibilidad agrupada del 93 % y una especificidad del 96 % para los estudios en adultos, cifras que bajaban al 92 y 76 % en niños. Su conclusión es que la calprotectina fecal era un instrumento valioso para determinar que pacientes eran susceptibles a ser sometidos a una

endoscopia digestiva baja (colonoscopia). Como consecuencia de este estudio proponían un algoritmo diagnostico que aparece en la fig. 15).

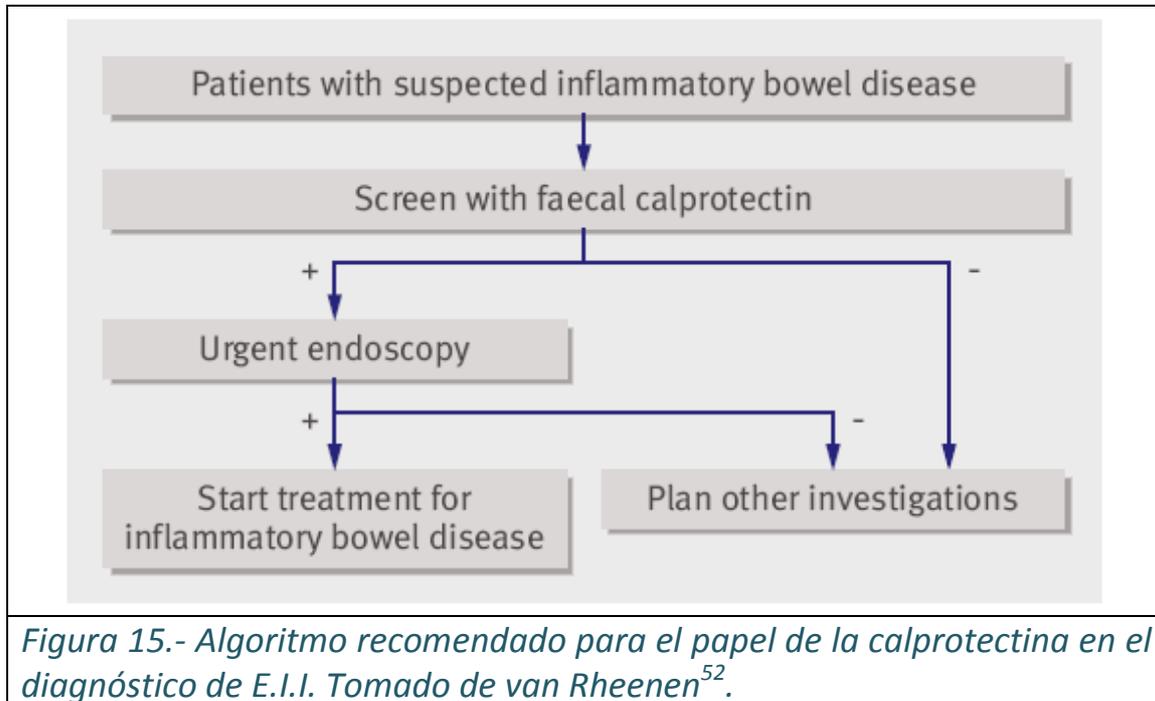


Figura 15.- Algoritmo recomendado para el papel de la calprotectina en el diagnóstico de E.I.I. Tomado de van Rheenen⁵².

En el presente estudio se han encontrado cifras de calprotectina fecal muy elevadas en los pacientes con EII tanto en enfermedad de Crohn como en colitis ulcerosa. Estos resultados están una situación intermedia dentro de lo publicado que oscilan entre los 237 $\mu\text{g/g}$ de Nissen⁵³ y los 6600 del estudio de Tomomasa⁵⁴. En este sentido los datos aquí presentados ocupan una situación intermedia tanto para la E.I.I. global (1312,5 $\mu\text{g/g}$) como para la enfermedad de Crohn (1113,6) y colitis ulcerosa (1713,5), ver tabla XII donde aparecen los datos publicados en pacientes pediátricos. La gran variedad de técnicas de medición de la calprotectina y de preparación de las muestras en los distintos estudios podrían explicar la variabilidad de los resultados publicados.

Tabla XII			
Valores de calprotectina en los distintos trabajos publicados en E.I.I. en pediatría (Modificado de Kostakis ⁵⁵)			
Estudio	Valor corte	pacientes	Calprotectina fecal
PRESENTE	23 µg/g	28	1312,5 (1087,1)
Fagerberg	50 µg/g	20	349 µg/g (213–440)
Bonnin Tomas	50 µg/g	15	1219 µg/g (322–2,967)
Sidler	50 µg/g	31	1265 µg/g (52–12,000)
Quail	50 µg/g	48	750 µg/g (235,8–1251)
Perminow	50 µg/g	36	1278 µg/g (13–8625)
Bruzzese	100 µg/g	15	309 ± 86 µg/g
Diamanti	100 µg/g	117	1675 µg/g (162–9500)
Crogan	100 µg/g	17	1932,1 ± 529,3
Perminow	NA	62	1183 µg/g (11–8625)
Paduchova	50 µg/g	19	1076,7 µg/g (109,9–2517,5)
Sipponen	100 µg/g	88	1199 (20–2742)
Diamanti	NA	31	1300 ± 1050 µg/g
Tomomasa	NA	23	6636,2 ± 13667,9
Bremner	50 µg/g	43	336,6 (22,4–1596) µg/g
Joishy	50 µg/g	26	251 µg/g
Gerasimidis	50 µg/g	15	2159 ± 520 µg/g
Fagerberg	50 µg/g	39	264 µg/g (101–382)
Olafsdottir	76 µg/g	17	293 ± 218 µg/g
Bunn	6,3 mg/L	26	9,1 mg/L (0,3–141,7)
Bunn	6,3 mg/L	37	11,8 mg/L (0,6–272,5)

El hallazgo de cifras más altas de calprotectina fecal en pacientes con CU respecto a los pacientes con enfermedad de Crohn también concuerda con lo publicado por algunos autores como Bruzzese⁵⁶ y Bunn⁵⁷, aunque no es un hallazgo que aparezca en todos los estudios^{58, 59}.

Por tanto este hallazgo aquí presentado no parece ser de utilidad para discriminar u orientar sobre el tipo de E.I.I. antes de disponer de los resultados de la biopsia. En la tabla XIII se resumen de los estudios citados.

Tabla XIII		
Comparación de los valores de calprotectina en pacientes con CU y CD		
Estudio	Colitis Ulcerosa	Enfermedad de Crohn
Bruzzese ⁵⁶	333 ± 82 µg/g	296 ± 89 µg/g
Bunn ⁵⁷	18,3 mg/L (3,7–272,5)	13,3 mg/L (0,9–25,7)
Perminow ⁵⁸	1181 µg/g (11–6123)	1,250 µg/g (13–8,625)
Bunn ⁵⁹	11,5 mg/L (0,6–272,5)	14 mg/L (0,7–59,7)

Finalmente se ha encontrado cifras de calprotectina fecal en los pacientes de enfermedad inflamatoria en remisión clínica (grupos BC1 y BCU1) de 429,7 y 701,4 µg/g respectivamente, cifras muy superiores a los del grupo control sano y a los de otros pacientes con patología digestiva excepto los del subgrupo de patología inflamatoria en los cuales la clínica y especialmente la anatomía patológica descartaron su inclusión como enfermedad de Crohn o Colitis ulcerosa (calprotectina media 576,5). Este hallazgo aparece ampliamente en la literatura (ver tabla XIV).

Este dato sugiere que aunque estaban libres de enfermedad clínicamente y por los resultados de los reactantes de fase aguda, es lógico suponer que persiste un cierto grado de inflamación intestinal, no consiguiéndose la curación mucosa. Este hecho debería confirmarse siempre por endoscopia. Por otra parte según datos recogidos en la unidad se ha encontrado que pacientes con E.I.I. con endoscopia normal presentaban cifras de calprotectina indetectables (datos no incluidos en el estudio). Este hallazgo sí que avala el valor de la calprotectina en los pacientes en remisión para orientar cuando se podría haber alcanzado la curación mucosa.

Tabla XIV**Comparación de los valores de calprotectina en pacientes con EII activa vs remisión clínica.**

Estudio	EII activa	Remisión
Diamanti ⁶⁰	1738 ± 940,3 µg/g	249 ± 131,6 µg/g
Fagerberg ⁶¹	392 µg/g (278–440)	32,9 µg/g (9,4–237)
Aomatsu ⁶²	1562,5 µg/g	172,5 µg/g
Walkiewicz ⁶³	3214 ± 2186 µg/g,	1373 ± 1630 µg/g
Wisikin ⁶⁴	1472 µg/g (757–2737)	201 µg/g (47–907)

D.- Calprotectina en resto de patología digestiva.

No se han encontrado muchos estudios que hayan analizado el comportamiento de la calprotectina fecal en la patología digestiva pediátrica no E.I.I. y no celiaca. En los tres que estudian estos hechos se presentan cifras superiores de calprotectina en las enfermedades digestivas orgánicas (gastroenteritis infecciosas, enterocolitis alérgicas incluso en las poliposis y en el reflujo gastroesofágico) que en el grupo de niños sanos^{39, 42,65}. También aparecen en los estudios de Berni Canani cifras de calprotectina fecal significativamente más bajas en los pacientes diagnosticados de trastornos funcionales del aparato digestivo: dolor abdominal crónico y recurrente funcional e intestino irritable.

Los resultados aquí presentados apuntan en la misma línea con valores muy ligeramente elevados respecto a los controles sanos (47,7 µg/g vs 23,3) en los niños diagnosticados de patología digestiva funcional. Por el contrario se han encontrados cifras de calprotectina fecal algo más altas en otros grupos de patología como los pacientes con enterocolitis alérgica (172,1), o infecciones gastrointestinales (121,4). Estos datos concuerdan con los presentados por Berni Canani y Carrocio. Este último observó que la calprotectina de los pacientes alérgicos se normalizaba tras 4 semanas de dieta exenta del alimento responsable.

Por tanto los resultados indicarían que la calprotectina fecal a títulos no muy altos, es un marcador sensible aunque poco específico para detectar inflamación en el tracto gastrointestinal al elevarse en las enfermedades que se caracterizan por inflamación de la pared intestinal, mientras que los niños con patología digestiva funcional muestran elevaciones muy leves y sin significación estadística, respecto a los controles sanos.

CONCLUSIONES

- Los pacientes pediátricos sin enfermedad digestiva presentaron un valor medio de calprotectina fecal de 16,3 (DS=3,5) $\mu\text{g/g}$ de heces. Por tanto el punto de corte de calprotectina en heces, calculado como media más 2 DS se establece en 23,3 $\mu\text{g/g}$.
- Los pacientes celíacos con dieta que contiene gluten presentan valores más altos de calprotectina fecal que los que recibían dieta libre de gluten, siendo esta diferencia estadísticamente significativa.
- El hallazgo de un valor de calprotectina fecal superior a 23.3 $\mu\text{g/g}$ en un paciente celíaco tiene un VPP del 90 % que esté tomando gluten, siempre que se descarte otras enfermedades digestivas.
- Por el contrario el hallazgo de una calprotectina normal en un paciente celíaco solo tiene un 68 % de probabilidad de indicar que no esté consumiendo gluten.
- Los pacientes celíacos en seguimiento con dieta libre de gluten presentan cifras de calprotectina similares a los controles sanos.
- La calprotectina fecal media del grupo de niños celíacos con ingesta de gluten fue similar a la encontrada en otros grupos con patología digestiva excepto los niños con enfermedades inflamatorias intestinales tanto colitis ulcerosa, como enfermedad de Crohn como inflamaciones intestinales inespecíficas.

- Los valores más elevados de calprotectina fecal se encontraron en el grupo de EII tanto en los pacientes de EC como en CU. Dentro de este grupo los niños con CU mostraron cifras significativamente superiores al subgrupo de EC.
- En el presente trabajo la calprotectina fecal no se normalizó en los pacientes con EII a pesar de estar en remisión clínica.
- El hallazgo de cifras de calprotectina fecal muy elevadas, es muy sugestivo de EII.
- Respecto al resto de patología digestiva no EII. la calprotectina fecal a títulos no muy altos, es un marcador sensible aunque poco específico para detectar inflamación en el tracto gastrointestinal, mientras que los niños con patología digestiva funcional muestran elevaciones muy leves y sin significación estadística ($p=0.1$ ns), respecto a los controles sanos.

BIBLIOGRAFIA

1. *García Sánchez MA, González R, et al. Precisión diagnóstica de la calprotectina fecal para predecir una colonoscopia patológica. MedClin (Barc). 2006;127:41-6*
2. *Cabrera Rodríguez R y Armas Ramos HM. Calprotectina fecal. ¿El marcador definitivo? BSCP Can Ped 2003;27:15-17*
3. *Thompson WG, Longstreth GF, Drossmann DA, Heaton KW, Irving EJ, Meller-Lissner SA. Funcional bowel disorders and functional abdominal pain. Gut. 1999;45:453-47*
4. *Bonnín Tomàs A, Vila Vidal M, et al. Calprotectina fecal como marcador diferencial entre patología gastrointestinal orgánica y funcional. Rev esp enferm dig 2007;99:689-693*
5. *García Sanchez MV, Gonzalez R, Iglesias E, et al. Precisión diagnóstica de la calprotectina fecal para predecir una colonoscopia patológica. Med Clin (Barc). 2006;127:41-6*
6. *Montalto M, Santoro L, et al. Faecal calprotectin concentrations in untreated coeliac patients. Scand J Gastroenterol. 2007 Aug;42:957-61.*
7. *García Morán G, Mejía OS, Hernández Vela S, García Cardona A, et al. Biomedicina (Biología, Patobiología, Bioclínica y Fármaco-Terapéutica) de la Familia de las Proteínas S100 en la Especie Humana. Salud UIS 2006;38: 128-152.*
8. *Marenholz I, Heizmann CW, et al. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). Biochem Biophys Res Commun. 2004; 322: 1111-22.*
9. *Wang G, Zhang S, et al. Heterodimeric interaction and interfaces of S100A1 and S100P. Biochem J. 2004; 382: 375-83.*

10. De Ingo P., Korndörfer, et al. *The Crystal Structure of the Human (S100A8/S100A9)₂ Heterotetramer, Calprotectin, Illustrates how Conformational Changes of Interacting α -Helices Can Determine Specific Association of Two EF-hand Proteins.* *Journal of Molecular Biology.* 2007;37:887 – 898
11. Rodrigo L. *Calprotectina fecal.* *Rev esp enferm dig.* 2007;99: 683-688.
12. Indriati M., Skaar E.p., et al. *Nutritional immunity: transition metals at the pathogen host interface.* *Nature Reviews Microbiology.* 2012; 10: 525-537.
13. Fournier B.M., Parkos C.A., et al. *The role of neutrophils during intestinal Inflammation.* *Nature.* 2012;5: 354-366
14. Rahimi F, Hsu K, et al. *FGF-2, IL-1beta and TGF-beta regulate fibroblast expression of S100A8.* *FEBS J* 2005; 272: 2811-27.
15. Luster A. *Chemokines — Chemotactic Cytokines That Mediate Inflammation.* *N Engl J Med* 1998; 338:436-445
16. Einarsson R. *S100 protein family with focus on S100 β biochemical properties, genomic organization and biologic functions.* XXIX International Congress of the International Society of Oncodevelopmental Biology and Medicine (ISOBM) and VII International Symposium Biology and Clinical Usefulness of Tumor Markers, Barcelona, 2001.
17. Schafer BW, Wicki R, et al. *Isolation of a YAC clone covering a cluster of nine S100 genes on human chromosome 1q21: rationale for a new nomenclature of the S100 calcium-binding protein family.* *Genomics* 1995; 25: 638-643.
18. Engelkamp D, Schafer BW, et al. *Six S100 genes are clustered on human chromosome 1q21: identification of two genes coding for the two previously unreported calcium-binding proteins S100D and S100E.* *Proc Nat Acad Sci USA* 1993; 90: 6547-6551.

19. Wang G, Zhang S, Fernig DG et al. Heterodimeric interaction and interfaces of S100A1 and S100P. *Biochem J.* 2004;382:375-83
20. Familia de las Proteínas S100 en la Especie Humana. *Salud UIS* 2006;38:128-152.
21. Sutherland AD, Geary RB, Frizelle FA. Review of fecal biomarkers in inflammatory bowel disease. *Dis Colon Rectum* 2008; 51: 1283-91.
22. Meeuwisse GW. Diagnostic criteria in coeliac disease. *Acta Paediatr Scand* 1970;59:461-3.
23. Marsh N. PROGRESS REPORT: Grains of truth: evolutionary changes in small intestinal mucosa in response to environmental antigen challenge. *Gut*, 1990; 31: 111-114.
24. Oberhuber G., Granditsch G., Vogelsang H. Histopathology of coeliac disease. The histopathology of coeliac disease: time for a standardized report scheme for pathologists *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 1999;11: 1185-94.
25. Walker-Smith JA, Guandalini S, Schmitz J, et al. Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. *Arch Dis Child* 1990;65: 909-11.
26. Guandalini S, Ventura A, Ansaldi N, et al. Diagnosis of coeliac disease: time for a change? *Arch Dis Child* 1989;64: 1320-4.
27. Ribes-Koninckx C, Mearin ML, Korponay-Szabó IR, Shamir R, Husby S, Ventura A, Branski D, Catassi C, Koletzko S, Mäki M, Troncone R, Zimmer KP. (The ESPGHAN Working Group on Coeliac Disease Diagnosis). Coeliac Disease Diagnosis: ESPGHAN 1990. Criteria or need for a change? Results of a Questionnaire. *JPGN.* 2012;54: 15-9.
28. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. S. Husby, S. Koletzko, I.R. Korponay-Szabó, M.L. Mearin, A. Phillips, R. Shamir, R. Troncone, K. Giersiepen, D. Branski, C. Catassi, M. Leigeman, M. Mäki, C. Ribes-Koninckx, A. Ventura, K.P. Zimmer. Guidelines for the Diagnosis of Coeliac Disease. For the

ESPGHAN Working Group on Coeliac Disease Diagnosis, on behalf of the ESPGHAN Gastroenterology Committee. *JPGN* 2012;54: 136–160.

29. Poullis A, Foster R, Northfield TC y Mendall MA. Review article: faecal markers in the assessment of activity in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2002; 16: 675-681.
30. IBD Working Group of the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. Inflammatory bowel disease in children and adolescents: recommendations for diagnosis the Porto criteria. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2005;41: 1-7.
31. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott ID, Bernstein CN, Brant SR, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol.* 2005;19 Suppl A:5-36.
32. Navas V, Blasco J, Sierra C, Barco A, Vicioso E. Eficacia del tratamiento nutricional primario en la enfermedad de Crohn pediátrica. *An Pediatr (Barc).* 2008;69: 506-14
33. Turner D, Otley AR, Mack D, De Bruijne J, Uusoue K, Walter T, et al. Development and evaluation of a Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index (PUCAI): A prospective multicenter study. *Gastroenterology.* 2007;133: 423-32.
34. Martín de Carpi J, Vilar P, Varea V. Infliximab como terapia de rescate en colitis ulcerosa grave resistente al tratamiento corticoideo. *An Pediatr (Barc).* 2008;69: 351-4
35. Mearin F. Síndrome del intestino irritable: nuevos criterios de Roma III. *Med Clin (Barc).* 2007;128: 335-43
36. Catassi, C.; Räscht, I.M.; Fabiani, E.; Rossini, M.; Bordicchia, F.; Candela, F.; Coppa, G.V. y Giorgi, P.L.: Coeliac disease in the year 2000: exploring the iceberg. *Lancet* 1994;343: 200-203.

37. Fragoso T, Garcia Barcallo E, Garcia Perez W et al. Estudio epidemiológico de la enfermedad inflamatoria intestinal en niños y adolescentes (estudio multicentrico). *Rev cub paedriatria* 2002;74: 195-202.
38. L. Rodrigo, s. Riestra¹, p. Niño, v. Cadahía, r. Tojo, d. Fuentes, m. Moreno, e. González-ballina, And e. Fernández. A population-based study on the incidence of inflammatory bowel disease in oviedo (northern spain). *Rev esp enferm dig (Madrid)*. 2004;96: 296-304
39. Balamtek N, Dem H, Baysoy. Fecal Calprotectin Concentration Is Increased In Children With Celiac Disease: Relation With Histopathological Findings. *Turk J Gastroenterol* 2012; 23: 505-508.
40. Berni-Canani R, et al. Diagnostic value of faecal calprotectin in paediatric gastroenterology clinical practice. *Dig Liver Dis*. 2004;36: 467-470.
41. Ertekin V, Selimoglu MA, Turgut A, Bakan N. Fecal Calprotectin Concentration in Celiac Disease. *J. Clin Gastroenterology* 2010;44: 544-6.
42. Tibble JA, et al. Use of surrogate markers of inflammation and Rome criteria to distinguish organic from nonorganic intestinal disease. *Gastroenterology*. 2002;123: 450-460.
43. Carroccio A, et al. Diagnostic accuracy of fecal calprotectin assay in distinguishing organic causes of chronic diarrhea from irritable bowel syndrome: a prospective study in adults and children. *Clin Chem*. 2003;49: 861-867.
44. Montalto M, Santoro L, Curigliano V, et al. Faecal calprotectin concentrations in untreated coeliac patients. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 2007; 42: 957-961
45. Konikoff M, Denson L. Role of Fecal Calprotectin as a Biomarker of Intestinal Inflammation in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 524-534

46. Ashorn S, Honkanen T, Kolho KL, Ashorn M, Valineva T, Wei B, et al. Fecal calprotectin levels and serological responses to microbial antigens among children and adolescents with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15: 199-205.
47. Bunn SK, Bisset WM, Main MJ, Gray ES, Olson S, Golden BE. Fecal calprotectin: validation as a noninvasive measure of bowel inflammation in childhood inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2001;33: 14-22.
48. Canani RB, de Horatio LT, Terrin G, Romano MT, Miele E, Staiano A, et al. Combined use of noninvasive tests is useful in the initial diagnostic approach to a child with suspected inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006;42: 9-15.
49. Fagerberg UL, Loof L, Myrdal U, Hansson LO, Finkel Y. Colorectal inflammation is well predicted by fecal calprotectin in children with gastrointestinal symptoms. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005;40: 450-5.
50. Kolho KL, Raivio T, Lindahl H, Savilahti E. Fecal calprotectin remains high during glucocorticoid therapy in children with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2006;41: 720-5.
51. Limburg PJ, Ahlquist DA, Sandborn WJ, Mahoney DW, Devens ME, Harrington JJ, et al. Fecal calprotectin levels predict colorectal inflammation among patients with chronic diarrhea referred for colonoscopy. *Am J Gastroenterol* 2000;95: 2831-7.
52. Otten CM, Kok L, Witteman BJ, Baumgarten R, Kampman E, Moons KG, et al. Diagnostic performance of rapid tests for detection of fecal calprotectin and lactoferrin and their ability to discriminate inflammatory from irritable bowel syndrome. *Clin Chem Lab Med* 2008;46: 1275-80.
53. Van Rheenen P, Van de Vijver E, Fidler V. Faecal calprotectin for screening of patients with suspected inflammatory bowel disease: diagnostic meta-analysis. *BMJ* 2010;341: 33-69

54. Nissen AC, van Gils CE, Menheere PP, van den Neucker AM, van der Hoeven MA, Forget PP. *Fecal calprotectin in healthy term and preterm infants. J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2004;38: 107-108
55. Tomomasa T, Tajiri H, Kagimoto S, et al. *Leukocytapheresis in pediatric patients with ulcerative colitis. J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2011;53: 34-39.
56. Kostakis I, Cholidou K, Vaiopoulos A, et al. *Fecal Calprotectin in Pediatric Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review. Dig Dis Sci.* 2013; 58: 309-319.
57. Bruzzese E, Raia V, Gaudiello G, et al. *Intestinal inflammation is a frequent feature of cystic fibrosis and is reduced by probiotic administration. Aliment Pharmacol Ther.* 2004;20: 813-819.
58. Bunn SK, Bisset WM, Main MJ, Gray ES, Olson S, Golden BE. *Fecal calprotectin: validation as a noninvasive measure of bowel inflammation in childhood inflammatory bowel disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2001;33: 14-22.
59. Perminow G, Brackmann S, Lyckander LG, et al. *A characterization in childhood inflammatory bowel disease, a new population-based inception cohort from South-Eastern Norway, 2005–07, showing increased incidence in Crohn’s disease. Scand J Gastroenterol.* 2009;44: 446-456.
60. Bunn SK, Bisset WM, Main MJ, Golden BE. *Fecal calprotectin as a measure of disease activity in childhood inflammatory bowel disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2001;32: 171-177.
61. Diamanti A, Knafelz D, Panetta F, et al. *Plasma citrulline as surrogate marker of intestinal inflammation in pediatric and adolescent with Crohn’s disease: preliminary report. Int J Colorectal Dis.* 2011;26: 1445-1451.
62. Fagerberg UL, Lööf L, Lindholm J, Hansson LO, Finkel Y. *Fecal calprotectin: a quantitative marker of colonic inflammation in*

children with inflammatory bowel disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2007;45: 414-420.

63. *Aomatsu T, Yoden A, Matsumoto K, et al. Fecal calprotectin is a useful marker for disease activity in pediatric patients with inflammatory bowel disease. Dig Dis Sci. 2011;56: 2372-2377.*
64. *Walkiewicz D, Werlin SL, Fish D, Scanlon M, Hanaway P, Kugathasan S. Fecal calprotectin is useful in predicting disease relapse in pediatric inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis. 2008;14: 669-673.*
65. *Wisikin AE, Wootton SA, Cornelius VR, Afzal NA, Elia M, Beattie RM. No relation between disease activity measured by multiple methods and REE in childhood Crohn disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2012;54: 271-276.*
66. *Kok L, Elias S, Witteman B, et al. Diagnostic Accuracy of Point-of-care Fecal Calprotectin and Immunochemical Occult Blood Tests for Diagnosis of Organic Bowel Disease in Primary Care: The Cost-Effectiveness of a Decision Rule for Abdominal Complaints in Primary Care (CEDAR) Study Clinical Chemistry 58:6; 989-998 (2012)*