

Aus der Abteilung Gastroenterologie der Klinik II des Zentrums für Innere Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock  
Direktor: Prof. Dr. med. S. Liebe

**Aussagekraft von fäkalem Calprotectin zur Beurteilung der  
Krankheitsaktivität bei Colitis ulcerosa und Morbus Crohn im Vergleich  
von zwei kommerziellen Testsystemen**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin  
der medizinischen Fakultät  
der Universität Rostock

vorgelegt von  
Antje Kangowski  
geb. am 04.09.1980 in Neuruppin

Rostock 2012

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Christan Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Stefan Liebe

2. Gutachter: PD Dr. Claus Kerkhoff

3. Gutachter: Prof. Dr. med. Christian Kneitz

Tag der Verteidigung: 26.09.2012

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Chronisch entzündliche Darmerkrankungen .....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Colitis ulcerosa .....	3
1.1.2	Morbus Crohn.....	4
<b>1.2</b>	<b>Diagnostik der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.....</b>	<b>5</b>
1.2.1	Aktivitätsindices .....	5
1.2.2	Entzündungsparameter im Blut .....	7
1.2.3	Calprotectin als Entzündungsparameter im Stuhl .....	9
<b>1.3</b>	<b>Zielsetzung.....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>15</b>
2.1.1	Patienten .....	15
2.1.2	Stuhlprobengewinnung.....	16
2.1.3	Stuhlprobenvorbereitung .....	17
2.1.4	Calprotectin ELISA Kits .....	17
2.1.5	Pufferlösungen.....	17
2.1.6	Geräte und Einmalartikel.....	18
2.1.6.1	Geräte .....	18
2.1.6.2	Einmalartikel .....	18
<b>2.2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>18</b>
2.2.1	Testprinzip.....	18
2.2.1.1	Calprotectin ELISA Kit (Calpro) .....	18
2.2.1.2	Calprotectin ELISA Kit (Immundiagnostik) .....	19
2.2.2	Vorbereitung der Reagenzien .....	19
2.2.2.1	Calprotectin ELISA Kit (Calpro) .....	19
2.2.2.2	Calprotectin ELISA Kit (Immundiagnostik) .....	20
2.2.3	Testdurchführung/Pipettierschema.....	20
2.2.3.1	Calprotectin ELISA Kit (Calpro) .....	20
2.2.3.2	Calprotectin ELISA Kit (Immundiagnostik) .....	21
<b>2.3</b>	<b>Statistik.....</b>	<b>22</b>

<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1</b>	<b>Deskriptive Statistik .....</b>	<b>23</b>
3.1.1	Angaben zu Diagnose, Alter und Geschlecht der Patienten.....	23
3.1.2	Aufteilung Patienten nach klinischer Krankheitsaktivität (CAI/CDAI).....	23
3.1.3	Dokumentierte Laborwerte für Colitis ulcerosa und Morbus Crohn.....	24
3.1.4	Patienten mit/ohne therapeutische Steroidtherapie bei Colitis ulcerosa und Morbus Crohn.....	27
3.1.5	Darstellung der Calprotectinkonzentrationen in Abhängigkeit von endoskopisch diagnostizierten Lokalisationen.....	28
<b>3.2</b>	<b>Korrelationsanalysen .....</b>	<b>31</b>
3.2.1	Korrelation zwischen Calpro-Test und Immundiagnostik-Test .....	31
3.2.2	Korrelation zwischen Calprotectin und klinischen Aktivitätsindices.....	32
3.2.3	Korrelation zwischen Calprotectin und Entzündungswerten im Blut (CRP und Leukozyten) .....	33
<b>3.3</b>	<b>Verhältnis der Calprotectinwerte zur klinischen Krankheitsaktivität .....</b>	<b>35</b>
3.3.1	Verhältnis der Calprotectinwerte zur klinischen Krankheitsaktivität bei Colitis ulcerosa .....	35
3.3.2	Verhältnis der Calprotectinwerte zur klinischen Krankheitsaktivität bei Morbus Crohn.....	36
<b>3.4</b>	<b>Pathologischer Calprotectin-Test und Krankheitsaktivität .....</b>	<b>38</b>
3.4.1	Pathologischer Calpro-Test für Colitis ulcerosa und Morbus Crohn .....	38
3.4.2	Pathologischer Immundiagnostik-Test für Colitis ulcerosa und Morbus Crohn.....	40
3.4.3	Sensitivität und Spezifität von Calprotectin .....	42
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>43</b>
<b>4.1</b>	<b>Korrelation zwischen Calprotectin beider Testsysteme .....</b>	<b>44</b>
<b>4.2</b>	<b>Korrelation zwischen Calprotectin und Aktivitätsindices.....</b>	<b>45</b>
<b>4.3</b>	<b>Korrelation zwischen Calprotectin und Entzündungswerten im Blut (CRP und Leukozyten).....</b>	<b>47</b>
<b>4.4</b>	<b>Verhältnis der Calprotectinwerte zur klinischen Krankheitsaktivität .....</b>	<b>48</b>
<b>4.5</b>	<b>Vergleich der beiden Testsysteme .....</b>	<b>49</b>
<b>4.6</b>	<b>Schlussfolgerung .....</b>	<b>50</b>

<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>53</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>55</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>64</b>
<b>8</b>	<b>Thesen.....</b>	<b>71</b>

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
AB	Detektionsantikörper
Abb.	Abbildung
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
bzw.	beziehungsweise
CAI	Clinical activity index
CDAI	Crohn`s disease activity index
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankung
CONJ	Konjugat
CRP	C-reaktives Protein
CTRL	Kontrolle
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EXBUF	Extraktionspufferkonzentrat
FC	fäkales Calprotectin
g	Gramm
kDa	Kilo Dalton
kg	Kilogramm
l	Liter
MCH	mean corpuscular hemoglobin
MCV	mean corpuscular volume
mg	Milligramm
ml	Milliliter
nm	Nanometer
NPV	negative predictive value
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
PPV	positive predictive value
RDS	Reizdarmsyndrom
rpm	Revolutions per Minute
SD	Standardabweichung
STD	Standards

## Abkürzungsverzeichnis

---

STOP	Stopplösung
SUB	Substrat
TNF-Antikörper	Tumor-Nekrose-Faktor-Antikörper
WASHBUF	Waschpufferkonzentrat

## 1 Einleitung

### 1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Unter chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) versteht man schubweise verlaufende oder kontinuierlich bestehende entzündliche Erkrankungen des Darmes.

Zu diesem Formenkreis gehören der Morbus Crohn und die Colitis ulcerosa.

Die jährlichen Zahlen zur Inzidenz und Prävalenz der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sind schwankend. Unbestritten ist ein stetiger Anstieg der Inzidenz in den letzten Jahren. Die mittlere Inzidenzrate des Morbus Crohn liegt bei 5,9 Fällen pro 100000 Einwohner pro Jahr, die Prävalenz zwischen 34 und 146 pro 100000 Einwohner [1]. Die Colitis ulcerosa ist mit einer Inzidenz von 3-7 Neuerkrankungen pro 100000 Einwohner pro Jahr und einer Prävalenz von 30-120 pro 100000 Einwohner etwas häufiger verbreitet als der Morbus Crohn [1].

Es besteht für beide Erkrankungen sowohl in Europa als auch in den USA ein Nord – Süd – Gefälle [53], wobei die meisten Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen im Norden leben. Einige Studien belegen, dass Stadtbewohner häufiger unter einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung leiden als die Landbevölkerung. Diese Erkenntnis unterstützt die Hypothese, dass Ernährungs- und Umweltfaktoren Einfluss auf die Ätiologie haben. Unterschiede, bezüglich der Häufigkeit des Auftretens, zeigen sich auch in den verschiedenen ethnischen Gruppen. Es wird beobachtet, dass die weiße Bevölkerungsgruppe bis zu 5mal häufiger erkrankt. Auch in den USA und Europa lebende Juden zeigen eine deutlich höhere Inzidenzrate als die nichtjüdische Bevölkerung, wobei in Israel lebende Juden wiederum eine geringere Inzidenzrate aufweisen. Diese Beobachtungen deuten auf ein Zusammenspiel genetischer und umweltbedingter Faktoren in der Ätiologie der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen hin [1].

Bis heute sind die genauen Ursachen der chronischen Entzündungsreaktion ungeklärt und Gegenstand der Forschung. Diskutiert wird ein Zusammenwirken von mehreren Faktoren.

Im Einzelnen handelt es sich um eine genetische Prädisposition, Umweltfaktoren und eine Dysregulation des intestinalen Immunsystems [45].

Es wird eine familiäre Häufung bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen beschrieben, die beim Morbus Crohn etwas stärker ausgeprägt ist. Verwandte ersten Grades haben bei Patienten mit Morbus Crohn ein 10fach höheres Risiko an der gleichen Diagnosestellung wie ihr betroffener Verwandter zu erkranken. Angehörige von Patienten mit Colitis ulcerosa weisen ein 4fach höheres Risiko gegenüber der Gesamtbevölkerung auf, diese Erkrankung auszubilden. Beim Morbus Crohn haben eineiige Zwillinge eine Konkordanzrate von 67%.

Eine geringere Konkordanz liegt bei der Colitis ulcerosa mit 20% vor [1]. Somit ist für Zwillinge mit Colitis ulcerosa der genetische Einfluss geringer ausgeprägt.

Neben einer genetischen Prädisposition werden auch umweltbedingte Faktoren für die Entstehung der Krankheit diskutiert. So stellt das Rauchen ein gesteigertes Risiko zur Entwicklung eines Morbus Crohn dar, sowie das Risiko einen erneuten Krankheitsschub zu fördern. Vermutet wird eine vasokonstriktive Wirkung des Nikotins, die eine Verschlechterung der Darmdurchblutung zur Folge hat und so die Ausbildung von Ulzerationen im Gastrointestinaltrakt fördert. Im Gegensatz zum Morbus Crohn tritt die Colitis ulcerosa bevorzugt bei Nichtrauchern oder ehemaligen Rauchern auf. Durch die Veränderung der Darmdurchblutung und Steigerung der Muzinproduktion wird ein protektiver Effekt des Nikotins diskutiert.

Charakteristisch für beide Erkrankungen sind Diarrhöen, die auch blutig sein können und abdominelle Schmerzen. Auch das Auftreten extraintestinaler Manifestationen im Sinne von Arthritiden, Hautveränderungen und Augenentzündungen sind möglich. Weiterhin ist im Zusammenhang mit diesen Erkrankungen eine Vielzahl von Komplikationen denkbar.

Der Krankheitsverlauf ist nicht vorhersehbar und individuell sehr unterschiedlich. Er verläuft schubweise, ohne eine Vorhersage über den Zeitpunkt, die Häufigkeit oder den Schweregrad der Schübe zu treffen. Man unterscheidet zwischen einem akut rezidivierenden Verlauf und einer chronisch aktiven Verlaufsform. Die akut rezidivierende Verlaufsform spiegelt sich in einzelnen akuten Schüben wieder, die etwa 4-12 Wochen andauern können und dazwischen liegenden Remissionsphasen mit einer Dauer von Wochen bis Jahren. Von einem chronisch aktiven Verlauf spricht man zum einen, wenn keine Remission erreicht wird, trotz intensiver Steroidtherapie über mindestens ein halbes Jahr und zum anderen, wenn eine Rezidivneigung bei Minimierung der Steroidtherapie vorliegt.

Da die Ätiopathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen unbekannt ist, beschränkt sich die medikamentöse Therapie auf die Reduzierung der Entzündungsaktivität und damit auf eine Verbesserung der Lebensqualität und Verhinderung von Rezidiven. Die Wahl der Therapiestrategie hängt von der Krankheitsaktivität, der Lokalisation und Ausdehnung der Entzündung und dem Vorhandensein von Komplikationen ab. Zu den Säulen der Basistherapie gehören der Einsatz von 5-Aminosalizylaten, Glukokortikoiden, Immunsuppressiva und TNF (Tumor-Nekrose-Faktor)-Antikörper. Eine Verordnung von 5-Aminosalizylaten, in oraler oder topischer Form, erfolgt zur Remissionserhaltung. Dieses Präparat ist die erste Wahl in der Behandlung einer gering- bis mäßiggraden Colitis ulcerosa. Bei einem akuten Schub kommen Glukokortikoide in parenteraler oder oraler Form zum Einsatz.

Sie stellen die vordergründige Therapieoption zur Behandlung eines gering- bis mäßigaktiven Morbus Crohn dar. Liegt ein Befall des distalen Kolons vor, werden Kortikosteroide auch lokal in Form von Schaum oder Klysmen dargereicht. Zu den Immunsuppressiva zählen Azathioprin, Methotrexat, 6-Mercaptopurin, Tacrolimus und Cyclosporin. Sie sind nicht Medikamente der ersten Wahl in der Behandlung der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Es besteht ein erhöhtes Risiko schwerwiegende Nebenwirkungen auszubilden. Ein weiterer Nachteil ist, dass eine volle Wirkung der Medikamente erst nach Monaten erreicht wird. Eine Indikation zur Immunsuppression liegt beim steroidabhängigen und steroidrefraktären Verlauf vor.

### **1.1.1 Colitis ulcerosa**

Die Colitis ulcerosa konnte erstmals in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts von den infektiösen Kolitiden abgegrenzt werden.

Sie zählt zu den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, die sich auf die Kolonmukosa beschränkt und kontinuierlich vom Rektum nach proximal ausbreitet. Häufig ist das Rektum bzw. Rektosigmoid (etwa 95% der Patienten) befallen. Eine Ausdehnung der Entzündung auf den gesamten Kolonrahmen bis hin zum terminalen Ileum, im Sinne einer „Backwash-Ileitis“, ist möglich. Je nach Ausdehnung unterscheidet man eine Proktitis/ Proktosigmoiditis (40%), Linksseitenkolitis (40%) oder Pankolitis (10-20%) [2].

Die Krankheit manifestiert sich bei einem breit gefächerten Altersprofil bevorzugt im Alter zwischen 20-40 Jahren. Selbst in höheren Lebensjahrzehnten kann die Erstdiagnose gestellt werden. Etwas häufiger ist bei der Colitis ulcerosa das männliche Geschlecht betroffen (Männer:Frauen; 1,4:1) [2].

Ein wichtiges Leitsymptom dieser Erkrankung ist die rektale Blutung. Das Fehlen dieses Symptoms kann die Diagnose in Frage stellen. Weitere Krankheitssymptome sind häufige blutig-eitrig, schleimige Diarrhöen, abdominelle Schmerzen bevorzugt im linken Unterbauch, in Form von Tenesmen, oder Stuhldrang. Bei schweren Krankheitsverläufen können allgemeines Krankheitsgefühl, Gewichtsverlust, Fieber oder Anämie beobachtet werden. Die klinische Untersuchung ist meist unauffällig. Bei ausgedehntem Befall, während eines schweren Schubes, finden sich reduzierte Darmgeräusche und ein geblähtes, druckempfindliches Abdomen, insbesondere in den betroffenen Darmbereichen.

Als extraintestinale Manifestationen sind Arthralgien und Arthritiden, Haut- und Schleimhautveränderungen (Erythema nodosum, Pyoderma gangraenosum, Stomatitis aphthosa) sowie Augenmanifestationen (Uveitis, Iridozyklitis, Episkleritis) zu nennen.

Mit dem Vorhandensein der Colitis ulcerosa können mögliche Komplikationen einhergehen, die ein chirurgisches Therapieverfahren unumgänglich machen. Zu diesen Komplikationen gehören die Kolonperforation, eine massive Blutung im betroffenen entzündlichen Darmabschnitt, das toxische Megakolon und das Risiko zur Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms. Eine Kolitisdauer von mehr als 7-10 Jahren, häufiges Auftreten von akuten Schüben, vor allem bei einer Pankolitis ulcerosa, eine frühe Erstdiagnose im Alter von unter 18 Jahren, sowie das gleichzeitige Vorliegen einer primär sklerosierenden Cholangitis können eine Karzinomentstehung begünstigen.

### 1.1.2 Morbus Crohn

Die Autoren Crohn, Ginzburg und Oppenheimer beschrieben erstmals im Jahr 1932 eine Entzündung des terminalen Ileums [21]. Später nachdem bekannt wurde, dass die Erkrankung den gesamten Intestinaltrakt befallen kann, wurde sie nach dem Erstautor B.B. Crohn benannt.

Der Morbus Crohn ist charakterisiert durch eine Entzündung, die alle Darmwandschichten ergreifen kann und ein diskontinuierliches-segmentales Befallsmuster aufweist. Die Erkrankung kann im gesamten Gastrointestinaltrakt, von der Mundschleimhaut bis zum Anus, lokalisiert sein. Am häufigsten tritt sie als Ileokolitis (40-55%), terminales Ileum und Coecum, auf, gefolgt vom terminalem Ileum (25-40%) und isolierter Kolitis (15-35%).

Der Morbus Crohn ist in allen Altersklassen vertreten, wobei ein deutlicher Erkrankungsgipfel zwischen dem 15. und 35. Lebensjahr liegt. Seit den 70er Jahren wird ein zweiter Erkrankungsgipfel bei den über 60jährigen beschrieben [96]. Obwohl es keine signifikanten Geschlechtsunterschiede gibt, erkranken Frauen etwas häufiger an einem Morbus Crohn als Männer (Frauen:Männer; 1,2:1) [1].

Die Initialsymptome sind schleimig-wässrige Diarrhöen und Bauchschmerzen, oft im rechten Unterbauch bei Manifestation in der Ileozökalregion. Neben den Leitsymptomen können auch Fieber, Gewichtsverlust und eine Anämie vorherrschen. Bei einem Befall des Kolons sind gelegentlich auch blutige Diarrhöen nachweisbar. Es liegt bei der Erkrankung eine Neigung zu Abszess- und Fistelbildungen, Fissuren und narbigen Stenosen vor. Die Ausbildung von Fisteln und Abszessen ist auf den transmuralen Befall des Darms zurückzuführen.

In einigen Krankheitsverläufen können zuerst die oben genannten Begleitkomplikationen auftreten bevor die ersten intestinalen Manifestationen entstehen. Deshalb sollten diese Anzeichen immer Anlass zur weiteren gastroenterologischen Abklärung sein. Seltener Komplikationen sind massive Blutungen, eine Darmperforation und die Entstehung eines kolorektalen Karzinoms. Wobei das Risiko ein kolorektales Karzinom beim Morbus Crohn

(0,4-0,8%) zu entwickeln deutlich geringer ist im Vergleich zur Colitis ulcerosa (7,5% nach 20 Jahren mit ansteigender Tendenz). Wie bereits bei der Colitis ulcerosa beschrieben, ist auch der Morbus Crohn mit extraintestinalen Organmanifestationen vergesellschaftet. Hierzu gehören die Gelenkbeschwerden (Monarthritis, Oligoarthritis), die Hautmanifestationen (Erythema nodosum und Pyoderma gangraenosum), die Augenentzündungen (Episkleritis, Iridozyklitis) und die Gallenwegsbeteiligung in Form einer primär sklerosierenden Cholangitis.

## **1.2 Diagnostik der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen**

Die Diagnose der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen setzt sich aus verschiedenen diagnostischen Bausteinen zusammen. Am Anfang stehen eine gute Anamnese und eine klinische Untersuchung im Vordergrund, um wichtige Informationen für ein weiteres diagnostisches Vorgehen zu erhalten. Im Verlauf spielen endoskopische und radiologische Untersuchungen, Ultraschalldiagnostik und Laboruntersuchungen, als weitere Verfahren eine bedeutende Rolle in der Diagnostik der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.

Die Arbeit beschäftigt sich ausführlicher mit der Darstellung und Beurteilung von Aktivitätsindices sowie Entzündungsparametern im Blut und Stuhl.

### **1.2.1 Aktivitätsindices**

Zur Beurteilung der Aktivität und des Schweregrades der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wurden Aktivitätsindices etabliert.

Beim Morbus Crohn hat sich der CDAI (Crohn's disease activity index) nach Best durchgesetzt. Dieser Aktivitätsindex wurde 1976 für eine multizentrische amerikanische Crohn-Studie entwickelt [6].

Der CDAI nach Best berücksichtigt neben objektiven Entzündungsparametern auch subjektive Parameter und extraintestinale Manifestationen, die wie Best es formulierte, die „over-all activity“ bei Morbus Crohn reflektieren und somit Ausdruck der allgemeinen Krankheitsschwere bei Morbus Crohn sind [3, 6].

Mittlerweile ist der Index international anerkannt und ein Maß für den Schweregrad der Erkrankung. Er setzt sich aus 8 verschiedenen Variablen zusammen und orientiert sich an klinischen und laborchemischen Parametern. Die klinischen Parameter umfassen die subjektiv wahrgenommenen Symptome des Patienten. Mittels einer Zahlenskala werden die Patienten aufgefordert, ihre Bauchschmerzen und das Allgemeinbefinden selbst zu beurteilen sowie eine Angabe zur Stuhlfrequenz und Durchfallbehandlung zu machen. Der Hämatokrit-Wert ist die einzige objektiv laborchemische Messgröße. Die einzelnen Variablen werden mit einem

bestimmten Faktor multipliziert und dann zu einer Gesamtsumme addiert. Ein Ergebnis von unter 150 Punkten spricht für eine ruhende Erkrankung bzw. für ein Remissionsstadium. Bei Werten von über 150 liegt ein akuter Schub bzw. ein Rezidiv vor. (Anhang, Tabelle 1)

Ein Nachteil des CDAI nach Best ist der hohe Anteil an subjektiven Daten und die geringe Beachtung von objektiven Laborparametern. Die Angaben des Patienten und ihre Wertung durch den Arzt beeinflussen die Bestimmung des Schweregrades der Erkrankung [1].

Im Jahr 1980 wurde der Index nach Van Hees entwickelt, der sich auf die Beurteilung der Aktivität der Erkrankung konzentriert. Dieser berücksichtigt, im Vergleich zum CDAI nach BEST, die objektive Beurteilung der Labordiagnostik und der Untersuchungsbefunde [106]. Er beinhaltet 9 Parameter. Dazu gehören Serumalbumin, Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG), Körpergewicht, Resistenzen im Abdomen, Geschlecht, Fieber, Stuhlbeschaffenheit, Darmresektion und extraintestinale Läsionen. Obwohl der Index nach Van Hees eine bessere Objektivität aufweist, besteht sein Nachteil, gegenüber dem CDAI, in der komplizierten Berechnung.

Der gebräuchlichste Aktivitätsindex der Colitis ulcerosa ist der CAI (Clinical activity index) nach Rachmilewitz. Er beinhaltet neben klinischen auch endoskopische Parameter. Der klinische Index, konzentriert sich auf 7 Variablen aus dem klinischen und laborchemischen Bereich. Die Ergebnisse der einzelnen Variablen werden zu einer Gesamtsumme addiert. Bei Werten von unter 5 liegt eine inaktive Erkrankung vor. Auf eine aktive Erkrankung deuten Werte von 5 und größer. (Anhang, Tabelle 2)

Der endoskopische Index beurteilt die Beschaffung und Vulnerabilität der Schleimhaut, die Gefäßzeichnung und das Auftreten von Mukosaschäden in Form von Ulzerationen und Fibrinauflagerungen. Ein Punktergebnis von mehr als 3 deutet auf eine Krankheitsaktivität hin. Ein Problem ist auch hier der große Anteil an subjektiven Daten, der die Beurteilung der Krankheitsaktivität erschwert oder verfälscht

Die Studie von Schoepfer et al. [89] untersuchte unter anderem den Zusammenhang zwischen dem endoskopischen und klinischen Aktivitätsindex nach Rachmilewitz. Es konnte gezeigt werden, dass der klinische Aktivitätsindex zwischen inaktiver und milder Erkrankung ( $p < 0,001$ ) sowie zwischen moderater und hoher entzündlicher Aktivität ( $p = 0,002$ ) unterscheiden konnte, aber nicht zwischen milder und moderater endoskopisch nachgewiesener Aktivität. Zusammenfassend zeigte sich eine gute Korrelation zwischen klinischen Rachmilewitz-Index und endoskopischen Aktivitätsindex.

### **1.2.2 Entzündungsparameter im Blut**

Zur Erfassung der entzündlichen Krankheitsaktivität werden neben der Anamnese, der klinischen Untersuchung und den bildgebenden Verfahren verschiedene Laborparameter bestimmt. Hierzu gehören unter anderem CRP (C-reaktives Protein), BSG (Blutsenkungsgeschwindigkeit), Hämatokrit, Leukozyten und Thrombozyten. Es ist jedoch zu erwähnen, dass zurzeit keine speziellen Laborparameter für CED vorliegen und eine Differenzierung zwischen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa anhand von Laborwerten nicht vorgenommen werden kann. Durch laborchemische Untersuchungen können Mangelzustände im Vitamin- und Eisenhaushalt diagnostiziert werden. Der Verdacht äußert sich bereits bei Veränderungen von MCH (mean corpuscular hemoglobin) und MCV (mean corpuscular volume). Es besteht die Notwendigkeit einer weiteren Bestimmung von Folsäure, Vitamin B12, Ferritin und Eisen. Ursächlich für die Mangelzustände sind vermutlich Resorptionsstörungen.

Eisen- und Ferritinmangel sind als Ausdruck intestinaler Blutungen, Resorptionsstörungen und durch die Entzündung selbst zu werten. Bei anhaltender Entzündungsaktivität zeigen sich häufig ein erniedrigter Eisenspiegel und ein erhöhter Ferritinwert. Eine Erhöhung des Ferritins, als Akute-Phase-Protein, weist des Weiteren auf einen inflammatorischen Prozess hin.

Beim Morbus Crohn treten im Rahmen des Dünndarmbefalls oder nach Ileozökalresektion Einschränkungen in der Resorption von Vitamin B12 und Folsäure auf, folglich treten häufiger beim Morbus Crohn ein Vitamin B12- und Folsäuremangel auf.

Aufgrund des Vorliegens einer allgemeinen Resorptionsstörung kommt es auch zu einer erniedrigten Aufnahme von Vitaminen, wie Vitamin A, C, D und E, sowie Spurenelementen (Magnesium, Zink).

Aktive Entzündungen bei der Colitis ulcerosa sind mit einer Akute-Phase-Reaktion und folglich mit einer Einwanderung von Leukozyten in den Darm vergesellschaftet. Verschiedenen Proteine können im Serum und im Stuhl gemessen werden [62]. Das CRP gehört neben Caeruloplasmin, Fibrinogen, Haptoglobin und Ferritin zu den Akute-Phase-Proteinen und wird in den Hepatozyten nach Stimulation durch proinflammatorische Zytokine wie Interleukin 1 und 6 gebildet. Es besteht eine Assoziation zwischen CRP und klinischer bzw. endoskopischer Aktivität bei CED [7].

Der CRP-Wert gilt als unspezifischer Entzündungsparameter, der nicht spezifisch für CED ist. Dennoch handelt es sich nach Diagnosesicherung um einen wichtigen Verlaufparameter zur Beurteilung der Krankheitsaktivität bei CED. Es hat sich gezeigt, dass Patienten mit Morbus Crohn in der Regel höhere CRP-Werte aufweisen als Patienten, die unter einer Colitis

ulcerosa leiden [89, 107]. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die transmurale Entzündung beim Morbus Crohn sein [107, 108].

Erhöhte CRP-Werte lassen sich auch bei klinischer Remission vermuten, bei jedoch subklinisch ablaufenden Entzündungsprozessen. Bei der Colitis ulcerosa treten gehäuft normale Entzündungsparameter auf, insbesondere beim distalen Befall des Kolons [42]. Der CRP-Wert korreliert weniger gut mit der Krankheitsaktivität bei Patienten mit Colitis ulcerosa, als vergleichsweise bei an Morbus Crohn erkrankten Patienten [26, 107, 108].

In der Arbeit von Schoepfer et al. [86] war es möglich mittels CRP und Leukozyten zwischen milder und moderater endoskopisch nachgewiesener Aktivität zu differenzieren. Unterschiede konnten aber weder zwischen inaktiver und milder/moderater Aktivität noch zwischen hoher endoskopisch gesicherter Aktivität festgestellt werden. Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass im Vergleich zum Morbus Crohn bei der Colitis ulcerosa nur eine schwächere CRP-Reaktion vorliegt [78]. Eine Erklärung dafür könnte der Ort der Entzündungsreaktion sein, denn die Colitis ulcerosa ist auf die Mucosa beschränkt, wohingegen der Morbus Crohn transmural auftritt. Eine andere Möglichkeit für interindividuelle Unterschiede in der CRP-Produktion bei Menschen ist der Polymorphismus des CRP-Gens [14, 86]. Zusammenfassend scheint CRP bei der Colitis ulcerosa kein adäquater Biomarker für die Beurteilung der endoskopischen Entzündungsaktivität zu sein.

Im Rahmen einer Entzündung bzw. Akute-Phase-Reaktion kommt es ebenfalls zu einer Leukozytose. Eine Leukozytose mit Linksverschiebung kann auf eine bakterielle Komplikation hindeuten. Die Leukozytenzahl ist ein unspezifischer Parameter. Erhöhte Leukozytenzahlen können mit verschiedenen Erkrankungen z.B. Tumorleiden, immunologische Erkrankungen und anderen akuten Infektionen einhergehen. Die Bestimmung der Leukozyten eignet sich allerdings gut für Verlaufskontrollen der klinischen Aktivität.

Das Auftreten einer Thrombozytose wird häufig bei Patienten mit floridem Morbus Crohn, als Zeichen der entzündlichen Aktivität beobachtet [62, 96].

Als ein weiterer diagnostischer Marker wurde der Proteinkomplex Calprotectin aus den beiden S100-Proteinen S100A8 und S100A9 vorgeschlagen, der im nachfolgenden Kapitel besprochen wird.

### 1.2.3 Calprotectin als Entzündungsparameter im Stuhl

Im Jahr 1980 wurde Calprotectin erstmals durch Fagerhol und Mitarbeiter aus menschlichen Granulozyten isoliert. Historisch wurde Calprotectin zunächst als L1-Protein bezeichnet [30]. Calprotectin besteht aus den S100-Proteinen S100A8 (weitere Synonyme sind MRP8 [68], L1 light chain, Calgranulin A [115]) und S100A9 (weitere Synonyme sind MRP14 [68], L1 heavy chain, Calgranulin B [115]). Diese gehören zur S100-Protein-Familie, einer Familie niedrig molekularer Calcium-bindender Proteine, die nicht ubiquitär exprimiert werden. Der Proteinkomplex, S100A8/A9 [88], wurde schließlich, auf Vorschlag von Fagerhol, als Calprotectin bezeichnet, um die Calciumbindung und dessen antimikrobielle Eigenschaften besser wiederzuspiegeln [95].

Die S100-Proteine besitzen antimikrobielle [95], chemotaktische [59] und Apoptose-induzierende [36] Eigenschaften. Mit geringen Ausnahmen sind die S100-Proteine codierenden Gene in einem Gen-Cluster auf dem humanen Chromosom 1q21 lokalisiert [72, 84].

Eine wichtige Rolle spielen die S100-Proteine in der Vermittlung von Signalübertragungen, die durch einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in Gang gesetzt werden. Sie besitzen jeweils zwei Calcium-Bindungsstellen vom EF-Hand-Typ und bilden nach Bindung von Calcium Homo-und/oder Heterodimere. Beide EF-Hände sind durch eine zentrale „hinge“ Region miteinander verbunden und werden N-und C-terminal durch hydrophobe Regionen umgeben [55]. Die Homo-und/oder Heterodimere werden als die biologisch aktive Form der S100-Proteine angesehen [85]. Diese Proteinkomplexe interagieren spezifisch mit Zielproteinen, wie z.B. Kinasen, Phosphatasen und Ionen-transportierenden Proteinen, und sind als Calcium-modulierte Signalproteine an einer Vielzahl zellulärer Vorgänge, wie Zelldifferenzierung, Zellzyklus, Regulation von Kinasen und Cytoskelett-Membran-Interaktionen, beteiligt [42, 55].

Die genaue biologische Funktion der beiden Proteine S100A8 und S100A9 ist noch nicht abschließend geklärt. Einige Studien belegen jedoch, dass beide Proteine eine wichtige Rolle in entzündlichen Prozessen spielen [37, 68]. Es konnten in verschiedenen Studien mehrere intra-und extrazelluläre Funktionen der S100A8 und S100A9 nachgewiesen werden. Zu den intrazellulären Funktionen gehören die Bindung von Calcium-und Zinkionen [38] und die Calcium-abhängige Bindung von Fettsäuren [54]. Als extrazelluläre Funktionen sind zytotoxische Effekte gegen murine Knochenmarkszellen, Makrophagen und Mitogen-stimulierte Lymphozyten [117], aber auch antimikrobielle Wirkungen auf *Candida albicans* [95, 80] und chemotaktische Wirkungen für neutrophile Granulozyten zu nennen [59].

S100A8 und S100A9 werden hauptsächlich von myelomonozytischen Zellen exprimiert und zeigen in vivo eine starke Tendenz zur Formation von Homo- und Heterokomplexen [40].

Calprotectin besteht aus einer leichten (8 kDa) und zwei schweren Polypeptidketten (14 kDa) mit einem Molekulargewicht von insgesamt 36 kDa (kilo Dalton) [23]. Es stellt etwa 60% der cytosolischen Proteine in neutrophilen Granulozyten dar. Geringere Mengen werden auch in Monozyten und reaktiven Makrophagen nachgewiesen [24, 73, 97]. Hessian et al. [41] zeigten hingegen, dass die S100-Proteine bis zu 45% der cytosolischen Proteine in den neutrophilen Granulozyten und etwa 5% in den Monozyten repräsentieren. Calprotectin moduliert als Apoptoseinduzierender und wachstumsfördernder Faktor die Proliferation und das Überleben von normalen und malignen Zellen [117]. Es wird aktiv von aktivierten Phagozyten sezerniert und induziert über die Bindung an verschiedene Rezeptoren wie Receptor of Advanced Glycation Endproduct (RAGE) oder der Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) entzündliche Prozesse. Calprotectin bindet neben Calcium auch weitere Metallionen wie Zink und Mangan [18]. Die antibakteriellen [56, 95] und antimykotischen [16, 80] Eigenschaften beruhen insbesondere auf der Zinkbindung [97].

Da Calprotectin während der Darmpassage nicht abgebaut wird und im Stuhl sehr stabil ist, können auch Entzündungen im oberen Darmtrakt in den Stuhlproben nachgewiesen werden [73]. Daneben kann Calprotectin auch im Plasma [5], in der Synovialflüssigkeit [5], im Speichel [22] und im Urin [47] auftreten. Calprotectinkonzentrationen im Plasma sind bei Männern 30% höher als bei Frauen [23]. Bei einer Entzündung steigt der Plasma-Calprotectinspiegel um das 5-40fache an z.B. bei Sepsis, Lungenkarzinom [31] und rheumatoider Arthritis [4]. Erhöhte Calprotectinkonzentrationen im Plasma wurden auch bei der zystischen Fibrose beobachtet [37].

Da Calprotectin von Zellen des angeborenen Immunsystems freigesetzt wird, zeigt es keine Spezifität bezüglich der verursachenden Grunderkrankung, sondern weist lediglich auf das Vorhandensein und das Ausmaß einer Entzündung hin.

Calprotectin stellt keinen krankheitsspezifischen Marker dar. Als Ursachen für eine erhöhte fäkale Calprotectinkonzentration können chronisch entzündliche Darmerkrankungen [9, 10, 73, 76, 102], Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, oder tumoröse Veränderungen des Darmgewebes, Kolonkarzinom oder Kolonadenom, [58, 74, 98, 105] in Frage kommen. Das bedeutet auch, dass Calprotectin als unspezifischer Biomarker nicht zwischen bakterieller Infektion und NSAR-induzierter Colitis unterscheiden kann [87, 98]. Carroccio et al. [15] stellten in ihrer Studie fest, dass falsch positive Calprotectinwerte auch im Stuhl von Zöliakie-Patienten auftreten können.

Einige Studien [49, 106, 108] konnten bei über 90% der an einem kolorektalen Karzinom erkrankten Patienten einen Anstieg der Calprotectinkonzentration feststellen.

Beim Auftreten von Entzündungen oder neoplastischen Darmerkrankungen gelangen durch die Störung der Barrierefunktion der Schleimhaut vermehrt Granulozyten in das Darmlumen.

Die Folge ist eine Freisetzung von Calprotectin aus den Granulozyten und somit die Messbarkeit dieses sensiblen Markers im Stuhl.

Des Weiteren wurde festgestellt, dass Verwandte 1. Grades eines an Morbus Crohn erkrankten Patienten höhere Calprotectinkonzentrationen aufweisen [100]. Das Gleiche gilt für Verwandte 1. Grades bei Colitis ulcerosa-Patienten [64]. Es ist deshalb möglich, dass Verwandte 1. Grades ein erhöhtes Risiko haben, eine CED zu entwickeln.

Neuere Studien konnten belegen, dass fäkales Calprotectin auch ein nützlicher Diagnostik-Marker für die Beurteilung einer hepatischen Enzephalopathie und einer spontanen bakteriellen Peritonitis bei Leberzirrhose ist [39].

Andere Studien belegen, dass Neugeborene erhöhte Calprotectinkonzentrationen aufweisen, die im Verlauf der nächsten Lebenswochen abfallen und erst ab dem 5. Lebensjahr vergleichbare Werte zu Erwachsenen annehmen [12, 52, 69].

Ebenso kommt es zu erhöhten Calprotectinwerten im Stuhl, wenn Blutungen von mehr als 100 ml vorliegen [61].

Roseth et al. [76] stellten fest, dass fäkales Calprotectin sehr gut mit der fäkalen Exkretion von Indium-111-markierten Leukozyten korreliert. Diese Methode stellte als fäkaler Marker bis zu diesem Zeitpunkt den Goldstandard zur Beurteilung der Entzündung im Darm dar [114]. Trotz großer Aussagekraft dieser Methode ist sie mit einigen Nachteilen verbunden, dazu gehören, dass sie recht beschwerlich und teuer ist und der Patient ionisierender Strahlung ausgesetzt wird.

Die Arbeit von Dolwani et al. [26] besagt, dass aufgrund der unterschiedlichen mittleren Calprotectinkonzentrationen zwischen aktiven Morbus Crohn (Median 227  $\mu\text{g/g}$ ) und gesunder Kontrollgruppe (Median 10  $\mu\text{g/g}$ ) differenziert werden kann.

Im Jahr 1992 entwickelten Roseth und Mitarbeiter eine Methode Calprotectin aus den Fäzes zu extrahieren und mittels ELISA zu quantifizieren. Sie fanden heraus, dass Calprotectin durch die Gegenwart der Calciumbindung sich als sehr stabil erwiesen hat. Dies ermöglicht eine Lagerung des Stuhls bei 4°C Celcius und das die Fäzes ca. eine Woche bei Raumtemperatur aufbewahrt werden können, sodass die Stuhlprobe unproblematisch mit der Post verschickt werden kann [73].

Durch die Anwesenheit von Calcium erfolgt eine Konformationsänderung bei den S100-Proteinen, dadurch erscheint das Protein relativ stabil gegenüber Hitze und Proteolyse [32, 66].

Der kommerzielle Calprotectin Test wurde am Anfang PhiCal ELISA genannt (Nycomed Pharma AS, Oslo, Norway) und wurde in den frühen 1990er Jahren vom Universitätsklinikum Aker und Ullevål in Oslo Norwegen entwickelt [77], aktuell existiert er als Calprest und wird von Eurospital (Trieste, Italy) validiert [28]. Ursprünglich waren 5 g Fäzes zur Bestimmung der Calprotectinkonzentration nötig [73]. Nach Verbesserung der Testverfahren genügten nur noch 50 bis 100 mg Fäzes [108].

Es konnten gute Korrelationen zwischen fäkalem Calprotectin, dem histopathologischen Index und der klinischen Krankheitsaktivität bei CED nachgewiesen werden [8, 73, 75].

Eine signifikante Korrelation wurde zwischen Calprotectin und endoskopischem sowie histopathologischem Index bei der Colitis ulcerosa in der Studie von D'Inca et al. [25] gefunden. Gegensätzliche Ergebnisse fand man beim Morbus Crohn, aufgrund der schwierigen Messung der Krankheitsaktivität bei Dünndarbefall.

Canani et al. zeigten in einer Studie von an 26 Morbus Crohn erkrankten Kindern, dass eine gute Korrelation zwischen fäkalem Calprotectin und dem endoskopischen sowie histopathologischen Index zur Erkennung einer Entzündung im Darm besteht [13].

Anhand von fäkalem Calprotectin ist es möglich zwischen entzündlichen = organischen (CED) und nicht entzündlichen = funktionellen Darmerkrankungen (Reizdarmsyndrom) zu unterscheiden. Mit Hilfe des Calprotectin kann auch bei in Remission befindlichen Patienten einen klinisch aktiver Schub vorhergesagt werden [20, 93, 102, 107].

In der Arbeit von Sander et al. [79] wurde bereits im Jahr 1984 festgestellt, dass nur eine sehr geringe Korrelation zwischen fäkalem Calprotectin (früher L1-Protein) und CRP, Leukozyten im Blut und BSG besteht.

Wassell et al. untersuchten die Fähigkeit von Calprotectin zwischen Morbus Crohn und Reizdarmsyndrom (RDS) zu unterscheiden. Sie stellten fest, dass Morbus Crohn-Patienten mit nachgewiesener Aktivität (histologisch und CDAI > 150) deutlich höhere Calprotectinkonzentrationen aufwiesen und somit eine Spezifität von 100% und Sensitivität von 85% aufzeigten um zwischen Morbus Crohn und Reizdarmsyndrom zu unterscheiden [114].

In der Studie von Costa et al. wurde die Aussage geprüft, ob Calprotectin Vorhersagen zu einem klinischen Rückfall machen kann. Die Studie bewies, dass Calprotectin im Stuhl eine stärkere Vorhersage für die Ausbildung eines akuten Schubes bei Colitis ulcerosa machen kann als bei Morbus Crohn [20].

Tibble et al. [102] deuteten daraufhin, dass hohe Calprotectinkonzentrationen im Stuhl Patienten identifizieren können, die sich aktuell in klinischer Remission befinden und ein erhöhtes Risiko haben einen zeitnahen akuten Schub zu erleiden.

Bezüglich der Lokalisationen ließen sich besonders hohe Calprotectinkonzentrationen bei einer Proktitis und Linksseitenkolitis finden, als im Gegensatz dazu bei der Pancolitis. Das deutet daraufhin, dass hinsichtlich der Calprotectinfreisetzung nicht die Ausdehnung der Entzündung entscheidend ist, sondern der Grad der Entzündung [73].

Die Calprotectinmessung im Stuhl stellt einen objektiven Index zur Beurteilung der Entzündungsaktivität bei CED dar, sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen [8]. Der relativ günstige Biomarker Calprotectin ist als diagnostische Alternative eine zuverlässige und geeignete nichtinvasive Methode [17].

In der Studie von Jones et al. [51] wurden bei 164 Morbus Crohn Patienten die Beziehung zwischen endoskopischen und klinischen Aktivitätsindex – CDAI und fäkalen Biomarker (Calprotectin und Laktoferrin) untersucht. Es ließen sich signifikante Korrelationen zwischen der endoskopischen Aktivität und den fäkalen Biomarker finden. Es zeigte sich keine Korrelation zwischen dem CDAI und dem endoskopischen Aktivitätsindex.

Die Arbeit von Schoepfer et al. [89] beschäftigte sich unter anderem mit der Korrelation zwischen fäkalem Calprotectin und dem endoskopischen Aktivitätsindex nach Rachmilewitz bei Colitis ulcerosa. Es wurde demonstriert, dass fäkales Calprotectin zwischen inaktiver und milder/moderater/hocher endoskopischer Aktivität unterscheiden kann. Aus diesem Grund hat Calprotectin das Potenzial, das endoskopische Monitoring bei Colitis ulcerosa zu ersetzen. Calprotectin ist ein sensitiver und spezifischer Parameter für die Feststellung einer intestinalen Entzündung bei Patienten mit CED [94, 112]. Besonders bei Vorliegen einer Colitis ulcerosa sind eine hohe Sensitivität und Spezifität nachweisbar, in Bezug auf das Risiko einen akuten Schub auszubilden. Beim Morbus Crohn ist Calprotectin auch ein sensitiver Marker für das Erkennen eines Rückfallrisikos, jedoch liegt eine schlechtere Spezifität vor [20, 102].

### 1.3 Zielsetzung

Die Abklärung der Krankheitsaktivität chronisch entzündlicher Darmerkrankungen ist ohne Einsatz invasiver diagnostischer Methoden schwierig. Als Goldstandard in der Diagnostik zur Beurteilung eines akuten Schubes zählen, neben der Endoskopie und Histologiegewinnung, bisher die Klinik, Paraklinik und Sonographie des Abdomens.

Eine zunehmende Bedeutung stellen intestinale Entzündungsparameter, wie das Calprotectin im Stuhl dar. Bei der Bestimmung handelt es sich um eine nicht-invasive Methode, die weniger belastend für den Patienten ist.

Folgende Fragen sollen mit dieser Arbeit beantwortet werden:

1. Korrelieren die klinischen Aktivitätsindices (CAI/CDAI) mit der fäkalen Calprotectinkonzentration? Gibt es Unterschiede bei Colitis ulcerosa und Morbus Crohn?
2. Gibt es eine Korrelation zwischen fäkalem Calprotectin und Entzündungswerten im Blut (CRP, Leukozyten). Sind Unterschiede bei Colitis ulcerosa und Morbus Crohn feststellbar?
3. Finden sich erhöhte fäkale Calprotectinwerte bei klinischer Krankheitsaktivität? Treten erhöhte Calprotectinwerte auch bei klinischer Remission auf? Können normwertige Calprotectinwerte bei klinischer Krankheitsaktivität auftreten?
4. Welches Testsystem, monoklonales oder polyklonales Testsystem, eignet sich besser in der Praxis zur Beurteilung der klinischen Krankheitsaktivität bei Colitis ulcerosa und Morbus Crohn? Ist mit beiden Calprotectin-Bestimmungen das gleiche Resultat zu erwarten?

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Patienten**

Alle Untersuchungen wurden anhand von Stuhlproben von Patienten aus der Gastroenterologischen Ambulanz der Universität Rostock durchgeführt. In einem Erfassungszeitraum von 2006 bis 2008 wurden 60 Patienten mit einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung in die Arbeit eingeschlossen. Die Analyse der Untersuchungsergebnisse erfolgte prospektiv. Zum etwaigen Zeitpunkt, ein bis drei Tage vor der Stuhlentnahme wurde der klinische Schweregrad anhand von Aktivitätsindices bestimmt, nach Best bei Vorliegen eines Morbus Crohn und nach Rachmilewitz bei Colitis ulcerosa. Anhand des jeweiligen klinischen Aktivitätsindex wurde die Krankheitsaktivität festgelegt. Bei einem CDAI-Wert  $< 150$  handelte es sich um Patienten mit einer inaktiven Erkrankung. Wenn der CDAI-Wert  $\geq 150$  lag, wurde von einer aktiven Erkrankung ausgegangen. Das Gleiche galt für die Colitis ulcerosa. Ein CAI-Wert  $< 5$  wurde als inaktive Erkrankung gewertet. Bei Vorliegen eines CAI-Wertes  $\geq 5$  wurde der Befund als aktive Erkrankungsform definiert.

Zusätzlich wurden die Entzündungsparameter im Blut mittels Blutentnahme untersucht. Darin eingeschlossen waren C-reaktives Protein und Leukozyten. Die Diagnosestellung CED erfolgte bereits im Vorfeld anhand etablierter klinischer, histologischer und endoskopischer Kriterien.

Die Patienten wurden folgenden Diagnosegruppen zugeordnet:

Gruppe 1: Colitis ulcerosa = 28

Gruppe 2: Morbus Crohn = 32

#### **Gruppe 1**

Diese Gruppe umfasste 28 Patienten die an Colitis ulcerosa erkrankt waren. Es handelte sich um 17 Männer und 11 Frauen im Alter zwischen 24 und 68 Jahren. Zur weiteren Differenzierung erfolgte eine Aufteilung des Gesamtkollektivs in zwei befundabhängige Untergruppen. Zum einen die Gruppe der in Remission (inaktive Erkrankung) befindlichen Patienten und zum anderen Patienten mit einer aktiven Verlaufsform (aktive Erkrankung). Bei der Colitis ulcerosa waren 13 Patienten aktiv, davon 8 Männer und 5 Frauen und 15 Patienten in Remission, davon 9 Männer und 6 Frauen.

## **Gruppe 2**

Bei den an Morbus Crohn erkrankten Patienten, insgesamt 32 Patienten, handelte es sich um 16 Frauen und 16 Männer im Alter zwischen 23 und 63 Jahren. 11 Patienten hatten eine aktive Erkrankung, davon 4 Männer und 7 Frauen. Die restlichen 21 Patienten waren klinisch in Remission. Hierzu gehörten 12 Männer und 9 Frauen.

Insgesamt ergab sich ein Kollektiv von 24 Patienten mit einer aktiven Erkrankung und 36 Patienten mit einer inaktiven Erkrankung. Zusätzlich zu dem Aktivitätsindex wurden die Entzündungsparameter (CRP und Leukozyten) im Blut bestimmt.

Ausgeschlossen aus der Arbeit wurden initial Patienten mit wässrigen blutigen Stuhlgängen ohne ausreichendes Stuhlmaterial. Das betraf 3 Patienten mit aktiver Colitis ulcerosa und 1 Patient mit aktivem Morbus Crohn.

### **2.1.2 Stuhlprobengewinnung**

Jeder Patient erhielt vor Einschluss in diese Arbeit eine schriftliche Patienteninformation über die Verwendung der persönlichen Daten in einer wissenschaftlichen Arbeit und eine genaue Anleitung zur Stuhlprobengewinnung. Voraussetzung für den Einschluss in diese Arbeit war die Einverständniserklärung des Patienten. Der Patient erhielt ein Stuhlplastikröhrchen mit einem an dem Drehverschluss befestigtem Löffel. Es sollte eine kirschgroße Portion (ca. 3 g) Stuhlmaterial gewonnen werden, wobei der Patient darauf hingewiesen wurde Stuhlproben von verschiedenen Stellen des Stuhles zu nehmen. Gut verschlossen wurde das Röhrchen in ein größeres Übröhrchen gesteckt, welches gut leserlich mit Namen, Vornamen, Geburtsdatum und Datum der Stuhlentnahme beschriftet wurde.

Anschließend wurde das fest verschraubte Stuhltransportröhrchen in den von uns mitgegebenen Umschlag gesteckt und mit der Post versandt. Die Patienten wurden darüber informiert, dass die Stuhlprobe spätestens innerhalb von vier Tagen nach der Stuhlentnahme beim Empfänger angekommen sein und Temperaturen von über 30°C bei der Lagerung vermieden werden sollten. Bei Ankunft der Stuhlproben wurden diese sofort ins Labor gebracht und bei -20°C eingefroren.

### 2.1.3 Stuhlprobenvorbereitung

Die tiefgefrorenen Stuhlproben wurden langsam zunächst im Kühlschrank bei 4-8°C, später bei Raumtemperatur, über Nacht, schonend aufgetaut.

Nach Entnahme der Stuhlproben, sollten 100 mg Stuhlmaterial abgewogen werden. Die Stuhlprobenmasse wurde manuell abgewogen, bei geringfügigen Abweichungen (Bereich 80-120 mg) des Gewichts wurde die exakte Menge für jede Probe genau notiert. Es traten nur vereinzelt Abweichungen von 1 mg beim manuellen Abwiegen auf, sodass das Puffervolumen 5 ml aufwies und der Verdünnungsfaktor konstant 1:50 war.

Auf jede einzelne Probe, wurde unabhängig von der eingewogenen Menge, 5 ml Extraktionspuffer pipettiert. Um eine gute Durchmischung von Stuhl und Puffermenge zu erreichen wurde ein Vortex-Mixer für ca. 30 Sekunden verwendet.

Anschließend wurde 1 ml der Probenlösung in ein Eppendorfröhrchen überführt und zentrifugiert, um weiterhin bestehende Ablagerungen am Röhrchenrand zu entfernen.

Bei Anwendung des Calprotectin ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) Kit von Immundiagnostik erfolgte eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 13000 g.

Unter Vorgabe beim Calpro Test wurden die Probenröhrchen nach dem Mixen auf einen Schüttler gestellt und bei über 1000 rpm weitere 30 Minuten gemischt. Im Anschluss wurde die Probenlösung für 20 Minuten bei 10000 g und einer Temperatur von 4°C zentrifugiert.

Der gewonnene Überstand nach der Zentrifugation wurde bei beiden Tests 1:50 mit dem Wasch- oder auch Probenverdünnungspuffer genannt, verdünnt.

Diese Endverdünnung wurde dann in die Mikrotiterplatten überführt, wobei zu erwähnen ist, dass 50 µl beim Calpro-Test und 100 µl beim Immundiagnostik-Test pro Vertiefung in die Mikrotiterplatten gesetzt wurde.

### 2.1.4 Calprotectin ELISA Kits

ELISA Calprotectin (Calpro, Art.Nr.: CAL0300)

ELISA Calprotectin (MRP 8/14) (Immundiagnostik, Art.Nr.: K 6930 KO/ K 6935 KO)

### 2.1.5 Pufferlösungen

ELISA Waschpufferkonzentrat (WASHBUF) Art. Nr.: K 6930WP, Fa. Immundiagnostik

Konjugat Konzentrat (CONJ) Art. Nr.: K 6930K, Fa. Immundiagnostik

Extraktionspuffer Calpro Test

Probenverdünnungspuffer Calpro Test

## 2.1.6 Geräte und Einmalartikel

### 2.1.6.1 Geräte

Glaswaren (Bechergläser, Erlenmeyerkolben)	Fa. Schott Duran
Gefrierschrank	Fa. Liebherr
Handpipetten, diverse Größen	Fa. Eppendorf
Mikrotiterplatten Reader BIO TEK EL 800, Filter 450/630	Fa. BIO TEK
Mikrotiterplattenschüttler mit Inkubator, Julabo SW 20	Fa. BIO TEK
Mikrozentrifuge, Avanti 30 Zentrifuge	Fa. Beckman Coulter GmbH
Multipipette	Fa. Brand GmbH + CO KG
Schüttler, IKA-Schüttler MTS 4	Fa. Janke & Kunkel GmbH
Stuhlprobenwaage, Satorius analytic	Fa. Satorius AG
Vortex-Mixer, New ZX	Fa. UniEquip

### 2.1.6.2 Einmalartikel

Antikörperbeschichtete Mikrotiterplatte (Calpro)	Fa. NovaTec Immundiagnostica GmbH
Antikörperbeschichtete Mikrotiterplatte (Immundiagnostik)	Fa. Immundiagnostik
Pipettenspitzen mit variablen Volumina von 10-5000 µl	Fa. Greiner-Bio-one
PP-Röhrchen, steril 15 ML	Fa. Greiner-Bio-one
Reagiergefäß, verschließbar 1,5 ml	Fa. Sarstedt
Stuhlröhrchen	Fa. Sarstedt
Unsterile Handschuhe	Fa. AMPri GmbH

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Testprinzip

#### 2.2.1.1 Calprotectin ELISA Kit (Calpro)

Durch die Mischung der Stuhlprobe mit dem Extraktionspuffer wurde das Calprotectin in eine Pufferbase überführt. Nach dem Zentrifugieren und einen weiteren Verdünnungsschritt mittels Probenverdünnungspuffer konnte die Probe spezifisch im Assay auf Calprotectin getestet werden.

Das Calprotectin aus den Standards und Proben band sich an den auf der Mikrotiterplatte fixierten polyklonalen Antikörper. Ungebundene Komponenten wurden durch Waschen mit einer Waschlösung entfernt. Calprotectin reagierte durch Immunaффinität mit einem gereinigten Enzym markierten Anti-Calprotectin.

Bei diesem Test wurden Kaninchen Antikörper eingesetzt, welche mit sechs verschiedenen Epitopen von Calprotectin reagieren. Vorteil war, dass selbst bei Zerstörung von einzelnen Epitopen oder durch Blockierung von Komplexbindungen mit anderen Substanzen in der Stuhlprobe eine Bindung von Calprotectin sicher angezeigt wurde [11].

### **2.2.1.2 Calprotectin ELISA Kit (Immundiagnostik)**

Verwendung bei diesem Test fanden zwei ausgewählte monoklonale Antikörper, die in der Lage waren humanes Calprotectin zu erkennen.

Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte waren mit einem monoklonalen anti-human Calprotectin Antikörper beschichtet. In diese Vertiefungen wurden die Teststandards, Kontrollen und Patientenseren, die auf Calprotectin zu untersuchen waren pipettiert.

Im ersten Inkubationsschritt wurde das Calprotectin aus der Probe von dem gekoppelten Fängerantikörper gebunden. Im zweiten Inkubationsschritt wurde der Detektionsantikörper, ein weiterer monoklonaler anti-human Calprotectin Antikörper, an das Calprotectin gebunden. Anschließend wurde das Konjugat (Extravidin, Peroxidase markiert) hinzugesetzt und es bildete sich ein Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte, der sich zusammensetzte wie folgt: Fängerantikörper - humanes Calprotectin - Detektionsantikörper - Peroxidase Konjugat. Tetramethylbenzidin wurde als Peroxidasesubstrat eingesetzt. Durch die Zugabe von Säure wurde die Enzymreaktion abgestoppt und es erfolgte ein Farbumschlag von blau nach gelb.

Diese Verbindung konnte photometrisch bei 450 nm gemessen werden. Die Intensität der Farbe war dem Calprotectin-Gehalt direkt proportional. Parallel wurde eine Standardkurve optische Dichte versus Standardkonzentration-erstellt, aus der die Konzentration der Proben ermittelt wurden [48].

## **2.2.2 Vorbereitung der Reagenzien**

### **2.2.2.1 Calprotectin ELISA Kit (Calpro)**

1. Extraktionspuffer:

Extraktionspuffer 1:2,5 mit aqua dest. verdünnt  
(90 ml Extraktionspufferkonzentrat + 135 ml aqua dest.)

2. Waschlösung:

Waschlösung 1:20 mit aqua dest. verdünnt  
(50 ml Waschlösungskonzentrat + 950 ml aqua dest.)

3. Probenverdünnungspuffer:

Probenverdünnungspuffer 1:10 mit aqua dest. verdünnt  
(20 ml Probenverdünnungskonzentrat + 180 ml aqua dest.)

### 2.2.2.2 Calprotectin ELISA Kit (Immundiagnostik)

1. Waschpuffer:  
WASHBUF (Waschpufferkonzentrat) 1:10 mit aqua bidest. verdünnt  
(100 ml WASHBUF + 900 ml aqua bidest.)
2. Extraktionspuffer:  
EXBUF (Extraktionspufferkonzentrat) 1:2,5 mit aqua bidest. verdünnt  
(90 ml EXBUF + 135 ml aqua bidest.)
3. STD (Standards) und CTRL (Kontrolle) mit 500 µl aqua bidest. gemischt
4. AB (Detektionsantikörper) 1:1000 in Waschpuffer verdünnt  
10 µl AB + 10 ml Waschpuffer
5. CONJ (Konjugat) 1: 1000 in Waschpuffer verdünnt  
10 µl CONJ + 10 ml Waschpuffer
6. Probenvorbereitung (ausführlich siehe Stuhlprobenvorbereitung)  
Verdünnung I: 5 ml Extraktionspuffer + 100 mg Stuhlprobe  
Verdünnung II: Verdünnung I nach Zentrifugation 1: 50 mit Waschpuffer verdünnt  
Verdünnung II = 20 µl Überstand (Verdünnung I) + 980 µl Waschpuffer  
100 µl der Verdünnung II pro Vertiefung in Mikrotiterplatte eingesetzt

### 2.2.3 Testdurchführung/Pipettierschema

Alle Reagenzien und Proben wurden vor der Verarbeitung auf Raumtemperatur gebracht.

#### 2.2.3.1 Calprotectin ELISA Kit (Calpro)

1. Patientenproben 1:50 mit Probenverdünnungspuffer verdünnt  
(20 µl Probe + 980 µl Probenverdünnungspuffer)
2. 50 µl Standards, Kontrolle und vorverdünnte Proben in Mikrotiterplatte pipettiert
3. Abdeckung der Mikrotiterplatte mit Klebefolie und Inkubation bei Raumtemperatur unter Schütteln über 1000 rpm für 45 Minuten
4. Verwerfen des Platteninhaltes
5. Waschen der Mikrotiterplatte 5 x mit 250 µl Waschlösung, danach auf Saugpapier ausgeschlagen
6. 50 µl Konjugat in jede Vertiefung pipettiert
7. erneute Abdeckung der Mikrotiterplatte mit Klebefolie und Inkubation bei Raumtemperatur unter Schütteln über 1000 rpm für 45 Minuten

8. Platteninhalt verworfen
9. Waschen der Mikrotiterplatte 5 x mit 250  $\mu$ l Waschlösung, danach auf Saugpapier ausgeschlagen
10. 100  $\mu$ l Substrat in jede Vertiefung pipettiert
11. Inkubation der Mikrotiterplatte für 30 Minuten im Dunkeln
12. 100  $\mu$ l Stopplösung zugefügt
13. Die Extinktion wurde im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gemessen unter Durchführung einer Referenzmessung bei 620 nm

Der ermittelte Wert für die Calprotectinkonzentration in der Stuhlprobe wurde mit einem Verdünnungsfaktor von 2500 multipliziert um die genaue Konzentration im Stuhl zu bestimmen. Beim multiplizieren mit 2,5 erhielt man die Konzentration im Stuhl in mg/kg.

Ein Wert zwischen 5-50 mg/kg entspricht dem Normalwert.

Gemessene Werte zwischen 200-20000 mg/kg deuten auf eine entzündliche Aktivität bei CED an.

#### **2.2.3.2 Calprotectin ELISA Kit (Immundiagnostik)**

1. Waschen der Mikrotiterplatte 5 x mit 250  $\mu$ l verdünntem Waschpuffer, danach Reste vom Waschpuffer auf Saugpapier ausgeschlagen
2. Pipettierung 100  $\mu$ l STD/SAMPLE/CTRL in Doppelbestimmung in Mikrotiterplatte
3. Inkubation der abgedeckten Mikrotiterplatte für 60 Minuten unter Schütteln bei 37°C
4. Verwerfung des Platteninhaltes
5. Waschen der Mikrotiterplatte 5 x mit 250  $\mu$ l verdünntem Waschpuffer, danach Reste vom Waschpuffer auf Saugpapier ausgeschlagen
6. Pipettierung 100  $\mu$ l AB (Detektionsantikörper) in alle Vertiefungen
7. Inkubation der abgedeckten Mikrotiterplatte für 60 Minuten unter Schütteln bei 37°C
8. Verwerfung des Platteninhaltes
9. Waschen der Mikrotiterplatte 5 x mit 250  $\mu$ l verdünntem Waschpuffer, danach Reste vom Waschpuffer auf Saugpapier ausgeschlagen
10. Pipettierung 100  $\mu$ l CONJ (Konjugat) in alle Vertiefungen
11. Inkubation der abgedeckten Mikrotiterplatte für 60 Minuten unter Schütteln bei 37°C
12. Verwerfung des Platteninhaltes
13. Pipettierung 100  $\mu$ l SUB (Substrat) in alle Vertiefungen
14. Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur für 20 Minuten

15. Pipettierung 50 µl STOP (Stopplösung) in alle Vertiefungen
16. Extinktion im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen Referenzwellenlänge 620 nm gemessen

Zur Bestimmung der Konzentration im Stuhl wurde die ermittelte Calprotectinkonzentration mit 2500 multipliziert (Verdünnung I x Verdünnung II).

Ein Wert bis 15 mg/l entspricht dem Normalwert.

### 2.3 Statistik

Für alle relevanten Parameter wurden Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD) und Median errechnet. Der Vergleich der Gruppen wurde mittels ungepaarten, nichtparametrischen U-Test nach Mann-Whitney, aufgrund der geringen Fallzahl und der nicht unbedingt anzunehmenden Normalverteilung der Parameter ermittelt. Häufigkeiten wurden mittels des Chi-Quadrat-Tests (exakter, 2-seitiger Test) verglichen. Alle Vergleiche sind Ergebnisse zweiseitiger Tests. Bei einem zweiseitig ausgerichteten Test wurde ein p-Wert  $< 0,05$  als signifikant angesehen. Korrelationen wurden mittels Spearmans Korrelationskoeffizient untersucht. Die graphische Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  SD, des Medians, die Quartile, Extremwerte und Ausreißer sowie den größten und den kleinsten nicht extremen Wert erfolgte mittels Box-and-Whisker-Plots. Die statistischen Auswertungen wurden mit Hilfe von kommerzieller statistischer Software (IBM SPSS-Statistic Version 19) durchgeführt.

Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt angegeben:

$p \geq 0,05$	nicht signifikant
$p < 0,05$	signifikant
$p < 0,01$	sehr signifikant
$p < 0,001$	hoch signifikant

Die Korrelationskoeffizienten wurden wie folgt interpretiert:

$0 < r \leq 0,2$	keine bis sehr geringe Korrelation
$0,2 < r \leq 0,5$	geringe Korrelation
$0,5 < r \leq 0,7$	mittlere Korrelation
$0,7 < r \leq 0,9$	starke Korrelation
$0,9 < r \leq 1$	perfekte Korrelation

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Deskriptive Statistik

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Stuhlproben und Blutwerte von insgesamt 60 Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen untersucht. Die Diagnosen Colitis ulcerosa und Morbus Crohn wurden bereits im Vorfeld mittels endoskopischer Diagnostik (Koloskopie) in Kombination mit der histologischen Begutachtung gesichert. Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine prospektive Querschnittsstudie, da die Bestimmung der Calprotectinkonzentration im Stuhl einmalig zu einem bestimmten Zeitpunkt untersucht wurde. Die Konzentration von Calprotectin im Stuhl wurde mittels zweier Testverfahren (Calpro-Test und Immundiagnostik-Test) in allen Stuhlproben bestimmt.

##### 3.1.1 Angaben zu Diagnose, Alter und Geschlecht der Patienten

Die einzelnen Charakteristika der Patienten sind in Tabelle 1 aufgeführt.

	Colitis ulcerosa	Morbus Crohn
Patientenzahl	28	32
Alter in Jahren $\pm$ Standardabweichung	47,2 $\pm$ 12,4	35,6 $\pm$ 10,2
Alter bei Erstdiagnose $\pm$ Standardabweichung	36,1 $\pm$ 12,7	28,6 $\pm$ 10,6
Minimales Alter	24	23
Maximales Alter	68	63
Geschlecht (männlich/weiblich)	17/11	16/16

**Tabelle 1:** Klinische Daten der Patienten. Das Alter wurde als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Ansonsten handelt es sich um absolute Patientenzahlen.

##### 3.1.2 Aufteilung Patienten nach klinischer Krankheitsaktivität (CAI/CDAI)

Als Goldstandard der wissenschaftlichen Arbeit dienen die Aktivitätsindizes (CAI nach Rachmiliwitz bei Colitis ulcerosa, CDAI nach Best bei Morbus Crohn) zur Bestimmung der Befunderhebung in klinisch aktive oder inaktive Erkrankung. Bei einem CAI  $\geq$  5 lag eine klinisch aktive Erkrankung bei der Colitis ulcerosa vor. Ein CAI  $<$  5 wurde als inaktive Erkrankung definiert. War der CDAI  $\geq$  150 beim Morbus Crohn, lag eine aktive Erkrankung

vor. CDAI-Werte < 150 demonstrierten eine klinisch inaktive Erkrankung. Die absoluten Patientenzahlen für die klinische Befundeinteilung sind in Tabelle 2 und 3 dargestellt.

<b>aktive Erkrankung</b>		
	<b>Colitis ulcerosa</b>	<b>Morbus Crohn</b>
<b>Patientenzahl</b>	13	11

**Tabelle 2:** Patienten mit aktiver Colitis ulcerosa und aktiven Morbus Crohn. Die Zuordnung erfolgte mittels klinischer Aktivitätsindices.

<b>inaktive Erkrankung</b>		
	<b>Colitis ulcerosa</b>	<b>Morbus Crohn</b>
<b>Patientenzahl</b>	15	21

**Tabelle 3:** Patienten mit inaktiver Colitis ulcerosa und inaktiven Morbus Crohn. Die Zuordnung erfolgte mittels klinischer Aktivitätsindices.

### 3.1.3 Dokumentierte Laborwerte für Colitis ulcerosa und Morbus Crohn

Unabhängig von der Diagnose Colitis ulcerosa und Morbus Crohn wurden die Mittelwerte  $\pm$  die Standardabweichungen, der Median sowie der minimale und maximale Wert für die einzelnen Parameter der aktiven und inaktiven Erkrankungen errechnet. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 4 bis 7 dargestellt.

Ergebnisse

	<b>Colitis ulcerosa</b>					
	<b>aktive Erkrankung</b>					
	n	Mittelwert	Standardabweichung	Median	Minimum	Maximum
Calprotectin in mg/kg (Calpro)	12	1038,26	724,93	885,10	127,78	2275,23
Calprotectin in mg/l (Immundiagnostik)	13	150,01	94,15	117,08	3,93	318,35
Hämoglobin in mmol/l	13	8,30	1,30	8,70	5,80	10,10
Hämatokrit in l/l	13	0,39	0,06	0,41	0,28	0,46
Leukozyten in Gpt/l	13	8,41	3,44	7,80	4,30	15,60
Thrombozyten in Gpt/l	13	393,10	139,80	400,00	231,00	598,00
CRP in mg/l	12	11,90	15,00	4,70	0,30	47,20
Eisen in µmol/l	10	16,40	15,10	15,30	0,50	55,80

**Tabelle 4:** Zusammenstellung der Laborwerte für klinisch aktive Colitis ulcerosa (Mittelwerte  $\pm$  SD, Median, minimaler und maximaler Wert für fäkales Calprotectin und Laborparameter im Blut).

	<b>Colitis ulcerosa</b>					
	<b>inaktive Erkrankung</b>					
	n	Mittelwert	Standardabweichung	Median	Minimum	Maximum
Calprotectin in mg/kg (Calpro)	15	776,64	816,97	689,95	50,20	2159,35
Calprotectin in mg/l (Immundiagnostik)	15	99,09	101,03	73,10	5,28	327,95
Hämoglobin in mmol/l	15	8,30	1,00	8,50	5,80	10,00
Hämatokrit in l/l	15	0,39	0,04	0,39	0,31	0,47
Leukozyten in Gpt/l	15	7,95	2,51	7,80	5,14	12,90
Thrombozyten in Gpt/l	15	331,40	91,40	310,00	204,00	499,00
CRP in mg/l	14	4,10	5,00	2,40	0,30	19,00
Eisen in µmol/l	14	11,30	5,40	11,10	1,70	25,40

**Tabelle 5:** Zusammenstellung der Laborwerte für klinisch inaktive Colitis ulcerosa (Mittelwerte  $\pm$  SD, Median, minimaler und maximaler Wert für fäkales Calprotectin und Laborparameter im Blut).

Ergebnisse

	<b>Morbus Crohn</b>					
	<b>aktive Erkrankung</b>					
	n	Mittelwert	Standard- abweichung	Median	Minimum	Maximum
Calprotectin in mg/kg (Calpro)	11	817,03	548,45	707,15	283,00	2180,45
Calprotectin in mg/l (Immundiagnostik)	11	168,11	97,45	149,16	57,00	368,10
Hämoglobin in mmol/l	11	7,80	1,10	7,90	5,90	10,00
Hämatokrit in l/l	11	0,37	0,05	0,38	0,28	0,46
Leukozyten in Gpt/l	11	9,54	4,23	8,80	0,80	17,40
Thrombozyten in Gpt/l	11	427,10	185,50	406,00	173,00	796,00
CRP in mg/l	11	52,30	85,00	28,90	1,00	299,00
Eisen in µmol/l	9	8,30	2,90	8,30	3,30	13,10

**Tabelle 6:** Zusammenstellung der Laborwerte für klinisch aktiven Morbus Crohn (Mittelwerte  $\pm$  SD, Median, minimaler und maximaler Wert für fäkales Calprotectin und Laborparameter im Blut).

	<b>Morbus Crohn</b>					
	<b>inaktive Erkrankung</b>					
	n	Mittelwert	Standard- abweichung	Median	Minimum	Maximum
Calprotectin in mg/kg (Calpro)	19	377,86	404,46	258,93	23,60	1640,25
Calprotectin in mg/l (Immundiagnostik)	21	73,05	84,69	61,25	2,95	333,90
Hämoglobin in mmol/l	21	8,40	0,80	8,50	7,10	9,50
Hämatokrit in l/l	21	0,40	0,04	0,40	0,34	0,45
Leukozyten in Gpt/l	21	7,45	2,80	7,00	3,80	15,40
Thrombozyten in Gpt/l	21	323,10	75,40	334,00	182,00	507,00
CRP in mg/l	20	9,20	8,50	7,00	0,20	29,90
Eisen in µmol/l	18	16,50	8,00	15,10	5,20	33,20

**Tabelle 7:** Zusammenstellung der Laborwerte für klinisch inaktiven Morbus Crohn (Mittelwerte  $\pm$  SD, Median, minimaler und maximaler Wert für fäkales Calprotectin und Laborparameter im Blut).

### 3.1.4 Patienten mit/ohne therapeutische Steroidtherapie bei Colitis ulcerosa und Morbus Crohn

Von den insgesamt 60 Patienten erhielten 35 Patienten eine orale Steroidtherapie, und 11 Patienten eine lokale Steroidtherapie. Die übrigen 14 Patienten wurden nicht medikamentös mit Steroiden behandelt. Die Patientenzahlen sind in den Tabellen 8 bis 11 dargestellt.

<b>Colitis ulcerosa</b>			
<b>aktive Erkrankung</b>			
	Keine Steroidtherapie	Orale Steroidtherapie	Lokale Steroidtherapie
Patientenzahl (n = 13)	1	10	2

**Tabelle 8:** Anzahl der Colitis ulcerosa Patienten mit/ohne Steroidtherapie bei Vorliegen einer klinisch aktiven Erkrankung.

<b>Colitis ulcerosa</b>			
<b>inaktive Erkrankung</b>			
	Keine Steroidtherapie	Orale Steroidtherapie	Lokale Steroidtherapie
Patientenzahl (n = 15)	3	10	2

**Tabelle 9:** Anzahl der Colitis ulcerosa Patienten mit/ohne Steroidtherapie bei Vorliegen einer klinisch inaktiven Erkrankung.

<b>Morbus Crohn</b>			
<b>aktive Erkrankung</b>			
	Keine Steroidtherapie	Orale Steroidtherapie	Lokale Steroidtherapie
Patientenzahl (n = 11)	1	9	1

**Tabelle 10:** Anzahl der Morbus Crohn Patienten mit/ohne Steroidtherapie bei Vorliegen einer klinisch aktiven Erkrankung.

<b>Morbus Crohn</b>			
<b>inaktive Erkrankung</b>			
	Keine Steroidtherapie	Orale Steroidtherapie	Lokale Steroidtherapie
Patientenzahl (n = 21)	9	6	6

**Tabelle 11:** Anzahl der Morbus Crohn Patienten mit/ohne Steroidtherapie bei Vorliegen einer klinisch inaktiven Erkrankung.

### 3.1.5 Darstellung der Calprotectinkonzentrationen in Abhängigkeit von endoskopisch diagnostizierten Lokalisationen

Durch die endoskopische Diagnostik ließ sich im Vorfeld der entzündlich veränderte Darmabschnitt lokalisieren und bestimmen.

Für die klinisch aktiven Erkrankungen bei der Colitis ulcerosa konnte der höchste Median für die fäkale Calprotectinkonzentration beim Calpro-Test, bei Befall einer Linkskolitis (1066,40 mg/kg) gefunden werden, gefolgt von Pankolitis (764,32 mg/kg) und distaler Kolitis (625,38 mg/kg). Für das fäkale Calprotectin vom Immundiagnostik-Test ließ sich der höchste Median bei Vorliegen einer Pankolitis (146,45 mg/l), gefolgt von Linkskolitis (144,08 mg/l) und distaler Kolitis (84,70 mg/l) feststellen.

Bei den klinisch inaktiven Erkrankungen für Colitis ulcerosa zeigte sich der höchste Median für das fäkale Calprotectin vom Calpro-Test bei Befall einer distalen Kolitis (921,68 mg/kg), gefolgt von Pankolitis (689,95 mg/kg) und Linkskolitis (135 mg/kg). Beim Immundiagnostik-Test ließ sich der höchste Median für das fäkale Calprotectin bei Vorliegen einer distaler Kolitis (108,08 mg/l) feststellen, gefolgt von einer Pankolitis (73,10 mg/l) und einer Linkskolitis (71,38 mg/l).

Die ausführlichen Ergebnisse sind in Tabelle 12 und 13 aufgelistet.

		<b>Colitis ulcerosa</b>					
		<b>aktive Erkrankung</b>					
		Isoliert	Isoliert	Ileo-	Pan-	Links-	Distale
		Ileum	Kolon	kolitis	kolitis	kolitis	Kolitis
Calprotectin	n	0	0	0	4	5	3
(Calpro)	Median				764,32	1066,40	625,38
Calprotectin	n	0	0	0	4	6	3
(Immundiagnostik)	Median				146,45	144,08	84,70

**Tabelle 12:** Fäkale Calprotectinkonzentrationen beider Testsysteme bei entsprechendem Befall der endoskopisch diagnostizierten Lokalisationen bei klinisch aktiver Colitis ulcerosa. Dargestellt sind Medianwerte.

		<b>Colitis ulcerosa</b>					
		<b>inaktive Erkrankung</b>					
		Isoliert Ileum	Isoliert Kolon	Ileo- kolitis	Pan- kolitis	Links- kolitis	Distale Kolitis
Calprotectin (Calpro)	n	0	0	0	7	5	3
	Median				689,95	135,0	921,68
Calprotectin (Immundiagnostik)	n	3	1	4	1	2	0
	Median				73,10	71,38	108,08

**Tabelle 13:** Fäkale Calprotectinkonzentrationen beider Testsysteme bei entsprechendem Befall der endoskopisch diagnostizierten Lokalisationen bei klinisch inaktiver Colitis ulcerosa. Dargestellt sind Medianwerte.

Der höchste Median für die fäkale Calprotectinkonzentration beim Calpro-Test, bei klinisch aktiven Morbus Crohn Patienten konnte bei Befall von Pankolitis (2180 mg/kg), gefolgt von Linkskolitis (984,83 mg/kg), isoliert Ileum (707,15 mg/kg), Ileokolitis (590,96 mg/kg) und isoliert Kolon (328,60 mg/kg) nachgewiesen werden. Beim Immundiagnostik-Test zeigte sich der höchste Median für fäkales Calprotectin bei den aktiven Erkrankungen bei Vorliegen einer Linkskolitis (327,70 mg/l), gefolgt von Ileokolitis (1541,98 mg/l), Pankolitis (130,15 mg/l), isoliert Ileum (114,65 mg/l) und isoliert Kolon (66,90 mg/l).

Für die klinisch inaktiven Erkrankungen beim Morbus Crohn konnte der höchste Median für fäkales Calprotectin, Calpro Test, bei Befall des isolierten Kolons (512,95 mg/kg) gefolgt von isolierten Ileums (311,50 mg/kg), Ileokolitis (210,52 mg/kg) und Pankolitis (67,10 mg/kg) festgestellt werden. Beim Immundiagnostik-Test konnten für das fäkale Calprotectin der höchste Median bei Befall eines isolierten Ileums (65,93 mg/l) gefolgt von Ileokolitis (58,36 mg/l), isoliert Kolon (38,03 mg/l) und Pankolitis (20,10 mg/l) gefunden werden. Die ausführlichen Ergebnisse sind in Tabelle 14 und 15 aufgelistet.

Ergebnisse

<b>Morbus Crohn</b>							
<b>aktive Erkrankung</b>							
		Isoliert Ileum	Isoliert Kolon	Ileo- kolitis	Pan- kolitis	Links- kolitis	Distale Kolitis
Calprotectin (Calpro)	n	3	1	4	1	2	0
	Median	707,15	328,60	590,96	2180,45	948,83	
Calprotectin (Immundiagnostik)	n	3	1	4	1	2	0
	Median	114,65	66,90	151,98	130,15	327,70	

**Tabelle 14:** Fäkale Calprotectinkonzentrationen beider Testsysteme bei entsprechendem Befall der endoskopisch diagnostizierten Lokalisationen bei klinisch aktiven Morbus Crohn. Dargestellt sind Medianwerte.

<b>Morbus Crohn</b>							
<b>inaktive Erkrankung</b>							
		Isoliert Ileum	Isoliert Kolon	Ileo- kolitis	Pan- kolitis	Links- kolitis	Distale Kolitis
Calprotectin (Calpro)	n	7	3	8	1	0	0
	Median	311,50	512,95	210,52	67,10		
Calprotectin (Immundiagnostik)	n	7	4	8	1	0	1
	Median	65,93	38,03	58,36	20,10		3,55

**Tabelle 15:** Fäkale Calprotectinkonzentrationen beider Testsysteme bei entsprechendem Befall der endoskopisch diagnostizierten Lokalisationen bei klinisch inaktiven Morbus Crohn. Dargestellt sind Medianwerte.

### 3.2 Korrelationsanalysen

#### 3.2.1 Korrelation zwischen Calpro-Test und Immundiagnostik-Test

Zusammengefasst für die Colitis ulcerosa bestand eine starke, sehr signifikante Korrelation ( $r=0,768$ ,  $p<0,001$ ) zwischen den beiden Testsystemen. Ersichtlich ist das anhand der Tabelle 16.

<b>Colitis ulcerosa</b>	
<b>aktive und inaktive Erkrankungen</b>	
Korrelation	Spearman-Rang-Korrelationskoeffizient r
Calpro-Test - Immundiagnostik-Test	0,768***

**Tabelle 16:** Korrelation zwischen Calprotectin (Calpro-Test) und Calprotectin (Immundiagnostik-Test) bei Colitis ulcerosa für klinisch aktive plus inaktive Erkrankungen.

Das Signifikanzniveau wird wie folgt ausgedrückt: \*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$ , \*\*\*  $p<0,001$

Wird die Colitis ulcerosa in klinisch aktive und inaktive Erkrankung unterteilt, zeigte sich, dass eine starke, hoch signifikante Korrelation ( $r=0,818$ ,  $p<0,001$ ) zwischen den beiden Testsystemen bei den klinisch inaktiven Erkrankungen vorlag. Für die klinisch aktiven Erkrankungen stellte sich eine mittlere signifikante Korrelation ( $r=0,671$ ,  $p<0,05$ ) dar. Die ermittelten Korrelationskoeffizienten und die Signifikanzen sind der Tabelle 17 zu entnehmen.

<b>Colitis ulcerosa</b>		
	<b>aktive Erkrankung</b>	<b>inaktive Erkrankung</b>
Korrelation	Spearman-Rang-Korrelationskoeffizient r	
Calpro-Test - Immundiagnostik-Test	0,671*	0,818***

**Tabelle 17:** Korrelation zwischen Calprotectin (Calpro-Test) und Calprotectin (Immundiagnostik-Test) bei Colitis ulcerosa unterteilt in klinisch aktive und inaktive Erkrankungen.

Das Signifikanzniveau wird wie folgt ausgedrückt: \*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$ , \*\*\*  $p<0,001$

Für den Morbus Crohn war eine starke, sehr signifikante Korrelation ( $r=0,808$ ,  $p<0,001$ ) zwischen dem monoklonalen und polyklonalen Testsystem ersichtlich. Die ermittelten Korrelationskoeffizienten und Signifikanzen werden in der Tabelle 18 veranschaulicht.

<b>Morbus Crohn</b>	
<b>aktive und inaktive Erkrankungen</b>	
Korrelation	Spearman-Rang-Korrelationskoeffizient r
Calpro-Test - Immundiagnostik-Test	0,808***

**Tabelle 18:** Korrelation zwischen Calprotectin (Calpro-Test) und Calprotectin (Immundiagnostik-Test) bei Morbus Crohn für klinisch aktive plus inaktive Erkrankungen.

Das Signifikanzniveau wird wie folgt ausgedrückt: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

Unterteilte man den Morbus Crohn in klinisch aktive und inaktive Erkrankung bot sich eine starke, hoch signifikante Korrelation zwischen den beiden Testsystemen für die klinisch inaktiven Erkrankungen ( $r=0,854$ ,  $p < 0,001$ ). Eine signifikante mittlere Korrelation bestand für beide Testsysteme bei den klinisch aktiven Erkrankungen. Die ermittelten Korrelationskoeffizienten und Signifikanzen werden in der Tabelle 19 veranschaulicht.

<b>Morbus Crohn</b>		
	<b>aktive Erkrankung</b>	<b>inaktive Erkrankung</b>
Korrelation	Spearman-Rang-Korrelationskoeffizient r	
Calpro-Test - Immundiagnostik-Test	0,655*	0,854***

**Tabelle 19:** Korrelation zwischen Calprotectin (Calpro-Test) und Calprotectin (Immundiagnostik-Test) bei Morbus Crohn unterteilt in klinisch aktive und inaktive Erkrankungen.

Das Signifikanzniveau wird wie folgt ausgedrückt: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

Im Vergleich zur Colitis ulcerosa korrelierten die Testsysteme gering besser untereinander beim Morbus Crohn.

### 3.2.2 Korrelation zwischen Calprotectin und klinischen Aktivitätsindices

Es bestand für die Colitis ulcerosa in der Gesamtheit keine signifikante Korrelation zwischen fäkalem Calprotectin, für beide Testsysteme, und dem CAI. Die ermittelten Korrelationskoeffizienten und Signifikanzen sind der Tabelle 20 zu entnehmen.

<b>Colitis ulcerosa</b>	
Korrelation	Spearman-Rang-Korrelationskoeffizient r
Calprotectin (Calpro) - CAI	0,290
Calprotectin (Immundiagnostik) - CAI	0,296

**Tabelle 20:** Korrelation zwischen Calprotectin und klinischen Aktivitätsindex CAI bei Colitis ulcerosa.

Das Signifikanzniveau wird wie folgt ausgedrückt: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

Beim Morbus Crohn ließ sich eine signifikante Korrelation nur beim Calpro-Test zwischen fäkalem Calprotectin und CDAI ( $r=0,497$ ,  $p=0,005$ ) nachweisen. Die ermittelten Korrelationskoeffizienten und Signifikanzen sind der Tabelle 21 zu entnehmen.

Korrelation	<b>Morbus Crohn</b>
	Spearman-Rang-Korrelationskoeffizient r
Calprotectin (Calpro) - CDAI	0,497**
Calprotectin (Immundiagnostik) - CDAI	0,348

**Tabelle 21:** Korrelation zwischen Calprotectin und klinischen Aktivitätsindex CDAI bei Morbus Crohn.

Das Signifikanzniveau wird wie folgt ausgedrückt: \*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$ , \*\*\*  $p<0,001$

### 3.2.3 Korrelation zwischen Calprotectin und Entzündungswerten im Blut (CRP und Leukozyten)

Für die Colitis ulcerosa wies der Immundiagnostik-Test ( $r=0,548$ ,  $p=0,004$ ) vergleichend zum Calpro-Test ( $r=0,433$ ,  $p=0,031$ ) eine bessere Korrelation und höhere Signifikanz mit dem Entzündungswert CRP im Blut auf. Eine sehr geringe, nicht signifikante Korrelation bestand zwischen dem polyklonalen ( $r=0,170$ ,  $p=0,396$ ) und monoklonalen ( $r=0,025$ ,  $p=0,898$ ) Testsystem und der Leukozytenzahl im Blut. Das heißt, die fäkalen Calprotectinwerte korrelierten signifikant mit den CRP-Werten im Blut. Keine signifikante Korrelation konnte zwischen dem fäkalen Calprotectin und den Leukozyten im Blut gefunden werden.

Die ermittelten Korrelationskoeffizienten und die Signifikanzen sind der Tabelle 22 zu entnehmen.

Korrelation	<b>Colitis ulcerosa</b>
	aktive und inaktive Erkrankungen
	Spearman-Rang-Korrelationskoeffizient r
Calprotectin (Calpro) - CRP	0,433*
Calprotectin (Immundiagnostik) - CRP	0,548**
Calprotectin (Calpro) - Leukozyten	0,170
Calprotectin (Immundiagnostik) - Leukozyten	0,025

**Tabelle 22:** Korrelation zwischen Calprotectin und Entzündungswerten im Blut bei Colitis ulcerosa für klinisch aktive plus inaktive Erkrankungen.

Das Signifikanzniveau wird wie folgt ausgedrückt: \*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$ , \*\*\*  $p<0,001$

Bei Differenzierung der Colitis ulcerosa in klinisch aktive und inaktive Erkrankung korrelierten die fäkalen Calprotectinwerte nur signifikant mit den CRP-Werten im Blut bei den klinisch inaktiven Erkrankungen (Calpro-Test:  $r=0,660$ ,  $p=0,010$ ; Immundiagnostik-Test:  $r=0,548$ ,  $p=0,043$ ). Für beide Befundgruppen bestand keine signifikante Korrelation zwischen dem fäkalen Calprotectin und den Leukozyten im Blut. Die ermittelten Korrelationskoeffizienten und die Signifikanzen sind der Tabelle 23 zu entnehmen.

Korrelation	Colitis ulcerosa	
	aktive Erkrankung	inaktive Erkrankung
	Spearman-Rang-Korrelationskoeffizient r	
Calprotectin (Calpro) - CRP	-0,073	0,660*
Calprotectin (Immundiagnostik) - CRP	0,448	0,548*
Calprotectin (Calpro) - Leukozyten	0,140	0,184
Calprotectin (Immundiagnostik) - Leukozyten	0,022	0,066

**Tabelle 23:** Korrelation zwischen Calprotectin und Entzündungswerten im Blut bei Colitis ulcerosa unterteilt in klinisch aktive und inaktive Erkrankungen.

Das Signifikanzniveau wird wie folgt ausgedrückt: \*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$ , \*\*\*  $p<0,001$

Von den beiden Testsystemen bestand für das fäkale Calprotectin vom Immundiagnostik-Test beim Morbus Crohn eine signifikant höhere Korrelation zum CRP ( $r=0,536$ ,  $p=0,002$ ). Beim Calpro-Test korrelierte das fäkale Calprotectin signifikant mit dem CRP ( $r=0,449$ ,  $p=0,015$ ). Die Leukozytenzahl korrelierte auch beim Morbus Crohn nicht signifikant mit den fäkalen Calprotectinkonzentrationen beider Testsysteme. Die ermittelten Korrelationskoeffizienten und Signifikanzen sind der Tabelle 24 zu entnehmen.

Korrelation	Morbus Crohn
	aktive und inaktive Erkrankungen
	Spearman-Rang-Korrelationskoeffizient r
Calprotectin (Calpro) - CRP	0,449*
Calprotectin (Immundiagnostik) - CRP	0,536**
Calprotectin (Calpro) - Leukozyten	-0,034
Calprotectin (Immundiagnostik) - Leukozyten	0,144

**Tabelle 24:** Korrelation zwischen Calprotectin und Entzündungswerten im Blut bei Morbus Crohn für klinisch aktive plus inaktive Erkrankungen.

Das Signifikanzniveau wird wie folgt ausgedrückt: \*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$ , \*\*\*  $p<0,001$

Bei der weiteren Unterteilung des Morbus Crohn in klinisch aktive und inaktive Erkrankung fiel auf, dass eine signifikante Korrelation für fäkales Calprotectin und CRP nur beim Immundiagnostik-Test für die klinisch inaktiven Erkrankungen ( $r=0,536$ ,  $p=0,031$ ) bestand. Das fäkale Calprotectin bei den klinisch aktiven Erkrankungen korrelierte nicht signifikant mit dem CRP. Keine signifikanten Korrelationen ließen sich auch zwischen dem fäkalen Calprotectin beider Testsysteme und den Leukozyten feststellen.

Die ermittelten Korrelationskoeffizienten und Signifikanzen sind der Tabelle 25 zu entnehmen.

	<b>Morbus Crohn</b>	
	<b>aktive Erkrankung</b>	<b>inaktive Erkrankung</b>
Korrelation	Spearman-Rang-Korrelationskoeffizient r	
Calprotectin (Calpro) - CRP	0,527	0,303
Calprotectin (Immundiagnostik) - CRP	0,282	0,483*
Calprotectin (Calpro) - Leukozyten	-0,582	-0,091
Calprotectin (Immundiagnostik) - Leukozyten	-0,336	0,081

**Tabelle 25:** Korrelation zwischen Calprotectin und Entzündungswerten im Blut bei Morbus Crohn unterteilt in klinisch aktive und inaktive Erkrankungen.

Das Signifikanzniveau wird wie folgt ausgedrückt: \*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$ , \*\*\*  $p<0,001$

### 3.3 Verhältnis der Calprotectinwerte zur klinischen Krankheitsaktivität

#### 3.3.1 Verhältnis der Calprotectinwerte zur klinischen Krankheitsaktivität bei Colitis ulcerosa

Der Median für die fäkale Calprotectinkonzentration beim Calpro-Test betrug für die aktiven Erkrankungen 885,10 mg/kg und für die inaktiven Erkrankungen 689,95 mg/kg ( $p=0,217$ ). Beim Immundiagnostik-Test betrug der fäkale Calprotectin Median für die aktiven Erkrankungen 117,08 mg/l und bei den inaktiven Erkrankungen 73,10 mg/l ( $p=0,185$ ). Hinsichtlich der fäkalen Calprotectinkonzentration bei beiden Testsystemen unterschied sich die klinisch inaktive Erkrankung nicht signifikant von der klinisch aktiven Erkrankung bei der Colitis ulcerosa.

Die Testergebnisse sind in Tabelle 26 aufgelistet und die fäkalen Calprotectinwerte werden nach Krankheitsaktivität bei Colitis ulcerosa in Form von Boxplot-and-Whisker-Plots in den Abbildungen 1 und 2 dargestellt.

<b>Colitis ulcerosa</b>					
	<b>aktive Erkrankung</b>		<b>inaktive Erkrankung</b>		<b>p</b>
	<b>n</b>	<b>Median</b>	<b>n</b>	<b>Median</b>	
Calprotectin (Calpro)	12	885,10	15	689,95	0,217
Calprotectin (Immundiagnostik)	13	117,08	15	73,10	0,185

**Tabelle 26:** Ergebnisse der Signifikanztestung nach Mann-Whitney U-Test für die fäkalen Calprotectinkonzentrationen bezogen auf die klinische Krankheitsaktivität bei Colitis ulcerosa. Dargestellt sind Medianwerte.

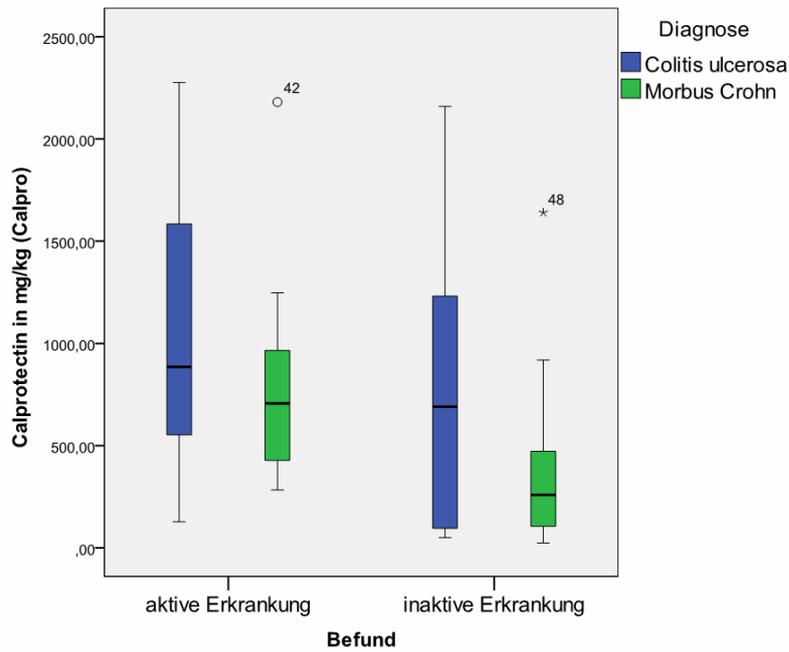
### 3.3.2 Verhältnis der Calprotectinwerte zur klinischen Krankheitsaktivität bei Morbus Crohn

Hinsichtlich der fäkalen Calprotectinkonzentration lag ein Median beim Calpro Test für die aktiven Erkrankungen von 707,15 mg/kg und bei den inaktiven Erkrankungen von 258,93 mg/kg ( $p=0,005$ ) vor. Beim Immundiagnostik-Test lag der Median für die aktiven Erkrankungen bei 149,16 mg/l und für die inaktiven Erkrankungen bei 61,25 mg/l ( $p=0,002$ ). Diese Unterschiede waren deutlicher beim Immundiagnostik Test. Im Vergleich zur Colitis ulcerosa zeigten beim Morbus Crohn beide Testsysteme für fäkales Calprotectin hohe signifikante Unterschiede gegenüber klinisch aktiver und inaktiver Erkrankung. Das bedeutete, dass vergleichsweise zu den klinisch inaktiven Patienten bei den klinisch aktiven Patienten signifikant höhere Calprotectinwerte gemessen werden konnten. Dies galt für beide Testsysteme. Die Testergebnisse sind in Tabelle 27 gelistet und die fäkalen Calprotectinwerte werden nach Krankheitsaktivität beim Morbus Crohn in Form von Boxplot-and-Whisker-Plots in den Abbildungen 1 und 2 dargestellt.

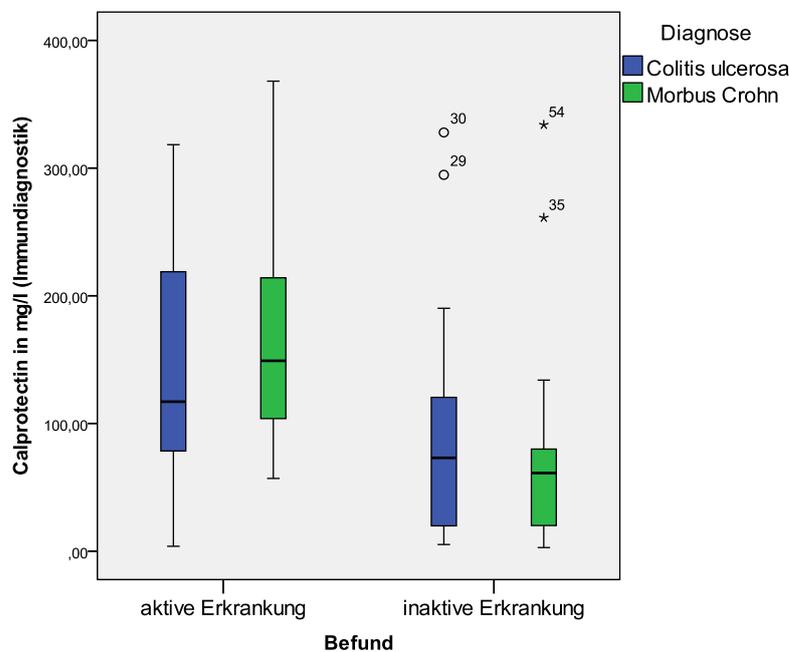
<b>Morbus Crohn</b>					
	<b>aktive Erkrankung</b>		<b>inaktive Erkrankung</b>		<b>p</b>
	<b>n</b>	<b>Median</b>	<b>n</b>	<b>Median</b>	
Calprotectin (Calpro)	11	707,15	19	258,93	0,005
Calprotectin (Immundiagnostik)	11	149,16	21	61,25	0,002

**Tabelle 27:** Ergebnisse der Signifikanztestung nach Mann-Whitney U-Test für die fäkalen Calprotectinkonzentrationen bezogen auf die klinische Krankheitsaktivität bei Morbus Crohn. Dargestellt sind Medianwerte.

Abbildung 1 und 2: Graphische Darstellungen der fäkalen Calprotectinwerte für beide Testsysteme nach klinischer Krankheitsaktivität bei Colitis ulcerosa und Morbus Crohn



**Abb. 1:** Calprotectinkonzentrationen (Calpro-Test) für Morbus Crohn und Colitis ulcerosa bei aktiver und inaktiver Erkrankung. Auf der Ordinate aufgetragen ist das Calprotectin in mg/kg im Stuhl. Dargestellt sind Medianwerte, die Werte entsprechen denen aus den oben stehenden Tabellen 26 und 27.



**Abb. 2:** Calprotectinkonzentrationen (Immundiagnostik-Test) für Morbus Crohn und Colitis ulcerosa bei aktiver und inaktiver Erkrankung. Auf der Ordinate aufgetragen ist das Calprotectin in mg/l im Stuhl. Dargestellt sind Medianwerte, die Werte entsprechen denen aus den oben stehenden Tabellen 26 und 27.

### 3.4 Pathologischer Calprotectin-Test und Krankheitsaktivität

Für den Calpro Test lag bei Patienten ein pathologisches Testergebnis vor, wenn die fäkale Calprotectinkonzentration  $> 50$  mg/kg, vom Hersteller festgelegter cut-off, betrug. Alle Werte unter 50 mg/kg für fäkales Calprotectin, wurden einem normalen Testergebnis zugeordnet. Beim Immundiagnostik-Test wurde für die Patienten ein pathologisches Testergebnis bestimmt, wenn die fäkale Calprotectinkonzentration  $> 15$  mg/l, vom Hersteller festgelegter cut-off, betrug. Ein normales Testergebnis lag bei einer fäkalen Calprotectinkonzentration unter 15 mg/l vor.

#### 3.4.1 Pathologischer Calpro-Test für Colitis ulcerosa und Morbus Crohn

Von den insgesamt 15 Colitis ulcerosa-Patienten in klinischer Remission ( $CAI < 5$ ) hatten alle ein pathologisches Testergebnis ( $FC > 50$  mg/kg) für fäkales Calprotectin (FC).

Nur 2 von 19 Morbus Crohn-Patienten in Remission ( $CDAI < 150$ ) hatten ein normales Testergebnis für fäkales Calprotectin ( $FC < 50$  mg/kg).

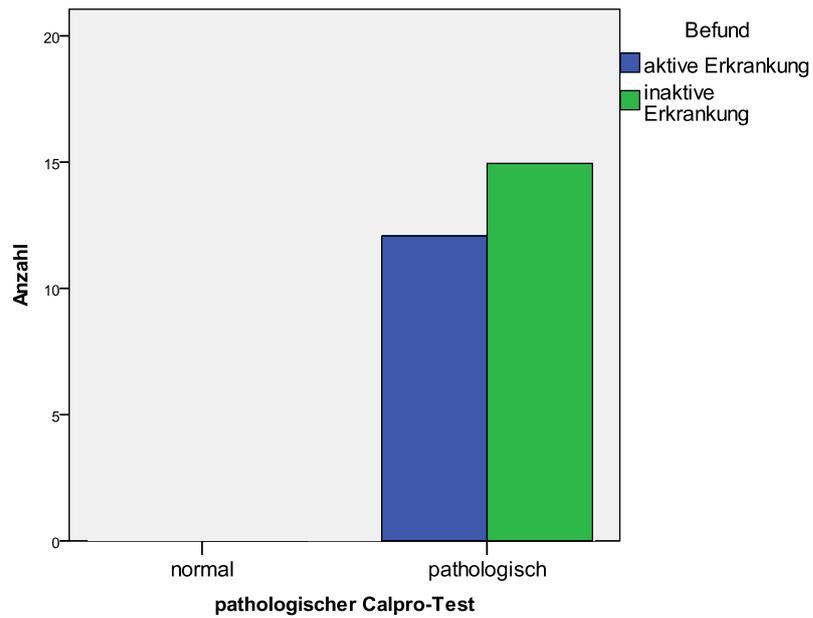
Umgekehrt zeigte sich für alle klinisch aktiven Patienten bei Colitis ulcerosa und Morbus Crohn ein pathologisches Testergebnis ( $FC > 50$  mg/kg) für fäkales Calprotectin.

Zur aktiven Erkrankungsgruppe zählten beim Morbus Crohn 11 Patienten, welche alle einen pathologischen Testwert aufzeigten. Das bedeutete bei einem  $p=0,265$ , dass keine Signifikanz zwischen pathologischem Testergebnis und klinischer Krankheitsaktivität auszumachen war. Beim Calpro-Test hatten alle 30 Patienten unabhängig von klinisch aktiver oder inaktiver Erkrankung ein pathologisches Testergebnis, sodass keine statistische Auswertung über Zusammenhänge erstellt werden konnte.

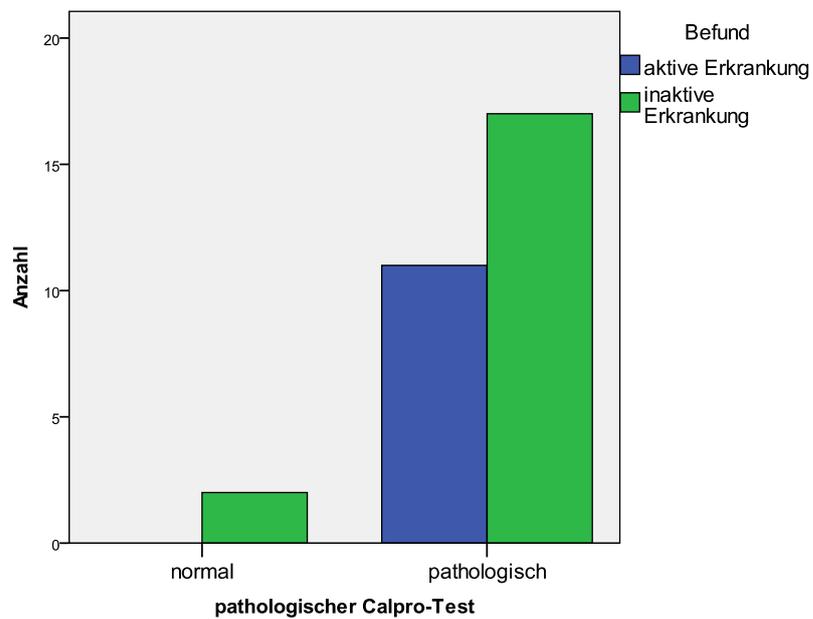
Die Ergebnisse sind in der Tabelle 30 und in den Abbildungen 3 und 4 dargestellt.

	Colitis ulcerosa			Morbus Crohn		
	Aktive Erkrankung	Inaktive Erkrankung	p	Aktive Erkrankung	Inaktive Erkrankung	p
FC $< 50$ mg/kg	0/12	0/15	-	0/11	2/19	0,265
FC $> 50$ mg/kg	12/12	15/15		11/11	17/19	

**Tabelle 30:** Normales ( $FC < 50$  mg/kg) und pathologisches ( $FC > 50$  mg/kg) fäkales Calprotectin bei klinisch aktiver und inaktiver Erkrankung für Calpro-Test bei Colitis ulcerosa und Morbus Crohn.



**Abb. 3:** Anzahl der klinisch aktiven und inaktiven Erkrankungen bei Colitis ulcerosa für pathologischen (FC > 50 mg/kg) und normalen (FC < 50 mg/kg) Calpro-Test.



**Abb. 4:** Anzahl der klinisch aktiven und inaktiven Erkrankungen bei Morbus Crohn für pathologischen (FC > 50 mg/kg) und normalen (FC < 50 mg/kg) Calpro-Test.

### 3.4.2 Pathologischer Immundiagnostik-Test für Colitis ulcerosa und Morbus Crohn

Nur 2 von den insgesamt 15 Colitis ulcerosa-Patienten in klinischer Remission ( $CAI < 5$ ) hatten ein normales Testergebnis ( $FC < 15 \text{ mg/l}$ ) für fäkales Calprotectin und 5 von 21 Morbus Crohn-Patienten in Remission ( $CDAI < 150$ ) ein normales Testergebnis für fäkales Calprotectin ( $FC < 15 \text{ mg/l}$ ).

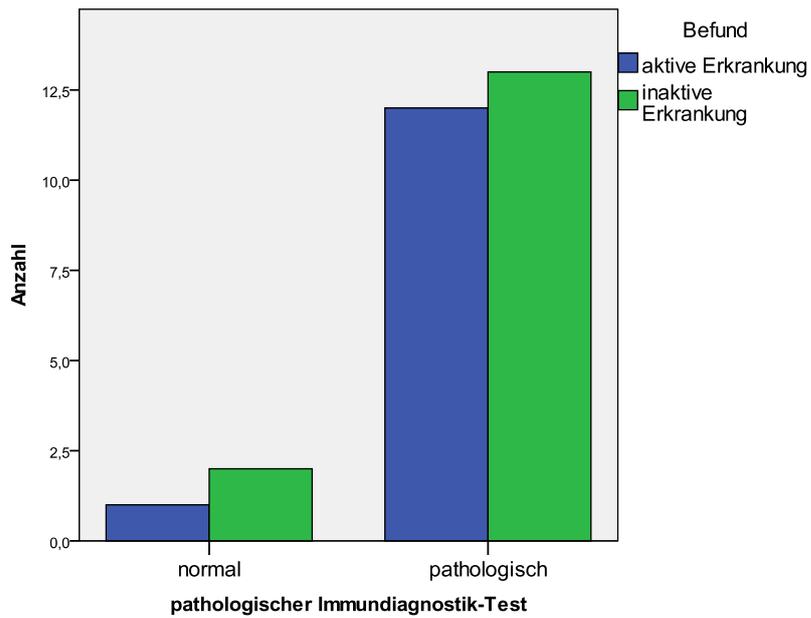
Umgekehrt fand sich nur bei 1 von 13 klinisch aktiven Patienten bei Colitis ulcerosa ein normales fäkales Calprotectin. Bei den 11 klinisch aktiven Morbus Crohn Patienten zeigten alle ein pathologisches Testergebnis ( $FC > 15 \text{ mg/l}$ ) für fäkales Calprotectin.

Bei einem  $p=0,630$  lag kein Zusammenhang zwischen klinisch aktiver oder inaktiver Erkrankung bei Colitis ulcerosa und pathologischen Immundiagnostik-Test vor.

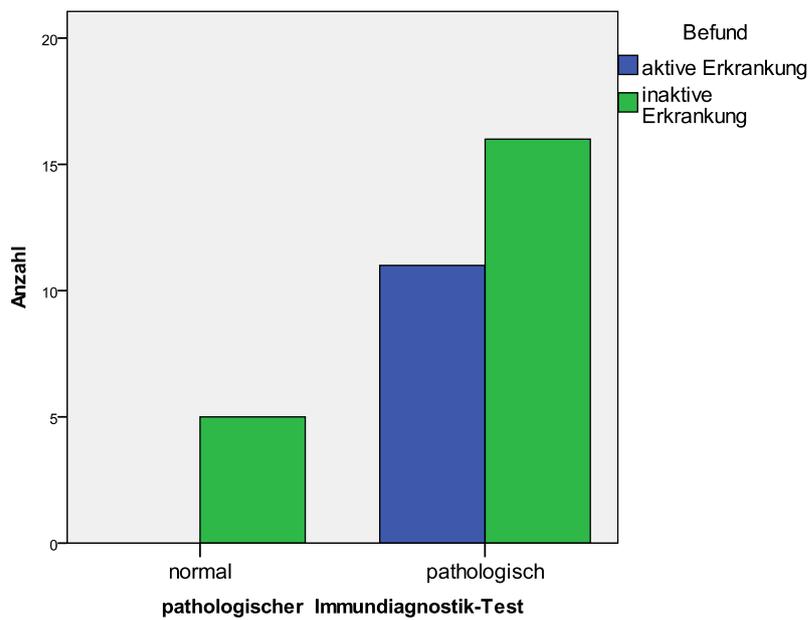
Beim Morbus Crohn ergab sich ein  $p=0,078$ , sodass definitionsgemäß keine signifikanten Unterschiede zwischen der klinischen Krankheitsaktivität und einem pathologischen Immundiagnostik-Test feststellbar waren. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 31 und in den Abbildungen 5 und 6 dargestellt.

	Colitis ulcerosa			Morbus Crohn		
	Aktive Erkrankung	Inaktive Erkrankung	p	Aktive Erkrankung	Inaktive Erkrankung	p
$FC < 15 \text{ mg/l}$	1/13	2/15	0,630	0/11	5/21	0,078
$FC > 15 \text{ mg/l}$	12/13	13/15		11/11	16/21	

**Tabelle 31:** Normales ( $FC < 15 \text{ mg/l}$ ) und pathologisches ( $FC > 15 \text{ mg/l}$ ) fäkales Calprotectin bei klinisch aktiver und inaktiver Erkrankung für Immundiagnostik-Test bei Colitis ulcerosa und Morbus Crohn.



**Abb. 5:** Anzahl der klinisch aktiven und inaktiven Erkrankungen bei Colitis ulcerosa für pathologischen ( $FC > 15 \text{ mg/l}$ ) und normalen ( $FC < 15 \text{ mg/l}$ ) Immundiagnostik-Test.



**Abb. 6:** Anzahl der klinisch aktiven und inaktiven Erkrankungen bei Morbus Crohn für pathologischen ( $FC > 15 \text{ mg/l}$ ) und normalen ( $FC < 15 \text{ mg/l}$ ) Immundiagnostik-Test.

### 3.4.3 Sensitivität und Spezifität von Calprotectin

Bezogen auf die Einteilung der Krankheitsaktivität in klinisch aktive und inaktive Erkrankung bei der Colitis ulcerosa, betrug die Sensitivität 100% und die Spezifität 0% für das polyklonale Testsystem.

Das lässt sich darauf zurückführen, dass keine normalen Testergebnisse vorlagen. Der positive Vorhersagewert (PPV) lag bei 44,4%.

Für das monoklonale Testsystem von Immundiagnostik betrugen die Sensitivität 92,3% und die Spezifität 13,3%. Es konnten ein positiver Vorhersagewert von 48% und ein negativer Vorhersagewert (NPV) von 66,7% bestimmt werden. Das Vorliegen eines negativen Testergebnisses schloß eine klinisch aktive Erkrankung nahezu aus, jedoch galt der Umkehrschluss nicht, dass bei einem pathologischen Testergebnis eine klinisch aktive Erkrankung vorliegen müsste.

Beim Morbus Crohn betrug die Sensitivität des polyklonalen Calpro-Testsystems 100%, die Spezifität 11,8%, der positive Vorhersagewert 39,3% und der negative Vorhersagewert 100%. Für das monoklonale Immundiagnostik-Testsystem betrug die Sensitivität 100%, die Spezifität 16,1%, der positive Vorhersagewert 40,7% und der negative Vorhersagewert 100%. Ausführliche Ergebnisse sind in der Tabelle 32 dargestellt.

	Colitis ulcerosa		Morbus Crohn	
	Calpro Test	Immundiagnostik Test	Calpro Test	Immundiagnostik Test
Sensitivität in %	100	92,3	100	100
Spezifität in %	0	13,3	11,8	16,1
PPV in %	44,4	48	39,3	40,7
NPV in %	0	66,7	100	100

**Tabelle 32:** Sensitivität, Spezifität, PPV und NPV für fäkales Calprotectin unter Verwendung des Calpro-Test und Immundiagnostik-Test bei Colitis ulcerosa und Morbus Crohn.

Fazit der Untersuchung war, dass beide Testsysteme, monoklonales und polyklonales Testsystem eine hohe Sensitivität für das Erkennen richtig positiver Patienten an allen Kranken und eine geringe Spezifität für das Erkennen richtig negativer Patienten an allen Nicht-Kranken aufwiesen, unabhängig vom Vorliegen einer Colitis ulcerosa oder eines Morbus Crohns. Dabei zeigte sich, dass das monoklonale Testsystem eine gering höhere Spezifität aufwies.

## 4 Diskussion

Für die Beurteilung der Krankheitsaktivität bei CED und für die Überwachung des therapeutischen Ansprechens sind zuverlässige diagnostische Methoden erforderlich. Die Einschätzung der klinischen Aktivität bei CED setzt sich zusammen aus der klinischen Anamnese, klinischen Symptomen sowie Laboruntersuchungen (CRP, Leukozyten, Thrombozyten, BSR, Hämoglobin). Die beste Beurteilung der Entzündungsaktivität bei CED basiert jedoch auf der Ileokoloskopie und/oder der histologischen Begutachtung [10, 29, 57], wobei im Fall des Morbus Crohn die Lokalisation der entzündlichen Läsion nicht immer mit der Ileokoloskopie erreicht werden kann. Diese Methode steht für eine invasive, kostspielige und zeitintensive Untersuchung. Gleichzeitig wird sie von vielen Patienten als unangenehm empfunden.

Weil Patienten häufig einer endoskopischen Diagnostik eher ablehnend gegenüberstehen, zum einen weil sie als nicht angenehm empfunden wird und zum anderen mit Komplikationen, insbesondere bei hoher Krankheitsaktivität mit Perforationsgefahr, verbunden sein kann, verzichteten wir in dieser Arbeit auf eine Koloskopieuntersuchung zum Zeitpunkt der klinischen Untersuchung und Stuhlentnahme. Als Goldstandard wurden die klinischen Aktivitätsindices (CAI/CDAI) gewählt. Als eine Einschränkung dieser Arbeit ist zu erwähnen, dass keine Aussage zur Krankheitsaktivität der Darmschleimhaut getroffen wurde, da bei dieser Arbeit, im Vergleich zu anderen Studien, als Goldstandard nicht die endoskopische Beurteilung der Krankheitsaktivität gewählt wurde, sondern der klinische Aktivitätsindex.

Hierbei muss erwähnt werden, dass der klinische Alltag einer gastroenterologischen Ambulanz auf dem Patientengespräch, der klinischen Untersuchung und der Bestimmung von Laborparametern aus dem Blut basiert. Es ist nicht immer möglich bei beginnender Schubsymptomatik zeitnah einen Koloskopietermin wahrnehmen zu können, auch ist man auf das Einverständnis des Patienten angewiesen. Nicht alle Patienten sind gewillt, sich regelmäßig einer Koloskopie zu unterziehen, wenn eine Krankheitsaktivität zu vermuten ist. Also bleiben häufig nur der klinische Aktivitätsindex und die Laborparameter übrig zur schnellen Einschätzung einer möglichen Krankheitsaktivität. Nachteil dabei ist natürlich, dass eine Beurteilung der Entzündungsaktivität der Darmschleimhaut nicht möglich ist.

In der Arbeit von Saverymuttu et al. [82] wurde 1986 nachgewiesen, dass Indium-111 markierte Leukozyten die akut entzündliche Situation der Darmschleimhaut gut widerspiegeln. Aufgrund der hohen Kosten, Belastung der Patienten mit radioaktiver

Strahlung und die geringe Verfügbarkeit der Methode in entsprechenden Einrichtungen, setzte sich diese diagnostische Untersuchung im klinischen Alltag nicht durch.

Eine 1999 von Roseth et al. [76] veröffentlichte Studie zeigte, dass die Bestimmung des Calprotectin im Vergleich zur Indium-111 Leukozytenmethode ähnliche Ergebnisse lieferte.

In dieser Arbeit sollte geprüft werden, ob der Stuhl-Leukozytenmarker Calprotectin mit den klinischen Aktivitätsindices korreliert und geeignet ist zwischen einer aktiven und inaktiven Erkrankung bei CED zu unterscheiden. Es stellte sich somit die Frage, ob sich die Bestimmung von Calprotectin im Stuhl als noninvasive Methode für die Erkennung einer Krankheitsaktivität eignet.

Dazu wurden zwei kommerzielle Testsysteme (Calpro AS, Norwegen und Immundiagnostik, Deutschland) verwendet. Der Unterschied zwischen den beiden Testsystemen ist die Verwendung von ELISA-Kits mit polyklonalen Antikörpern (Calpro-Test) und monoklonalen Antikörpern (Immundiagnostik-Test). In den vorausgegangen Studien [73, 89, 90, 94, 112] wurde häufig der PhiCal-Test (polyklonaler ELISA-Kit) angewandt. Das lässt sich vermutlich darauf zurückführen, dass dieser Test zuerst von Roseth und Mitarbeitern entwickelt wurde [73]. Eine weitere Begründung könnte sein, dass viele Wissenschaftler, (z.B. Sipponen, Tøn) welche sich mit dem Thema fäkales Calprotectin und CED auseinandersetzten, aus dem nördlichen Europa stammen und auf den in Norwegen hergestellten PhiCal-Test zurückgriffen. Ein mit monoklonalen Antikörpern bestückter ELISA-Kit wurde in den Arbeiten von Langhorst, Schröder, Naumann und Malícková [60, 63, 67, 91] verwendet.

Des Weiteren war die Aufgabenstellung, ob mögliche Korrelationen zwischen den im Serum gemessenen Entzündungsparametern, CRP und Leukozyten, und der fäkalen Calprotectinkonzentration bestehen. Mehrere Studien haben gezeigt, dass die Messung der fäkalen Entzündungsparameter bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sensitiver und spezifischer ist, als die Bestimmung dieser Parameter im Serum [89, 112].

#### **4.1 Korrelation zwischen Calprotectin beider Testsysteme**

In der vorliegenden Arbeit wurde eine signifikante Korrelation zwischen den fäkalen Calprotectinkonzentrationen für beide Testsysteme bei Colitis ulcerosa ( $r=0,768$ ,  $p<0,001$ ) und Morbus Crohn ( $r=0,808$ ,  $p<0,001$ ) gefunden. Wurden beide Erkrankungen in klinisch aktive und inaktive Erkrankung unterteilt, zeigten sich bei der Colitis ulcerosa ( $r=0,818$ ,  $p<0,001$ ) und beim Morbus Crohn ( $r=0,854$ ,  $p<0,001$ ) signifikante Korrelationen für die klinisch inaktiven Erkrankungen.

Auch bei den klinisch aktiven Erkrankungen korrelierten beide Testsysteme (Colitis ulcerosa:  $r=0,671$ ,  $p<0,01$ ; Morbus Crohn:  $r=0,655$ ,  $p<0,01$ ) signifikant miteinander. In der Arbeit von

Malicková et al. [63] wurden ebenfalls ein monoklonales und polyklonales Testsystem miteinander verglichen. Beide Methoden zeigten eine gute Korrelation (Pearson's Korrelationskoeffizient  $r = 0,83$ )

#### **4.2 Korrelation zwischen Calprotectin und Aktivitätsindices**

Bei Betrachtung der klinischen Aktivitätsindices in dieser Arbeit zeigte sich für beide Testsysteme keine signifikante Korrelation zwischen fäkalem Calprotectin und dem CAI bei der Colitis ulcerosa ( $r=0,290$  für Calpro-Test;  $r=0,296$  für Immundiagnostik-Test,  $p>0,05$ ). Eine hohe Korrelation ließ sich beim Calpro-Test ( $r=0,497$ ,  $p=0,005$ ) zwischen fäkalem Calprotectin und dem CDAI bei Morbus Crohn feststellen, aber nicht beim Immundiagnostik-Test ( $r=0,348$ ,  $p>0,05$ ).

Eine sehr geringe Korrelation zwischen fäkalem Calprotectin und klinischem Aktivitätsindex konnte auch nur in der Arbeit von Schröder et al. festgestellt werden. Anhand der Calprotectinkonzentrationen war es unmöglich die Krankheitsaktivität in milde, moderate und schwere Aktivität einzuteilen [91].

Schoepfer et al. [90] untersuchten in einer Studie mit 140 Morbus Crohn Patienten die Korrelation von fäkalem Calprotectin zwischen dem Endoskopie-Score für Morbus Crohn, CRP, Leukozyten im Blut und den CDAI. Sie fanden heraus, dass das fäkale Calprotectin am besten mit dem endoskopischen Aktivitätsindex korrelierte, gefolgt von CRP und Leukozyten. Am wenigsten korrelierte das Calprotectin mit dem CDAI. Der CDAI erwies sich als ungeeignet zwischen endoskopischer Aktivität und Inaktivität zu unterscheiden. Die Sensitivität des CDAI für die Feststellung einer endoskopischen Krankheitsaktivität lag nur bei 33%. Ursächlich dafür erscheint, dass der CDAI nur auf subjektiven Symptomen basiert und somit nur eine unzureichende Fähigkeit besitzt, geringgradige Entzündungen der Darmschleimhaut festzustellen.

Ähnliche Aussagen wurden auch in der Studie von Sipponen et al. [94] getroffen, welche sich bei 77 Morbus Crohn Patienten mit der Korrelation zwischen fäkalem Calprotectin und CDAI sowie endoskopischer Krankheitsaktivität beschäftigte.

Der CDAI korrelierte mit fäkalem Calprotectin ( $r=0,397$ ), CRP ( $r=0,388$ ) und endoskopischen Befund ( $r=0,381$ ). Die Korrelationen mit dem endoskopischen Befund waren am größten. Obwohl 85 Patienten klinisch inaktiv waren, zeigten nur 37/85 (43,5%) einen normalen Calprotectinwert. Die Sensitivität vom CDAI betrug nur 27% zur festgestellten endoskopischen Krankheitsaktivität. Unter den 21 Patienten mit klinischer Krankheitsaktivität waren 20 Patienten mit pathologischen Calprotectinwerten. Fäkale Calprotectinkonzentrationen waren signifikant niedriger bei inaktiven Erkrankungen und signifikant höher

bei aktiven Erkrankungen, insbesondere bei Kolonbefall und weniger bei Ileumbefall. Bei milder endoskopischer Krankheitsaktivität hatten eine beträchtliche Anzahl von Patienten normale fäkale Calprotectinwerte. In der Mehrheit dieser Fälle war die Krankheitsaktivität auf das terminale Ileum beschränkt.

Eine weitere Arbeit von Vieira et al. [112] beschäftigte sich auch mit der Korrelation zwischen Calprotectin und klinischer Aktivität. In der Studie wurden 78 Patienten untersucht, davon 38 mit Colitis ulcerosa und 40 mit Morbus Crohn. Es konnte festgestellt werden, dass beim Morbus Crohn der CDAI mit dem Calprotectin korrelierte ( $p=0,010$ ).

Andere Arbeiten [19, 25] ergaben, dass Calprotectin die Krankheitsaktivität besser reflektiert bei Colitis ulcerosa, als bei Morbus Crohn. So fanden Costa et al. [19] heraus, dass fäkale Calprotectinkonzentrationen über 50  $\mu\text{g/g}$  besser mit dem CAI korrelierten, als mit dem CDAI.

Wagner et al. [113] beschäftigten sich in ihrer Verlaufsstudie mit der Frage nach dem Erkennen eines akuten Schubes unter medikamentöser Therapie anhand der Bestimmung der Calprotectinwerte im Stuhl. In ihrer Arbeit wurden 27 Patienten mit Colitis ulcerosa und 11 Patienten mit Morbus Crohn eingeschlossen. Unter anderem wurde auch hier die Korrelation zwischen Calprotectin und klinischen Aktivitätsindex untersucht. Es zeigte sich bei beiden Patientengruppen keine Korrelation zwischen dem klinischen Aktivitätsindex und dem fäkalen Calprotectin. Korrelationen konnten jedoch zwischen fäkalem Calprotectin und dem endoskopischen Aktivitätsindex festgestellt werden, insbesondere im Verlauf der medikamentösen Behandlung.

Es gibt weitere Studien, in denen keine Korrelation zwischen fäkalem Calprotectin und CDAI demonstriert werden konnte [34].

Aufgrund der Tatsache, dass der CDAI hauptsächlich subjektive Parameter und solche Parameter enthält, die nicht direkt den Entzündungszustand des Darmes wiedergeben, wird häufig nur eine geringe Übereinstimmung zwischen dem CDAI und den endoskopischen, histologischen und immunologischen Parametern gefunden [2, 93].

Saverymuttu et al. [82] berichtete, dass 89% der Morbus Crohn Patienten in Remission ( $\text{CDAI} < 150$ ) eine höhere fäkale  $^{111}\text{In}$ -markierte Granulozyten Exkretion zeigten, als Patienten mit Reizdarmsyndrom. Sie schlossen daraus, dass der CDAI die Darmentzündung unterschätzt.

Ein weiterer Nachteil ist, dass viele CED-Patienten eine Erhaltungstherapie mit Steroiden bekommen haben zur Behandlung der CED. Steroide können die subjektiven Parameter der Aktivitätsindices positiv beeinflussen, sodass Patienten angeben klinisch inaktiv zu sein trotz entzündlicher Darmaktivität [43].

Fazit ist, dass die Einteilung aktive versus inaktive Erkrankung mittels klinischen Aktivitätsindex nicht direkt mit der Calprotectinkonzentration im Stuhl verglichen werden kann.

### **4.3 Korrelation zwischen Calprotectin und Entzündungswerten im Blut (CRP und Leukozyten)**

In dieser Arbeit ließen sich signifikante Korrelationen zwischen CRP im Blut und fäkalem Calprotectin bei Colitis ulcerosa ( $r=0,433$ ,  $p=0,031$  für Calpro-Test;  $r=0,548$ ,  $p=0,004$  für Immundiagnostik-Test) und Morbus Crohn ( $r=0,449$ ,  $p=0,015$  für Calpro-Test;  $r=0,536$ ,  $p=0,002$  für Immundiagnostik-Test) nachweisen. Dabei korrelierte das monokonale Testsystem (Immundiagnostik-Test) bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa besser mit dem CRP im Blut.

Nach Differenzierung beider Erkrankungen in klinisch aktiven und inaktiven Befund zeigte sich, dass nur eine signifikante Korrelation zwischen fäkalem Calprotectin und CRP bei den inaktiven Erkrankungen für Colitis ulcerosa ( $r=0,660$ ,  $p=0,010$  für Calpro-Test;  $r=0,548$ ,  $p=0,043$  für Immundiagnostik-Test) und Morbus Crohn ( $r=0,303$ ,  $p>0,05$  für Calpro-Test;  $r=0,483$ ,  $p=0,031$  für Immundiagnostik-Test) vorlag. Auch hier war die Fallzahl für die Unterteilung in aktive (Colitis ulcerosa:  $n=11$  für Calprotest,  $n=12$  für Immundiagnostik-Test; Morbus Crohn:  $n=11$ ) und inaktive Erkrankungen (Colitis ulcerosa:  $n=14$ ; Morbus Crohn:  $n=18$  für Calpro-Test,  $n=20$  für Immundiagnostik-Test) für beide Diagnosen sehr klein, um damit statistisch signifikante Aussagen treffen zu können.

In der Studie von Vieira et al. [112] konnte gezeigt werden, dass die CRP-Werte mit dem fäkalen Calprotectin bei Colitis ulcerosa und Morbus Crohn korrelierten.

Signifikante Korrelationen zwischen fäkalem Calprotectin und CRP ( $r=0,2853$ ,  $p=0,0019$ ) wurden auch in der Arbeit von Silberer et al. festgestellt [93].

Calprotectin im Stuhl wurde auch eine höhere diagnostische Genauigkeit beigemessen, als das CRP in der Arbeit von Langhorst et al. [60].

In der Arbeit von Roseth et al. [73] konnten keine Korrelationen zwischen CRP und fäkalem Calprotectin gefunden werden.

Die Beurteilung der klinischen Krankheitsaktivität und der serochemischen Entzündungswerte zeigten, dass nur eine schwache Korrelation zum endoskopischen und histologischen Befund bei CED Patienten besteht [46].

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit belegt werden, dass keine signifikante Korrelation zwischen fäkalem Calprotectin für beide Testsysteme und der Leukozytenzahl im Blut bei Colitis ulcerosa ( $r=0,170$ ,  $p=0,396$  für Calpro-Test;  $r=0,025$ ,  $p=0,898$  für Immundiagnostik-

Test) und Morbus Crohn ( $r=-0,034$ ,  $p=0,858$  für Calpro-Test;  $r=0,144$ ,  $p=0,431$  für Immundiagnostik-Test) besteht, unabhängig von der klinischen Krankheitsaktivität.

Eine signifikante Korrelation zwischen Calprotectin und Leukozyten ( $r=0,0310$ ,  $p=0,7389$ ) wurde auch in der Arbeit von Silberer et al. [93] ausgeschlossen.

#### **4.4 Verhältnis der Calprotectinwerte zur klinischen Krankheitsaktivität**

Beim Vergleich der fäkalen Calprotectinkonzentrationen zeigte sich in dieser Arbeit kein signifikanter Unterschied (Calpro-Test:  $p=0,217$ ; Immundiagnostik-Test:  $p=0,185$ ) zwischen den klinisch aktiven (Calpro-Test: Median 885,10 mg/kg; Immundiagnostik-Test: Median 117,08 mg/l) und inaktiven Erkrankungen (Calpro-Test: Median 689,95 mg/kg; Immundiagnostik-Test: Median 73,10 mg/l) bei Colitis ulcerosa-Patienten.

Im Vergleich zur Colitis ulcerosa konnten beim Morbus Crohn für das fäkale Calprotectin hohe signifikante Unterschiede (Calpro-Test:  $p=0,005$ , Immundiagnostik-Test:  $p=0,002$ ) gegenüber klinisch aktiver (Calpro-Test: Median 707,15 mg/kg; Immundiagnostik-Test: Median 149,16 mg/l) und inaktiver Erkrankung (Calpro-Test: Median 258,93 mg/kg; Immundiagnostik-Test: Median 61,25 mg/l) festgestellt werden. Trotz des signifikanten Unterschiedes bei Morbus Crohn Patienten konnte nachgewiesen werden, dass der Median von fäkalem Calprotectin deutlich erhöht bei Patienten mit klinisch inaktiver Erkrankung ist. Das ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass trotz klinischer Remission eine entzündliche Darmaktivität vorliegt.

Costa et al. [19] kamen in ihrer Studie zu der Erkenntnis, dass höhere Calprotectinkonzentrationen beim Morbus Crohn auftreten. Die mittlere Calprotectinkonzentration in der Studie von Costa lag beim Morbus Crohn für einen CDAI  $< 150$  bei 213  $\mu\text{g/g}$  und einen CDAI  $> 150$  bei 405  $\mu\text{g/g}$ . Bei der Colitis ulcerosa konnten mittlere Calprotectinkonzentrationen bei einem CAI  $< 4$  mit 123  $\mu\text{g/g}$  und einem CAI  $> 4$  mit 327  $\mu\text{g/g}$  gemessen werden.

Auch Roseth fand, gemessen am klinischen Aktivitätsindex CDAI/CAI, erhöhte Calprotectinkonzentrationen bei den aktiven Erkrankungen [77].

In einer anderen Arbeit von 2004 bestätigte Roseth aus seiner klinischen Erfahrung heraus, dass Colitis ulcerosa-Patienten in Remission niedrigere Calprotectinkonzentrationen als Morbus Crohn-Patienten zeigten [78].

In einer Studie von Langhorst et al. [60] wurde die Aktivität/Inaktivität von 139 Patienten, davon 42 Colitis ulcerosa, 43 Morbus Crohn und 54 Reizdarmsyndrom, endoskopisch/histologisch bestimmt. Hier ließen sich höhere Medianwerte für die Calprotectinkonzentration bei inaktiver (34,5  $\mu\text{g/ml}$ ) und aktiver Erkrankung (108,6  $\mu\text{g/ml}$ )

bei der Colitis ulcerosa feststellen. Die Medianwerte für Calprotectin beim Morbus Crohn lagen bei 11,2 µg/ml (inaktiv) und bei 105,0 µg/ml (aktiv).

Sie fanden heraus, dass fäkales Calprotectin in der Lage ist, zwischen aktiver und inaktiver Erkrankung sowie zwischen Colon irritabile zu unterscheiden. Von den untersuchten Stuhlmarkern hatte jedoch keiner die Fähigkeit die Entzündung besser zu reflektieren als die endoskopische Diagnostik. Aus der Kombination Bestimmung von Calprotectin im Stuhl, CRP im Blut und dem klinischen Aktivitätsindex ist eine zunehmende diagnostische Genauigkeit bezüglich der endoskopischen Entzündung bei Colitis ulcerosa festzustellen [60]. Bei Xiang et al. [116] wurden 66 Patienten mit aktiver und inaktiver Colitis ulcerosa untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass signifikant höhere Calprotectinkonzentrationen bei der aktiven Colitis ulcerosa im Vergleich zur inaktiven Colitis ulcerosa gefunden wurden.

#### **4.5 Vergleich der beiden Testsysteme**

Ein Ergebnis dieser Arbeit war, dass beide Testsysteme eine hohe Sensitivität (Calpro-Test 100%, Immundiagnostik-Test 95,8%) für das Erkennen richtig aktiver Erkrankungen aufwiesen, unabhängig vom Vorliegen einer Colitis ulcerosa oder eines Morbus Crohn. Erklärbar ist das durch den direkten Kontakt des Stuhlmaterials mit der entzündeten Darmoberfläche [93].

Ausgehend von Versuchen mit radioaktiv markierten Granulozyten [82] ließ sich feststellen, dass ein enger Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der intestinalen Entzündung und den fäkal nachgewiesenen Granulozyten besteht. Weil Calprotectin also in den Granulozyten exprimiert wird, spiegelt dieses Protein das Vorliegen einer Darmentzündung wieder [93].

Der Nachteil war, dass das Calprotectin nur eine geringe Spezifität (Calpro-Test 5,88%, Immundiagnostik-Test 19,4%) für das Erkennen richtig inaktiver Patienten, gemessen am klinischen Aktivitätsindex, anzeigte. Bei einer etwas geringeren Sensitivität wies das monoklonale Testsystem von Immundiagnostik eine etwas höhere Spezifität auf.

Für 80-90% der Patienten mit Colitis ulcerosa und Morbus Crohn, welche, definiert durch die Aktivitätsindices, sich als klinisch inaktiv zeigten, konnten auch erhöhte Calprotectinkonzentrationen bestimmt werden. Es ist zu vermuten, dass bei diesen Patienten eine persistierende Entzündung der Darmschleimhaut trotz klinischer Remission vorliegen könnte. Deshalb kann nicht davon ausgegangen werden, dass im klinischen Remissionszustand auch eine fehlende Darmaktivität vorliegt.

Aufgrund dieses Befundes eignet sich Calprotectin nicht als noninvasiver Marker, um zwischen aktiver und inaktiver Erkrankung bei CED zu unterscheiden.

Das steht im Widerspruch zu vielen Studien [8, 9, 10, 25, 75, 98], in denen als Goldstandard die endoskopische Aktivität festgelegt wurde. Hier konnten eine hohe Sensitivität und eine hohe Spezifität für Calprotectin festgestellt werden, sodass sich daraus ergibt, dass Calprotectin als nichtinvasiver objektiver Laborparameter geeignet ist.

In der Arbeit von Malícková et al. [63] wurden zwei ELISA-Kits mit je polyklonalen und monoklonalen Antikörpern verglichen. Der monoklonale Test wurde von der Firma Bühlmann (Schweiz) und der polyklonale Test von PhiCal (Deutschland) verwendet. Es wurden in der Arbeit 36 Patienten mit Morbus Crohn und 29 Patienten mit Colitis ulcerosa untersucht. Die Ergebnisse von beiden Methoden zeigten eine gute Korrelation (Pearson's Korrelationskoeffizient  $r = 0,83$ ). Die Sensitivität des monoklonalen Tests betrug 79%, seine Spezifität 87%. Beim polyklonalen Test betrug die Sensitivität 74% und die Spezifität 84%. Es zeigte sich somit eine höhere Sensitivität und Spezifität für den monoklonalen Test der Firma Bühlmann.

Eine andere Arbeit von Schirmacher et al. [86] beschäftigte sich mit der Validierung fäkaler Leukozytenmarker in der Differentialdiagnose der chronischen Diarrhoe. Es wurden 89 Patienten mit einer chronischen Diarrhoe unklarer Genese und 16 Patienten mit Morbus Crohn in Remission als Vergleichsgruppe untersucht. Calprotectin wurde mittels monoklonalen und polyklonalen Assay bestimmt. Das Ergebnis war, dass das monoklonale Testsystem bessere Testvaliditätskriterien aufwies. Die Sensitivität betrug 90,6% und die Spezifität 87,8% für das monoklonale Testverfahren. Beim polyklonalen Test betrugen die Sensitivität 87,5% und die Spezifität 82,9%.

#### **4.6 Schlussfolgerung**

Zusammenfassend legen die Untersuchungen den Schluss nahe, dass die Bestimmung von fäkalem Calprotectin nicht sicher die Krankheitsaktivität bei Colitis ulcerosa und Morbus Crohn widerspiegelt. Es konnte jedoch in dieser Arbeit gezeigt werden, dass nahezu alle Patienten mit erhöhten Aktivitätsindices auch erhöhte fäkale Calprotectinkonzentrationen aufweisen, sodass hinweislich eine entzündliche Aktivität der Darmschleimhaut vorliegen kann bzw. nicht auszuschließen ist. Besonders beim Morbus Crohn konnten signifikant höhere Calprotectinkonzentrationen bei den klinisch aktiven Erkrankungen ermittelt werden. Anhand der klinischen Aktivitätsindices kann keine sichere Aussage über die Entzündungsaktivität der Darmschleimhaut getroffen werden. Die Aktivitätsindices (CDAI/CAI) reflektieren eher den Gesundheitszustand des Patienten und seine Lebensqualität als den Grad der Entzündung der Darmschleimhaut. Daher können latente subklinische

Entzündungen der Darmschleimhaut bei klinischer Remission persistieren und verantwortlich für einen erneuten akuten Schub sein [19, 102].

Ein weiterer Nachteil ist, dass viele Patienten in dieser Studie mit lokalen oder systemischen Steroiden (systemische Steroidtherapie: 35 Patienten, lokale Steroidtherapie 11 Patienten), in Form einer Erhaltungstherapie, behandelt wurden. Es ist zu vermuten, dass die Steroide einen günstigen Einfluss auf die klinische Krankheitsaktivität hatten und daraus resultierend ein geringerer Aktivitätsindex errechnet wurde, d.h. Patienten gaben eine klinische Remission trotz bestehender entzündlicher Darmaktivität an.

Obwohl Calprotectin kaum mit den klinischen Symptomen korreliert, konnten viele Studien zeigen, dass ein starker Zusammenhang zwischen Calprotectin und endoskopisch gemessener entzündlicher Aktivität des Darmes besteht.

Das bedeutet, dass Calprotectin bezogen auf den endoskopischen Aktivitätsindex als objektive nicht-invasive Methode in Frage kommen kann.

Einige Studien, wie die Arbeit von Costa et al. [20] haben sich damit beschäftigt, ob Calprotectin Vorhersagen über einen klinischen Rückfall machen könnte. Die Autoren stellten fest, dass Calprotectin im Stuhl bei Colitis ulcerosa eine bessere Vorhersage für die Ausbildung eines akuten Schubes erlaubt als bei Morbus Crohn.

Das bedeutet, dass fälschlich inaktive Patienten in dieser Arbeit möglicherweise in Begriff waren eine beginnende Schubsymptomatik zu entwickeln, insbesondere bei Vorliegen einer chronischen subklinischen Entzündung der Darmschleimhaut. Wie auch andere Studien zeigte diese Arbeit, dass eine signifikante Korrelation zwischen fäkalem Calprotectin und CRP, als Entzündungsparameter im Blut, bei Colitis ulcerosa und Morbus Crohn besteht. Interessanterweise konnte diese signifikante Korrelation nur bei den inaktiven Erkrankungen festgestellt werden. Keine signifikante Korrelation lag zwischen dem fäkalen Calprotectin und den Leukozyten im Blut bei Colitis ulcerosa und Morbus Crohn vor.

Der Vergleich der beiden Testsysteme in der Arbeit belegt, dass das monoklonale Testsystem sowohl eine gering niedrigere Sensitivität (95,8%) für das Erkennen von klinisch aktiven Patienten aufwies, als auch eine gering höhere Spezifität (19,4%) für das Erkennen klinisch inaktiver Patienten im Gegensatz zum polyklonalen Testsystem (Sensitivität 100%, Spezifität 5,88%).

Beide Testsysteme korrelierten hoch signifikant bei Colitis ulcerosa und Morbus Crohn miteinander.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das monoklonale Testsystem von Immundiagnostik am ehesten für eine Unterscheidung zwischen aktiver und inaktiver Erkrankung geeignet ist. Ein Nachteil des polyklonalen Testsystems war, dass bei drei Patienten keine

Calprotectinwerte messbar waren, vermutlich durch das Vorliegen einer sehr geringen Calprotectinkonzentration in diesen Stuhlproben oder durch eine fehlerhafte Handhabung.

Des Weiteren reflektiert fäkales Calprotectin lediglich die Exkretion neutrophiler Granulozyten. Dies ist differentialdiagnostisch von Bedeutung bei Patienten mit Reizdarmsyndrom, bei denen funktionellen Störungen im Vordergrund stehen und keine entzündliche Erkrankung des Darmes vorliegt. Bei fehlender Entzündungsreaktion kommt es nicht zu einer Exkretion von neutrophilen Granulozyten und folglich nicht zu einer massiven Ausschüttung von Calprotectin in das Darmlumen und den Stuhl. Bei Nachweis von Calprotectinwerten im Normbereich ist die Bestimmung von Calprotectin im Stuhl zur Abgrenzung von Patienten mit Reizdarmsyndrom gegenüber solchen mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sinnvoll. Der Vorteil des Leukozytenmarkers Calprotectin liegt in der einfachen, nicht-invasiven Probengewinnung und der vergleichsweise kostengünstigen Bestimmung [93].

Derzeit gibt es nur unzureichende Daten, dass Patienten mit fehlender klinischer und endoskopischer Krankheitsaktivität, jedoch mit isoliert erhöhten fäkalen Calprotectinwerten von einem Ausbau der antientzündlichen Therapie profitieren würden. Persistierende Erhöhungen von fäkalem Calprotectin sollten Gegenstand weiterer Untersuchungen sein [113].

Der Stuhlparameter Calprotectin erlaubt keine sichere Aussage über die Entzündungsaktivität der Darmschleimhaut, stellt jedoch im Zusammenhang mit der klinischen Aktivität, den Entzündungsparametern im Blut, endoskopischen, histologischen, sonographischen und radiologischen Untersuchungen eine Unterstützung in der Beurteilung der entzündlichen Krankheitsaktivität der Darmschleimhaut dar.

Die Suche nach spezifischeren sowie empfindlicheren biochemischen Indikatoren geht weiter. Aktuell ist die Koloskopie mit der Histologiegewinnung noch immer der "Goldstandard" in der Diagnostik der CED [70].

## 5 Zusammenfassung

Die Beurteilung der entzündlichen Aktivität der Darmschleimhaut anhand des klinischen Aktivitätsindex bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen stellt im Alltag mit der daraus resultierenden Fragestellung, bezüglich einer möglichen Therapieoptimierung weiterhin eine Hürde in der ambulanten Betreuung dar. Zur Einschätzung der Entzündungsaktivität der Darmschleimhaut gelten Aktivitätsindices als unzuverlässige Parameter.

In den vergangenen letzten Jahren gewann die Bestimmung fäkaler Leukozytenmarker, als objektive, nicht-invasive und kostengünstige Methode eine erhöhte Aufmerksamkeit.

Hierzu gehört das fäkale Calprotectin, welches hauptsächlich in neutrophilen Granulozyten, aber auch in Blutmonozyten exprimiert wird. Es besitzt antimikrobielle, chemotaktische und Apoptose-induzierende Wirkungen.

Ziel dieser Arbeit war es, die Aussagekraft von fäkalem Calprotectin in Bezug auf die Krankheitsaktivität bei CED-Patienten zu prüfen. An dieser Studie nahmen 60 Patienten teil, davon 28 Patienten mit Colitis ulcerosa und 32 Patienten mit Morbus Crohn. Anhand der klinischen Aktivitätsindices (CAI und CDAI) wurden die Patienten in Gruppen mit aktiver und inaktiver Erkrankung unterteilt. Bei der Colitis ulcerosa waren 13 Patienten klinisch aktiv ( $CAI \geq 5$ ) und 15 Patienten klinisch inaktiv ( $CAI < 5$ ). Von den Morbus Crohn Patienten waren 11 klinisch aktiv ( $CDAI \geq 150$ ) und 21 klinisch inaktiv ( $CDAI < 150$ ).

Die Arbeit zeigte, dass zwischen den beiden verwendeten kommerziellen Testsystemen eine hoch signifikante Korrelation bei Colitis ulcerosa und Morbus Crohn vorlag (Colitis ulcerosa:  $r=0,768$ ,  $p<0,001$ ; Morbus Crohn:  $r=0,808$ ,  $p<0,001$ )

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Korrelation zwischen fäkalem Calprotectin und den Aktivitätsindices (CAI, CDAI) zu untersuchen. Nur beim Morbus Crohn korrelierten die fäkalen Calprotectinwerte vom Calpro-Test ( $r=0,497$ ,  $p=0,005$ ) signifikant mit dem CDAI. Für den Immundiagnostik-Test ( $r=0,348$ ,  $p>0,05$ ) ließ sich keine signifikante Korrelation mit dem CDAI finden. Keine signifikanten Korrelationen traten zwischen dem fäkalem Calprotectin für beide Testsysteme und dem CAI bei der Colitis ulcerosa auf (Calpro-Test:  $r=0,290$ ,  $p>0,05$ ; Immundiagnostik-Test:  $r=0,296$ ,  $p>0,05$ )

Untersucht wurde in dieser Arbeit auch die Korrelation zwischen fäkalem Calprotectin und den Entzündungswerten im Blut (CRP und Leukozyten). Für beide Testsysteme ließen sich signifikante Korrelationen zwischen fäkalem Calprotectin und CRP bei Colitis ulcerosa (Calpro-Test:  $r=0,433$ ,  $p=0,031$ ; Immundiagnostik-Test:  $r=0,548$ ,  $p=0,004$ ) und Morbus Crohn (Calpro-Test:  $r=0,449$ ,  $p=0,015$ ; Immundiagnostik-Test:  $r=0,536$ ,  $p=0,002$ ) nachweisen. Dies galt jedoch nur für die klinisch inaktiven Erkrankungen bei Colitis ulcerosa

(Calpro-Test:  $r=0,660$ ,  $p=0,010$ ; Immundiagnostik-Test:  $r=0,548$ ,  $p=0,043$ ) und Morbus Crohn (Calpro-Test:  $r=0,303$ ,  $p=0,222$ ; Immundiagnostik-Test:  $r=0,483$ ,  $p=0,031$ ).

Bei der Colitis ulcerosa (Calpro-Test:  $r=0,170$ ,  $p=0,396$ ; Immundiagnostik-Test:  $r=0,025$ ,  $p=0,898$ ) und Morbus Crohn (Calpro-Test:  $r=-0,034$ ,  $p=0,858$ ; Immundiagnostik-Test:  $r=0,144$ ,  $p=0,431$ ) korrelierte das fäkale Calprotectin für beide Testsysteme nicht signifikant mit den Leukozyten, unabhängig vom Vorliegen einer aktiven oder inaktiven Erkrankung.

Des Weiteren beweist die Arbeit, dass klinisch aktive Patienten höhere Calprotectinwerte im Stuhl als klinisch inaktive Patienten aufwiesen. Dieser signifikante Unterschied gilt insbesondere für den Morbus Crohn (Calpro-Test:  $p=0,005$ ; Immundiagnostik-Test:  $p=0,002$ ).

Bei der Colitis ulcerosa (Calpro-Test:  $p=0,217$ ; Immundiagnostik-Test:  $p=0,185$ ) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Calprotectinkonzentration und der Krankheitsaktivität festgestellt werden.

Diese Arbeit verdeutlicht, dass Calprotectin ein sensitiver Marker zur Erfassung der klinisch aktiven Erkrankungen bei Colitis ulcerosa (Calpro-Test: Sensitivität 100%; Immundiagnostik-Test: 92,3%) und Morbus Crohn (Calpro-Test: Sensitivität 100%; Immundiagnostik-Test: 100%) ist, da fast alle Patienten mit erhöhtem Aktivitätsindex auch erhöhte Calprotectinkonzentrationen aufwiesen. Obwohl 80-90% der Patienten mit Colitis ulcerosa und Morbus Crohn sich in klinischer Remission befanden, angezeigt durch die Aktivitätsindices, zeigte auch dieses Patientenkollektiv erhöhte Calprotectinkonzentrationen.

Das bedeutet, dass anhand eines normwertigen Aktivitätsindex keine Aussage über die Entzündungsaktivität der Darmschleimhaut getroffen werden kann.

Im Vergleich der beiden kommerziellen Testsysteme erscheint das monoklonale Testsystem von Immundiagnostik am ehesten für den klinischen Alltag geeignet zu sein.

Abschließend muß festgestellt werden, dass der Calprotectinwert keine gesicherte Aussage über die Krankheitsaktivität erlaubt, sondern lediglich auf eine entzündliche Aktivität hinweisen kann. Es kann die endoskopische und histologische Diagnostik in der Diagnosestellung und Verlaufskontrolle nicht ersetzen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. **Adler G**  
In : Adler G, Beckh K, Böhm BO, Brambs HJ, v. Herbay A, Starlinger M (Hrsg)  
Morbus Crohn – Colitis ulcerosa  
Auflage Springer - Verlag Berlin Heidelberg New York (1997)
2. **Andre C, Descos L, Landais P et al.**  
Assessment of appropriate laboratory measurements to supplement the Crohn's disease activity index  
Gut (1981) 22: 571-574
3. **Arndt B, Schmidt – Gayk H, Schürmann G et al.**  
Fäkale Parameter zur Beurteilung der Krankheitsaktivität bei Morbus Crohn  
Klin. Lab. (1993) 39: 867-876
4. **Berntzen HB, Munthe E, Fagerhol MK**  
The major granulocyte protein L1 as an indicator of inflammatory joint disease  
Scand J Rheumatol (1988) Suppl 76: 251-6
5. **Berntzen HB, Olmez U, Fagerhol MK et al.**  
The leukocyte protein L1 in plasma and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis  
Scand J Rheumatol (1991) 20: 74-82
6. **Best WR, Beckett JM, Singelton JW et al.**  
Development of a Crohn's Disease Activity Index -National cooperative Crohn's Disease Study  
Gastroenterology (1976) 70: 439-444
7. **Bitton A, Peppercorn M, Antonioli D et al.**  
Clinical, biological, and histologic parameters as predictors of relapse in ulcerative colitis.  
Gastroenterology. (2001) 120: 13-20
8. **Bjarnason I, Sherwood R**  
Fecal calprotectin: a significant step in the non-invasive assessment of intestinal Inflammation  
J Pediatr Gastroenterol and Nutrition (2001) 33: 11-13
9. **Bunn SK, Bisset WM, Main MJ et al.**  
Fecal calprotectin: validation as a non-invasive measure of bowel inflammation in childhood inflammatory bowel disease  
J Pediatr Gastroenterol Nutr (2001) 33: 14-22
10. **Bunn SK, Bisset WM, Main MJ et al.**  
Fecal calprotectin as a measure of disease activity in childhood inflammatory bowel disease  
J Pediatr Gastroenterol Nutr (2001) 32: 171-177
11. **CALPRO AS –Infomationsbroschüre**
12. **Campeotto F, Butel MJ, Kalach N et al.**  
High faecal calprotectin concentrations in newborn infants  
Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed (2004) 89: F353-5
13. **Canani RB, Terrin G, Rapacciuolo L et al.**  
Faecal calprotectin as reliable non-invasive marker to assess the severity of mucosal inflammation in children with inflammatory bowel disease  
Dig Liver Dis 2008 40: 54-53

14. **Carlson CS, Aldred SF, Lee PK et al.**  
Polymorphisms within the C-reactive protein (CRP) promoter region are associated with plasma CRP levels  
*Am J Hum Genet* (2005) 77: 64-77
15. **Carroccio A, Iacono G, Cottone M 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
16. **Clohessy PA, Golden BE**  
Calprotectin-mediated zinc chelation as a biostatic mechanism in host defence  
*Scand J Immunol* (1995) 42: 551-6
17. **Condon A, Graff L, Elliot L et al.**  
Acceptance of colonoscopy requires more than test tolerance  
*Can J Gastroenterol* (2008) 22: 41-7
18. **Corbin BD, Seeley EH, Raab A et al.**  
Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses  
*Science* (2008) 1: 962-5
19. **Costa F, Mumolo MG, Bellini M et al.**  
Role of faecal calprotectin as non-invasive marker of intestinal inflammation  
*Digestive and Liver Disease* (2003) 35: 642-647
20. **Costa F, Mumolo MG, Ceccarelli L et al.**  
Calprotectin is a stronger predictive marker of relapse in ulcerative colitis than in Crohn's disease  
*Gut* (2005) 54: 364-368
21. **Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD**  
Regional enteritis – a pathological and clinical entity  
*J Amer Med Ass* (1932) 99: 1323-1328
22. **Cuida M, Brun JG, Tynning T et al.**  
Calprotectin levels in oral fluids: the importance of collection site.  
*Eur J Oral Sci.* (1995) 103: 8-10
23. **Dale I, Fagerhol MK, Naesgaard I**  
Purification and partial characterisation of highly immunogenetic leukocyte protein, L1 antigen  
*Eur J Biochem* (1983) 134: 1-6
24. **Dale I, Brandtzaeg P, Fagerhol MK**  
Distribution of a new myelomonocytic antigen (L1) in human peripheral blood leukocytes. Immunofluorescence and immunoperoxidase staining features in comparison with lysozyme and lactoferrin  
*Am J Clin Pathol* (1985) 84: 24-34
25. **D'Inca R, Dal Pont E, Di Leo V et al.**  
Calprotectin and lactoferrin in the assessment of intestinal inflammation and organic Disease  
*Int J Colorectal Dis* (2007) 22: 429-437
26. **Dolwani S, Metzner M, Wassell JJ et al.**  
Diagnostic accuracy of faecal calprotectin estimation in prediction of abnormal small bowel radiology  
*Aliment Pharmacol Ther* (2004) 20: 615-621
27. **Fagan EA, Dyck RF, Maton PN et al.**  
Serum levels of C-reactive protein in Crohn's disease and ulcerative colitis  
*Eur J Clin Invest* (1982) 12: 351-9

28. **Fagerberg UL, Lööf L, Merzoug RD et al.**  
Fecal calprotectin levels in healthy children studied with an improved assay  
*J Pediatr Gastroenterol Nutr* (2003) 37: 468-472
29. **Fagerberg UL, Loof L, Myrdal U et al.**  
Colorectal inflammation is well predicted by fecal calprotectin in children with gastrointestinal symptoms.  
*J Pediatr Gastroenterol Nutr* (2005) 40: 450-455
30. **Fagerhol MK, Dale I, Andersson T**  
A radioimmunoassay for a granulocyte protein as a marker in studies on the turnover of such cells  
*Bull Eur Physiopathol Respir* (1980) 16: 273-282
31. **Fagerhol MK, Andersson K, Naess-Andresen CF et al.**  
Calprotectin (the L1 leukocyte protein)-Stimulus response coupling: the role of intracellular calcium – binding proteins  
Boca Raton, Fla: CRC Press Inc (1990): 187-210
32. **Fagerhol MK**  
Nomenclature for proteins: is calprotectin a proper name for the elusive myelomonocytic protein?  
*J Clin Pathol: Mol Pathol* (1996) 49: M74-M79
33. **Frenz MB, Dunckley P, Camporota L et al.**  
Comparison between prospective and retrospective evaluation of Crohn`s disease activity index  
*Am J Gastroenterol* (2005) 100: 1117-1120
34. **Gaya DR, Mackenzie JF**  
Faecal Calprotectin: a bright future for assessing disease activity in Crohn's disease.  
*QJM* (2002) 95: 557-558
35. **Gaya DR, Lyon TDB, Duncan A et al.**  
Faecal calprotectin in the assessment of Crohn`s disease activity  
*Q J Med* (2005) 98: 435-441
36. **Ghavami S, Kerckhoff C, Chazin WJ et al.**  
Mechanism of apoptosis induced by S100A8/A9 in colon cancer cell lines: the role of ROS and the effect of metal ions.  
*J Leukoc Biol* (2004) 76: 169-75
37. **Golden BE, Clohessy PA, Russel G et al.**  
Calprotectin as a marker of inflammation in cystic fibrosis  
*Arch Dis Child* (1996) 74: 136-9
38. **Guignard F, Mauel J, Markert M**  
Identification and characterization of a novel human neutrophil protein related to the S100 family  
*Biochem J* (1995) 309: 395-401
39. **Gundling F, Schmidtler F, Hapfelmeier A et al.**  
Fecal calprotectin is a useful screening parameter for hepatic encephalopathy and spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis  
*Liver Int* (2011) 31: 1406-1415
40. **Heizmann CW, Fritz G, Schäfer BW**  
S100 proteins: structure, functions and pathology  
*Front Biosci* (2002) 7: 1356-1368
41. **Hessian PA, Edgeworth J, Hogg N**  
MRP-8 and MRP-14, two abundant Ca (2+)-binding proteins of neutrophils and monocytes  
*J Leukoc Biol* (1993) 53: 197-204

42. **Hilt DC, Kligman D**  
The S-100 protein family: A biochemical and functional overview. In: Novel Calcium-Binding Proteins. Fundamentals and Clinical Implications (C.W. Heizman, ed.), Springer Verlag, Heidelberg, (1991) pp65-103
43. **Hodgson HJF**  
Assessment of drug therapy in inflammatory bowel disease  
J Clin Pharmacol (1982) 14: 159-70
44. **Hoffmann JC, Kroesen AJ, Klump B**  
Chronisch entzündliche Darmerkrankungen- Das CED-Handbuch für Klinik und Praxis  
Labordiagnostik von Emmrich, J  
Georg Thieme Verlag 2004
45. **Hoffmann JC, Kroesen AJ, Klump B**  
Chronisch entzündliche Darmerkrankungen- Das CED-Handbuch für Klinik und Praxis  
Das intestinale Immunsystem von Holtmann M, Neurath MF  
Georg Thieme Verlag 2004
46. **Holmquist L, Ahren C, Fallstrom SP**  
Clinical disease activity and inflammation activity in the rectum in relation mucosal inflammation assessed by colonoscopy. A study of children and adolescents with chronic inflammatory bowel disease  
Acta Paediatr Scand (1990) 79: 527-34
47. **Holt J, Fagerhol MK, Dale I**  
Quantitation of a leukocyte protein (L1) in urine  
Acta Paediatr Scand (1983) Jul; 72 (4): 615-6
48. **Immundiagnostik- Informationsbroschüre**
49. **Johne B, Fagerhol MK, Lyberg T et al.**  
Functional and clinical aspects of the myelomonocyte protein calprotectin  
J Clin Pathol (1997) 50: 13-123
50. **Johne B, Kronborg O, Ton HI et al.**  
A new fecal calprotectin test for colorectal neoplasia. Clinical results and comparison with previous method  
Scand J Gastroenterol (2001) 36: 291-296
51. **Jones J, Loft us Jr EV, Panaccione R et al.**  
Relationship between disease activity and serum and fecal biomarkers in patients with Crohn's disease  
Clin Gastroenterol Hepatol (2008) 6: 1218-24
52. **Judd TA, Day AS, Lemberg DA et al.**  
Update of fecal markers of inflammation in inflammatory bowel disease  
J Gastroenterol Hepatol (2011) 26: 1493-1499
53. **Kappelman MD, Rifas-Shiman SL, Kleinman K et al.**  
The prevalence and geographic distribution of Crohn's disease and ulcerative colitis in the United States  
Clin Gastroenterol Hepatol (2007) 12: 1424-9
54. **Kerkhoff C, Klempt M, Kaever V et al.**  
The two calcium-binding proteins, S100A8 and S100A9, are involved in the metabolism of arachidonic acid in human neutrophils  
J Biol Chem (1999) 274: 32672-9
55. **Kligman D, Hilt DC**  
The S100 protein family  
Trends Biochem (1988) Sci 13: 437-443
56. **Kocher M, Kenny PA, Farram E et al.**  
Functional chemotactic factor CP-10 and MRP-14 are abundant in murine abscesses  
Infect Immun (1996) 64: 1342-50

57. **Konikoff MR, Denson LA**  
Role of fecal calprotectin as a biomarker of intestinal inflammation in inflammatory bowel disease  
*Inflamm Bowel Dis* (2006) 12: 524-534
58. **Kristinsson J, Roseth A, Fagerhol MK et al.**  
Fecal calprotectin concentration in patients with colorectal carcinoma  
*Dis Colon Rectum* (1998) 41: 316-321
59. **Lackmann M, Cornish CJ, Simpson RJ et al.**  
Purification and structural analysis of a murine chemotactic cytokine (CP-10) with sequence homology to S100 proteins  
*J Biol Chem* (1992) 267: 7499-504
60. **Langhorst J, Elsenbruch S, Koelzer J et al.**  
Noninvasive markers in the assessment of intestinal inflammation in inflammatory bowel diseases: performance of fecal lactoferrin, calprotectin and PMN-elastase, CRP, and clinical indices  
*Am J Gastroenterol* (2008) 103: 162-169
61. **Masoodi I et al.**  
Biomarkers in the management of ulcerative colitis: a brief review  
*GMS German Medical Science* 2011, Vol. 9
62. **Mazlam MZ, Hodgson JH**  
Peripheral blood monocyte cytokine production and acute phase response in inflammatory bowel disease  
*Gut* (1992) 33: 773-778
63. **Malícková K, Janatková I, Bortlík M et al.**  
Calprotectin levels in patients with idiopathic inflammatory bowel disease comparison of two commercial tests  
*Epidemiol Mikrobiol Imunol* (2008) 57: 147-53
64. **Monalto M, Curigliano V, Santoro L et al.**  
Fecal calprotectin in first-degree relatives of patients with ulcerative colitis  
*Am J Gastroenterol* (2007) 102: 132-136
65. **Morowitz DA, Allen LW, Kirsner JB**  
Thrombocytosis in chronic inflammatory bowel disease  
*Ann Intern Med* (1968) 68: 1013-1021
66. **Naess-Andresen CF, Egelanddal B, Fagerhol MK**  
Calcium binding and concomitant changes in the structure and heat stability of Calprotectin (L1-protein)  
*J Clin Pathol: Mol Pathol* (1995) 48: M 278-84
67. **Naumann M, Povse N, Stein J**  
Neutrophilen-Proteine im Stuhl. Vergleichende Validierung eines neuen monoklonalen Calprotectin-Assay in der Differentialdiagnose der chronischen Diarrhoe  
Medizinische Klinik I, ZAFES, Klinikum der J.W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main
68. **Odink K, Cerletti N, Bruggen J et al.**  
Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages of rheumatoid arthritis  
*Nature* (1987) 330: 80-2
69. **Olafsdottir E, Aksnes L, Fluge G et al.**  
Faecal calprotectin levels in infants with infantile colic, healthy infants, children with inflammatory bowel disease, children with recurrent abdominal pain and healthy children  
*Acta Paediatr* (2002) 91: 45-50

70. **Poullis A, Foster R, Northfield TC et al.**  
Review article: Fecal markers in assessment of activity in inflammatory bowel disease.  
*Aliment Pharmacol Ther* (2002) 16: 675-681
71. **Poullis A, Foster R, Mendall MA, Fagerhol MK**  
Emerging role of calprotectin in gastroenterology  
*Journal of Gastroenterology and Hepatology* (2003) 18: 756-762
72. **Ridinger K, Ilg EC, Niggli FK et al.**  
Clustered organization of S100 genes in human and mouse  
*Biochim Biophys Acta* (1998) 1448: 254-263
73. **Roseth AG, Fagerhol MK, Aadland E et al.**  
Assessment of the neutrophil dominating protein calprotectin in feces  
*Scand J Gastroenterol* (1992) 27: 793-798
74. **Roseth AG, Kristinsson J, Fagerhol MK et al.**  
Faecal calprotectin: a novel test for the diagnosis of colorectal cancer?  
*Scand J Gastroenterol* (1993) 28: 1073-1076
75. **Roseth AG, Aadland E, Jahnsen J et al.**  
Assessment of disease activity in ulcerative colitis by faecal calprotectin, a novel granulocyte marker protein  
*Digestion* (1997) 58: 176-180
76. **Roseth AG, Schmidt PN, Fagerhol MK**  
Correlation between faecal excretion of indium-111-labelled granulocytes and calprotectin, a granulocyte marker protein, in patients with inflammatory bowel disease  
*Scand J Gastroenterol* (1999) 34: 50-54
77. **Roseth AG**  
Determination of faecal calprotectin, a novel marker of organic gastrointestinal disorders  
*Digestive and Liver Disease* (2003) 35: 607-609
78. **Roseth AG, Aadland E, Grzyb K**  
Normalization of faecal calprotectin: a predictor of mucosal healing in patients with inflammatory bowel disease  
*Scand J Gastroenterol* (2004) 39: 1017-1020
79. **Sander J, Fagerhol MK, Bakken JS et al.**  
Plasma levels of the leukocyte L1 protein in febrile conditions: relation to aetiology, number of leukocytes in blood, blood sedimentation reaction and C-reactive protein  
*Scand J Clin Lab Invest* (1984) 44: 357-62
80. **Santhanagopalan V, Hahn BL, Sohnle PG**  
Resistance of zinc-supplemented *Candida albicans* cells to the growth inhibitory effect of calprotectin  
*J Infect Dis* (1995) 171:1 289-94
81. **Saverymuttu SH**  
Clinical remission in Crohn`s disease-Assessment using fecal <sup>111</sup>In granulocyte excretion  
*Digestion* (1986) 33: 74-9
82. **Saverymuttu SH, Camilleri M, Rees H et al.**  
Indium-111 granulocyte scanning in the assessment of disease extent and disease activity in inflammatory bowel disease  
*Gastroenterol* (1986) 90: 1121-1128
83. **Saverymuttu SH, Hodgson HJ, Chadwick VS, et al.**  
Differing acute phase responses in Crohn`s disease and ulcerative colitis  
*Gut* (1986) 27: 809-813

84. **Schäfer BW, Wicki R, Engelkamp D 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: 638-43
85. **Schäfer BW, Heizmann CW**  
The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology  
*Trends Biochem Sci* (1996) 21: 134-40
86. **Schirmacher S, Naumann M, Caspary WF et al.**  
Prospektive Validierung fäkaler Leukozytenmarker in der Differentialdiagnose der Chronischen Diarrhoe  
*Z Gastroenterol* (2004): 42
87. **Schoepfer AM, Trummler M, Seeholzer P et al.**  
Accuracy of four fecal assays in the diagnosis of colitis  
*Dis Colon Rectum* (2007) 50: 1697-706
88. **Schoepfer AM, Trummler M, Seeholzer P et al.**  
Discriminating IBD from IBS: comparison of the test performance of fecal markers, blood leukocytes, CRP, and IBD antibodies  
*Inflamm Bowel Dis* (2008) 14: 32-39
89. **Schoepfer AM, Beglinger C, Straumann A et al.**  
Ulcerative Colitis: Correlation of the Rachmilewitz Endoscopic Activity Index with Fecal Calprotectin, Clinical Activity, C-reactive Protein and Blood Leukocytes  
*Inflamm Bowel Dis* (2009) 15: 1851-1858
90. **Schoepfer AM, Beglinger C, Straumann A 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: 162-169
91. **Schröder O, Naumann M, Shastri Y et al.**  
Prospective evaluation of faecal neutrophil-derived proteins in identifying intestinal inflammation: combination of parameters does not improve diagnostic accuracy of calprotectin  
*Aliment Pharmacol Ther* (2007) 26: 1035-1042
92. **Shine B, Berghouse L, Lennard Jones J. E. et al.**  
C-Reactive protein as an aid in the differentiation of functional and inflammatory bowel disorders  
*Clinica Chimica Acta* (1985) 148: 105-109
93. **Silberer H, Küppers B, Mickisch O et al.**  
Fecal leukocyte proteins in inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome  
*Clin Lab* (2005) 51: 117-126
94. **Sipponen T, Savilahti E, Kolho KL et al.**  
Crohn's Disease Activity assessed by fecal calprotectin and lactoferrin: correlation with Crohn's disease activity index and endoscopic findings  
*Inflamm Bowel Dis* (2008) 1: 40-6
95. **Steinbakk M, Naess-Andresen CF, Lingaas E et al.**  
Antimicrobial actions of calcium binding leukocyte L1 protein, calprotectin  
*Lancet* (1990) 336: 763-5
96. **Stowe SP, Redmond SR, Stormont JM et al.**  
An epidemiologic study of inflammatory bowel disease in Rochester, New York. Hospital incidence  
*Gastroenterology* (1990) 98: 104-10
97. **Striz I, Trebichavsky I**  
Calprotectin – a pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation  
*Physiol Res* (2004) 53: 245-253

98. **Summerton CB, Longlands MG, Wiener K et al.**  
Faecal calprotectin: a marker of inflammation throughout the intestinal tract  
*Eur J Gastroenterol Hepatol* (2002) 14: 841-845
99. **Talstad I, Rootwelt K, Gjone E**  
Thrombocytosis in ulcerative colitis and Crohn's disease  
*Scand J Gastroenterol* (1973) 8: 135-8
100. **Thjodleifsson B, Sigthorsson G, Cariglia N et al.**  
Subclinical intestinal inflammation: An inherited abnormality in Crohn's disease relatives?  
*Gastroenterology* (2003) 124: 1728-37
101. **Tibble JA, Sigthorsson G, Foster R et al.**  
High prevalence of NSAID enteropathy as shown by a simple faecal test  
*Gut* (1999) 45: 362-366
102. **Tibble JA, Sigthorsson G, Bridger S et al.**  
Surrogate markers of intestinal inflammation are predictive of relapse in patients with inflammatory bowel disease  
*Gastroenterol* (2000) 119: 15-22
103. **Tibble J, Teahon K, Thjodleifsson B et al.**  
A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease  
*Gut* (2000) 47: 506-513
104. **Tibble JA, Bjarnason I**  
Non-invasive investigation of inflammatory bowel disease  
*World J Gastroenterol* (2001) 7: 460-465
105. **Tibble JA, Bjarnason I**  
Fecal calprotectin as an index of intestinal inflammation  
*Drugs of Today* (2001) 37: 85-96
106. **Tibble JA, Sigthorsson G, Foster R et al.**  
Faecal calprotectin and faecal occult blood tests in the diagnosis of colorectal carcinoma and adenoma  
*Gut* (2001) 49: 402-408
107. **Tibble JA, Sigthorsson G, Foster R et al.**  
Use of surrogate markers of inflammation and Rome criteria to distinguish organic from nonorganic intestinal disease  
*Gastroenterol* (2002) 123: 450-460
108. **Tøn H, Øystein B, Dale S, Holtlund J et al.**  
Improved assay for fecal calprotectin  
*Clinica Chimica Acta* (2000) 292: 41-54
109. **Van Hees PAM, Van Elteren PH, Van Lier HJJ et al.**  
An index of inflammatory activity in patients with Crohn's disease  
*Gut* (1980) 21: 279-286
110. **Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts R**  
C-Reactive Protein as a Marker for Inflammatory Bowel Disease  
*Inflamm Bowel Dis* (2004) 10: 661-665
111. **Vermeire S, G. van Assche, P. Rutgeerts**  
Laboratory markers in IBD: useful, magic or unnecessary toys?  
*Gut* (2006) 55: 426-431
112. **Vieira A, Fang CB et al.**  
Inflammatory bowel disease activity assessed by fecal calprotectin and lactoferrin: correlation with laboratory parameters, clinical, endoscopic and histological indexes  
*BMC Research Notes* (2009) 2: 221

- 113. Wagner M, Peterson CGB, Ridefelt P et al.**  
Fecal markers of inflammation used as surrogate markers for treatment outcome in relapsing inflammatory bowel disease  
World J Gastroenterol (2008) 14: 5584-5589
- 114. Wassell J, Dolwani S, Metzner M et al.**  
Faecal calprotectin: a new marker for Crohn`s disease?  
Ann Clin Biochem (2004) 41: 230-232
- 115. Wilkinson MM, Busuttill A, Hayward C et al.**  
Expression pattern of two related cystic-fibrosis-assoziated calcium-binding-proteins in normal and abnormal tissues  
J Cell Sci (1988) 91: 221-30
- 116. Xiang JY, Ouyang Q, Li GD et al.**  
Clinical value of fecal calprotectin in determining disease activity of ulcerative colitis  
World J Gastroenterol (2008) 14: 53-57
- 117. Yui S, Mikami M, Yamazaki M**  
Induction of apoptotic cell death in mouse lymphoma and human leukemia cell lines by a calcium-binding protein complex, calprotectin, derived from inflammatory peritoneal exudate cells  
J Leukocyte Biol (1995) 58: 650-658

## **7 Anhang**

Tabelle 1: Crohn`s Disease Activity Index (CDAI) nach Best (1976)

Tabelle 2: Clinical Activity Index (CAI) nach Rachmilewitz (1989)

Tabelle 3: Patientendaten

Tabelle 1:

**Crohn's Disease Activity Index (CDAI) nach Best (1976)**

Variable		Koeffizient	Endwert
1. Anzahl der <b>weichen Stühle</b> in der letzten Woche	=	x 2	=
2. Grad der <b>Bauchschmerzen</b> in der letzten Woche 0 = keine, 1 = leicht, 2 = mäßig, 3 = schwer	=	x 5	=
3. <b>Allgemeinbefinden</b> in der letzten Woche 0 = gut, 1 = nicht ganz so gut, 2 = schlecht, 3 = sehr schlecht, 4 = unerträglich	=	x 7	=
4. <b>andere mit Morbus Crohn assoziierte Symptome</b> in der letzten Woche (je 1 Punkt) Iritis/Uveitis, Gelenkschmerzen/Arthritis, Erythema nodosum, Analfissur/- fisteln/- abszesse, Pyoderma gangränosum, Stomatitis aphthosa, Temperaturen > 37,5°C, andere Fisteln	=	x 20	=
5. Symptomatische <b>Durchfallbehandlung</b> 0 = nein, 1 = ja	=	x 30	=
6. <b>Resistenzen im Abdomen</b> 0 = nein, 2 = fraglich, 5 = sicher	=	x 10	=
7. <b>Hämatokrit</b> (W = 42-Hkt, M = 47-Hkt)	=	x 6	=
8. <b>Gewicht</b> ( 1-(Gewicht/Standardgewicht) )	=	x 100	=

CDAI < 150 = ruhende Erkrankung

CDAI > 150 = aktive Erkrankung

CDAI > 450 = hochaktive Erkrankung

Tabelle 2:

**Clinical Activity Index (CAI) nach Rachmilewitz (1989)**

---

1. **Anzahl der Stühle** pro Woche

< 18 = 0, 18-35 = 1, 36-60 = 2, > 60 = 3

---

2. **Blut im Stuhl**

kein = 0, wenig = 2, viel = 4

---

3. **Allgemeinbefinden**

gut = 0, mäßig = 1, schlecht = 2, sehr schlecht = 3

---

4. **Bauchschmerzen**

keine = 0, leicht = 1, mäßig = 2, stark = 3

---

5. **Temperatur**

37-38°C = 0, > 38°C = 3

---

6. **Extraintestinale Manifestationen**

Iritis = 3, Erythema nodosum = 3, Arthritis = 3

---

7. **Laborwerte**

BSG > 50 mm (1h) = 1, BSG > 100 mm (2h) = 2, Hb < 10 g/dl = 4

---

CAI =

CAI < 5 = inaktive Erkrankung

CAI ≥ 5 = aktive Erkrankung

## Anhang

Patient	Geschlecht	Geburtsdatum	Morbus Crohn	Colitis ulcerosa	klinisch inaktiv	klinisch aktiv	CRP in mg/l	Leukozyten in Gpt/l	Calprotectin in mg/kg (Calpro AS)	Calprotectin in mg/l (Immun-diagnostik)
1	m	13.09.1974	x			x CDAI 157	33,4	17,4	517,3	149,16
2	m	22.02.1972	x		x CDAI 108				512,95	70,1
3	w	11.08.1956	x		x CDAI 55		28,3	8,4	127,43	61,25
4	m	04.11.1978	x		x CDAI 99		8,2	5,5	919,35	65,9
5	m	04.09.1965		x		x CAI 7	47,2	11,4	545,1	117,08
6	w	22.06.1951		x	x CAI 2		0,7	12,7	1540,53	80,15
7	w	10.06.1970	x			x CDAI 192	1,0	8,6	707,15	93
8	w	17.01.1965		x	x CAI 0		5,2	9,6	782,9	73,1
9	m	08.03.1977	x		x CDAI 108		14,8	11,3	104,28	27,95
10	m	23.05.1978	x		x CDAI 81		2,8	6,3	<NG	2,95
11	m	19.05.1939		x		x CAI 6	2,5	7,8	625,38	84,7
12	w	09.07.1964	x		x CDAI 28		29,9	6,6	405,18	261,18
13	m	14.03.1983		x	x CAI 0		0,8	7,3	50,2	5,28
14	w	25.12.1956		x		x CAI 5	4,7	fehlt	220,45	63,25
15	m	29.11.1977	x		x CDAI 137		6,1	9,2	237,05	23,08
16	m	17.10.1972	x		x CDAI 40		6,62	4,75	432,3	333,9
17	w	04.08.1950		x	x CAI 1		7,4	7,8	921,68	123,7

Anhang

Nummer	Geschlecht	Geburtsdatum	Morbus Crohn	Colitis ulcerosa	Remission	Akuter Schub	CRP in mg/l	Leukozyten in Gpt/l	Calprotectin in mg/kg (Calpro AS)	Calprotectin in mg/l (Immun-diagnostik)
19	w	03.06.1950		x		x CAI 10	23,7	4,3	560,13	116,08
20	w	24.06.1984	x			x CDAI 161	7,6	8,9	402,15	26,76
21	w	24.10.1963	x			x CDAI 172	78,4	7,3	328,8	102,28
22	w	22.08.1977	x			x CDAI 197	28,9	8,1	443,7	114,92
23	m	29.11.1950	x		x CDAI 140		1,2	7,0	67,1	20,1
24	w	12.06.1980	x		x CDAI 76		13,7	7,1	258,93	65,95
25	w	16.02.1957		x	x CAI 1		3,0	5,14	82,63	17,98
26	m	07.03.1970		x	x CAI 0		10,9	12,9	72,7	15,775
27	w	11.02.1955	x		x CDAI 135,5		0,4	7,2	73,25	7,2
28	w	27.10.1967	x		x CDAI 59		fehlt	9,20	45,58	7,63
29	w	07.12.1966	x		x CDAI 67		6,1	10,4	266,73	68,15
30	m	28.10.1972		x		x CAI 5	4,2	6,4	1066,4	78,56
31	m	22.12.1965		x		x CAI 5	3,0	7,8	<NG	3,93
32	m	14.06.1972	x		x CDAI 106		0,2	3,8	<NG	3,55
33	w	28.01.1968	x			x CDAI 230	3,9	11,2	339	114,65
34	m	11.08.1976	x		x CDAI 70		7,4	4,4	107,1	28,33
35	m	26.01.1967		x	x CAI 2		0,6	5,4	61,58	10,85
36	w	09.10.1982	x			x CDAI 468	299	8,0	2180,45	130,15
37	m	26.05.1978	x		x CDAI 80		2,8	8,3	311,5	87,3

Nummer	Geschlecht	Geburtsdatum	Morbus Crohn	Colitis ulcerosa	Remission	Akuter Schub	CRP in mg/l	Leukozyten in Gpt/l	Calprotectin in mg/kg (Calpro AS)	Calprotectin in mg/l (Immun-diagnostik)
38	w	11.06.1959		x		x CAI 5	21,8	6,9	801,7	218,88
39	w	01.03.1965	x			x CDAI 186	47,6	12,7	1247,58	172,48
40	w	27.03.1962		x		x CAI 7	fehlt	6,0	1180,7	258,33
41	w	25.10.1969	x		x CDAI 83,4		7,4	6,1	162,1	50,78
42	m	16.05.1981		x	x CAI 4		5,0	6,1	689,95	190,2
43	w	23.11.1981		x		x CAI 5	6,1	11,1	2099,03	175,83
44	w	15.02.1983	x			x CDAI 141,5	18,1	7,4	607,1	80,05
45	w	08.03.1957		x	x CAI 3		1,8	6,1	135	21,8
46	m	05.10.1954		x	x CAI 0		9,0	5,2	707,23	294,73
47	m	27.01.1961		x		x CAI 5	5,2	12,3	127,78	61,05
48	m	25.11.1951		x		x CAI 6	1,2	10,1	2275,23	209,6
49	m	21.01.1966		x	x CAI 0		6,8	12,3	2135,75	327,95
50	m	28.11.1971		x		x CAI 2	59	6,7	2071,28	117,38
51	m	04.06.1982	x		x CDAI 58,5		2,4	10,9	877,68	128,65
52	m	20.06.1941		x	x CAI 4		28,8	15,6	1988,75	318,35
53	m	18.03.1941		x		x CAI 10	1,7	4,7	968,5	244,58
54	m	23.11.1965	x			x CDAI 272	16,2	8,8	788,4	368,1
55	m	16.06.1940		x	x CAI 3		6,3	6,0	2159,35	108,08

Nummer	Geschlecht	Geburtsdatum	Morbus Crohn	Colitis ulcerosa	Remission	Akuter Schub	CRP in mg/l	Leukozyten in Gpt/l	Calprotectin in mg/kg (Calpro AS)	Calprotectin in mg/l (Immun-diagnostik)
56	m	04.06.1944	x			x CDAI 151	45,4	13,5	283	57
57	m	25.05.1960		x	x CAI 1		fehlt	7,98	130	28,05
58	m	30.01.1960	x		x CDAI 66		3,7	4,5	23,6	5,95
59	w	20.03.1983	x		x CDAI 110		12,8	4,97	1640,25	134
60	m	21.02.1977	x			x CDAI 188	13,5	7,6	664,63	154,8

Tabelle 3: Patientendaten

## 8 Thesen

1. Die Aktivitätsbeurteilung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen setzt sich aus mehreren Untersuchungen zusammen. Dazu gehören die Labordiagnostik, die Sonographie, die radiologischen Untersuchungen und weiterhin, als Goldstandard, die Endoskopie mit Histologie. Die Koloskopie ist aber eine invasive und für den Patienten als belastend empfundene Untersuchung.
2. Wünschenswert für die Aktivitätsbeurteilung wären nichtinvasive, weniger kostspielige, zeitsparende Diagnostikmethoden. Hierzu gehören fäkale Leukozytenmarker wie das Calprotectin.
3. Calprotectin wird mittels ELISA im Stuhl gemessen. Der Stuhl kann eine Woche bei Raumtemperatur gelagert werden, Calprotectin ist folglich sehr stabil.
4. Zwischen fäkalem Calprotectin und endoskopisch bestimmter entzündlicher Aktivität des Darmes konnte ein Zusammenhang nachgewiesen werden. Die Bestimmung eignet sich zur Abgrenzung von funktionellen Darmstörungen, wie dem Reizdarmsyndrom. Fäkales Calprotectin ist nicht in der Lage zwischen den verschiedenen Ursachen einer intestinalen Entzündung zu unterscheiden und somit nicht spezifisch für das Erkennen einer chronischen entzündlichen Darmerkrankung.
5. Die vorliegende Arbeit sollte prüfen, ob sich die Bestimmung von fäkalem Calprotectin zur Unterscheidung von aktiver und inaktiver chronisch entzündlicher Darmerkrankung eignet. Als Vergleichsparameter wurden die klinischen Aktivitätsindices CAI und CDAI eingesetzt. Zusätzlich sollte ein Vergleich zu den Entzündungsparametern CRP und Leukozyten vorgenommen werden.
6. Untersucht wurden 60 Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. 28 Patienten hatten eine Colitis ulcerosa und 32 Patienten einen Morbus Crohn.
7. Die Krankheitsaktivität wurde durch die Aktivitätsindices CAI und CDAI festgelegt. Die aktive Colitis ulcerosa hat einen CAI  $\geq 5$ , die inaktive einen CAI  $< 5$ . Der aktive Morbus Crohn hat einen CDAI  $\geq 150$ , der inaktive einen CDAI  $< 150$ . 13 Patienten

mit Colitis ulcerosa waren klinisch aktiv und 15 klinisch inaktiv. Von den Morbus Crohn Patienten waren 11 Patienten klinisch aktiv und 21 Patienten klinisch inaktiv.

8. Zum Einsatz kamen 2 Testsysteme für Calprotectin mit einem monoklonalen (Immundiagnostik-Test) bzw. einem polyklonalen Antikörper (Calpro-Test).  
Eine signifikante Korrelation konnte für fäkales Calprotectin zwischen den beiden Testsystemen bei Colitis ulcerosa und Morbus Crohn ermittelt werden (Colitis ulcerosa:  $r=0,768$ ,  $p<0,001$ ; Morbus Crohn:  $r=0,808$ ,  $p<0,001$ ).
9. Die klinischen Aktivitätsindices CAI und CDAI korrelierten nicht mit der Calprotectinausscheidung. Einzige Ausnahme bildete das polyklonale Testsystem (Calpro-Test:  $r=0,497$ ,  $p=0,005$ ) für den Morbus Crohn.
10. Ursachen für die mangelnde Korrelation könnten sein:
  - Die klinischen Aktivitätsindices spiegeln eher den subjektiven Gesundheitszustand des Patienten und seine Lebensqualität wieder, als den Grad der intestinalen Entzündung.
  - Eine therapeutische Steroidbehandlung kann die subjektiven Parameter der Aktivitätsindices positiv so beeinflussen, dass falsch niedrige Aktivitätsindices ermittelt werden.
  - Latente subklinische Entzündungen der Darmschleimhaut können bei klinischer Remission persistieren und verantwortlich sein für erhöhte Calprotectinkonzentrationen.
11. CRP und fäkales Calprotectin korrelierten nur bei den inaktiven Erkrankungen von Morbus Crohn (Calpro-Test:  $r=0,449$ ,  $p=0,015$ ; Immundiagnostik-Test:  $r=0,536$ ,  $p=0,002$ ) bzw. Colitis ulcerosa (Calpro-Test:  $r=0,433$ ,  $p=0,031$ ; Immundiagnostik-Test:  $r=0,548$ ,  $p=0,004$ ). Bei aktiver Erkrankung fand sich keine Korrelation.
12. Keine signifikante Korrelation ließ sich in dieser Arbeit zwischen dem fäkalen Calprotectin und den Leukozyten im Blut bei Colitis ulcerosa (Calpro-Test:  $r=0,170$ ,  $p=0,396$ ; Immundiagnostik-Test:  $r=0,025$ ,  $p=0,898$ ) und Morbus Crohn (Calpro-Test:  $r=-0,034$ ,  $p=0,858$ ; Immundiagnostik-Test:  $r=0,144$ ,  $p=0,431$ ) feststellen.

13. Bei aktiven Erkrankungen von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa waren die gemessenen Calprotectinausscheidungen höher als bei inaktiven Erkrankungen. Signifikante Unterschiede konnten aber nur beim Morbus Crohn (Calpro-Test:  $p=0,005$ ; Immundiagnostik-Test:  $p=0,002$ ) errechnet werden.
14. Die Berechnung der Sensitivität (Colitis ulcerosa: Calpro-Test: 100%; Immundiagnostik-Test: 92,3%; Morbus Crohn: Calpro-Test: 100%; Immundiagnostik-Test: 100%) und Spezifität (Colitis ulcerosa: Calpro-Test: 0%, Immundiagnostik-Test: 13,3%; Morbus Crohn: Calpro-Test: 11,8%, Immundiagnostik-Test: 16,1%) bzw. des positiven oder negativen Vorhersagewertes für die Unterscheidung von aktiver und inaktiver Erkrankung zeigen, dass sich Calprotectin dafür nicht eignet. Diese Aussage trifft mit den gleichen Einschränkungen wie in These 10 zu.
15. Eine künftige Fragestellung könnte sein, ob die Calprotectinausscheidung mit der histologischen Aktivität besser korreliert als mit klinischen Indices oder Entzündungsparametern des Blutes. Dies wäre für die Beantwortung der Frage, ob Endoskopien umgangen werden können, von großer Bedeutung.