



**Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik
im Dr. von Haunerschen Kinderspital
Ludwig-Maximilians-Universität München**

Direktor: Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt

**Stellenwert von fäkalem Calprotectin bei Kindern
über 3 Jahren mit chronisch-entzündlicher
Darmerkrankung**

**Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München**

vorgelegt von
Josivânia Maria Pereira da Silva
aus
Sapé (Brasilien)
2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Sibylle Koletzko

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Gerd Sauter
Prof. Dr. med. Natascha Nüssler

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Christine Prell

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR

Tag der mündlichen Prüfung: 13. November 2008

für meine Tochter

Rosa-Maria †

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einleitung	8
1.1. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED)	8
1.1.1. <i>Epidemiologie</i>	8
1.1.2. <i>Pathogenese</i>	10
1.1.3. <i>Klinik</i>	11
1.1.4. <i>Diagnostik</i>	11
1.1.5. <i>Therapie</i>	13
1.1.6. <i>Psychosomatik</i>	15
1.2. Calprotectin	16
1.3. Fragestellung	18
2. Patienten und Methoden	19
2.1. Patienten der repräsentativen Querschnittanalyse	19
2.2. Patienten der longitudinalen Untersuchung	19
2.3. Methode	20
2.3.1. <i>Aktivitätsindices</i>	20
2.3.2. <i>Laborparameter</i>	20
2.3.3. <i>Calprotectinmessung</i>	21
2.3.4. <i>Nachmessung vom fäkalen Calprotectin</i>	22
2.4. Material	24
2.4.1. <i>Calprotectin Test (Firma NovaTec, Dietzenbach/DE)</i>	24
2.4.2. <i>Hilfsmittel und Laborgeräte</i>	24
2.4.3. <i>Statistische Auswertung</i>	25
3. Ergebnisse	26
3.2. Repräsentative Queranalyse	26
3.2.1. <i>Diagnose, Geschlecht und Alter</i>	26
3.2.2. <i>Krankheitsaktivitätsindex</i>	27
3.2.3. <i>Calprotectin</i>	29
3.2.4. <i>Korrelation zwischen FC und Aktivitätsindices</i>	30
3.2.5. <i>Korrelation zwischen FC und Laborparametern</i>	32
3.2.5. <i>Korrelation zwischen FC und Laborparametern</i>	32
3.3. Longitudinale Untersuchung	34
3.3.1. <i>Untersuchungsverteilung nach Krankheitsaktivität</i>	34
3.3.2. <i>Calprotectinwerte</i>	34
3.3.3. <i>ROC-Kurven für fäkales Calprotectin</i>	35
3.3.3. <i>ROC-Kurven für fäkales Calprotectin</i>	36
4. Diskussion	37
4.1. Patienten	37

4.2. Repräsentative Queranalyse	38
4.2.1. <i>Calprotectin</i>	38
4.2.2. <i>Korrelation zwischen FC und Aktivitätsindices</i>	38
4.2.3. <i>Korrelation zwischen FC und Laborparametern</i>	40
4.3. Longitudinale Untersuchung	42
4.3.1. <i>Untersuchungsverteilung nach Krankheitsaktivität</i>	42
4.3.2. <i>Calprotectinwerte</i>	42
4.3.3. <i>ROC Kurven</i>	43
4.4. Ausblick	44
5. Zusammenfassung	46
6. Literaturverzeichnis	49
7. Anhang	58
7.1 Referenzwerte	58
7.2 Aktivitätsindices	59
7.2.1. <i>Colitis ulcerosa-Aktivitätsindex (UCAI)</i>	59
7.2.2. <i>Morbus Crohn-Aktivitätsindex (PCDAI)</i>	60
7.2.2. <i>CED-Aktivitätsindex (mLSS)</i>	62
7.3. Verzeichnis der Tabelle und Diagramme	63
7.4. Abbildungsverzeichnis	64
7.5. Danksagung	65
7.6. Eidesstattliche Erklärung	66
Curriculum vitae	67

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
ANCA	antineutrophile zytoplasmatische Antikörper
ASCA	anti-Saccharomyces-cerevisiae Antikörper
AUC	Area under the curve
BSG	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
CDAI	Crohn's Disease Activity Index
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CI	Colitis indeterminata
CRP	C-reaktives Protein
CU	Colitis ulcerosa
dl	Deziliter
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FC	Fäkales Calprotectin
g	Gramm
h	Stunde
kDa	kilo Dalton
KI	Konfidenzintervall
l	Liter
LSS	Lloyd-Still Score
MC	Morbus Crohn
mg	Milligramm
MIF	Migrationsinhibitionsfaktor

ml	Milliliter
mLSS	modifizierte Lloyd-Still Score
mm	Millimeter
MRT	Magnetresonanztomographie
nm	Nanometer
NOD2-Gen	Nucleotid Oligodimerisation Domain
NPW	negativer prädiktiver Wert
PCDAI	Pediatric Crohn's Disease Index
PPW	positiver prädiktiver Wert
ROC	Receiver-Operating-Characteristics
rpm	Revolutions per Minute
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
UCAI	Ulcerative Colitis Activity Index

1. Einleitung

1.1. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED)

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen lassen sich in drei Gruppen einteilen: Colitis ulcerosa (CU), Morbus Crohn (MC) und Colitis indeterminata (CI). In den letzten Jahrzehnten ist es zu einer zunehmenden Inzidenz von CED im Kindesalter gekommen [4;19;33;53;83]. Die Colitis ulcerosa ist durch eine chronische Schleimhautentzündung charakterisiert und auf das Kolon und Rektum beschränkt. Der Entzündungsprozess beginnt in den meisten Fällen im Rektum und breitet sich kontinuierlich nach proximal im Kolon aus. Beim Morbus Crohn handelt es sich um eine transmurale Inflammation, die den gesamten Gastrointestinaltrakt betreffen kann. Der typische Befall vom Morbus Crohn schließt eine segmentale Beteiligung des Magen-Darm-Trakts ein. Zusätzlich sind ein Reihe von extraintestinalen Komplikationen möglich. Bei Colitis indeterminata handelt es sich um Fälle, die weder dem Morbus Crohn noch der Colitis ulcerosa eindeutig zugeordnet werden können. Im Verlauf dieser Krankheit ist eine Zuordnung häufig möglich [5;55;58].

1.1.1. Epidemiologie

CED kommen überwiegend in entwickelten Ländern vor, das heißt die CED-Inzidenz sinkt weltweit betrachtet von Nord nach Süd. Man spricht daher von einem Nord-Süd-Gefälle [54;73]. Die höchsten Krankheitsraten findet man in Nordamerika, Nord- und Westeuropa und die niedrigsten in Afrika, Südamerika und Asien [66]. Die globale Inzidenz liegt zwischen $0,5 - 24,5/10^5$ Bewohner für die Colitis ulcerosa und $0,1 - 16/10^5$ Bewohner für den Morbus Crohn. Die globale Prävalenz von CED beträgt ca. $396/10^5$ Bewohner [62]. In den 70er und 80er Jahren wurde vermutet, dass das „Nord-Süd-Gefälle“ von CED auch in Europa existiert [7;62]. In einer europäischen CED-Studie wurde eine unterschiedliche Krankheitsrate in Nord- und Süd-Europa gefunden. Mit der Teilnahme von südlichen und nördlichen europäischen Kliniken an diese Studie und nach einem

standardisierten Protokoll wurde zwischen Oktober 1991 und September 1993 eine Inzidenz von $10,4/10^5$ Bewohner (nördliche Kliniken: $11,8/10^5$; südliche Kliniken: $8,7/10^5$) bei der Colitis ulcerosa und $5,6/10^5$ Bewohner ($7,0/10^5$ vs. $3,9/10^5$) beim Morbus Crohn bestimmt. In dieser Arbeit war der Inzidenzunterschied von CED zwischen Nord-Europa und Süd-Europa kleiner als in den vorherigen Studien. Dabei wurde unterstellt, dass die Krankheitsrate in Süd-Europa stieg während sie in Nord-Europa konstant blieb [95].

In einigen europäischen Ländern wurde eine kontinuierlich zunehmende CED-Inzidenz beobachtet [62]. Zum Beispiel stieg in Dänemark die Inzidenz jeweils von $4,1/10^5$ für den Morbus Crohn und $9,2/10^5$ Bewohner für die Colitis ulcerosa in den 80er Jahren auf $8,6/10^5$ und $13,4/10^5$ Bewohner zwischen den Jahren 2003 und 2005 [72]. Ähnliches konnte in Schweden beobachtet werden, wo sich die Morbus Crohn-Inzidenz von $4,9/10^5$ (1985 – 1989) auf $8,3/10^5$ Bewohner (1990 – 2001) erhöhte [64].

Trotz großer Schwierigkeiten wurden mehrere epidemiologischen CED-Studien im pädiatrischen Bereich durchgeführt. In den letzten zehn Jahren ist zu beobachten, dass die CED (insbesondere Morbus Crohn) unter Kindern häufiger wird und mehr jüngere Kinder betroffen sind. Bei ca. 20% der CED-Patienten wird die Diagnose im Kindesalter gestellt. Anhand unterschiedlicher Methoden bestimmten europäische und amerikanische Forschungsgruppen die pädiatrische Krankheitsrate bei den CED [83]. Nach Lakatos 2006 und Ravikumara 2006 können die Ergebnisse wie folgt zusammengefasst werden (Tab. 1).

Tabelle 1: neueste Inzidenz-Daten bei Kindern mit CED [62;83]

Land	Zeitraum der Studie	Inzidenz (neue Fälle/ 10^5 /Jahr)		
		CED	CU	MC
Nord-Frankreich	1997 - 1999		0,8	2,6
Großbritannien und Nordirland	1998 - 1999	5,2	1,5	3,0
Schweden	1999 - 2001	10,5	1,8	8,4
USA	2000 - 2001		2,1	4,5

Nach Angaben des Statistischen Jahrbuchs 1999 leben 37.000 Kinder und Jugendliche mit CED in Deutschland [96]. In einer Fünfjahresanalyse (in den Jahren 2000 bis 2004) des sächsischen Registers für Kinder mit CED wurden neue epidemiologische Daten erhoben. Die Rate der Neuerkrankungen liegt in 27 Kinderkliniken bei $7,6/10^5$ Kinder (Morbus Crohn 4,0 und Colitis ulcerosa 9,1) mit einem Altersgipfel von 14 Jahre, statt wie bisher beschrieben zwischen 14 und 17 Jahren [34].

1.1.2. Pathogenese

Die Ätiologie von CED entsteht vermutlich aus einer Interaktion zwischen genetischer Prädisposition, immunologischer Dysregulation, mukosaler Schrankenstörung, Umwelteinflüsse und mikrobielle Darmflora [89]. Durch Familien- und Zwillingsstudien wurde die entscheidende Bedeutung der genetischen Prädisposition nachgewiesen. Ungefähr einer von 8 - 10 CED-Patienten berichtet von einer positiven Familienanamnese. Zudem tragen Verwandte 1.Grades und Zwillinge (bei Morbus Crohn) ein erhöhtes Risiko CED zu entwickeln [92;93]. Weiterhin verstärkte die Identifizierung der Mutation im NOD2-Gen (Nucleotid Oligodimerisation Domain) auf dem Chromosom 16 die Hypothese von einem genetischen Polymorphismus bei Patienten mit Morbus Crohn [24;36;47;80]. Diese Mutation hat Einfluss auf die Barriereigenschaften der intestinalen Mukosa [48;104]. Weitere CED-Suszeptibilitätsregionen wurden auf den Chromosomen 16, 12, 6, 14, 5 und 19 gefunden [9;20;43].

Die Mukosahömeostase besteht aus einem Gleichgewicht zwischen entzündungsfördernden und entzündungshemmenden Zytokinen. Bei CED ist dieses Gleichgewicht gestört und es kommt zu einer chronischen fehlgeleiteten Aktivierung von Entzündungsprozessen, die beim Morbus Crohn mehr durch TH1-Zytokine (Interleukin 12, Interferon γ) und bei der Colitis ulcerosa mehr durch TH2-Zytokine (Interleukine 5 und 13) vermittelt würden. Als Folge dieser Fehlregulation besteht eine Reduktion der normalen Darmflora bzw. eine Translokation von bakteriellen Antigenen. Verschiedene Viren und Bakterien wurden in der Ätiologie vom Morbus Crohn angeschuldigt, jedoch nie bestätigt. Hierzu zählen *Mycobacterium paratuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*,

Escherichia coli und das Masernvirus [43;61]. Umweltfaktoren wie Rauchen beeinflussen die Pathogenese der CED. Rauchen ist mit einem erhöhten Risiko für Morbus Crohn verbunden. Außerdem scheint bei Rauchern das Risiko für Komplikationen im Verlauf dieser Krankheit erhöht zu sein [21;37;69;71].

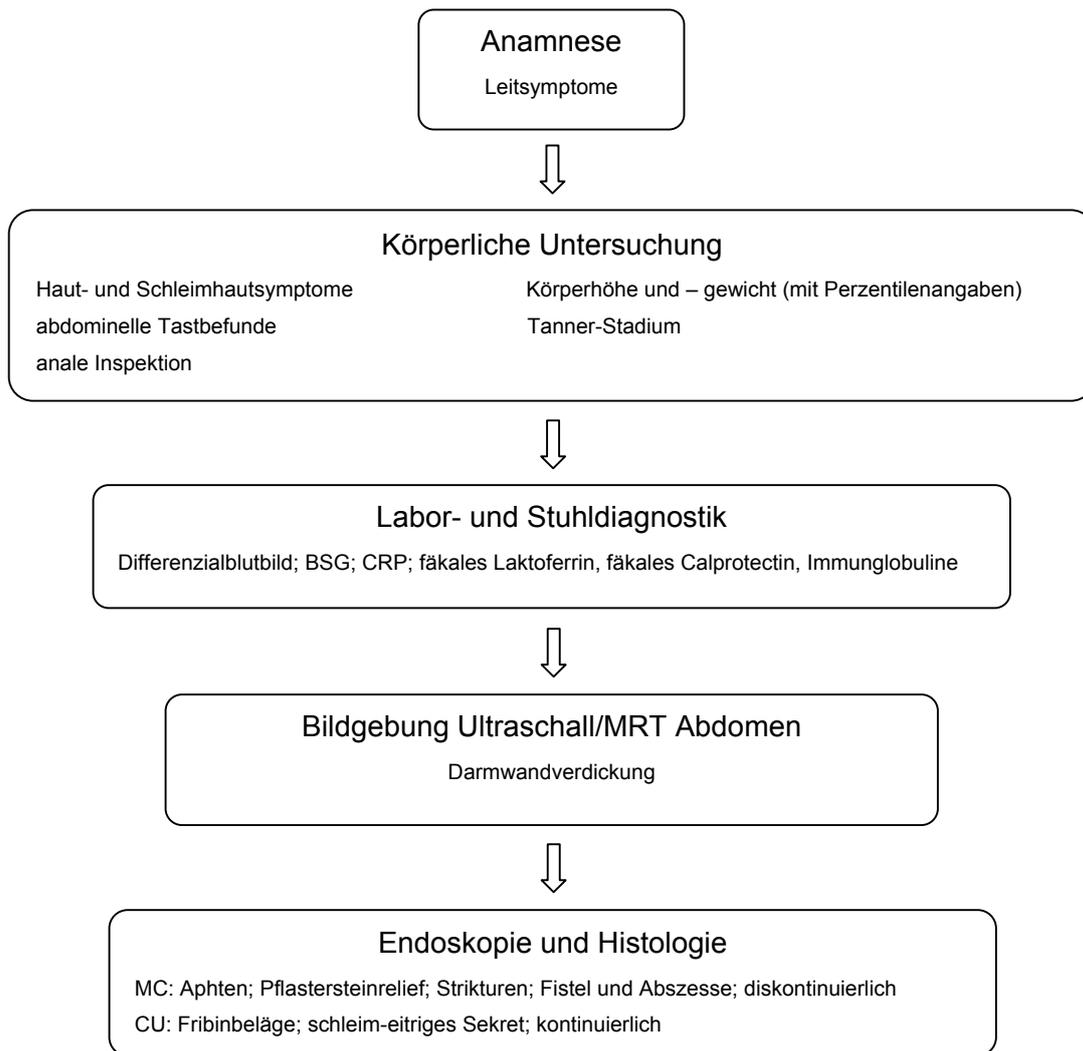
1.1.3. Klinik

Der klinische Verlauf von CED ist durch unterschiedlich lange Phasen mit akuter Krankheitsaktivität (= Schub) im Wechsel mit klinischer Beschwerdefreiheit (= Remission) gekennzeichnet [75;100]. Zu den typischen Symptomen bei Morbus Crohn gehören Bauchschmerzen, Gewichtsstillstand oder -verlust, chronische Durchfälle, perianale Veränderungen (40%) und verzögerte Pubertät (65%). Bei Colitis ulcerosa sind Bauchschmerzen (Tenesmen) und blutig-schleimige Diarrhöe die Leitsymptome.

Die extraintestinalen Manifestationen wie Arthritis, Augenentzündungen oder Leberbeteiligung werden häufiger bei Morbus Crohn-Patienten (> 40%) als Colitis ulcerosa-Patienten (9%) beobachtet. Während beim Morbus Crohn Fistel, Abszessbildung und Stenosen häufig auftreten können, sind ein erhöhtes Risiko für Darmkarzinom und ein toxisches Megakolon bei der Colitis ulcerosa typische Komplikationen [74].

1.1.4. Diagnostik

Die Diagnose setzt sich aus einem Mosaik von Anamnese, körperlicher Untersuchung, Labor- und Stuhldiagnostik, bildgebenden Verfahren und Endoskopie mit Biopsien zusammen (Diagramm1).

Diagramm 1: Diagnostisches Flussdiagramm von CED [55]

Bezüglich der Laborparameter sind Unterscheidungen zwischen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa zu beachten. Bei Morbus Crohn zeigen sich BSG und CRP meist deutlich erhöht, während dies bei Colitis ulcerosa-Patienten geringer ausgeprägt ist. Außerdem wird pANCA in etwa 70% der Colitis ulcerosa-Fälle nachgewiesen, ASCA dagegen in mehr als 50% der Morbus Crohn-Fälle [27;42;84].

CED-Patienten sollten in regelmäßigen Abständen in gastroenterologischen ausgerichteten Zentren gesehen werden, um die Krankheitsaktivität einzuschätzen. Zur Einschätzung vom Schweregrad der Krankheitsaktivität wurden verschiedene Aktivitätsindizes erstellt. Lloyd-Still und Green [65]

entwickelten 1979 ein Auswertungssystem basiert auf klinischen Symptomen, Laborparameter und Röntgenaufnahmen. Die radiologischen Aufnahmen wurden später im Lloyd-Still Index (LSS) nicht mehr berücksichtigt bzw. ausgeschlossen und daraus entstand der modifizierte Lloyd-Still Index (mLSS) [12]. Weitere genutzten Aktivitätsindizes sind der Crohn's Disease Activity Index (CDAI), der durch die Angabe der Patienten, Anamnese und Laborparameter errechnet wird [98] und der Ulcerative colitis Activity Index (UCAI), für dessen Berechnung nur klinische Daten verwendet werden [85]. Für die pädiatrischen Patienten legte Hyams *et al.* 1991 [49] den Pediatric Crohn's Disease Index (PCDAI) fest. Für diesen Aktivitätsindex müssen die subjektiven Informationen der Patienten, die Laborbewertungen sowie die Wachstumsgeschwindigkeit herangezogen werden.

1.1.5. Therapie

Die Therapieempfehlungen von CED-Patienten werden durch die klinischen Befunde und Laboruntersuchungen bestimmt. Das Ziel der Therapie ist zuerst eine Remissionsinduktion, dann eine Remissionserhaltung und letztendlich eine Heilung der Darmschleimhaut [81]. Bei Kindern ist zusätzlich eine ungestörte altersgemäße Entwicklung, insbesondere des Gewichts und der Größe, anzustreben [44]. Dafür werden Pharmakotherapie, Ernährungstherapie, psychologische und psychotherapeutische Betreuung und chirurgische Interventionen eingesetzt [90].

Bei der medikamentösen Therapiemaßnahme werden folgenden Medikamente (einzeln oder in unterschiedlichen Kombinationen) angewendet [45;70]:

- 5-Aminosalizylsäure (5-ASA)
- Salazosulfapyridin (SASP)
- Glukokortikosteroide (GKS)
- Metronidazol und andere Antibiotika
- Azathioprin/6-Mercaptopurin (6-MP)
- Methotrexat (MTX)
- TNF- α -Antikörper

Die Pharmakotherapie von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa wird je nach Krankheitsaktivität und Lokalisation der inflammatorischen Läsion eingesetzt (Tab. 2).

Tabelle 2: Erläuterung der medikamentösen Möglichkeiten bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa [46;58]

	Morbus Crohn	Colitis ulcerosa
fulminanter Schub	Prednisolon i.v. bei Versagen: Cyclosporin A, Infliximab + Azathioprin	Prednisolon i.v. bei Versagen: Cyclosporin A
mittlere bis hohe Aktivität	Prednisolon i.v. bei Versagen: Cyclosporin A Ileocoecaler Befall: Budesonid oral Ernährungstherapie	subtotale oder totale Kolitis: Prednisolon i.v. bei Versagen: Cyclosporin A distaler Lokalisation: 5-ASA oral + topisch
geringe bis mittlere Aktivität	Linkseitiges Kolon: 5-ASA oral / topisch + Budesonid topisch ausgedehnter Befall: 5-ASA oral + Prednisolon oral bei Versagen: Prednisolon oral, Azathioprin Ernährungstherapie	subtotale oder totale Kolitis: 5-ASA distaler Lokalisation: 5-ASA oral + topisch
chronische Aktivität	Prednisolon + Azathioprin oder 6-MP bei Azathioprinunverträglichkeit: Prednisolon + Infliximab oder Methotrexat	Prednisolon + Azathioprin oder 6- MP
Remission	keine Therapie	5-ASA

CED ist mit zahlreichen nutritiven Defiziten verbunden, die Folge der Krankheit und auch der medikamentösen Therapie sein können. Bei Kindern (besonders mit Morbus Crohn) gehen diese Defizite mit Wachstumsretardierung und verzögerter Pubertät einher [40;57;108]. Die Ernährungstherapie hat vor allem eine Verminderung der Entzündungsaktivität im Darm sowie einen Ausgleich nutritiver Defizite und eine Bereitstellung genügender Nährstoffe zum Ziel [77]. In Form von Elementardiät, nährstoffdefinierte Diät und Oligopeptiddiät kann eine Ernährungstherapie eingesetzt werden [53;58].

Bei Morbus Crohn-Patienten ist der chirurgische Ansatz nicht kurativ und sollte nur bei akuten Komplikationen (wie Abszesse, Fistel und Stenosen) und

Therapieresistenz indiziert werden. Im Gegensatz zu Morbus Crohn besteht bei Colitis ulcerosa die Möglichkeit durch eine Operation eine Heilung zu erzielen. Die chirurgischen Indikationen für Colitis ulcerosa-Patienten sind Karzinomprophylaxe und Therapieresistenz (gehäuft bei Kindern) [58].

1.1.6. Psychosomatik

Die psychosozialen Aspekte dieser chronischen Erkrankung sind nicht zu unterschätzen. Mit dem Anstieg der CED-Erkrankungshäufigkeit unter Kindern wird diese Problematik noch relevanter. Unter anderem sind schulische Probleme, soziale Isolierung und Verhaltensstörungen (z.B. Depression) häufige Probleme bei Kindern und Jugendlichen [10;68]. Aufgrund dessen sollen diese Patienten durch eine enge Zusammenarbeit von Familie, Ärzten, Sozialpädagogen und Psychologen betreut werden [38;56].

1.2. Calprotectin

Zum ersten Mal wurde das Calprotectin 1980 von Fagerhol *et al.* [32] beschrieben und als L1 Protein benannt. Dasselbe Protein wurde während der 80er Jahre von Odink *et al.* [78] als MRP 8 und MRP 14 (Migrationsinhibitionsfaktor - Protein (MIF)) und von Wilkinson *et al.* [107] als Calgranulin A und B bezeichnet.

Durch die Identifizierung der Aminosäuresequenz und DNA-Analyse bewiesen Andersson *et al.* [2] die Identität dieser Proteine. Als die kalziumbindende Fähigkeit dokumentiert wurde, wurde die Bezeichnung Calprotectin vorgeschlagen [97]. Später wurden andere Proteine, die die Fähigkeit mit Kalzium zu binden haben, als S-100 Proteine gruppiert [52].

Calprotectin ist ein 36 kDa Protein und besteht aus einer leichten Polypeptid-Kette und zwei schweren Polypeptid-Ketten (je 14 kDa), die nicht-kovalent gebunden sind [26;31;52]. Es stellt einen Großteil der zytosolischen Proteine in den neutrophilen Granulozyten und ist in weniger hohen Konzentrationen auch in Monozyten und Makrophagen vorhanden [13]. Seine antimikrobielle Aktivität wirkt gegen Bakterien und Pilze und ist im Bezug auf die minimale hemmende Konzentration mit mehreren Antibiotika vergleichbar [87]. Außerdem sind Chemotaxis, Stimulation von Antikörperproduktion und Neutrophilen-immobilisierungsfaktor andere Funktionen von Calprotectin, die inflammatorischen Reaktionen regulieren können [52]. Wegen der Fähigkeit sich mit Zink zu verbinden, kann Calprotectin sowohl entzündliche Prozesse als auch Krebszellenproliferation inhibieren [1;51].

Calprotectin ist in Zellen, in Gewebe und in Flüssigkeiten des gesamten Körpers vorzufinden [52;101]. Sein Plasmaspiegel kann bei einer Entzündung um das 5- bis 40-fache steigen, allerdings ist es als Entzündungsmarker unspezifisch. Bei Entzündungen im Darm ist das Calprotectin auch im Stuhl zu finden und kann um das 6-fache größer als im Plasma sein [60]. Fäkales Calprotectin ist bei Raumtemperatur über 7 Tage stabil, somit kann die Stuhlprobe zu Hause gewonnen und dann versandt werden. Mit Hilfe eines ELISA-Tests (enzyme-linked immunosorbent assay) kann die Calprotectin-Konzentration bestimmt werden [13;102]. Erhöhte Werte konnten bei Patienten mit entzündlichen oder malignen Veränderungen im Gastrointestinaltrakt gefunden werden. Hierzu zählen kolonrektales Karzinom (KRK) [13;17;82;99], CED [8;22;106], infektiöse

Gastroenteritis (GE) [16], allergische Kolitis [16], nekrotisierende Enterocolitis (NEC) [18] und cystische Fibrose (CF) [109]. Bei CED wird die erhöhte fäkale Calprotectinkonzentration durch den in der Darmwand erhöhten Leukozytenumsatz bzw. durch die verstärkte neutrophile Migration ins Darm-Lumen erklärt [30].

In der letzten Zeit trat Calprotectin im Stuhl (FC) als ein möglicher Marker für Darmentzündungen mit potenzieller klinischer Anwendbarkeit bei CED und anderen Pathologien des Magen-Darm-Traktes immer weiter in den Vordergrund [28;41]. Im Bezug auf die CED-Diagnose scheint FC präziser als das C-reaktive Protein (CRP), die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BSG), der anti-Saccharomyces-cerevisiae Antikörper (ASCA) und der antineutrophile zytoplasmatische Antikörper (ANCA) zu sein. Allerdings ist FC zur Unterscheidung zwischen CED und Darmkrebs nicht geeignet [106]. Bei Erwachsenen und Kindern mit CED korreliert FC gut mit endoskopischen und histologischen Krankheitsaktivität [12;86]. Von Roseth *et al.* [88] wurde eine signifikante Korrelation zwischen FC und abdominaler Szintigraphie mit Indium-111 bestätigt. Bunn *et al.* [12] fanden bei Kindern heraus, dass die FC-Konzentration auch wie der Lloyd-Still Index die Entzündungsaktivität bei CED sehr gut anzeigen kann. Ähnlich verhält es sich auch mit dem pädiatrischen Morbus Crohn Aktivitätsindex (PCDAI) [12;25].

Bei Kindern mit CED unter Kortikoidtherapie war zu beobachten, dass die FC Niveaus parallel mit der klinischen Besserung sank. Allerdings erreichte FC selten den normalen Bereich, was für eine anhaltende Mukosaentzündung trotz klinischer Remission sprechen kann [59].

Letztendlich fanden Costa *et al.* [23] in einer Langzeituntersuchung bei Erwachsenen mit CED heraus, dass FC ein stärkerer prädiktiver Parameter für Rückfälle bei Colitis ulcerosa als bei Morbus Crohn ist.

Bei CED im Kindesalter ist der Aktivitätsstatus besonders schwierig einzuschätzen. Da die Kinder die Ernsthaftigkeit ihrer Symptome nicht immer verbal ausdrücken können, wird die Berechnung der Aktivitätsindizes negativ beeinflusst. Mit invasiven Untersuchungsmethoden sollten pädiatrischen Patienten sparsam umgegangen werden. Aus diesem Grund ist ein nicht-invasiver Marker für Kinder mit CED besonders wünschenswert, um die Entzündungsaktivität spezifischer und schmerzloser beurteilen zu können und damit frühzeitig die

therapeutischen Maßnahmen umzustellen. Calprotectin ist stabil im Stuhl, leicht zu messen und unmittelbar mit einem Entzündungsprozess verbunden. Auf Grund dieser Eigenschaften kann FC vor allem bei Kindern mit CED routinemäßig als ein Entzündungsmarker verwendet werden, besonders zur Früherkennung eines Rückfalles.

1.3. Fragestellung

Folgende Fragen sollen mit dieser Arbeit beantwortet werden:

1. Korreliert der fäkale Calprotectin-Wert mit dem modifiziertem Lloyd-Still Index, dem PCDAI und dem UCAI?
2. Gibt es eine Korrelation zwischen FC und den typischerweise ermittelten Laborparametern bei Kindern mit Colitis ulcerosa und Morbus Crohn (BSG, CRP, Albumin, Leukozyten und Hämoglobin)?
3. Finden sich erhöhte FC-Werte auch bei klinischer Remission, entsprechend den berechneten Aktivitätsindices, bzw. normale FC-Werte bei leichter, mittelschwerer oder schwerer Krankheitsaktivität?

2. Patienten und Methoden

2.1. Patienten der repräsentativen Querschnittanalyse

Eingeschlossen in dieser Studie wurden alle Kinder ≥ 3 Jahren mit Colitis ulcerosa und Morbus Crohn aus der gastroenterologischen Ambulanz des Dr. von Haunerschen Kinderspitals München, bei denen zwischen März 2003 und Mai 2005 alle Daten zur Berechnung der Aktivitätsindices (AI) und zeitgleich FC gemessen wurden. Insgesamt wurden 366 Untersuchungen von 104 Kindern (63 männlich und 41 weiblich, 36 Colitis ulcerosa und 68 Morbus Crohn) aufgenommen. Die Diagnose Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn war bei allen Patienten endoskopisch und histologisch gesichert worden.

Für eine repräsentative Querschnittuntersuchung wurde jeweils nur die erste Untersuchung der 104 Kinder, bei der der vollständigen Datensatz (Leukozyten, Hämoglobin, Albumin, CRP und BSG) vorhanden war, ausgewertet.

2.2. Patienten der longitudinalen Untersuchung

Für den longitudinalen Verlauf wurden von 27 Kindern (19 Morbus Crohn / 8 Colitis ulcerosa), die zu Beginn des Beobachtungszeitraumes in Remission (PCDAI ≤ 10 bzw. UCAI ≤ 3) waren und über mindestens ein Jahr betreut wurden, 151 Calprotectinmessungen aufgenommen. Während eines Beobachtungszeitraumes von 12 bis 22 Monaten waren diese Patienten durch regelmäßige klinische Evaluation und Blutentnahmen untersucht worden. Bei jeder Vorstellung hatten sie eine Stuhlprobe abgegeben. Die 151 Calprotectinmessungen wurden nach Krankheitsaktivität (Remission oder Schub), die das Kind zu dem Zeitpunkt der Untersuchung aufwies, zugeordnet. Remission wurde als klinische Beschwerdefreiheit mit negativem AI (PCDAI ≤ 10 bzw. UCAI ≤ 3) definiert [50;85]. Zugleich wurde ein Schub als Auftreten oder Verschlechterung der Symptome festgesetzt, begleitend mit einer Steigerung von PCDAI auf $\geq 12,5$ bzw. UCAI auf ≥ 4 und der Veränderung der Therapie [23].

2.3. Methode

2.3.1. Aktivitätsindices

Die Einschätzung der Krankheitsaktivität wurde bei Kindern mit Colitis ulcerosa in Anlehnung an den UCAI [85] und den mLSS [12] bzw. bei Kindern mit Morbus Crohn an den PCDAI [49] und mLSS beurteilt (Anhang 2 bis 4). Hierbei wurde die Klassifizierung der Krankheitsaktivität gemäß den Indexwerten durchgeführt (Tab. 3 und 4) [12;49;85].

Tabelle 3: Klassifikation der Krankheitsaktivität nach UCAI- und PCDAI-Werten

	PCDAI	UCAI
Remission	≤ 10	≤ 3
Schub	≥12,5	≥ 4

Tabelle 4: Klassifikation der Krankheitsaktivität nach mLSS-Werten

	mLSS
leicht	> 65
mittelschwer	35 – 65
schwer	< 35

2.3.2. Laborparameter

Die Werte für Leukozyten, Hämoglobin, Albumin, BSG (60 Min) und CRP wurden im Klinischen Labor nach Standardmethoden bestimmt (Normalbereiche im Anhang 1, Tab. 11) [67].

2.3.3. Calprotectinmessung

Die Stuhlproben wurden in dem Zeitraum von März 2003 bis April 2005 gewonnen und bei -20°C tiefgefroren. Sie wurden mit Hilfe einer kommerziellen ELISA-Tests (Calprest, Fa. Eurospital; Calprotectin-Test, Fa. NovaTec) gemessen. Dieser Test basiert auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion zwischen Calprotectin-spezifischen Antigenen und polyklonalen Kaninchen-Antikörpern. Das Calprotectin aus der Stuhlprobe bindet sich mit einem auf der Mikrotiterplatte immobilisierten Antikörper. Zunächst werden ungebundene Komponenten abgewaschen und ein weiterer enzymgekoppelter Antikörper hinzugegeben, mit dem gebundenes Calprotectin durch Immunaффinität reagiert. Durch diese Enzymreaktion entsteht ein farbiges Substrat, das kolorimetrisch bestimmt wird und dessen Stärkegrad im Verhältnis zum Calprotectin-Gehalt im Stuhl steht [29].

Für die Vorbereitung der Calprotectinmessung mussten der Extraktionspuffer, die Waschlösung und der Probenverdünnungspuffer verdünnt werden und die bei -20°C gefrorenen Stuhlproben bei Raumtemperatur aufgetaut werden. Die Reagenzien wurden mit destilliertem Wasser jeweils zu 1:2,5 (90 ml Extraktionspuffer + 135 ml destilliertes Wasser), 1:20 (50 ml Waschlösungskonzentrat + 950 ml destilliertes Wasser) und 1:10 ml (20 ml Probenverdünnungskonzentrat + 180 ml destilliertes Wasser) verdünnt.

Von jeder aufgetauten Probe wurde 40 mg Stuhl abgewogen und in einem Probenröhrchen mit 2,0 ml Extraktionspuffer verdünnt. Die Stuhlproben in den geschlossenen Stuhlröhrchen wurden 30 Sekunden gevortext und weiter auf einem Schüttler über 1000 rpm für 30 Minuten homogenisiert. 1 ml der homogenisierten Stuhlprobenlösung wurde in ein Eppendorfröhrchen gegeben und 20 Minuten bei 14000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Danach wurden 0,5 ml des Überstandes in ein frisches Eppendorfröhrchen pipettiert. Der Überstand kann bei -20°C zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt werden.

2.3.4. Nachmessung vom fäkalen Calprotectin

Für diesen Teil der Arbeit wurde in Fällen, in den das gemessene Maximum außerhalb des oberen Messbereiches lag, eine Verdünnungsreihe hergestellt.

Die 62 Stuhlproben stammen aus dem Zeitraum von März 2003 bis Mai 2005 von 17 Patienten mit Colitis ulcerosa und 45 Patienten mit Morbus Crohn.

Die aufgenommen Überstandsproben wurden langsam bei Raumtemperatur aufgetaut und nach 30 Sekunden Vortexen zu 1:50 (20µl Stuhlprobe + 980µl Probenverdünnungspuffer) mit Verdünnungspuffer verdünnt. Des Weiteren wurden die zu 1:50 verdünnten Stuhlproben wie in Diagramm 2 weiter verdünnt.

Diagramm 2: Erläuterung der Verdünnungsproportion

Verdünnung	Proportion
1:125	⇒ 400 µl 1:50 verdünnte Stuhlprobe + 600 µl Probenverdünnungspuffer
1:250	⇒ 200 µl 1:50 verdünnte Stuhlprobe + 800 µl Probenverdünnungspuffer
1:500	⇒ 100 µl 1:50 verdünnte Stuhlprobe + 900 µl Probenverdünnungspuffer
1:1000	⇒ 50 µl 1:50 verdünnte Stuhlprobe + 950 µl Probenverdünnungspuffer

Anschließend wurden 50 µl der Stuhllösungen, Standards und Kontrolle in die Vertiefungen der ELISA-Mikrotiterplatte pipettiert.

Die ELISA-Platte wurde mit Folie zugedeckt und auf einem Schüttler über 1000 rpm 45 ± 5 Minuten lange bei Raumtemperatur inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wurde die Platte 5 Mal mit 250 ml Waschlösung gewaschen. Nach dem letzten Waschvorgang wurde die Mikrotiterplatte mit Hilfe von Papiertüchern von Restflüssigkeit befreit. In die Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurde 50 µl Enzym-Konjugat-Lösung pipettiert und der Inkubationsprozess wurde wiederholt. Nach der Inkubation wurde der Waschschrift erneut durchgeführt und in jede Vertiefung der Platte wurde 100 µl Enzym-Substrat gegeben. Die mit Alufolie gewickelte ELISA-Platte wurde für 20 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In Spektrophotometer wurde die Extinktion der Mikrotiterplatte bei 405 nm photometrisch gemessen.

Die ermittelten Ergebnisse der zu 1:50, 1:125, 1:250, 1:500 und 1:1000 verdünnten Stuhlproben wurden noch umgerechnet (siehe Diagramm 3). Als Ergebnis erhielt man die Calprotectin-Konzentration in $\mu\text{g/g}$ Stuhl.

Diagramm 3: Umrechnung der Ergebnisse

Verdünnung	Umrechnung
1:50	▶ Ergebnis x 1
1:125	▶ Ergebnis x 2,5
1:250	▶ Ergebnis x 5
1:500	▶ Ergebnis x 10
1:1000	▶ Ergebnis x 20

Die Calprotectin-Werte wurden von 0 bis 50 $\mu\text{g/g}$ als Normalbefund, von 50 bis 100 $\mu\text{g/g}$ als grenzwertig und $>100 \mu\text{g/g}$ als pathologisch eingeteilt [106].

2.4. Material

2.4.1. Calprotectin Test (Firma NovaTec, Dietzenbach/DE)

- Mikrotiterplatte (beschichtet mit spezifischen polyklonalen Calprotectin-Antikörpern)
- Waschlösung
- Extraktionspuffer
- Probenverdünnungspuffer
- Enzym-Konjugat
- Enzym-Substrat
- Calprotectin Standards
- Calprotectin Kontrolle

2.4.2. Hilfsmittel und Laborgeräte

- | | |
|--|--|
| • Destilliertes Wasser | Firma B. Braun, Melsungen/DE |
| • Rührstäbchen | Firma Sarstedt, Nümbrecht/DE |
| • Stuhlröhrchen | Firma Roche Diagnostik, Mannheim/DE |
| • Pipettenspitzen 1000 µl, 100 µl (blau, gelb) | Firma Eppendorf, Wesseling-Berzdorf/DE |
| • Präzisionspipetten (100µl; 200µl; 200 -1000µl) | Firma Eppendorf, Wesseling-Berzdorf/DE |
| • 8 Kanal Pipette Research® pro | Firma Eppendorf, Wesseling-Berzdorf/DE |
| • Vortex | Firma Bender & Hobein, Zürich/CH |
| • Schüttler | Firma GFL, Burgwedel/DE |
| • Gefrierschrank (-20°C) | Firma Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe/DE |
| • Multi-Reagenz-Waschgerät | Firma Dynatech, Virginia/USA |
| • Mikrotiterplatten Reader Dynex MRX | Firma Dynatech, Virginia/USA |
| • Digitalwaage | Firma Sartorius, Göttingen/DE |
| • Zentrifuge Universal 32 | Firma Hettich, Tuttlingen/DE |

2.4.3. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe der Software SPSS 15.0 für Windows (Version 15.0.1, SPSS Inc., Chicago, Illinois/ USA, 2006) durchgeführt.

Da die Stichproben nicht normalverteilt sind, wurden nicht-parametrische Tests verwendet. Der Mann-Whitney-U-Test wurde herangezogen, um die Signifikanz zwischen zwei Gruppen zu prüfen. Bei der Überprüfung der Signifikanz zwischen 3 oder mehreren Gruppe wurde der Kruskal-Wallis-Test angewandt. Als Signifikanzgrenze wurde der p-Wert $\leq 0,05$ angenommen. Die Korrelationen zwischen dem FC und den Laborparametern (Leukozyten, Hämoglobin, Albumin, BSG und CRP) bzw. den Aktivitätsindizes (mLSS, PCDAI und UCAI) wurden durch den Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho festgelegt. Zudem wurde die Korrelationskoeffizienten wie in der nachstehende Tabelle interpretiert (Tab. 5) [103].

Tabelle 5: Interpretation des Korrelationskoeffizienten

$0 < r \leq 0,2$	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

Um einen Überblick über die Sensitivität und Spezifität von FC zu erhalten, wurden ROC-Kurven (Receiver-Operating-Characteristics) erstellt.

3. Ergebnisse

3.2. Repräsentative Queranalyse

3.2.1. Diagnose, Geschlecht und Alter

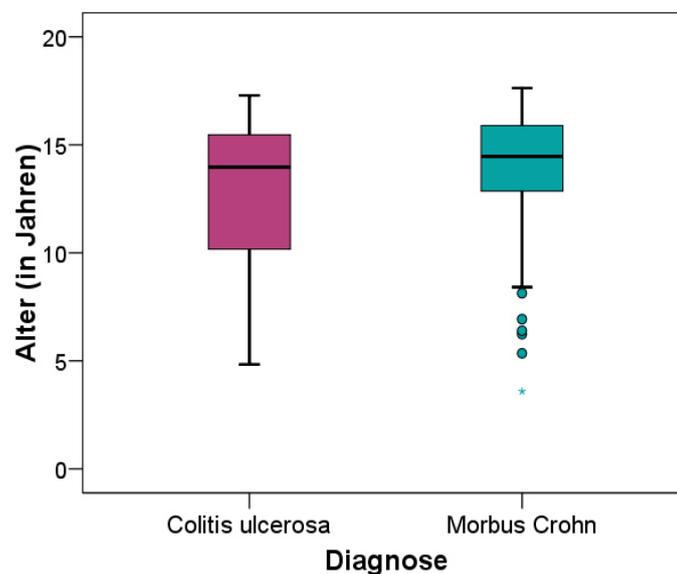
Die 104 aufgenommenen Kinder setzen sich aus 36 (34%) mit Colitis ulcerosa und 68 (65,4%) mit Morbus Crohn zusammen. 63 (60,6%) waren männlich und 41(39,4%) weiblichen Geschlechts (Tab. 6).

Tabelle 6: Aufteilung der Patienten nach Diagnose und Geschlecht

		Diagnose	
		Colitis ulcerosa n= 36 (34,6%)	Morbus Crohn n= 68 (65,4%)
Geschlecht	männlich	18 (17,3%)	45 (43,3%)
	weiblich	18 (17,3%)	23 (22,1%)

Der Altersmedian lag für Colitis ulcerosa bei 13,9 Jahren (Spannweite 4,8 - 17,3) und für Morbus Crohn auf 14,4 Jahren (3,6 - 17,6) (Abb. 1).

Abbildung 1: Altersverteilung nach Diagnose



3.2.2. Krankheitsaktivitätsindex

Von den 104 Kindern wurden für die Colitis ulcerosa-Patienten UCAI und mLSS bzw. für die Morbus Crohn-Patienten PCDAI und mLSS berechnet. Bei den Kindern mit Colitis ulcerosa lag der UCAI zwischen 0 und 18. 18 Kinder (50%) fanden sich in klinischer Remission und 18 Kinder (50%) im Schub. Der PCDAI lag bei den Morbus Crohn-Kindern zwischen 0 und 75. Dabei befanden sich 34 Kinder (50%) in klinischer Remission und 34 (50%) im Schub (Tab. 7).

Tabelle 7: Aufteilung der Patienten nach Krankheitsaktivität (UCAI / PCDAI)

		Colitis ulcerosa n= 36	Morbus Crohn n= 68
UCAI	Remission (≤ 3)	18	
	Schub (≥ 4)	18	
PCDAI	Remission (≤ 10)		34
	Schub ($\geq 12,5$)		34

Der mLSS befand sich zwischen 50 – 85 bei Colitis ulcerosa bzw. zwischen 33 und 85 bei Morbus Crohn.

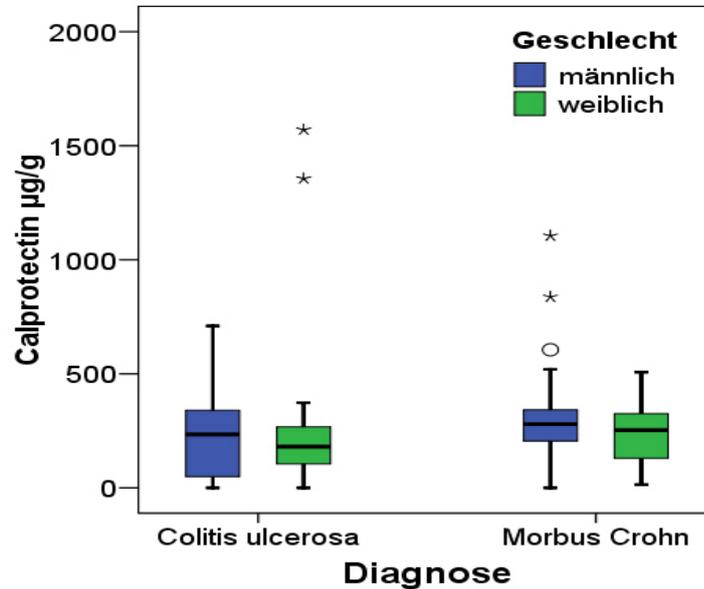
Bei Colitis ulcerosa zeigten 33 Kinder leichte Krankheitsaktivität (mLSS > 65) und 3 Kinder mittelschwere (mLSS 35 – 65). 52 Kindern mit Morbus Crohn befanden sich bei leichter Krankheitsaktivität, 15 Kinder bei mittelschwerer und bei 1 Kind schwerer (mLSS < 35) (Tab.8). Es war kein eindeutiger Geschlechtsunterschied hinsichtlich der Krankheitsaktivität weder bei Colitis ulcerosa (nach UCAI: p= 0,7; nach mLSS: p= 0,4) noch bei Morbus Crohn (nach PCDAI: p= 0,3; nach mLSS: p= 0,8) zu erkennen.

Tabelle 8: Aufteilung der Patienten nach Krankheitsaktivität (mLSS)

		mLSS		
		leicht > 65	mittelschwer 35 – 65	schwer < 35
Patienten n= 104	CU n= 36	33	3	
	MC n= 68	52	15	1

3.2.3. Calprotectin

Abbildung 2: FC bei CU und MC nach Geschlecht



Bei dem Patientenkollektiv betrug der Median des FC 254,5 µg/g (Spannweite 0,0 - 1.570,0 µg/g). Hierzu ergab ein Median bei Colitis ulcerosa von 215,8 µg/g (0,0 - 1.570,0 µg/g) und bei Morbus Crohn von 278,5 µg/g (0,0 - 1.105,0 µg/g), was keinen signifikanten Unterschied zeigte ($p = 0,11$). Es wurde keine geschlechtsspezifische Differenz bezüglich der fäkalen Calprotectinwerte bei den gesamten Patienten ($p = 0,2$), bei den Colitis ulcerosa-Patienten ($p = 0,6$) und bei den Morbus Crohn-Patienten ($p = 0,3$) gefunden (Abb. 2). Weder bei Colitis ulcerosa ($p = 0,1$) noch bei Morbus Crohn ($p = 0,1$) bestand eine Korrelation zwischen FC und dem Alter.

3.2.4. Korrelation zwischen FC und Aktivitätsindices

FC korreliert signifikant mit dem UCAI ($r = 0,42$; $p < 0,05$; Abb. 3a) bzw. mit dem PCDAI ($r = 0,50$; $p < 0,0001$; Abb. 3b). Es bestand eine signifikant negative Korrelation zwischen FC und mLSS sowohl bei den Kindern mit Colitis ulcerosa ($r = -0,57$; $p < 0,0001$; Abb. 3c) als auch bei den Kindern mit Morbus Crohn ($r = -0,39$; $p < 0,01$; Abb. 3d).

Abbildung 3a: Korrelation FC-UCAI

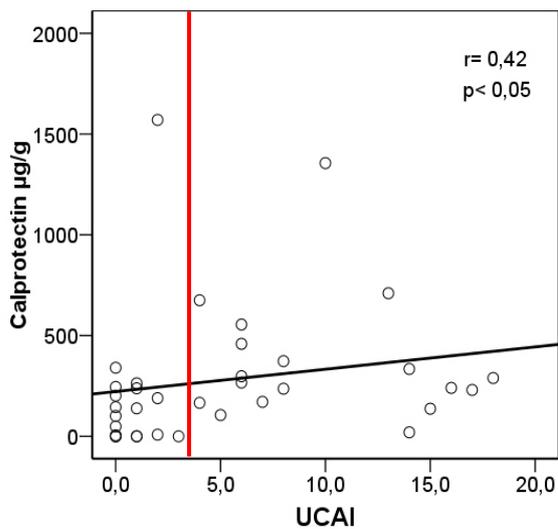


Abbildung 3b: Korrelation FC-PCDAI

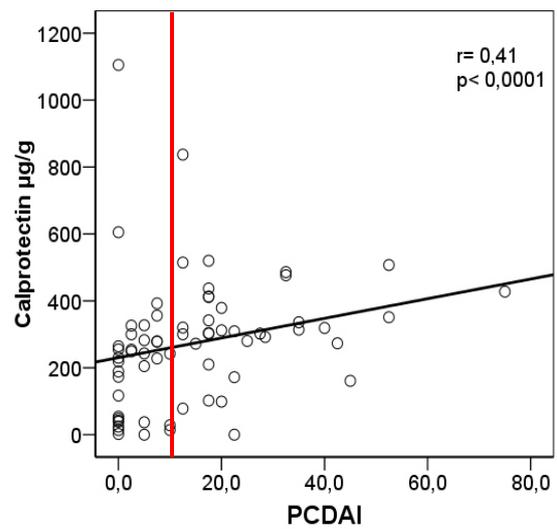


Abbildung 3c: Korrelation FC-mLSS bei CU

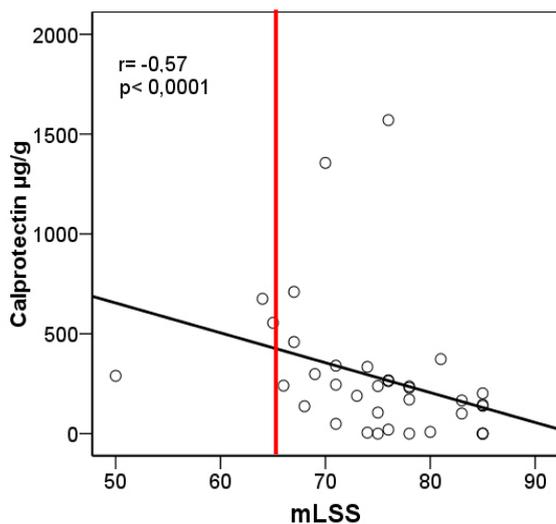
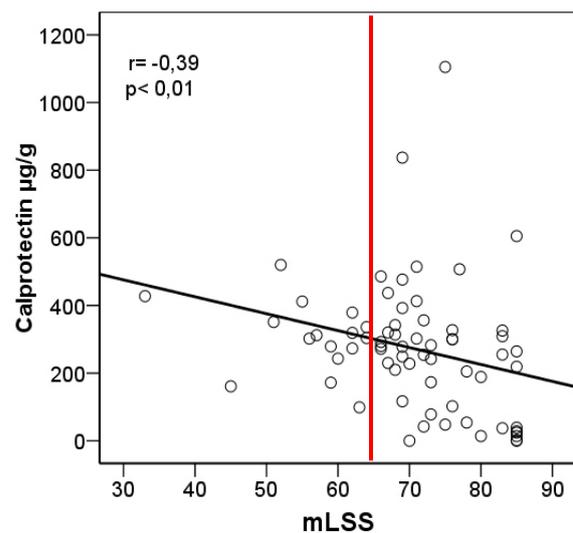


Abbildung 3d: Korrelation FC-mLSS bei MC



Nur 10 von 34 Morbus Crohn-Kindern in klinischer Remission (PCDAI ≤ 10) und 8 von 18 Colitis ulcerosa-Kindern in Remission (UCAI ≤ 3) hatten ein normales FC ($< 50 \mu\text{g/g}$ Stuhl). Umgekehrt fand sich ein normales FC nur bei 1 von 34 Kindern mit aktivem Morbus Crohn bzw. 1 von 18 mit aktiver Colitis ulcerosa (Tab. 9).

Tabelle 9: Normales FC bei klinischer Remission und klinischem Schub

	UCAI		PCDAI	
	Remission (≤ 3)	Schub (≥ 4)	Remission (≤ 10)	Schub ($\geq 12,5$)
	n= 18	n= 18	n= 34	n= 34
FC $< 50 \mu\text{g/g}$	8 / 18	1 / 18	10 / 34	1 / 34
FC $\geq 50 \mu\text{g/g}$	10 / 18	17 / 18	24 / 34	33 / 34

Die Aufteilung der Patienten nach Krankheitsaktivität bei einer FC-Konzentration von $100 \mu\text{g/g}$ zeigte keinen großen Unterschied im Vergleich zu einem normalen FC ($< 50 \mu\text{g/g}$) (Tab. 10).

Tabelle 10: Pathologisches FC bei klinischer Remission und klinischem Schub

	UCAI		PCDAI	
	Remission (≤ 3)	Schub (≥ 4)	Remission (≤ 10)	Schub ($\geq 12,5$)
	n= 18	n= 18	n= 34	n= 34
FC $< 100 \mu\text{g/g}$	8 / 18	1 / 18	11 / 34	3 / 34
FC $\geq 100 \mu\text{g/g}$	10 / 18	17 / 18	23 / 34	31 / 34

3.2.5. Korrelation zwischen FC und Laborparametern

Für die Kinder mit Morbus Crohn konnte eine signifikante negative Korrelation zwischen FC und Albumin ($r = -0,52$; $p < 0,0001$; Abb. 5a) bzw. Hämoglobin gefunden werden ($r = -0,39$; $p < 0,01$; Abb. 5b). Bei der Colitis ulcerosa war diese Korrelation weder mit Albumin ($r = -0,29$; $p < 0,1$) noch mit Hämoglobin ($r = -0,23$; $p < 0,5$) signifikant.

Abbildung 4a: Korrelation FC-Albumin bei MC

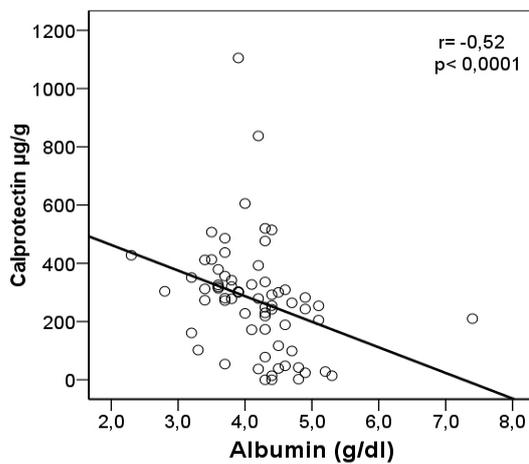
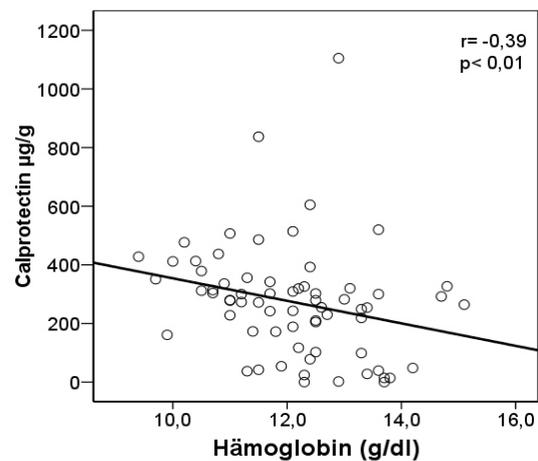


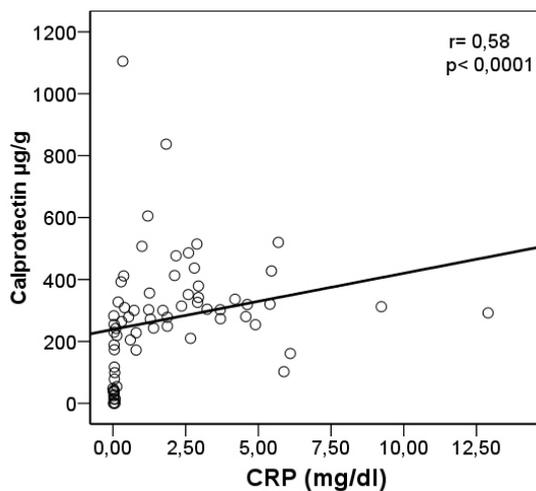
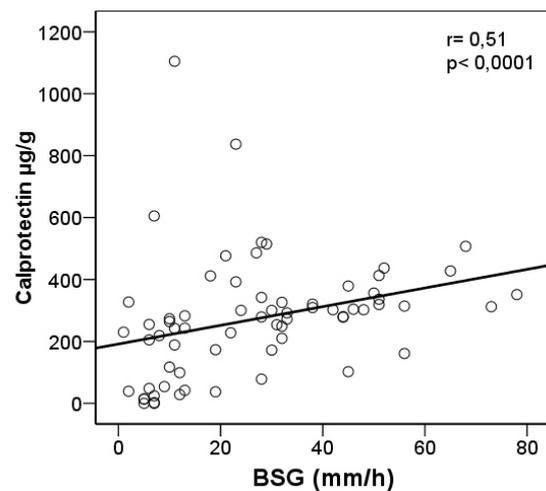
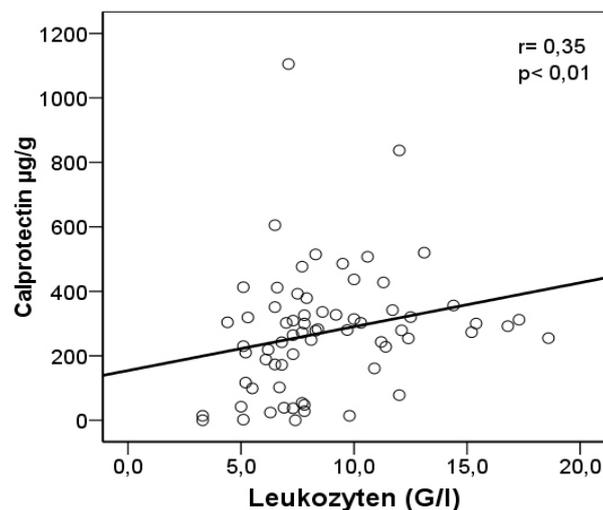
Abbildung 4b: Korrelation FC-Hb bei MC



Bei Morbus Crohn korrelierten die FC-Werte mit CRP ($r = 0,58$, $p < 0,0001$; Abb. 5c), BSG ($r = 0,51$; $p < 0,0001$; Abb. 5d) und Leukozyten ($r = 0,35$; $p < 0,01$; Abb. 5e) signifikant. Bei der Patientengruppe mit Colitis ulcerosa bestand keine signifikante Korrelation zwischen FC und CRP ($r = 0,16$; $p < 0,5$), BSG ($r = 0,23$; $p < 0,5$) und Leukozyten ($r = 0,18$; $p < 0,5$). Die ermittelten Korrelationskoeffizienten werden in der Tabelle 11 veranschaulicht.

Tabelle 11: Korrelationskoeffizienten zwischen FC-Werten und Albumin, Hämoglobin, CRP, BSG und Leukozyten bei Colitis ulcerosa und Morbus Crohn

		Albumin	Hb	CRP	BSG	Leukozyten
CU	r	-0,29	-0,23	0,16	0,23	0,18
	p	0,08	0,17	0,34	0,17	0,30
MC	r	-0,52	-0,39	0,58	0,51	0,35
	p	0,000	0,001	0,000	0,000	0,004

Abbildung 4c: Korrelation FC-CRP bei MC**Abbildung 4d:** Korrelation FC-BSG bei MC**Abbildung 4e:** Korrelation FC-Leukozyten bei MC

3.3. Longitudinale Untersuchung

3.3.1. Untersuchungsverteilung nach Krankheitsaktivität

Die 151 Calprotectinmessungen von den 27 Kindern (19 Morbus Crohn / 8 Colitis ulcerosa) wurden den zwei Untergruppen „klinische Remissions“ bzw. „akuter Schub“ zugeordnet. Die Remissions-Gruppe umfasste 122 Calprotectinmessungen (33 Colitis ulcerosa; 89 Morbus Crohn) und die Schub-Gruppe 29 Calprotectinmessungen (7 Colitis ulcerosa; 22 Morbus Crohn) (Tab. 12).

Tabelle 12: Remissions- und Schub-Gruppen nach Diagnose

	Diagnose	
	Colitis ulcerosa n= 40	Morbus Crohn n= 111
klinische Remission n= 122 (80,8%)	33(21,9%)	89 (58,9%)
akuter Schub n= 29 (19,2%)	7 (4,6%)	22 (14,6%)

3.3.2. Calprotectinwerte

Der FC Median lag bei 102,0 µg/g (Spannweite 0,0 - 525,4 µg/g) bei der Colitis ulcerosa-Gruppe mit Remission und auf 260,0 µg/g (240,0 - 373,0 µg/g) bei den Colitis ulcerosa-Fällen mit Schub.

Bei Morbus Crohn betrug der Median von FC 224,0 µg/g (0,0 - 435,0 µg/g) bei den Fällen mit Remission und 290,0 µg/g (15,0 – 480,0 µg/g) bei den Fällen mit Schub. Hinsichtlich der fäkalen Calprotectinkonzentration unterschied sich die Remissions-Gruppe von der Schub-Gruppe signifikant sowohl bei Colitis ulcerosa ($p= 0,005$) als auch bei Morbus Crohn ($p= 0,002$). Die fäkalen Calprotectin-Werte werden nach Krankheitsaktivität bei Colitis ulcerosa und bei Morbus Crohn in Form von Boxplot und Streudiagramm in den Abbildungen 5a und 5b dargestellt.

Abbildung 5a: FC Werte nach Krankheitsaktivität bei CU und MC

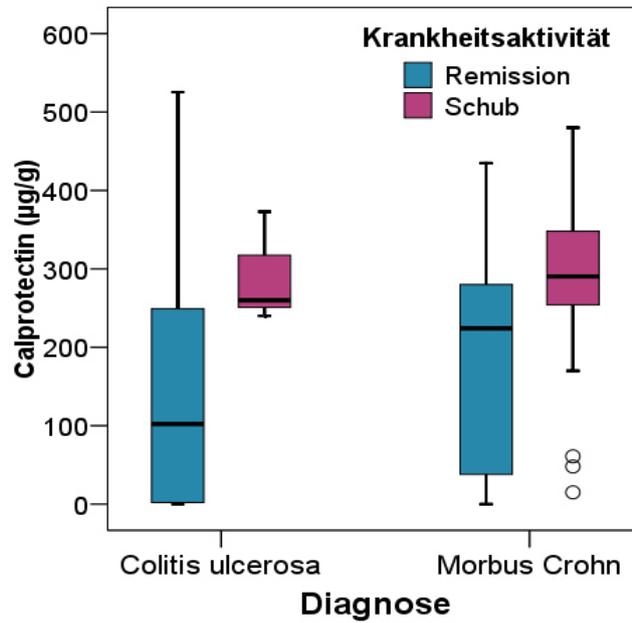
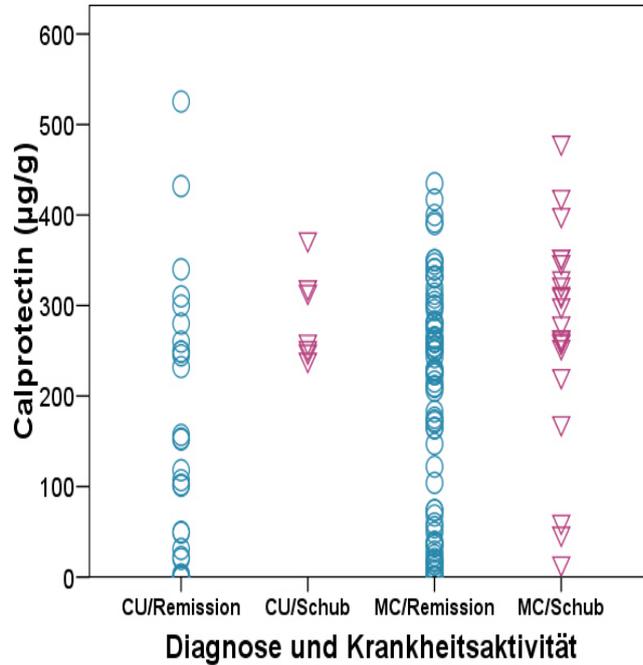


Abbildung 5b: FC Werte nach Krankheitsaktivität bei CU und MC



3.3.3. ROC-Kurven für fäkales Calprotectin

Die Sensitivität und Spezifität von FC als ein prädiktiver Parameter eines Schubs bei Colitis ulcerosa und Morbus Crohn wurden beim cut-off von 100 µg/g festgestellt. Die FC Konzentration von 100 µg/g ergab bei Colitis ulcerosa eine Sensitivität von 100%, eine Spezifität von 45%, einen PPW von 28% und einen NPW von 100%. Bei Morbus Crohn zeigte sich diese FC Konzentration eine Sensitivität von 86%, eine Spezifität von 34%, einen PPW von 24% und NPW von 76% (Tab. 13).

Tabelle 13: Sensitivität, Spezifität, PPW und NPW bei Colitis ulcerosa und Morbus Crohn

	Colitis ulcerosa	Morbus Crohn
Sensitivität	100%	86%
Spezifität	45%	34%
PPW	28%	24%
NPW	100%	76%

Die Fläche unter der Kurve war 0,83 (95% KI 0,70 - 0,95) bei Colitis ulcerosa und 0,71 (95% KI 0,59 - 0,83) bei Morbus Crohn (Abb. 6a und 6b).

Abb. 6a: ROC-Kurve für FC bei CU

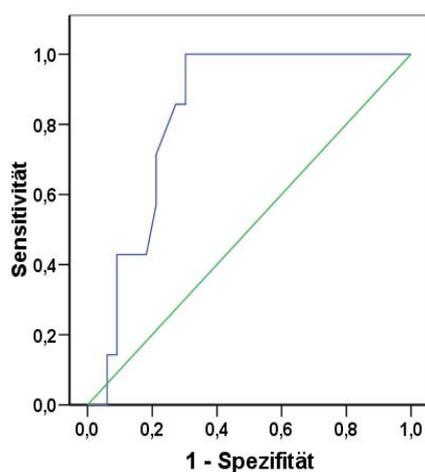
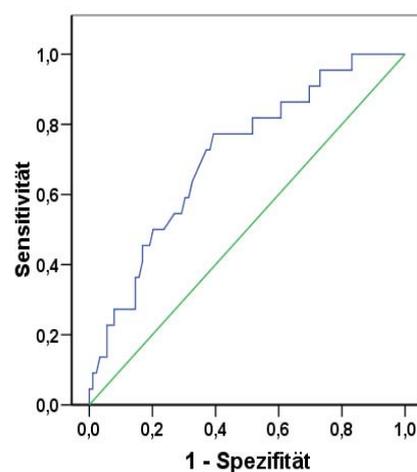


Abb. 6b: ROC-Kurve für FC bei MC



4. Diskussion

Fäkales Calprotectin wurde in den letzten Jahren als sensitiver Parameter für Entzündung im Gastrointestinaltrakt erkannt. Bei dieser Arbeit wurde nun die Rolle von FC bei Kindern ≥ 3 Jahren mit CED untersucht.

4.1. Patienten

In mehreren Studien wurde die Altersabhängigkeit von FC untersucht [14;39;79;91]. Hierbei zeigten sich erhöhte FC-Werte für Kinder bis zum Alter von 3 Jahren. Für diese Studie wurden deswegen Kinder jünger als 3 Jahre ausgeschlossen.

Das Verhältnis von Patienten mit Morbus Crohn zu solchen mit Colitis ulcerosa in unserer Studie ist vergleichbar mit anderen pädiatrischen Studien und den neusten epidemiologischen Angaben. Die Inzidenz-Daten, die von Lakatos und Ravikumara vorgestellt wurden, zeigten ein Überwiegen von Morbus Crohn bei Kindern im Vergleich zu Colitis ulcerosa [62;83]. Bei der Studie von Canani *et al.* [16] waren von den 113 Kinder mit CED 45 mit Colitis ulcerosa (39,8%) und 68 mit Morbus Crohn (60%). Diese epidemiologische Mehrheit von Morbus Crohn wird auch bei den in dieser Studie untersuchten Patienten beobachtet, in der der Anteil von Morbus Crohn-Patienten 65,4% und von Colitis ulcerosa-Patienten 34,6% beträgt. Alle Studien zeigen somit ein Verhältnis von Morbus Crohn zu Colitis ulcerosa im Kindesalter von etwa 2/3 zu 1/3.

Bezüglich der Geschlechteraufteilung wurde ein Überwiegen der Jungen (60,6%) gegenüber den Mädchen (39,4%) beobachtet. Diese Tendenz zeigte sich auch in der Untersuchung von Bunn (37 CED: 21 Morbus Crohn und 16 Colitis ulcerosa; 59,4% männlich, 40,6% weiblich) und Canani (113 CED: 68 Morbus Crohn und 45 Colitis ulcerosa; 69,9% männlich, 30,1% weiblich) [12;16].

Auch der Altersmedian von 13,9 bei Colitis ulcerosa und 14,4 bei Morbus Crohn entspricht in etwa dem Altersdurchschnitt der Studie von Bremner (Colitis ulcerosa 12; Morbus Crohn 13) [11].

Allgemein zeigte sich das Patientengut repräsentativ für CED und vergleichbar mit anderen pädiatrischen Studien. Allerdings ist die Fallzahl von 36 Patienten mit

Colitis ulcerosa zu klein, um damit statistisch signifikante Aussage treffen zu können.

4.2. Repräsentative Queranalyse

4.2.1. Calprotectin

Bei der Messung von FC nach Angabe des Herstellers kam es bei sehr hohen FC-Werten dazu, dass der tatsächliche Wert über dem gemessenen Höchstwert lag. Nach Herstellung einer Verdünnungsreihe in 5-fachen Schritten, wurde ein maximaler FC-Wert von 5100 µg/g ermittelt.

Als Normalwert für Calprotectin wurde in dieser Arbeit der vom Hersteller angegebene Bereich von 0 µg/g bis 50 µg/g festgelegt. Bei der Promotionsarbeit von Kirschner (C. Kirschner) wurde dieser Normbereich bestätigt. Dabei von 119 gesunde Kinder > 1 Jahr hatten 110 Probanden FC < 50 µg/g. In der Metaanalyse von von Roon [106] wurden Normwerte von 0 - 100 µg/g empfohlen.

In dieser aktuellen Metaanalyse, in der sowohl Erwachsenen- als auch Kinder-Studien eingeschlossen wurden, wurden erhöhte FC-Werte bei CED gefunden (n= 1024; Median 219 µg/g) [106]. Als Schlussfolgerung wurde die Verwendung von Calprotectin zur Diagnostik bei CED empfohlen.

Der FC Median in unserer Studie lag bei 254,5 µg/g und ist mit dem Ergebnis von Bremner *et al.* (n= 43, Median 337 µg/g) [11] und Nissen *et al.* (n= 18, Median 237 µg/g) [76] vergleichbar. Außerdem zeigte sich kein signifikanter Unterschied (p= 0,11) zwischen den FC-Werten bei Colitis ulcerosa (Median 215,8 µg/g) und bei Morbus Crohn (Median 278,5 µg/g), sowie dies in der Arbeit von Canani *et al.* [15] 2006 beschrieben wurden.

4.2.2. Korrelation zwischen FC und Aktivitätsindices

In der vorliegenden Arbeit wurde eine signifikante Korrelation zwischen FC und mLSS bei den Colitis ulcerosa-Patienten (p< 0,0001) und auch bei den Morbus Crohn-Patienten (p< 0,01) gefunden. Sowohl bei den Patienten mit Colitis ulcerosa als auch bei denen mit Morbus Crohn war der FC Median höher bei den Kindern

mit mittelschwerer Krankheitsaktivität (555 µg/g bei Colitis ulcerosa; 304 µg/g bei Morbus Crohn) als bei denen in klinischer Remission (189 µg/g bei Colitis ulcerosa; 260 µg/g bei Morbus Crohn). Weiterhin korrelierten die FC-Werte signifikant mit dem UCAI bzw. mit dem PCDAI. Diese Korrelation fiel sowohl bei den Colitis ulcerosa-Kindern als auch bei den Morbus Crohn-Kindern schwächer aus. Im Gegensatz zum UCAI, bei dessen Berechnung nur klinische Daten herangezogen werden, fließen beim PCDAI auch die Entzündungsparameter ein. Dies kann vermutlich diesen Unterschied in der Korrelation erklären. Diese unterschiedliche Berechnung von Aktivitätsindices kann auch ein Grund sein, dass FC besser mit mLSS als mit UCAI korrelierte. Bei dem mLSS werden außer Laborparametern auch Faktoren wie Gewicht und Wachstum beurteilt, die nicht nur bei einer aktiven Colitis ulcerosa verschlechtert sein können.

Ein ähnliches Verhältnis zwischen FC und Aktivitätsindices wurde in den Studien von Bunn und Costa gezeigt. Bunn *et al.* [12] konnten einen signifikanten Zusammenhang zwischen fäkalem Calprotectin und dem mLSS bei Kindern mit CED nachweisen. Die FC-Konzentration zeigte sich bei der Gruppe mit mittelschwerer Krankheitsaktivität (mLSS 35 - 65) maßgeblich höher als bei der Remissions-Gruppe (mLSS > 65). In der Arbeit von de Jong wurde eine enge Korrelation zwischen FC und PCDAI ($p < 0,01$) bei Kindern mit Morbus Crohn gefunden [25]. Costa *et al.* [23] wiesen bei Erwachsenen mit CED nach, dass die fäkalen Calprotectinwerte besser mit dem CAI ($p < 0,001$) als mit dem CDAI ($p < 0,01$) korrelierten.

Trotz der signifikanten Korrelation zwischen fäkalem Calprotectin und den Aktivitätsindices wiesen knapp die Hälfte der Colitis ulcerosa-Patienten bzw. zwei Drittel der Morbus Crohn Patienten mit klinischer Remission (UCAI ≤ 3 ; PCDAI ≤ 10) erhöhte FC-Werte auf. Dieses Verhältnis spricht für eine persistierende Mukosaentzündung trotz klinischer Remission. Dies ist insofern interessant, da offensichtlich auch bei Patienten in klinischer Remission nicht von einer vollständigen Heilung der Mukosa ausgegangen werden kann.

In anderen Studien wurde gezeigt, dass die Aktivitätsindices nur grob die entzündliche Aktivität im Gastrointestinaltrakt nachweisen. Sie können lediglich Informationen über den aktuellen Krankheitszustand liefern. Zudem sind sie stark vom Vertrauensniveau zwischen Arzt und Patienten abhängig [13;35;59;63].

Außerdem ist die Berechnung der Aktivitätsindices für den klinischen Alltag zeitaufwendig.

Bei Kindern mit CED fand Bunn *et al.* [13] eine enge Korrelation zwischen fäkalen Calprotectinkonzentration und den endoskopischen bzw. den histologischen Befunden. FC eignet sich zur Erfassung der Entzündungsaktivität im Darm und für die Früherkennung eines Rezidivs offensichtlich besser als die Aktivitätsindices. So sollte bei erhöhten FC-Werten an eine Intensivierung der Therapie gedacht werden und eventuell auch erneute diagnostische Schritte eingeleitet werden. Von Roon schlägt in seiner Metaanalyse hierfür den Grenzwerten von 100 µg/g vor [106].

4.2.3. Korrelation zwischen FC und Laborparametern

Bei der Betrachtung der Laborparameter in dieser Studie zeigte sich eine ausgeprägte Korrelation zwischen den FC-Werten und Albumin i.S. ($p < 0,0001$), Hb-Wert ($p < 0,01$), CRP ($p < 0,0001$), BSG ($p < 0,0001$) und Leukozyten ($p < 0,01$) bei den Morbus Crohn-Patienten, aber nicht bei den Colitis ulcerosa-Patienten.

Bremner *et al.* [11] berichteten einen engen Zusammenhang zwischen der FC-Konzentration und CRP ($p = 0,001$) bei CED-Patienten. In einer Untersuchung von Bunn *et al.* [12] bei Kindern mit CED korrelierte FC ebenfalls signifikant mit Albumin i.S. ($p = 0,002$) bzw. mit BSG ($p = 0,01$).

Laborparameter wie CRP, BSG und Serumalbumin werden routinemäßig als Entzündungsmarker bei CED verwandt. Andererseits wurde in mehreren Studien gezeigt, dass diese Entzündungsparameter unspezifisch für die Erfassung einer entzündlichen Aktivität bei CED sind [13;59;60]. Zudem können die Werte von BSG in Rahmen von bestimmten Krankheiten wie Anämie, Polyzythämie und Thalassämia beeinflusst werden [104].

In einer Studie bei Kindern untersuchten Canani *et al.* [15] nicht-invasive Tests bei der Diagnose von CED. Dabei wurde eine Spezifität bei FC von 88,9%, ASCA / pANCA von 88,9% und bei BWUS (bowel wall ultrasonography measurement) von 77,8% gesehen. Bei Kombination dieser Tests konnte eine Spezifität von 99,47% erreicht werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass FC in Kombination mit

den in CED gängigen Laborparametern großen diagnostischen Wert hat. Damit besteht die Möglichkeit bei Kindern auf invasive Untersuchungen zu verzichten.

FC und Lactoferrin wurde in mehreren Untersuchungen bei Patienten mit CED verglichen [3;60;63]. Es wurde eine vergleichbare diagnostische Wertigkeit der beiden Leukozyten-Proteinen festgestellt. Sowohl Lactoferrin als auch FC sind stabil in Raumtemperatur (FC 82%, Lactoferrin 90%) [63]. Bei Patienten mit CED zeigen die FC- und Lactoferrin-Konzentration vergleichbare Fläche unter der Kurve (0,87 für FC und 0,69 für Lactoferrin), Sensitivität (93% und 82%) und Spezifität (100% für beide) [94].

Aufgrund der langen Halbwertszeit eignet sich FC auch als Test im häuslichen Bereich, d.h. der Patient kann eine Stuhlprobe per Post schicken und muss sich zunächst nicht ambulant vorstellen. Eine routinemäßige Verwendung von Calprotectin hat sich aufgrund der entsprechenden Kosten noch nicht durchgesetzt. Eine Verwendung wird deswegen hauptsächlich im Rahmen von klinischen Studien erprobt.

4.3. Longitudinale Untersuchung

4.3.1. Untersuchungsverteilung nach Krankheitsaktivität

In einer longitudinalen Untersuchung an 79 Erwachsenen von Costa *et al.* [23] befanden sich 53,6% der Colitis ulcerosa-Patienten bzw. 60,5% der Morbus Crohn-Patienten in klinischer Remission ($UCAI \leq 4$; $CDAI \leq 150$) und 46,4% der Patienten mit Colitis ulcerosa bzw. 39,5% der Patienten mit Morbus Crohn in akutem Schub ($UCAI > 4$; $CDAI > 150$). Im Vergleich dazu liegt in vorliegender Arbeit bei den Colitis ulcerosa-Fällen der Anteil der Remissions-Gruppe mit 82,5% deutlich höher und der Anteil der Gruppe mit aktiver Erkrankung mit 17,5% deutlich niedriger. Bei den Morbus Crohn-Fällen sieht diese Verteilung mit 80,8% für die Remissions-Gruppe und 19,2% für die Gruppe mit aktiver Erkrankung ähnlich aus.

Bei dem Patientenkollektiv von Costa *et al.* [23] und bei dem hier betrachteten pädiatrischen Kollektiv wurde die Patientenverteilung nach Krankheitsaktivität durch die Berechnung von Aktivitätsindices bestimmt. Da die Aktivitätsindices bei Erwachsenen und bei Kindern unterschiedlich berechnet werden können, lässt sich so der Unterschied zwischen den Kollektiven erklären.

Eine gewisse Rolle könnte auch die Tatsache spielen, dass vor allem jugendliche Patienten zur Dissimulation neigen, d.h. vorhandene Symptome weniger gravierend beschreiben als diese in der Realität sind. Dadurch wird der Aktivitätsindex falsch niedrig berechnet.

4.3.2. Calprotectinwerte

Hinsichtlich der FC-Konzentrationen fanden Costa *et al.* [23] einen Median von 220,6 $\mu\text{g/g}$ bei den Patienten mit aktivem Morbus Crohn und 220,5 $\mu\text{g/g}$ bei den Morbus Crohn-Patienten in Remission ($p = 0,395$). Der FC Median betrug 220,6 $\mu\text{g/g}$ bei den Colitis ulcerosa-Fällen mit Schub und 67 $\mu\text{g/g}$ bei denen in Remission ($p < 0,0001$). Costa *et al.* [23] schlossen daraus, dass FC ein prädiktiver Parameter eines Schubs bei Colitis ulcerosa aber nicht bei Morbus Crohn sein kann.

In dieser longitudinalen Untersuchung unterschied sich der FC Median der Remissions-Gruppe von dem Median der Gruppe mit aktiver Erkrankung sowohl bei Colitis ulcerosa (FC-Remission= 102 µg/g; FC-Schub= 260 µg/g; p= 0,005) als auch bei Morbus Crohn (FC-Remission= 224 µg/g; FC-Schub= 290 µg/g; p= 0,002) signifikant. Trotz dieses ausgeprägten Unterschieds bei Morbus Crohn-Patienten ist zu beobachten, dass der Median vom fäkalen Calprotectin sich bei der Remissions-Gruppe (224,0 µg/g) deutlich erhöht zeigte. Dies kann für eine anhaltende Entzündung der Darmmukosa bei einer angezeigten klinischen Remission sprechen. Auch hier erweist sich die Berechnung der Aktivitätsindices nicht als zuverlässiger Parameter zur Einschätzung der Entzündungsaktivität im Darm.

4.3.3. ROC Kurven

Die FC-Konzentration von 150 µg/g erreichte in der Untersuchung von Costa *et al.* [23] eine Sensitivität von 89% und Spezifität von 82% für die Vorhersage eines Rückfalles bei Colitis ulcerosa. Im Vergleich dazu lagen bei den Morbus Crohn-Patienten die Sensitivität und die Spezifität auf 87% bzw. 43% niedriger.

Die FC-Konzentration von 100 µg/g wurde in einer jüngeren Studie präziser als 50 µg/g bzw. 150 µg/g bei der Diagnose von CED aufgewiesen. Aus diesem Grund wurde diese Konzentration als cut off bei diesem Kollektiv verwandt [106].

Bei den Colitis ulcerosa-Fällen zeigte diese FC-Konzentration höhere Sensitivität und Spezifität für die Schub-Prädiktion als bei den Morbus Crohn-Fällen. Weiterhin war die Fläche unter der Kurve bei Colitis ulcerosa etwa größer als bei Morbus Crohn. Obwohl in den beiden Studien verschiedene cut off-Werte benutzt wurden, sind die Ergebnisse vergleichbar. Damit wird erneut bestätigt, dass FC einen diagnostischen Vorhersagewert bei CED hat. Außerdem zeigte die FC-Konzentration in dieser Studie einen größeren positiven Vorhersagewert für einen Schub bei CED (insbesondere bei Colitis ulcerosa) als die Aktivitätsindices PCDAI und UCAI.

4.4. Ausblick

Seit der ersten Beschreibung von Calprotectin im Jahr 1980 [32] wurde viel über dieses Protein geforscht. Die Messung von FC ist nicht invasiv und unmittelbar mit einer Entzündungsaktivität im Darm verbunden. Da diese Messung schmerzlos und ohne Risiko für den Patient wiederholt werden kann, ist FC besonders bei Kindern mit CED sehr sinnvoll.

Die hohe Stabilität von FC bei Raumtemperatur erlaubt es, dass Patienten zwischen zwei Ambulanzuntersuchungen eine Stuhlprobe von zu Hause per Post schicken können. Dies würde eine engere Betreuung der CED-Patienten (hauptsächlich Kinder) ermöglichen ohne das Intervall zwischen den ambulanten Untersuchungen verkürzen zu müssen.

Aufgrund der starken Korrelation zwischen den FC-Konzentration und der endoskopischen und histologischen Krankheitsaktivität, die sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen mit CED beobachtet wurde [13;86], wird eine Änderung des Therapie-Regimes bei einem hohen FC-Wert empfohlen. Diese Therapie-Änderung könnte möglicherweise ohne endoskopische bzw. histologische Untersuchungen durchgeführt werden, was Zeit und Kosten sparen würde.

Die Nachteile von FC sind die hohen Kosten (ca. 16 €/Messung) und die zeitaufwendige Messungsmethode. Den ökonomischen Grundsätzen folgend, werden die Kosten des FC-Tests abnehmen je häufiger dieser verwendet wird (Angebot-Nachfrage-Regel).

Letzlich ist eine routinemäßige Anwendung von FC zur Bestimmung der Krankheitsaktivität bei CED jedoch sicher sinnvoll und gerechtfertigt, da sich durch frühere therapeutische Intervention entstehenden Mehrkosten durch stationäre Aufenthalte vermieden werden könnten. Hierzu fehlen bisher jedoch speziell im pädiatrischen Bereich größere kontrollierte Studien.

Ein sehr praktische und schnellere Messungsmethode von FC wurde schon entwickelt [6] und von Vestergaard *et al.* [105] in einer jüngsten Erwachsenen-Studie untersucht. Sie fanden heraus, dass der Calprotectin-Schnelltest (Cal-S) bei einem cut off Wert von 15 µg/g mit dem Calprotectin ELISA-Test (Cal-E) bei einem cut off von 50 µg/g vergleichbar ist. Cal-S wurde nur zum Ausschluss einer Entzündung im Gastrointestinaltrakt empfohlen, aber nicht als Marker der

Krankheitsaktivität bei CED. Allerdings fehlen in der Literatur entsprechende Untersuchungen zu dieser Messungsmethode bei Kindern mit CED.

FC könnte noch bei anderen Kinder-Erkrankungen wie allergische Colitis und NEC verstärkt angewendet werden. Darüber gibt es aber bisher in der Literatur nur wenige Studien. Zudem fehlt auch eine Untersuchung bei einem repräsentativeren Kollektiv.

5. Zusammenfassung

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen zeigen in den letzten Jahrzehnten eine zunehmende Inzidenz im Kindesalter. Zur Einschätzung der Krankheitsaktivität von Kindern mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen werden im klinischen Alltag und für Studien Aktivitätsindices verwandt, in denen sowohl klinische Symptome als auch Laborparameter eingehen. Diese Aktivitätsindices spiegeln nicht immer das Ausmaß der Mukosaentzündung wider. Aus diesem Grund werden nicht-invasive Laborparameter, die sich sowohl für die Diagnostik von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen als auch für die Einschätzung der Entzündungsaktivität im Darm eignen, evaluiert.

Calprotectin ist ein von neutrophilen Granulozyten abgeleitetes zytosolisches Protein, welches im Stuhl bei Raumtemperatur eine gute Stabilität zeigt. Durch verschiedene Arbeitsgruppen konnten erhöhte fäkale Calprotectin-Konzentrationen bei Patienten mit Darmentzündung wie chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, kolonrektales Karzinom, infektiöse Gastroenteritis, allergische Kolitis, nekrotisierende Enterocolitis und cystische Fibrose nachgewiesen werden. Es konnte im Rahmen von zwei Promotionsarbeiten gezeigt werden, dass fäkales Calprotectin ein empfindlicher Parameter für Entzündung im Darm ist und gut zwischen Kindern mit funktionellen Darmbeschwerden und Kindern mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen bei Diagnose diskriminiert (C. Kirschner, C. Waschk).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Korrelation zwischen fäkalem Calprotectin und den Aktivitätsindices (modifizierter Lloyd-Still Index, Pediatric Crohn's Disease Index und Ulcerative Colitis Activity Index) bzw. ausgewählten Laborparametern (BGS, CRP, Albumin, Hämoglobin, Leukozyten) bei Kindern mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen zu untersuchen. Außerdem wurden die fäkalen Calprotectin-Konzentrationen bei klinischer Remission und bei aktiver Krankheit verglichen.

104 Kinder ≥ 3 Jahre mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (36 Colitis ulcerosa und 68 Morbus Crohn; 63 männlich und 41 weiblich), bei denen zwischen

März 2003 und Mai 2005 alle Daten zur Berechnung der Aktivitätsindices und zeitgleich fäkales Calprotectin gemessen worden waren, wurden retrospektiv untersucht. 62 aus diesem Zeitraum tiefgefrorene Stuhlproben, deren gemessene Calprotectin-Konzentration außerhalb des oberen Messbereiches lag, wurden aufgetaut und nach Verdünnungen (1:50, 1:125, 1:250, 1:500 und 1:1000) austitriert und gemessen.

Bei den Kindern mit Morbus Crohn wurden Pediatric Crohn's Disease Index (PCDAI) und modifizierter Lloyd Still Index (mLSS) bestimmt, bei denen mit Colitis ulcerosa Ulcerative Colitis Activity Index (UCAI) und mLSS. In die Analyse wurde von jedem Kind nur die erste Untersuchung mit vollständigem Datensatz aufgenommen.

Für eine longitudinale Untersuchung wurden 151 fäkale Calprotectinmessungen von 27 Kindern (19 Morbus Crohn, 8 Colitis ulcerosa) eingeschlossen, die zu Beginn des Beobachtungszeitraumes in Remission (PCDAI ≤ 10 bzw. UCAI ≤ 3) waren und über mindestens ein Jahr betreut wurden. Diese Calprotectinmessungen wurden nach Krankheitsaktivität (Remission oder Schub) aufgeteilt und verglichen. Remission wurde als klinische Beschwerdefreiheit mit negativem Aktivitätsindex (PCDAI ≤ 10 bzw. UCAI ≤ 3) definiert. Zugleich wurde Schub als Auftreten oder Verschlechterung der Symptome festgesetzt, begleitend mit einer Steigerung von PCDAI auf $\geq 12,5$ bzw. UCAI auf ≥ 4 und der Veränderung der Therapie.

Bei der Querschnittuntersuchung der 104 Patienten zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen fäkalem Calprotectin und Geschlecht ($p = 0,2$) bzw. Alter ($p = 0,2$). Bei Morbus Crohn korrelierten die FC-Werte signifikant mit Albumin i.S. ($r = -0,52$; $p < 0,0001$), Hb-Wert ($r = -0,39$; $p < 0,01$), CRP ($r = 0,58$; $p < 0,0001$), BSG ($r = 0,51$; $p < 0,0001$) und Leukozyten ($r = 0,35$; $p < 0,01$). Auch fanden sich signifikante Korrelationen zwischen FC-Konzentration und dem PCDAI ($r = 0,50$; $p < 0,0001$) und dem UCAI ($r = 0,42$; $p < 0,05$). Sowohl bei Colitis ulcerosa-Patienten als auch bei Morbus Crohn-Patienten korrelierte FC mit dem mLSS ($r = -0,57$ und $p < 0,0001$ bei Colitis ulcerosa; $r = -0,39$ und $p < 0,01$ bei Morbus Crohn).

Nur 10 von 34 Kindern mit Morbus Crohn bzw. 8 von 18 mit Colitis ulcerosa, die sich in klinischer Remission befanden, hatten ein normales fäkales Calprotectin

(<50 µg/g Stuhl). Umgekehrt fand sich ein normales fäkales Calprotectin nur bei 1 von 34 Kindern mit aktivem Morbus Crohn, bzw. 1 von 18 mit aktiver Colitis ulcerosa.

Bei der longitudinalen Untersuchung wurde ein signifikanter Unterschied zwischen dem Median FC-Werte in der Remissions-Gruppe und dem Median der Gruppe mit aktiver Erkrankung sowohl bei Colitis ulcerosa (FC-Remission= 102 µg/g; FC-Schub= 260 µg/g; p= 0,005) als auch bei Morbus Crohn (FC-Remission= 224 µg/g; FC-Schub= 290 µg/g; p= 0,002) festgestellt.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Messung von fäkalem Calprotectin ein sensitiver Marker zur Erfassung von entzündlicher Aktivität im Darm ist, da nahezu alle Patienten mit erhöhten Aktivitätsindices hohe FC-Konzentration aufwiesen. Da knapp die Hälfte der Patienten mit Colitis ulcerosa bzw. zwei Drittel der Patienten mit Morbus Crohn in klinischer Remission – angezeigt durch Aktivitätsindices – erhöhte fäkale Calprotectin-Werte aufwiesen, scheint ein normaler Aktivitätsindex kein guter Parameter für eine Mukosaheilung zu sein. Langzeituntersuchungen müssen klären, ob ein normaler Wert von fäkalem Calprotectin ein prädiktiver Parameter für eine länger anhaltende Remission ist.

6. Literaturverzeichnis

1. Aadland E, Fagerhol MK. Faecal calprotectin: a marker of inflammation throughout the intestinal tract. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 2002, 14: 823-825.
2. Andersson KB, Sletten K, Berntzen HB, Dale I, Brandtzaeg P, Jellum E, Fagerhol MK. The leucocyte L1 protein: identity with the cystic fibrosis antigen and the calcium-binding MRP-8 and MRP-14 macrophage components. *Scand J Immunol* 1988, 28: 241-245.
3. Angriman I, Scarpa M, D'Inca R, Basso D, Ruffolo C, Polese L, Sturniolo GC, D'Amico DF, Plebani M. Enzymes in feces: Useful markers of chronic inflammatory bowel disease. *Clin Chim Acta* 2007, 381: 62-68.
4. Auvin S, Molinié, Gower-Rousseau C, Brazier F, Merle V, Grandbastien B, Marti R, Lerebours E, Dupas J, Colombel J, Salomez J, Cortot A, Turck D. Incidence, Clinical Presentation and Location at Diagnosis of Pediatric Inflammatory Bowel Disease: A Prospective Population-Based Study in Northern France (1988--1999). *J Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* 2005, 41: 49-55.
5. Baumgart DC., Sandborn WJ. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *The Lancet* 2007, 369: 1641-1657.
6. Bergis D, Schäfer V, Stein J. Verdacht auf infektiöse Diarrhö – Stuhlkultur ja oder nein? Evaluierung eines Stuhl-Calprotectinschnelltestes als positiv prädiktiven Marker für invasive Erreger. *Z Gastroenterol* 2005, 43.
7. Binder V. Epidemiology of IBD during the twentieth century: an integrated view. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004, 18: 463-479.
8. Bjarnason I SR. Fecal Calprotectin: A Significant Step in the Noninvasive Assessment of Intestinal Inflammation. *J Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* 2001, 33: 11-13.
9. Bonen DK, Cho JH. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2003, 124: 521-536.
10. Bousvaros A, Sylvester F, Kugathasan S, Szigethy E, Fiocchi C, Colletti R, Colletti R, Otley A, Amre D, Ferry G, Czinn SJ, Splawski JB, Oliva-Hemker M, Hyams JS, Faubion WA, Kirschner BS, Dubinsky MC, and the Members of the Challenges in Pediatric IBD Study Groups. Challenges in pediatric inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006, 12: 885-913.
11. Bremner A, Roked S, Robinson R, Phillips I, Beattie M. Faecal calprotectin in children with chronic gastrointestinal symptoms. *Acta Paediatrica* 2005, 94: 1855-1858.

12. Bunn SK, Bisset WM, Main MJ, Gray ES, Olson S, Golden BE. Fecal Calprotectin as a Measure of Disease Activity in Childhood Inflammatory Bowel Disease. *J Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* 2001, 32: 171-177.
13. Bunn SK, Bisset WM, Main MJ, Gray ES, Olson S, Golden BE. Fecal Calprotectin: Validation as a Noninvasive Measure of Bowel Inflammation in Childhood Inflammatory Bowel Disease. *J Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* 2001, 33: 14-22.
14. Campeotto F, Butel MJ, Kalach N, Derrieux S, Aubert-Jacquin C, Barbot L, Francoual C, Dupont C, Kapel N. High faecal calprotectin concentrations in newborn infants. *Arch.Dis.Child.Fetal Neonatal Ed.* 2004, 89: F353-F355.
15. Canani RB, de Horatio LT, Terrin G, Romano MT, Miele E, Staiano A, Rapacciuolo L, Plito G, Bisesti V, Manguso F, Vallone G, Sodano A, Troncone R. Combined Use of Noninvasive Tests is Useful in the Initial Diagnostic Approach to a Child with Suspected Inflammatory Bowel Disease. *J Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* 2006, 42: 9-15.
16. Canani RB, Rapacciuolo L, Romano MT, de Horatio LT, Terrin G, Manguso F, Cirillo P, Paparo F, Troncone R. Diagnostic value of Fecal Calprotectin in Pediatric gastroenterology clinical practice. *Digestive and Liver Disease* 2004, 36: 467-470.
17. Carroccio A, Iacono G, Cottone M, Di Prima L, Cartabellotta F, Cavataio F, Scalici C, Montalto G, Di Fede G, Rini G, Notarbartolo A, Averna MR. 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.
18. Carroll D, Corfield A, Spicer R, Cairns P. Faecal calprotectin concentrations and diagnosis of necrotising enterocolitis. *The Lancet* 2003, 361: 310-311.
19. Carvalho R, Hyams JS. Diagnosis and management of inflammatory bowel disease in children. *Semin Pediatr Surg* 2007, 16: 164-171.
20. Cho JH. Advances in the genetics of inflammatory bowel disease. *Current Gastroenterology Reports* 2004, 6: 467-673.
21. Cosnes J. Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2004, 18: 481-496.
22. Costa F, Mumolo MG, Bellini M, Romano MR, Ceccarelli L, Arpe P, Sterpi C, Marchi S, Maltinti G. Role of faecal calprotectin as non-invasive marker of intestinal inflammation. *Digestive and Liver Disease* 2003, 35: 642-647.
23. Costa F, Mumolo MG, Ceccarelli L, Bellini M, Romano MR, Sterpi C, Ricchiuti A, Marchi S, Bottai M. Calprotectin is a stronger predictive marker of relapse in ulcerative colitis than in Crohn's disease. *Gut* 2005, 54: 364-368.

24. Cuffari C. Inflammatory bowel disease in children: a pediatrician's perspective. *Minerva Pediatrica* 2006, 58: 139-157.
25. de Jong NS, Leach ST, Day AS. Fecal S100A12: a novel noninvasive marker in children with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006, 12: 566-572.
26. Desai D, Faubion WA, Sandborn WJ. Review article: biological activity markers in inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2007, 25: 247-255.
27. Désir B, Seidman EG. Transitioning the paediatric IBD patient to adult care. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2003, 17: 197-212.
28. Dolwani S, Metzner M, Wassell JJ, Yong A, Hawthorne AB. Diagnostic accuracy of faecal calprotectin estimation in prediction of abnormal small bowel radiology. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2004, 20: 615-621.
29. Eurospital. Calprest® Eurospital Technical Documents. 3-12.
Ref Type: Generic
30. Fagerberg UL, Löf L, Merzoug RD, Hansson Lo, Finkel Y. Fecal Calprotectin Levels in Healthy Children Studied with an Improved Assay. *J Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2003, 37: 768-772.
31. Fagerhol MK. Nomenclature for proteins: is calprotectin a proper name for the elusive myelomonocytic protein? *J Clin Pathol: Mol Pathol* 1996, 49: M74-M79.
32. Fagerhol MK, Dale I, Andersson T. Release and Quantitation of a Leucocyte Derived Protein (L1). *Scand J Haematol* 1980, 24: 393-398.
33. Farrokhyar F, Swarbrick ET, Irvine EJ. A Critical Review of Epidemiological Studies in Inflammatory Bowel Disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 2001, 36: 2-15.
34. Fischer P, Richter T. Inzidenz und Prävalenz chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (CED) bei Kindern und Jugendlichen in Sachsen – eine Fünfjahresanalyse des Sächsischen Registers für Kinder mit CED. *Kinder- und Jugendmedizin* 2007, 2: 114.
35. Gaya DR, Lyon TDB, Duncan A, Neilly JB, Han S, Howell J, Liddell C, Stanley AJ, Morris AJ, Mackenzie JF. Faecal calprotectin in the assessment of Crohn's disease activity. *QJM* 2005, 98: 435-441.
36. Geier MS, Butler RN, Howarth GS. Inflammatory bowel disease: Current insights into pathogenesis and new therapeutic options; probiotics, prebiotics and synbiotics. *International Journal of Food Microbiology* 2007, 115: 1-11.

37. Geißler M. Kolon. In Lehrbuch der Klinischen Pathophysiologie, Edited by Siegenthaler W BH, Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York, 2006, Ed. 9.
38. Gold N, Issenman R, Roberts J, Watt S. Well-Adjusted Children: An Alternate View of Children with Inflammatory Bowel Disease and Functional Gastrointestinal Complaints. *Inflamm Bowel Dis* 2000, 6: 1-7.
39. Golden B, Bunn S, Main M. Age-Dependent Variations in Fecal Calprotectin in Children. *J Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* 2002, 34: 324.
40. Griffiths AM. Specificities of inflammatory bowel disease in childhood. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2004, 18: 509-523.
41. Hanaway P, Roseth A. Inflammatory biomarkers predict relapse in IBD. *Gut* 2005, 54: 1346-1347.
42. Hendrickson BA, Gokhale R, Cho JH. Clinical Aspects and Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease. *Clinical Microbiology Reviews* 2002, 15: 79-94.
43. Herrlinger K SE. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen. *Der Internist* 2003, 44: 1151-1173.
44. Heuschkel R, Salvestrini C, Beattie RM, Hildebrand H, Walters T, Griffiths AM. Guidelines for the management of growth failure in childhood inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2008, 14: 1-11.
45. Hoffmann JC. Behandlung des Morbus Crohn und der Colitis ulcerosa. *Med Welt* 2004, 55: 59-66.
46. Hoffmann JC, Zeitz M. S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselerkrankungen und des Kompetenznetzes chronisch entzündliche Darmerkrankungen zur Diagnostik und Therapie der Colitis ulcerosa. *Medizinische Klinik* 2005, 100: 43-50.
47. Hugot JP. Inflammatory bowel disease: causes and consequences. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2004, 18: 447-449.
48. Hugot J. Inflammatory bowel disease: a complex group of genetic disorders. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2004, 18: 451-462.
49. Hyams JS, Ferry GD, Mandel FS, Gryboski JD, Kibort PM, Kirschner BS, Griffiths AM, Katz AJ, Grand RJ, Boyle JT. Development and Validation of a Pediatric Crohn's Disease Activity Index. *J Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* 1991, 12: 439-447.
50. Hyams JS, Markowitz J, Otley A, Otley A, Rosh J, Mack D, Bousvaros A, Kugathasan S, Pfefferkorn M, Tolia V, Evans J, Treem W, Wyllie R, Rothbaum R. Evaluation of the pediatric Crohn's disease activity index: a prospective multicenter experience. *J Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* 2005, 41: 416-421.

51. Isaksen B, Fagerhol MK. Calprotectin inhibits matrix metalloproteinases by sequestration of zinc. *Mol Pathol* 2001, 54: 289-292.
52. Johne B, Fagerhol MK, Lyberg T, Prydz H, Brandtzaeg P, Naess-Andresen CF, Dale I. Functional and clinical aspects of the myelomonocyte protein calprotectin. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 1997, 50: 113-123.
53. Kappelman MD, Bousvaros A. Nutritional concerns in pediatric inflammatory bowel disease patients. *Molecular Nutrition & Food Research* 2008, 1-8.
54. Kappelman MD, Rifas-Shiman SL, Kleiman K, Ollendorf D, Bousvaros A, Grand RJ, Finkelstein JA. The prevalence and geographic distribution of Crohn's disease and ulcerative colitis in the United States. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007, 5: 1424-1429.
55. Keller KM, Weitzel D, Lörcher U. Diagnostik der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 2004, 152: 122-132.
56. Kim SC, Ferry GD. Inflammatory bowel diseases in pediatric and adolescent patients: Clinical, therapeutic and psychosocial considerations. *Gastroenterology* 2004, 126: 1550-1560.
57. Kleinman R, Baldassano R, Caplan A, Griffiths A, Heyman M, Issenman R, Lake A. Nutrition Support for Pediatric Patients With Inflammatory Bowel Disease: A Clinical Report of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *J Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2004, 39: 15-27.
58. Koletzko S. Erkrankungen des Dün- und Dickdarms. In Lehrbuch der Therapie der Krankheiten im Kindes- und Jungendalter, Edited by Reinhardt D., Springer-Verlag Berlin Heidelberg-New York, 2004, Ed. 7: 1061-1110.
59. Kolho K, Raivio T, Lindahl H, Savilahti E. Fecal calprotectin remains high during glucocorticoid therapy in children with inflammatory bowel disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 2006, 41: 720-725.
60. 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.
61. Kucharzik T, Kucharzik T, Maaser C, Lügering A, Targan S, Domschke W. Recent understanding of IBD pathogenesis: implications for future therapies. *Inflamm Bowel Dis* 2006, 12: 1068-1083.
62. Lakatos PL. Recent trends in the epidemiology of inflammatory bowel diseases: up or down? *World J Gastroenterol* 2006, 12: 6102-6108.
63. Langhorst J, Elsenbruch S, Elsenbruch S, Elsenbruch S, Mueller T, Rueffer A, Spahn G, Michalsen A, Dobos GJ. Comparison of 4-Neutrophil-derived

- Proteins in Feces as Indicators of disease activity in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2005, 11: 1085-1091.
64. Lapidus A. Crohn's disease in Stockholm County during 1990-2001: an epidemiological update. *World J Gastroenterol* 2006, 7: 75-81.
65. Lloyd-Still JD, Green OC. A Clinical Scoring System for Chronic Inflammatory Bowel Disease in Children. *Digestive Diseases and Sciences* 1979, 24: 620-624.
66. Loftus EV. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 2004, 126: 1504-1517.
67. Lothar T. Labor und Diagnose. Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik, TH-Books-Verlags-Gesellschaft, 2005.
68. MacKner LM, MacKner LM, Crandall WV, Szigethy EM. Psychosocial functioning in pediatric inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006, 12: 239-244.
69. Mahid S, Minor K, Stevens P, Galandiuk S. The Role of Smoking in Crohn's Disease as Defined by Clinical Variables. *Digestive Diseases and Sciences* 2007, 52: 2897-2903.
70. Mascheretti S, Croucher PJP, Schreiber S. Pharmacogenetics of inflammatory bowel disease [small star, filled]. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2004, 18: 597-609.
71. Montgomery SM, Ekbohm A. Epidemiology of inflammatory bowel disease. *Currente Opinion in Gastroenterology* 2002, 18: 416-420.
72. Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Kreiner S, Binder V. Incidence and prevalence of Crohn's disease in the county of Copenhagen, 1962-87: a sixfold increase in incidence. *Scand J Gastroenterol* 1992, 27: 609-614.
73. Nerich V, Monnet E, Etienne A, Louafi S, Ramée C, Rican S, Weill A, Vallier N, Vanbockstael V, Auleley GR, Allemand H, Carbonnel F. Geographical variations of inflammatory bowel disease in France: a study based on national health insurance data. *Inflamm Bowel Dis* 2006, 12: 218-226.
74. Nieuwenhuis EES, Escher JC. Early onset IBD: What's the difference? *Digestive and Liver Disease* 2008, 40: 12-15.
75. Nikolaus S, Schreiber S. Diagnostics of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 2007, 133: 1670-1689.
76. Nissen AC, van Gils CE, Menheere PP, Van den Neucker AM, van der Hoeven MA, Forget PP. Fecal calprotectin in healthy term and preterm infants. *J Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2004, 38: 107-108.

77. O'Sullivan M, O'Morain C. Nutrition in inflammatory bowel disease. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2006, 20: 561-573.
78. Odink K, Cerletti N, Bruggen J, Clerc RG, Tarcsay L, Zwadlo G, Gerhards G, Schlegel R, Sorg C. Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages of rheumatoid arthritis. *Nature* 1987, 330: 80-82.
79. Olafsdottir E, Aksnes L, Fluge G, Berstad A. Faecal calprotectin levels in infants with infantile colic, healthy infants, children with inflammatory bowel disease, children with recurrent abdominal pain and healthy children. *Acta Paediatrica* 2002, 91: 45-50.
80. Philpott DJ, Viala J. Towards an understanding of the role of NOD2/CARD15 in the pathogenesis of Crohn's disease. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2004, 18: 555-568.
81. Ponsky T, Hindle A, Sandler A. Inflammatory Bowel Disease in the Pediatric Patient. *Surgical Clinics of North America* 2007, 87: 643-658.
82. Poullis A, Foster R, Shetty A, Fagerhol MK, Kendal MA. Bowel Inflammation as Measured by Fecal Calprotectin: A Link between Lifestyle Factors and Colorectal Cancer Risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004, 13: 279-284.
83. Ravikumara M, Sandhu BK. Epidemiology of Inflammatory Bowel Diseases in Childhood. *Indian Journal of Pediatrics* 2006, 73: 717-721.
84. Reese GE, Constantinides VA, Simillis C, Darzi AW, Orchard TR, Fazio VW, Tekkis PP. Diagnostic Precision of Anti-Saccharomyces cerevisiae Antibodies and Perinuclear Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies in Inflammatory Bowel Disease. *The American Journal of Gastroenterology* 2006, 101: 2410-2422.
85. Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, Chalmers DM, Axon AT. Non-pathogenic Escherichia coli versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *The Lancet* 1999, 354: 635-639.
86. Roseth AG, Aadland E, Jahnsen J, Jahnsen J, Raknerud N. Assessment of disease activity in ulcerative colitis by faecal calprotectin, a novel granulocyte marker protein. *Digestion* 1997, 58: 176-180.
87. Roseth AG, Fagerhol MK, Aadland E, Aadland E, Schjonsby H. Assessment of the Neutrophil Dominating Protein Calprotectin in Feces. *Scand J Gastroenterol* 1992, 27: 793-798.
88. 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.
89. Ruemmele FM, El Khoury MG, Talbotec C, Muraige C, Mougnot JF, Schmitz J, Goulet O. Characteristics of Inflammatory Bowel Disease With

- Onset During the First Year of Life. *J Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* 2006, 43: 603-609.
90. Rufo PA, Bousvaros A. Current therapy of inflammatory bowel disease in children. *Paediatr Drugs.* 2006, 8: 279-302.
 91. Rugtveit J, Fagerhol MK. Age-Dependent Variations in Fecal Calprotectin Concentrations in Children. *J Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* 2002, 34: 323-325.
 92. Russell RK, Satsangi J. IBD: a family affair. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2004, 18: 525-539.
 93. Sands BE. Inflammatory bowel disease: past, present, and future. *J Gastroenterol* 2007, 42: 16-25.
 94. Schröder O, Naumann M, Shastri Y, Povse N, Stein J. Prospective evaluation of faecal neutrophil-derived proteins in identifying intestinal inflammation: combination of parameters does not improve diagnostic accuracy of calprotectin. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2007, 26: 1035-1042.
 95. Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, Fear N, Price A, Carpenter L, van Blankenstein M. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut* 1996, 39: 690-697.
 96. Statistisches Bundesamt. Gesundheitswesen. In Statistisches Jahrbuch 1999 Metzler-Poeschel Stuttgart, 1999, Ed.416-443.
 97. Steinbakk M, Naess-Andresen CF, Lingaas E, Dale I, Brandtzaeg P, Fagerhol MK. Antimicrobial actions of calcium binding leucocyte L1 protein, calprotectin. *The Lancet* 1990, 336: 763-765.
 98. Summers RW, Switz DM, Sessions JT Jr., Beckett JM, Best WR, Kern F Jr., Singleton JW. National Cooperative Crohn's Disease Study: results of drug treatment. *Gastroenterology* 1979, 77: 847-869.
 99. Tibble J, Sigthorsson G, Foster R, Sherwood R, Fagerhol M, Bjarnason I. Faecal calprotectin and faecal occult blood tests in the diagnosis of colorectal carcinoma and adenoma. *Gut* 2001, 49: 402-408.
 100. Tibble J, Teahon K, Thjodleifsson B, Roseth A, Sigthorsson G, Bridger S, Foster R, Sherwood R, Fagerhol M, Bjarnason I. A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease. *Gut* 2000, 47: 506-513.
 101. Tomas AB, Vidal MV, Camps AR. Fecal calprotectin as a biomarker to distinguish between organic and functional gastrointestinal disease. *Revista Española de Enfermedades Digestivas* 2007, 99: 689-693.

102. Ton H, Brandsnes O, Dalea S, Holtlund J, Skuibinab E, Schjonsbyc H, Johne B. Improved assay for fecal calprotectin. *Clinica Chimica Acta* 2000, 292: 41-54.
103. Untersteiner H. Biostatistik: Datenauswertung mit Excel und SPSS für Naturwissenschaftler und Mediziner, Wien Facultas Verlags- und Buchhandels AG, 2005.
104. Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. Laboratory markers in IBD: useful, magic, or unnecessary toys? *Gut* 2006, 55: 426-431.
105. Vestergaard TA, Nielsen SL, Dahlerup JF, Hornung N. Fecal calprotectin: assessment of a rapid test. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 2007, 12: 1-7.
106. von Roon AC, Karamountzos L, Purkayastha S, Reese GE, Darzi AW, Teare JP, Paraskeva P, Tekkis PP. Diagnostic Precision of Fecal Calprotectin for Inflammatory Bowel Disease and Colorectal Malignancy. *The American Journal of Gastroenterology* 2007, 102: 803-813.
107. Wilkinson MM, Busuttill A, Hayward C, Brock DJ, Dorin JR, Van Heyningen V. Expression pattern of two related cystic fibrosis-associated calcium-binding proteins in normal and abnormal tissues. *J Cell Sci* 1988, 91: 221-230.
108. Wiskin AE, Wootton SA, Beattie RM. Nutrition Issues in Pediatric Crohn's Disease. *Nutrition in Clinical Practice* 2007, 22: 214-222.
109. Yui S, Nakatani Y, Mikami M. Calprotectin (S100A8/S100A9), an inflammatory protein complex from neutrophils with a broad apoptosis-inducing activity. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 2003, 26: 753-760.

7. Anhang

7.1 Referenzwerte

Tabelle 14: Referenzwerte für Leukozyten, Hämoglobin, CRP, BSG und Albumin nach Geschlecht und Alter

Parameter	Alter	Referenzbereich
Leukozyten (G/l)	2 - 6 Jahre	5,0 - 12,0
	6 - 12 Jahre	4,5 - 11,0
	12 - 18 Jahre	4,5 - 10,5
Hämoglobin (g/dl)	3 - 9 Jahre	11,1 - 14,3
	9 - 13 Jahre	11,8 - 15,0
	M > 13 Jahre	14,0 - 18,0
	W > 13 Jahre	12,0 - 16,0
Albumin (g/dl)	> 1 Jahre	3,5 - 5,0
CRP (mg/dl)		0,5
BSG 60 Min (mm/h)	M 0 - 50 Jahre	15,0
	W 0 - 50 Jahre	25,0

7.2 Aktivitätsindices

7.2.1. Colitis ulcerosa-Aktivitätsindex (UCAI)

Name: _____ Untersuchungsdatum: _____

	Score	Score
1. Anzahl d. Stuhlgangs pro Tag	1 – 10*	
2. Blutige Stühle pro Woche		
- nie	0	
- 1-2/ Woche	1	
- 3-4/ Woche	2	
- täglich	3	
- mit jedem Stuhlgang	4	
3. Körperliche Untersuchung		
- Tenesmen (d.h. krampfartige BS vor Stuhlgang)	1	
- Imperativer Stuhldrang	1	
- Abgang von Schleim	1	
- Stuhlinkontinenz	1	
- Iritis oder Uveitis	3	
- Arthritis oder Gelenkschmerzen	3	
- Erythema nodosum	3	
- Temperatur >38° C	3	
4. Bauchschmerzen		
- keine	0	
- gering	1	
- mäßig	2	
- schwer	3	
5. Allgemeines Wohlbefinden, Leistungsfähigkeit		
- gut	0	
- leicht beeinträchtigt	1	
- mäßig beeinträchtigt	2	
- stark beeinträchtigt	3	
- sehr stark beeinträchtigt	4	
Gesamte Score		

* ein Punkt pro Stuhlgang, nach dem ersten Stuhlgang

Bemerkung:

Unterschrift des Untersuchers:

Examination**Weight**

Weight gain or voluntary weight stable/loss	_____	(0)
Involuntary weight stable, weight loss 1-9%	_____	(5)
Weight loss $\geq 10\%$	_____	(10)

HeightAt Diagnosis:

< 1 channel decrease	_____	(0)
≥ 1 , < 2 channel decrease	_____	(5)
> 2 channel decrease	_____	(10)

or

Follow-up:

Height velocity $\geq -1SD$	_____	(0)
Height velocity < -1SD, > -2SD	_____	(5)
Height velocity $\leq -2SD$	_____	(10)

Abdomen

No tenderness, no mass	_____	(0)
Tenderness, or mass without tenderness	_____	(5)
Tenderness, involuntary guarding, definite mass	_____	(10)

Perirectal disease

None, asymptomatic tags	_____	(0)
1-2 indolent fistula, scant drainage, no tenderness	_____	(5)
Active fistula, drainage, tenderness, or abscess	_____	(10)

Extra-intestinal Manifestations

(Fever $\geq 38,5$ for 3 days over past week, definite arthritis, uveitis, E. nodosum, P. gangrenosum)

None	_____	(0)
One	_____	(5)
\geq Two	_____	(10)

7.2.2. CED-Aktivitätsindex (mLSS)

1. a) BM < 3/day, normal activity	10
b) BM 3-5/day, decreased activity	5
c) BM >5/day, severely restricted activity	1
2. a) No extraintestinal symptoms	5
b) Oral ulcers	3
c) Extraintestinal = skin, eye, liver	1
3. a) No joint symptoms	5
b) Monoarthralgia / arthritis	3
c) Arthritis / multiple joints	1
4. a) Ht > 25% for age	10
b) Ht > 3 - 25%	5
c) Ht < 3%	1
5. a) Wt > 25%	10
b) Wt 3 - 25%	5
c) Wt < 3%	1
6. a) Abdomen normal	10
b) Abdominal mass	5
c) Abdominal tenderness, distension	1
7. a) No perianal disease	10
b) Fissure, tag	5
c) Multiple fissure, fistula, abscess	1
8. a) Hb > 120 g/L	5
b) Hb 100 - 120 g/L	3
c) Hb < 100 g/L	1
9. a) ESR < 20 mm/hr	5
b) ESR 20 - 40 mm/hr	3
c) ESR > 40 mm/hr	1
10. a) WBC < 10,0	5
b) WBC 10 - 20	3
c) WBC > 20	1
11. a) Albumin > 32	10
b) Albumin 25 - 32	5
c) Albumin < 25	1

Date: _____

7.3. Verzeichnis der Tabelle und Diagramme

Tabelle 1:	Neueste Inzidenz-Daten bei Kinder mit CED
Tabelle 2:	Erläuterung der medikamentösen Möglichkeiten bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa
Tabelle 3:	Klassifikation der Krankheitsaktivität nach UCAI- und PCDAI-Werte
Tabelle 4:	Klassifikation der Krankheitsaktivität nach mLSS-Werte
Tabelle 5:	Interpretation des Korrelationskoeffizienten
Tabelle 6:	Aufteilung der Patienten nach Diagnose und Geschlecht
Tabelle 7:	Aufteilung der Patienten nach Krankheitsaktivität (UCAI / PCDAI)
Tabelle 8	Aufteilung der Patienten nach Krankheitsaktivität (mLSS)
Tabelle 9:	Normales FC bei klinischer Remission und klinischem Schub
Tabelle 10:	Pathologisches FC bei klinischer Remission und klinischem Schub
Tabelle 11:	Korrelationskoeffizienten zwischen FC-Werten und Albumin, Hämoglobin, CRP, BSG und Leukozyten bei Colitis ulcerosa und Morbus Crohn
Tabelle 12	Remissions- und Schub-Gruppen nach Diagnose
Tabelle 13:	Sensitivität, Spezifität, PPW und NPW bei Colitis ulcerosa und Morbus Crohn
Tabelle 14:	Referenzwerte für Leukozyten, Hämoglobin, CRP, BSG und Albumin nach Geschlecht und Alter
Diagramm 1:	Diagnostisches Flussdiagramm von CED
Diagramm 2:	Erläuterung der Verdünnungsproportion
Diagramm 3:	Umrechnung der Ergebnisse

7.4. Abbildungsverzeichnis

Die folgenden Abbildungen sind eine Darstellung der Ergebnisse und wurden mit dem SPSS Programm erstellt.

- Abbildung 1: Altersverteilung nach Diagnose
- Abbildung 2: FC bei Colitis ulcerosa und Morbus Crohn nach Geschlecht
- Abbildung 3a: Korrelation FC-UCAI
- Abbildung 3b: Korrelation FC-PCDAI
- Abbildung 3c: Korrelation FC-mLSS bei Colitis ulcerosa
- Abbildung 3d: Korrelation FC-mLSS bei Morbus Crohn
- Abbildung 4a: Korrelation FC-Albumin bei Morbus Crohn
- Abbildung 4b: Korrelation FC-Hb bei Morbus Crohn
- Abbildung 4c: Korrelation FC-CRP bei Morbus Crohn
- Abbildung 4d: Korrelation FC-BSG bei Morbus Crohn
- Abbildung 4e: Korrelation FC-Leukozyten bei Morbus Crohn
- Abbildung 5a: FC-Werte nach Krankheitsaktivität bei Colitis ulcerosa und Morbus Crohn
- Abbildung 5b: FC-Werte nach Krankheitsaktivität bei Colitis ulcerosa und Morbus Crohn
- Abbildung 6a: ROC-Kurve für FC bei Colitis ulcerosa
- Abbildung 6b: ROC-Kurve für FC bei Morbus Crohn

7.5. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Hier ist zuerst Frau Prof. Dr. med. Sibylle Koletzko zu nennen, die mir das interessante Thema überlassen und mich während der gesamten Arbeit kompetent betreut hat. Ihre fachliche Kompetenz und Anregung waren mir ein steter Ansporn und zudem gab sie mir die Gelegenheit meine eigenen Vorstellungen umzusetzen und die Ergebnisse dieser Arbeit auf einer Tagung zu präsentieren.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. med. Christine Prell, die mir mit ihren Erfahrungen immer tatkräftig und zu jeder Zeit zur Seite stand. Geduldig beantwortete sie meine Fragen und ihre Ideen trugen zu Fertigstellung dieser Arbeit bei.

Ohne die sehr gute Zusammenarbeit im Labor mit Frau Hannelore Zeilhofer wäre die Untersuchung der Stuhlproben nicht möglich gewesen.

Ein besonderer Dank gilt auch Frau M.Sc. Katharina Werkstetter, die mich mit ihren umfassenden statistischen Kenntnissen, speziell im SPSS-Programm, unterstützt hat.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Gertraud Ossiander für die Überlassung ihres Arbeitsplatzes und PCs bedanken.

Daneben gebührt den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der pädiatrischen Gastroambulanz der Haunerschen Kinderklinik für ihre immerwährende Hilfsbereitschaft und Kollegialität ein großes Dankeschön. Namentlich sind dies: Frau Dr. med. Andrea Schwarzer, Frau Dr. med. Tina Arenz, Herr PD Dr. med. Philip Bufler, Frau Angelika Rosinski, Frau Dana Popfinger und Frau Ursula Weise.

Zudem habe ich mich immer auf die Unterstützung meines Mannes, Hubert Weidner, verlassen können. Er hat mich bestärkt, wenn ich selbst an der erfolgreichen Fertigstellung meiner Doktorarbeit gezweifelt habe.

Zuletzt bedanke ich mich bei meinen Eltern, die mir meine medizinische Ausbildung ermöglicht haben.

7.6. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eide statt, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt habe. Alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen.

Ich erkläre dass, die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Mittwoch, den 25. Juni 2008

Josivânia Maria Pereira da Silva

Curriculum vitae

Josivânia Maria Pereira da Silva

Neufarner Straße 62 a

D – 85586 Poing

Telefon: 08121 255319

E-mail: josivaniamaria@wugnet.de

Persönliche Daten

Name	<u>Josivânia</u> Maria Pereira da Silva
Geburtsdatum	13. Februar 1971
Geburtsort	Sapé, Paraíba, Brasilien
Staatsangehörigkeit	deutsch und brasilianisch
Familienstand	verheiratet
Berufserlaubnis	11.Juli 2005 – 10. Juli 2009

Schulischer Werdegang

02.1978 – 12.1981	Grundschule Sapé
02.1982 – 12.1985	Gymnasium Sapé
02.1986 - 12.1988	Gymnasium João Pessoa
12.1989	Aufnahmeprüfung für die Universität Paraíba

Berufsausbildung

03.1990 – 12.1995	Studium der Allgemeinmedizin an der Universität Paraíba
01.1996 – 11.1996	Praktisches Jahr der Allgemeinmedizin an der Universität Pernambuco
02.1997	Aufnahme in den Nationalen Rat für Medizin (Ärzteausweis)
03.1997 – 03.1999	Qualifizierung zur Fachärztin auf dem Gebiet der Kindermedizin an der Universität Paraíba

11.1999 – 03.2000	Grundkurs: Gesundheit in der Familie, Iguatu, Ceará, Brasilien
04.2000	Fortbildung: Schwerpunkt Kinderkrankheiten im Kinderhospital Albert Sabin, Fortaleza, Ceará, Brasilien
seit 07.2006	Promotion auf dem Gebiet der pädiatrischen Gastroenterologie mit dem Thema: „Stellenwert von fäkalen Calprotectin bei Kindern über 3 Jahren chronisch-entzündlicher Darmerkrankung“ an der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München
03/2008	Fortbildung: Grundkurs Allgemeine Sonographie im Kindesalter, Brixen, Italien

Berufliche Erfahrung

04.1999 – 12.2003	Ärztin im Familiengesundheitsprogramm der Stadt Iguatu, Ceará, Brasilien
04.1999 – 11.2003	Kinderärztin im Bereitschaftsdienst der Kindernotfallklinik Dr. Manoel Batista de Oliveira, Iguatu, Ceará, Brasilien
01.2000 – 11.2003	Kinderärztin in der Ambulanz und in der Kinderstation des Hospitals Dr. Thadeu de Paulo Brito, Cariús, Ceará, Brasilien
07.2006 bis heute	Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung Gastroenterologie des Dr. von Haunersches Kinderspitals München

Sonstiges

Wissenschaftliche Arbeiten	J. M. Pereira da Silva, C. Prell, C. Waschk, P. Bufler, T. Arenz, M. Alberer, S. Koletzko. <i>Stellenwert der Calprotectin-Messung im Stuhl von Kindern ≥ 3 Jahre mit Verdacht auf CED.</i> 103. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin
----------------------------	--

(DGKJ). Nürnberg, 13.-16. September 2007. Abstract in
Monatsschr Kinderheilkd; 2007, 155, Suppl. 3: 125

C. Prell, C. Waschk, J. M. Pereira da Silva, P. Bufler, T.
Arenz, M. Alberer, S. Koletzko. *Diagnostic Value of
Fecal Calprotectin in Children with suspected or proven
Inflammatory Bowel Disease*. 15th United European
Gastroenterology Week. Paris, 27.-31. Oktober 2007.
Abstract in Gut; 2007, 56 (3), Suppl. 3 (CD-ROM)