

Aus der Medizinischen Poliklinik  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. K. Wilms

**Differentialdiagnose der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen  
Morbus Crohn und Colitis ulcerosa anhand der Autoantikörper  
pANCA, PAK und ASCA**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
Rainer Hufnagl  
aus Kitzingen

Würzburg, Juli 2002

Referent: Professor Dr. med. M. Scheurlen  
Koreferent: Professor Dr. med. W. Scheppach  
Dekan: Professor Dr. med. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 15. November 2002

Der Promovend ist Arzt

1	Einleitung.....	1
1.1	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen .....	1
1.1.1	Definition .....	1
1.1.2	Geschichtlicher Überblick .....	1
1.1.3	Epidemiologie .....	1
1.1.4	Ätiologie und Pathogenese .....	2
1.1.4.1	Genetische Faktoren .....	2
1.1.4.2	Exogene Faktoren .....	3
1.1.4.3	Immunologie .....	3
1.1.5	Klinik .....	5
1.2	Autoantikörper bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen .....	7
1.2.1	Antikörper gegen neutrophile Granulozyten .....	7
1.2.2	Antikörper gegen Pankreassekret .....	8
1.2.3	Antikörper gegen <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	9
1.3	Zielsetzung.....	10
2	Material und Methoden.....	11
2.1	Materialien .....	11
2.1.1	Patientenseren .....	11
2.1.2	Antiseren .....	12
2.1.3	Zellen und Gewebe .....	12
2.1.4	Chemikalien .....	13
2.1.5	Geräte.....	14
2.2	Versuchsdurchführung.....	15
2.2.1	Herstellung von Zell- bzw. Gewebepreparaten für die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie .....	15
2.2.1.1	Herstellung von Granulozytenpreparaten .....	15
2.2.1.2	Herstellung von Pankreasschnitten.....	16
2.2.1.3	Herstellung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Hefezellpreparaten.....	16
2.2.2	Mannanextraktion aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> für den Elisa-Test ....	17
2.2.3	Antikörperdetektion .....	18
2.2.3.1	Indirekte Immunfluoreszenztechnik zur Detektion von pANCA, PAK und ASCA.....	18

2.2.3.2	ELISA-Test zur Detektion von ASCA .....	20
2.3	Statistische Auswertung.....	21
3	Ergebnisse.....	22
3.1	Autoantikörper gegen neutrophile Granulozyten im indirekten Immunfluoreszenztest.....	22
3.1.1	Prävalenz von pANCA bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen .....	22
3.1.2	Regionale Unterschiede in der Prävalenz von pANCA.....	24
3.2	Autoantikörper gegen Pankreassekret im indirekten Immunfluoreszenztest .	25
3.2.1	Prävalenz von PAK bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen .....	25
3.3	Autoantikörper gegen <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	28
3.3.1	Etablierung von ASCA im indirekten Immunfluoreszenztest .....	28
3.3.1.1	Prävalenz von ASCA bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und anderen Autoimmunerkrankungen .....	28
3.3.1.2	Vergleich verschiedener Stämme von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	30
3.3.1.3	Antikörpertiter von ASCA bei Morbus Crohn Patienten.....	31
3.3.1.4	Antikörperklassen und Subklassen von ASCA bei Morbus Crohn Patienten .....	31
3.3.2	Etablierung eines ASCA-ELISA-Tests .....	32
3.3.2.1	Prävalenz von ASCA bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen .....	32
3.3.2.2	Vergleich der ELISA-Werte mit den Ergebnissen der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie .....	34
3.3.2.3	Vergleich unterschiedlicher Mannanpräparate .....	36
3.3.2.4	Abhängigkeit des ASCA-Titers von der Krankheitsaktivität .....	38
3.4	Bedeutung einer kombinierten serologischen Untersuchung für die Differentialdiagnose chronisch entzündlicher Darmerkrankungen .....	39
4	Diskussion.....	41
4.1	Autoantikörper gegen <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	41
4.2	Autoantikörper gegen neutrophile Granulozyten.....	45
4.3	Autoantikörper gegen Pankreassekret .....	47

4.4	Bedeutung einer kombinierten serologischen Untersuchung für die Differentialdiagnose chronisch entzündlicher Darmerkrankungen .....	48
5	Zusammenfassung .....	50
6	Literaturverzeichnis .....	52

# 1 Einleitung

## 1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

### 1.1.1 Definition

Unter dem Begriff der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) sind im engeren Sinne entzündliche Erkrankungen zusammengefaßt, deren Ätiologie und Pathogenese bis heute noch nicht im Einzelnen geklärt sind.

Die wichtigsten Vertreter sind der **Morbus Crohn (MC)** und die **Colitis ulcerosa (CU)**, die in ca. 90% der Fälle anhand klinischer, makromorphologischer und histologischer Kriterien unterschieden werden können.

### 1.1.2 Geschichtlicher Überblick

Die Krankheit, die wir heute als **Morbus Crohn** bezeichnen, wurde 1932 von Burril Crohn, G.D. Oppenheimer und L. Ginzburg vom Mount Sinai Hospital in New York erstmals anhand von Krankenbeobachtungen als „Ileitis terminalis“ oder „Ileitis regionalis“ beschrieben [1].

Der Begriff **Colitis ulcerosa** wurde erstmalig 1859 von dem Pathologen Sir Samuel Wilks beschrieben, der bei Patienten einen entzündlich geröteten, oft mit Ulzera übersäten Dickdarm beobachten konnte [2].

### 1.1.3 Epidemiologie

Die Inzidenz von **Morbus Crohn** hat in den letzten 40 Jahren in den Industrienationen deutlich zugenommen und liegt derzeit bei 3-6 Neuerkrankungen/10<sup>5</sup> EW/Jahr.

Die Erkrankungsrate in Deutschland (alte Länder) liegt mit etwa 4 Neuerkrankungen in diesem Bereich [3]. Der Inzidenzanstieg fand hier vorwiegend in den 70er Jahren statt.

Die Neuerkrankungsrate an **Colitis ulcerosa** ist dagegen im Langzeitverlauf relativ konstant geblieben mit erheblichen regionalen Schwankungen (ca. 10 Neuerkrankungen/10<sup>5</sup> EW/Jahr in Schweden, < 1 Neuerkrankung/10<sup>5</sup> EW/Jahr in Japan und Südafrika; in Deutschland ca. 2 Neuerkrankungen/10<sup>5</sup> EW/Jahr [3]).

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen treten vor allem bei jungen Menschen auf (Gipfel in der 2. und 3. Lebensdekade), beide Geschlechter sind gleich häufig betroffen.

#### **1.1.4 Ätiologie und Pathogenese**

##### **1.1.4.1 Genetische Faktoren**

Es gibt verschiedene Beobachtungen, die auf einen genetischen Hintergrund dieser Erkrankungen schließen lassen.

Diverse Familienstudien zeigten, daß Angehörige von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ein erhöhtes Risiko haben, selbst zu erkranken.

Bei Angehörigen ersten Grades lagen die Prävalenzraten für Morbus Crohn zwischen 3% [4] und 20% [5], in der Mehrzahl der Studien bei 8% - 10% [6, 7, 8].

Bennet et al. zeigten in einer Studie aus dem Jahr 1988, daß Kinder von Eltern, die beide an CED erkrankt sind, ein stark erhöhtes Risiko für diese Erkrankung haben [9].

Bei Morbus Crohn-Patienten mit einer Krankheitsmanifestation vor dem 20. Lebensjahr fanden sich jeweils höhere Prävalenzwerte bei den Verwandten. So waren Angehörige ersten Grades bis zu 39% betroffen [10], Geschwister bis zu 5% und Eltern bis zu 9% [11].

Ebenfalls höhere Prävalenzangaben fanden sich bei Ashkenazy-Juden in den USA [12].

Im Gegensatz zu Blutsverwandten manifestieren sich chronisch entzündliche Darmerkrankungen nur selten bei Ehepartnern [13].

Einen weiteren wichtigen Hinweis auf genetische Einflüsse gaben Zwillingsstudien, da sich besonders für Morbus Crohn eine hohe Konkordanz bei eineiigen Zwillingen zeigte (MC ca. 67%, CU ca. 20%), so daß man vor allem für diese Erkrankung einen genetischen Hintergrund annimmt. Zweieiige Zwillinge waren sehr viel seltener konkordant [14].

Purmann et al. zeigten, daß beim Morbus Crohn kein Mendel'scher Erbgang vorliegt [15]. Als mögliche Vererbungsmodelle kommen ein multifaktoriell polygener Erbgang oder ein rezessives Gen mit niedriger Penetranz in Frage. Als mögliche Genorte wurden die Chromosomen 2, 6, 12 und 16 beschrieben [16].

Einige Studien fanden eine HLA-Assoziation, jedoch konnte daraus noch kein ätiologischer Zusammenhang abgeleitet werden.

#### **1.1.4.2 Exogene Faktoren**

Der bedeutsamste exogene krankheitsassoziierte Faktor ist das Zigarettenrauchen. Während die Colitis ulcerosa bei Rauchern signifikant seltener ist als bei Nichtrauchern und unter Nikotinkonsum Erkrankungsschübe abklingen können, stellt das Rauchen einen wichtigen Risikofaktor für Morbus Crohn dar.

Zumindest beim Morbus Crohn scheint es einen Zusammenhang mit der Lebensweise in den Industrienationen zu geben. Diätetische (z.B. hoher Zuckerkonsum, industriell zubereitete Nahrungsfette) und infektiöse (z.B. atypische Mykobakterien, Masernvirus) Faktoren wurden diskutiert, konnten aber nie definitiv belegt werden.

#### **1.1.4.3 Immunologie**

Die Funktion der einzelnen Komponenten des intestinalen Immunsystems unter der Entzündung ist vielfach analysiert worden. Dabei fand sich eine maximale Aktivierung aller Teile der Entzündungskaskade. Offenbar liegt ein Defekt im Bereich des intestinalen Immunsystems vor, der das „Abschalten“ einer an sich physiologisch ablaufenden Immunreaktion auf einen Stimulus verhindert. Die lokale Zerstörung des Darms und die klinische Symptomatik sind Folge der während der ungezügelten Entzündungsreaktion gebildeten Mediatoren.

Im Bereich der T-Zell-vermittelten Immunreaktion sind eine erhöhte Frequenz aktivierter T-Zellen sowie eine erhöhte Proliferationsrate mukosaler T-Zellen von Patienten mit chronische entzündlichen Darmerkrankungen gegenüber bakteriellen Antigenen beschrieben worden [17].



Bedeutende Erkenntnisse über die Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen konnten durch Tiermodelle gewonnen werden. Das Fehlen von unterschiedlichen Zytokinen (z.B. Interleukin 2 oder Interleukin 10) als auch der Zelltransfer von CD4<sup>+</sup>-T-Zellsubsets konnten bei Mäusen eine chronische Colitis auslösen. Bei den meisten In-vivo-Modellen zeigten sich keine Erkrankungszeichen, wenn die Tiere in keimfreier Umgebung gehalten wurden. Hingegen konnten bei einer Reihe von Mausmodellen hohe Antikörpertiter gegen diverse bakterielle Antigene gefunden werden. Auch dies kann als wichtiger Hinweis für eine überschiessende Immunreaktion gegenüber der intestinalen Bakterienflora gewertet werden, die möglicherweise durch einen Verlust der immunologischen Toleranz (oralen Toleranz) zustande kommt.

Letztendlich geht man heute davon aus, daß genetische Faktoren den Boden für noch nicht identifizierte Umwelteinflüsse bereiten, die über eine gestörte Immunregulation zur Entwicklung einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung führen.

### 1.1.5 Klinik

Wichtigste klinische Symptome beim **Morbus Crohn** sind Bauchschmerzen, am häufigsten im rechten Unterbauch lokalisiert und Durchfälle (jeweils mehr als 70%), gefolgt von Gewichtsabnahme (ca. 50%) und Fieber (ca.35%). Makroskopisch sichtbarer Blutabgang mit dem Stuhl ist seltener als bei Colitis ulcerosa (ca. 20%).

Der Morbus Crohn kann grundsätzlich jeden Abschnitt des Gastrointestinaltraktes befallen. Das Befallsmuster ist meist segmental, die häufigste Lokalisation ist der Ileocecalbereich.

Histopathologisch handelt es sich um eine transmurale Entzündung; makroskopisch entsprechen ihr als fokale Minimalveränderungen aphthöse Läsionen. Bei schwerer Entzündung findet man isoliert oder in Gruppen stehend tiefe rund/ovale oder längsgestellt fissurale Ulzera. Bei chronischem Befall wird ein „Pflastersteinrelief“ beobachtet. Pathognomonisch und auch beweisend ist der Nachweis epitheloidzelliger Granulome, der allerdings nur in 20-60% der Fälle gelingt.

Komplikationen des Morbus Crohn im Analkanal und perianal sind häufig. Jeweils etwa 20-30% der Patienten leiden irgendwann im Krankheitsverlauf an Analfissuren, perianalen Fisteln oder Abszessen. Stenosen und Strikturen im Analkanal sind beim Morbus Crohn des Kolons besonders häufig.

Da es sich um eine transmurale Entzündung handelt, kann es zur Penetration in die Umgebung, meist mit zusätzlicher Superinfektion, kommen. Dementsprechend treten intraabdominale Fistel- und Abszeßbildungen auf.

Bei der **Colitis ulcerosa** ist das häufigste klinische Symptom Durchfall vom Colitistyp (eher kleinvolumig, oft mit Tenesmen), typischerweise mit Schleim- und/oder Blutbeimengungen. Bauchschmerzen sind deutlich seltener als beim Morbus Crohn, Fisteln oder Fissuren kommen nahezu nie vor.

Die Entzündung beginnt in der Regel im Rektum, breitet sich kontinuierlich proximal auf den übrigen Dickdarm (selten auch auf das terminale Ileum im Sinne einer „Backwash-Ileitis“) aus und ist auf Mukosa und Submukosa beschränkt.

Bei leichteren Formen werden endoskopisch vor allem diffuse Rötung und leichtes Ödem der Darmschleimhaut sowie eine vermehrte Verletzlichkeit gesehen. Die Gefäßzeichnung ist verwaschen oder aufgehoben. Mit zunehmendem Entzündungsgrad kommen oberflächliche Exudate, Spontanblutungen und flache Ulzerationen hinzu. In schweren Fällen kann die Haustrierung komplett aufgehoben und der Dickdarm stark verkürzt sein; typische Spätveränderungen sind Pseudopolypen.

Histologisch fehlt eine ähnlich pathognomonische Veränderung wie beim Morbus Crohn. Man findet ein gemischtes entzündliches Infiltrat, häufig, aber nicht beweisend, sind Granulozytenansammlungen in den Krypten (Kryptenabszesse).

Im Unterschied zum Morbus Crohn ist nach leichteren Schüben einer Colitis ulcerosa sowohl makroskopisch als auch histologisch eine *restitutio ad integrum* möglich.

Sowohl perianale Veränderungen als auch Stenosen sind bei der Colitis ulcerosa sehr selten, perianale Blutungen allerdings viel häufiger als beim Morbus Crohn.

Das toxische Megakolon ist die gefährlichste Komplikation der Colitis ulcerosa. Es handelt sich dabei um eine schwere Motilitätsstörung des entzündeten Darms mit konsekutiver massiver Dilatation und systemischen Folgen.

Darmperforationen sind bei der Colitis ulcerosa wesentlich häufiger als beim Morbus Crohn und meist Folge eines toxischen Megakolons.

Bei langandauerndem und progredientem Verlauf kann es bei beiden Erkrankungen zur Karzinomentstehung kommen, wobei das Risiko bei Colitis ulcerosa mit Pankolitis am höchsten ist. Sowohl beim Morbus Crohn, als auch bei der Colitis ulcerosa entwickeln sich gehäuft extraintestinale Manifestationen an den Knochen, Gelenken, der Haut sowie an der Leber und den Gallenwegen, deren Ätiologie wie die Grunderkrankung bislang noch weitgehend ungeklärt ist.

## **1.2 Autoantikörper bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen**

Die ersten Autoantikörper bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wurden 1959 von Broberger und Perlmann beschrieben [18]. In den letzten 40 Jahren wurde eine Vielzahl von Antikörpern untersucht, wobei die Mehrzahl allerdings durch mangelnde Krankheitsspezifität charakterisiert war. Keiner dieser Antikörper spielte eine direkte Rolle in der Ätiopathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen. Auf die in den letzten Jahren beschriebenen krankheitsspezifischen Autoantikörper soll im Folgenden näher eingegangen werden.

### **1.2.1 Antikörper gegen neutrophile Granulozyten**

Saxon et al. beschrieben 1990 erstmals zytoplasmatische Antikörper gegen neutrophile Granulozyten mit einem perinukleären Fluoreszenzmuster (pANCA, siehe 3.1.1. Abb. 1) im Serum von 68% der Patienten mit Colitis ulcerosa [19]. Duerr et al. fanden diese Antikörper auch bei 65% der Patienten mit primär sklerosierender Cholangitis (PSC) [20].

Eine Vielzahl von isolierten Granulozytenantigenen wurden auf ihre Reaktivität gegenüber pANCA getestet. Antigene wie Myeloperoxidase, Elastase, Cathepsin C und G, Glukosidase, Galaktosidase, Laktoferrin, bactericidal permeability increasing protein (BPI), Histone, Mastzell-Antigene, E. coli Protein und andere wurden untersucht, aber von keinem ließ sich beweisen, alleiniges Zielantigen für pANCA zu sein [21, 22]

In den meisten Studien konnte man keine Korrelation von pANCA mit der Krankheitsaktivität oder der Ausdehnung einer Colitis ulcerosa nachweisen; jedoch scheint pANCA bei CU-Patienten mit schwerem Krankheitsverlauf häufiger vorzukommen und nach Kolektomie zu persistieren [23]. Diese Erkenntnisse lassen vermuten, das pANCA nicht nur ein Epiphenomen der intestinalen Entzündung sind.

Nach einer anderen Studie scheint pANCA häufiger bei Patienten mit Colitis ulcerosa aufzutreten, die nach Kolektomie eine Pouchitis entwickeln [24].

Diesem Antikörper kommt möglicherweise auch eine Rolle als genetischer Marker zu, da er auch bei gesunden Familienangehörigen gefunden wurde [25, 26], wenngleich diese Befunde von anderen Untersuchern nicht nachvollzogen werden konnten [27, 28].

### **1.2.2 Antikörper gegen Pankreassekret**

Autoantikörper gegen Pankreassekret (PAK) wurden von Stöcker et al. erstmals 1984 beschrieben [29]. Sie waren spezifisch bei einem Teil der Patienten mit Morbus Crohn zu finden.

Das Antigen, mit dem PAK reagieren, wurde im Pankreassekret lokalisiert, es handelt sich um ein Trypsin-sensitives Makromolekül, das nicht identisch mit den bekannten exokrinen Pankreasenzymen ist [30].

Zwischenzeitlich ist zwischen zwei Subtypen dieses Antikörpers unterschieden worden (siehe 3.2.1. Abb. 2 und 3), wobei PAK I (großtropfig) andere Antigenepitope erkennen als PAK II (feingranulär).

PAK wurde bei einer Subgruppe von MC-Patienten mit exokriner Pankreasinsuffizienz signifikant häufiger gefunden als bei Patienten ohne Pankreasinsuffizienz [31]. Somit könnten PAK in der Pathogenese der Pankreasinsuffizienz (z.B. über eine chronische Pankreatitis) eine Rolle spielen.

Zwischen klinischen Parametern, wie Aktivität der Erkrankung, Ausbreitung, Auftreten von extraintestinalen Manifestationen oder Fisteln und PAK-Positivität besteht keine Korrelation [30].

Als genetischer Marker scheint PAK nach einer Familienstudie von Seibold et al. nicht geeignet zu sein [32].

### 1.2.3 Antikörper gegen *Saccharomyces cerevisiae*

ASCA bezeichnet Antikörper, die gegen den Hefepilz *Saccharomyces cerevisiae* gerichtet sind (siehe 3.3.1.1. Abb 4). Dieser einzellige Organismus, der allgemein als apathogen eingestuft wird, kommt in der Natur auf Pflanzen, Früchten und im Boden vor. Seit Generationen wird *Saccharomyces cerevisiae* zur Herstellung von Backwaren, Bier, Wein und Sekt verwendet.

Main et al. beschrieben 1988 als erste diesen Antikörper als spezifisch für Morbus Crohn [33].

Als wichtigste antigene Determinante der Hefezelle wurden von McKenzie et al. die Mannane genannt [34]. Mannoproteine bilden zusammen mit den Glukanen den Hauptbestandteil der Hefezellwand.

Das Antigen, mit dem ASCA reagieren, wurde 1996 von Sendid et al. genauer charakterisiert. Es entspricht einem Phosphopeptidomannan, wobei das eigentliche Epitop wahrscheinlich eine Mannotetraose ist [35].

### 1.3 Zielsetzung

Die Differentialdiagnose zwischen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa kann in der Regel anhand klinischer, endoskopischer, radiologischer und histologischer Befunde gestellt werden. In ca. 10 % der Fälle kann allerdings bei der Erstdiagnose einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung, insbesondere bei reinem Kolonbefall, zwischen beiden Formen nicht entgültig differenziert werden und es wird die Diagnose einer Colitis indeterminata erhoben. Da bei der Colitis ulcerosa gelegentlich die Kolektomie mit Anlage eines ileoanalen Pouches durchgeführt wird, muß die Differentialdiagnose zuverlässig gesichert werden, da sich beim Morbus Crohn die Durchführung einer solchen Operation aufgrund der konsekutiven schweren Pouchitis verbieten würde. Kommt es nach langjährigem Bestehen einer CED zu einer späten Erstdiagnose, kann die Einordnung des Krankheitsbildes bei ausgeprägten narbigen Veränderungen mitunter schwierig sein. Aus diesem Grunde wäre es hilfreich, in Analogie zu anderen Autoimmunerkrankungen **serologische Marker** in die Diagnosestellung mit einbeziehen zu können.

Für die vorliegende Studie wurden folgende Ziele definiert:

- 1.) Etablierung eines Immunfluoreszenztests zum Nachweis von ASCA
- 2.) Etablierung eines ELISA-Tests zum Nachweis von ASCA
- 3.) Untersuchung und Diskussion der Bedeutung der Autoantikörper pANCA, PAK und ASCA im Einzeltest bzw. in Kombination miteinander für die Differentialdiagnose Morbus Crohn / Colitis ulcerosa.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Patientenseren

Insgesamt wurden 510 Seren von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) im Rahmen einer retrospektiven Blindstudie untersucht.

Die Diagnose **Morbus Crohn** wurde bei 372 Patienten (172 Frauen, 200 Männer) anhand endoskopischer, histologischer und klinischer Kriterien gestellt [36].

Die Krankheitsaktivität wurde unter Verwendung des Crohn's disease activity index (CDAI) ermittelt [37].

Die Diagnose **Colitis ulcerosa** wurde bei 138 Patienten (70 Frauen, 68 Männer) anhand der Kriterien von Truelove und Witts [38] etabliert.

Das Alter der Patienten variierte von 18 bis 76 Jahren.

Die Patienten waren nach keinen besonderen Kriterien ausgewählt worden.

Die Patientenseren stammten aus den Ambulanzen der Medizinischen Poliklinik der Universität Würzburg, den Medizinischen Universitätskliniken Tübingen und Ulm sowie dem Cedars Sinai Medical Center, Los Angeles, USA.

Als **Kontrollseren** wurden neben 30 Seren von gesunden Personen (Blutspender), 38 Seren von Patienten mit folgenden Autoimmunerkrankungen verwendet:

Vaskulitiden (n = 13), M. Wegener (n = 5), Rheumatoide Arthritis (n = 5), undifferenzierte Kollagenosen (n = 5), Systemischer Lupus erythematodes (n = 4), Autoimmunhepatitis (n = 2), Hashimoto-Thyreoiditis (n = 1), CREST-Syndrom (n = 1), M. Basedow (n = 1), Sklerodermie (n = 1).

Die Seren wurden bis zu ihrer Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.



### 2.1.2 Antiseren

Für die indirekte Immunfluoreszenztechnik sowie für den ELISA-Test wurden folgende Antiseren verwendet:

- Antihuman IgA, IgG, IgM, Kappa, Lambda, polyvalent, FITC-konjugiert, vom Kaninchen; Firma DAKO Diagnostika, Hamburg
- Antihumanseren, die mit den Antikörperklassen IgA, IgG, IgM monospezifisch reagieren, FITC-konjugiert, vom Kaninchen; Firma DAKO
- Antihumanseren, die mit den IgG-Isotypen IgG1 und IgG2 monospezifisch reagieren, FITC-konjugiert, aus Aszitesflüssigkeit der Maus; Firma Sigma, Deisenhofen
- Antihuman IgA, IgG, IgM, Kappa, Lambda, polyvalent, Peroxidase-konjugiert, vom Kaninchen; Firma DAKO

### 2.1.3 Zellen und Gewebe

Für die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie und die Mannanextraktion wurden folgende Zellen und Gewebe verwendet:

- Zum Nachweis von pANCA **neutrophile Granulozyten** aus menschlichem Vollblut der Blutgruppe 0. Als Spender dienten gesunde Personen im Alter von 20 bis 30 Jahren. Das Blut wurde mit Citrat ungerinnbar gemacht und innerhalb von fünf Stunden verarbeitet (Granulozytenisolation siehe 2.2.1.1.).
- Zum Nachweis von PAK humanes **Pankreasgewebe** der Blutgruppe 0. Das Pankreasgewebe wurde binnen einer Stunde nach chirurgischer Resektion in 2-Methylbutan gegeben, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Kleinere Objekte wurden in Tissue-Tek gebettet.
- Zum Nachweis von ASCA folgende fünf verschiedene Stämme des Hefepilzes **Saccharomyces cerevisiae**:

Wenn nicht anders angegeben wurde zur Detektion von ASCA und zur Mannanextraktion *Saccharomyces cerevisiae cerevisiae* (Backhefe Vital Gold, Deutsche Hefewerke Hamburg/Nürnberg) verwendet.

Um die Eignung als Antigen zu ermitteln wurden vier weitere Stämme von *Saccharomyces cerevisiae* getestet: Obergährige Bierhefe (*Saccharomyces cerevisiae cerevisiae*), Untergährige Bierhefe (*Saccharomyces cerevisiae* var. *carlsbergensis*); Würzburger Hofbräu, Würzburg. Weinhefe 1 (*Saccharomyces cerevisiae cerevisiae*), Handelsname Lalvin E, Weinhefe 2 (*Saccharomyces cerevisiae* var. *bayanus*), Handelsname Uvaferm CM.

Die Hefen wurden bis zur Anzucht bei 4°C gelagert.

#### 2.1.4 Chemikalien

Es folgt eine Auswahl der wichtigsten verwendeten Chemikalien. Alle darüber hinaus verwendeten chemischen Substanzen waren allgemein gebräuchliche Laborchemikalien und vom höchsten verfügbaren Reinheitsgrad.

- Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,4  
(140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)
- Mono-Poly-Resolving Medium (MPRM), Ficoll-Hypaque, steril, Dichte 1,114;  
Firma ICN Biomedicals, Eschwege
- Tissue-Tek Einbettmittel; Firma Miles, Naperville, USA
- Yeast Extrakt; Firma DIFCO Laboratories, Detroit, USA
- Bacto Peptone; Firma DIFCO
- Bacto-Agar; Firma DIFCO
- Immuno-Mount Eindeckmedium; Firma Shandon, Frankfurt am Main
- Fehlingsche Lösung: Fehling I (0,28 M Kupfer(II)sulfat-5-hydrat) und  
Fehling II (1,2 M Kaliumnatriumtartrat-4-hydrat,  
2,5 M Natriumhydroxid) kurz vor Gebrauch zusammengeben
- Rinderserumalbumin (BSA): Albumin, Bovine, Fraction V, Minimum 98%;  
Firma Sigma, Deisenhofen
- Tween 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat); Firma Sigma

- TMB Microwell Peroxidase Substrate System; Firma Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, USA
- Mannan from *Saccharomyces cerevisiae*, Bestellnummer M 3640, Firma Sigma

### 2.1.5 Geräte

- Fluoreszenzmikroskop: Forschungsmikroskop Universal mit Fluoreszenz-Aufflichtkondensator III RS, Filtersatz blau 450-490, Farbteiler FT 510, Sperrfilter LP 515 und Quecksilber-Höchstdrucklampe HBO 50 W/ac, Aufsetzkamera MC 63, Objektiv Plan-Neofluar 16/0,50; Firma Zeiss, Oberkochen
- Kryotom: Cryocut E; Firma Reichert-Jung, Deutschland
- Zytozentrifuge: Cytospin 2, mit Kammern, Objektträgerhalterungen und Zytfilterkarten (76 / 26 mm); Firma Shandon, Frankfurt am Main
- Zentrifuge: Rotanta / RPC; Firma Hettich, Tuttlingen
- Zentrifuge: Avanti J-25; Firma Beckman Instruments, Palo Alto, USA
- Autoklav: Varioklav Dampfsterilisator; Firma H+P Labortechnik, Oberschleißheim
- Brutschrank: UM 500; Firma Memmert, Schwabach
- Platten-Lesegerät: Dynatech MR 5000; Firma Dynatech, Denkendorf mit ELISA-Platten Microton, 96 Wells, F-Form, hohe Bindungskapazität; Firma Greiner Labortechnik, Frickenhausen

## 2.2 Versuchsdurchführung

### 2.2.1 Herstellung von Zell- bzw. Gewebepräparaten für die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie

#### 2.2.1.1 Herstellung von Granulozytenpräparaten

Für die **Granulozytenisolation** aus menschlichem Vollblut (siehe 2.1.3.) wurde Mono-Poly-Resolving Medium (MPRM) verwendet, eine Lösung aus Ficoll 400 und Hypaque 85, die eine Trennung von mononukleären Leukozyten von polymorphkernigen Leukozyten in einem Zentrifugationsschritt erlaubt.

Es wurden 3 ml MPRM in ein dünnes 100x11/12 mm Zentrifugationsröhrchen gegeben und vorsichtig mit 3,5 ml Blut überschichtet. Anschließend wurde bei 400g ohne Bremse 30 min zentrifugiert (Hettich Zentrifuge Rotanta/RPC). Dabei bildeten sich drei Fraktionen (von oben): Mononukleäre Leukozyten, neutrophile Granulozyten und das Erythrozytenpellet. Die Banden bis zu den Granulozyten wurden vorsichtig abpipettiert und die Granulozyten mit einer Pasteurpipette in ein weiteres Zentrifugationsröhrchen überführt.

Zum Waschen der Zellen wurde das Zentrifugationsröhrchen mit PBS (pH 7,4) aufgefüllt und 5 min bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt, die Zellen am Boden des Gefäßes in PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert.

Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, die Zellen danach in PBS einpipettiert.

Zur **Herstellung von Zytocentrifugenpräparaten** aus neutrophilen Granulozyten wurden Zellsuspensionen aus PBS und Granulozyten in einer Konzentration von ca.  $5 \times 10^3$ /ml hergestellt. Die Zählung der Zellen zur Konzentrationsbestimmung erfolgte nach Pappenheim-Färbung in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop.

Nun wurde jede Kammer der Zytozentrifuge mit 100 µl der Zellsuspension beladen, anschließend wurde mit 600 Umdrehungen/min 10 min zentrifugiert.

Die auf den Objektträger zentrifugierten Zellen wurden luftgetrocknet und anschließend 4 min in 4°C kaltem Ethanol (95%) fixiert. Nach erneutem Lufttrocknen wurden die Objektträger in Frischhaltefolie verpackt und bei –20°C gelagert.

### **2.2.1.2 Herstellung von Pankreasschnitten**

Als Antigen wurde humanes Pankreasgewebe der Blutgruppe 0 verwendet (siehe 2.1.3.). Das gefrorene Gewebe wurde auf dem Schneidetisch des Kryotoms fixiert, bei einer Temperatur von –16 bis –20°C in 5 µm dicke Präparate geschnitten und auf Objektträger aufgebracht. Danach wurden die Präparate luftgetrocknet und in Aceton/Chloroform (1/1; v/v) über 4 min bei 4°C fixiert.

Die Objektträger wurden in Frischhaltefolie verpackt und bei –20°C gelagert.

### **2.2.1.3 Herstellung von *Saccharomyces cerevisiae* Hefezellpräparaten**

Die **Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae*** wurde auf YEPD (yeast extract-peptone-dextrose) – Agarplatten durchgeführt. Zur Herstellung des Kulturmediums wurden 1,1% Hefeextrakt, 2,2% Bacto-Pepton, 0,0055% Adenin-Sulfat und 2% Bacto-Agar in einem Erlenmeyerkolben vermengt und autoklaviert; 2% Glukose wurde nach separater Autoklavierung zugegeben. Nach Abkühlen wurde das Medium zu Kulturplatten gegossen und eine Suspension von Hefezellen in destilliertem Wasser ausgestrichen. Anschließend erfolgte die Bebrütung bei 30°C über mindestens 24 Stunden in einem Brutschrank. Die bebrüteten Agarplatten wurden bis zur weiteren Verwendung mit Parafilm verschlossen maximal eine Woche bei 4°C aufbewahrt.

Zur **Herstellung von Zytozentrifugenpräparaten** wurden *Saccharomyces cerevisiae* Kulturen von der YEPD-Agarplatte mit einer Impfschlinge entnommen, mehrmals mit destilliertem Wasser bei 2500 g / 5 min (Hettich Zentrifuge Rotanta/RPC) gewaschen und schließlich 125 mg der feuchten Hefezellen in 10 ml dest. Wasser suspensiert.

In jede Kammer der Zytocentrifuge wurde 150 µl der Hefezellsuspension einpipettiert; die Zentrifugation erfolgte über 5 min bei 500 Umdrehungen/min (hohe Beschleunigung).

Nach Lufttrocknen bei Raumtemperatur wurden die Präparate für 10 min in reinem Aceton fixiert und in Frischhaltefolie verpackt bei -20°C gelagert.

### **2.2.2 Mannanextraktion aus *Saccharomyces cerevisiae* für den Elisa-Test**

(modifiziert nach Kocourek et al. [39])

Die Kultivierung der Hefezellen (Backhefe Vital Gold, Deutsche Hefewerke Hamburg/Nürnberg) erfolgte in einem YEPD-Flüssigmedium (Herstellung siehe oben; ohne Bacto-Agar) in 1 Liter Erlenmeyerkolben, wobei die Zellen bei 30°C unter kontinuierlichem Schütteln bei 200 Umdrehungen/min für mindestens 24 Stunden bebrütet wurden.

Am Ende der logarithmischen Wachstumsphase wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 2500 g für 15 min (Beckman Zentrifuge Avanti J-25) und zweimaligem Waschen mit destilliertem Wasser (2500 g / 5 min) vom Kulturmedium getrennt.

100 g der feuchten Hefezellen wurden in 50 ml 0,02 M Natriumcitratpuffer (pH 7,0) gelöst und bei 125°C 90 min autoklaviert. Nach Abkühlen erfolgte durch Zentrifugieren (2500 g / 10 min) die Gewinnung der mannanhaltigen Oberphase, während der Bodensatz erneut in 75 ml des gleichen Puffers resuspendiert und oben beschriebenes Vorgehen wiederholt wurde. Die beiden gewonnenen Oberphasen wurden zusammengegeben und unter Rühren das gleiche Volumen an Fehlingscher Lösung zugesetzt. Der entstandene Kupfer-Mannan-Komplex wurde bei 2500 g / 5 min abzentrifugiert, das Pellet in 7 ml 3 N Salzsäure unter Rühren aufgelöst. Die entstandene grüne Lösung wurde langsam unter kräftigem Rühren in 100 ml einer Mischung aus Methanol und Essigsäure (8/1; v/v) gegeben.

Der Mannan-Komplex wurde bei 2500 g / 5 min abzentrifugiert, die grüne Oberphase entfernt und das Präzipitat erneut mit frischem Methanol-Essigsäuregemisch verrührt. Dieses Vorgehen wurde solange fortgesetzt, bis die Oberphase farblos war. Das Mannan wurde schließlich bei 15000 g / 15 min gesammelt, mehrmals mit reinem Methanol gewaschen (15000 g / 5 min) und bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Um eine komplette Entfernung von Glukanen (einem weiteren Bestandteil der Hefezellwand) zu gewährleisten, wurde das trockene Mannan in destilliertem Wasser (1 g in 25 ml) gelöst, mit Fehlingscher Lösung präzipitiert und wie oben beschrieben erneut gewonnen.

Das Mannan wurde bei 4°C bzw. bei -20°C gelagert.

### **2.2.3 Antikörperdetektion**

#### **2.2.3.1 Indirekte Immunfluoreszenztechnik zur Detektion von pANCA, PAK und ASCA**

Die Zytozentrifugenpräparate bzw. die Pankreasschnitte wurden aufgetaut und in eine feuchte Kammer gelegt.

Jeweils 50 µl Serum wurde auf die Zellen pipettiert und die Objektträger für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das zu untersuchende Serum wurde dabei folgendermaßen in PBS (pH 7,4) verdünnt: pANCA- und PAK-Test 1/10; ASCA-Test 1/100; zur ASCA Titerbestimmung seriell 1/200, 1/400, 1/800.

Nach dreimaligem Waschen in PBS (pH 7,4) wurden die Objektträger vorsichtig mit Zellstoffpapier abgetrocknet, wobei darauf zu achten war, daß die Zellen selbst immer feucht blieben.

Nun wurden 50 µl eines polyvalenten (IgA, IgG, IgM, Kappa, Lambda) Fluoreszeinkonjugierten Antihumanserums auf die Zellen aufgebracht und die Objektträger für weitere 30 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Das Antihumanserum wurde dabei wie folgt in PBS (pH 7,4) verdünnt: pANCA-Test 1/50; PAK-Test 1/25; ASCA-Test 1/100. Zur Untersuchung der Antikörperklassen und Subklassen von ASCA wurden Antihumanseren (FITC-konjugiert) in einer Verdünnung von 1/20 (in PBS) verwendet, die monospezifisch mit den Antikörperklassen IgA, IgG, IgM bzw. den Subklassen IgG<sub>1</sub> und IgG<sub>2</sub> reagieren.

Nach einem weiteren Waschgang (wie oben beschrieben) wurden die abgetrockneten Objektträger in Immuno-Mount eingebettet und mit Deckgläsern (24 / 60 mm) versehen.

Die Auswertung erfolgte durch zwei unabhängige Untersucher ohne vorherige Kenntnis der Diagnose mittels eines Fluoreszenz-Mikroskops bei 160-facher Vergrößerung.

Als Antikörper-Titer wurde die höchste Serumverdünnung festgelegt, bei der die Untersucher gerade noch ein positives Ergebnis erkennen konnten.

Zur Kontrolle wurde in jedem Untersuchungsgang ein sicher positives und negatives Serum mitgetestet.



### 2.2.3.2 ELISA-Test zur Detektion von ASCA

Das extrahierte Mannan (siehe 2.2.2.) wurde in Natriumcarbonat – Natriumbicarbonat Puffer (pH 9,6; 50mM) in einer Konzentration von 0,5 µg/ml gelöst.

Das zum Vergleich benutzte Mannan der Firma Sigma wurde in einer Konzentration von 50 µg/ml verwendet.

Die Antigenbeschichtung der ELISA-Platte erfolgte mit 100 µl dieser Lösung pro Well über 24 h bei 4°C. Anschließend wurden die Wells dreimal mit Waschpuffer I (PBS, pH 7,4 und 0,5% BSA) gewaschen und geblockt, danach die im gleichen Puffer verdünnten Seren (Verdünnung 1/2000) einpipettiert (100 µl pro Well) und über 24 Stunden bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer II (PBS, pH 7,4; 0,5% BSA; 0,05% Tween 20) wurden pro Well 100 µl eines polyvalenten (IgA, IgG, IgM, Kappa, Lambda) Peroxidase-konjugierten Antihumanserums in einer Verdünnung von 1/1000 aufgetragen und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer I wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von jeweils 50 µl TMB-Substratlösung gestartet. Die Farbreaktion wurde nach 3 min (bei Verwendung von Sigma-Mannan nach 4 min) durch jeweils 50 µl 25% Schwefelsäure gestoppt und die Platte bei 450 nm in einem Platten-Lesegerät ausgewertet.

Eine semiquantitative Bestimmung der Proben wurde mittels eines sehr stark reagierenden Patientenserums erreicht, dessen Aktivität willkürlich auf 2000 Einheiten pro ml gesetzt und als Standard verwendet wurde. Jeder Untersuchungsgang enthielt eine serielle Verdünnungsreihe dieses Standardserums von 1/1000 bis 1/64000, die als Aliquots bei -20°C gelagert wurden. Jeder Verdünnung des Standardserums wurde entsprechend der Vorgabe eine Konzentration (Einheiten/ml) zugeordnet und die gemessene Extinktion gegen die Konzentration in einer semilogarithmischen Eichkurve aufgetragen.

Mittels dieser Kurve wurden die Konzentrationen der Proben bestimmt.

### 2.3 Statistische Auswertung

Als Lagemaß wurde der Mittelwert, als Streumaß die Standardabweichung verwendet. Die Brauchbarkeit und Zuverlässigkeit der untersuchten diagnostischen Verfahren wurde mit Hilfe folgender Maßzahlen analysiert:

Anhand der **Sensitivität** (Maß der Empfindlichkeit des Tests) wurde bestimmt, mit welcher Wahrscheinlichkeit der Test bei Vorliegen einer Krankheit auch wirklich ein positives Ergebnis zeigt. Sie wurde definiert als Zahl der kranken Testpositiven dividiert durch die Gesamtzahl der Erkrankten.

Mit Hilfe der **Spezifität** (Maß der Eindeutigkeit des Tests) wurde untersucht, wie sicher der Test das tatsächliche Vorliegen einer Krankheit anzeigt und nicht etwa falsch positiv ist. Sie wurde definiert als Zahl der gesunden Testnegativen dividiert durch die Gesamtzahl aller Gesunden.

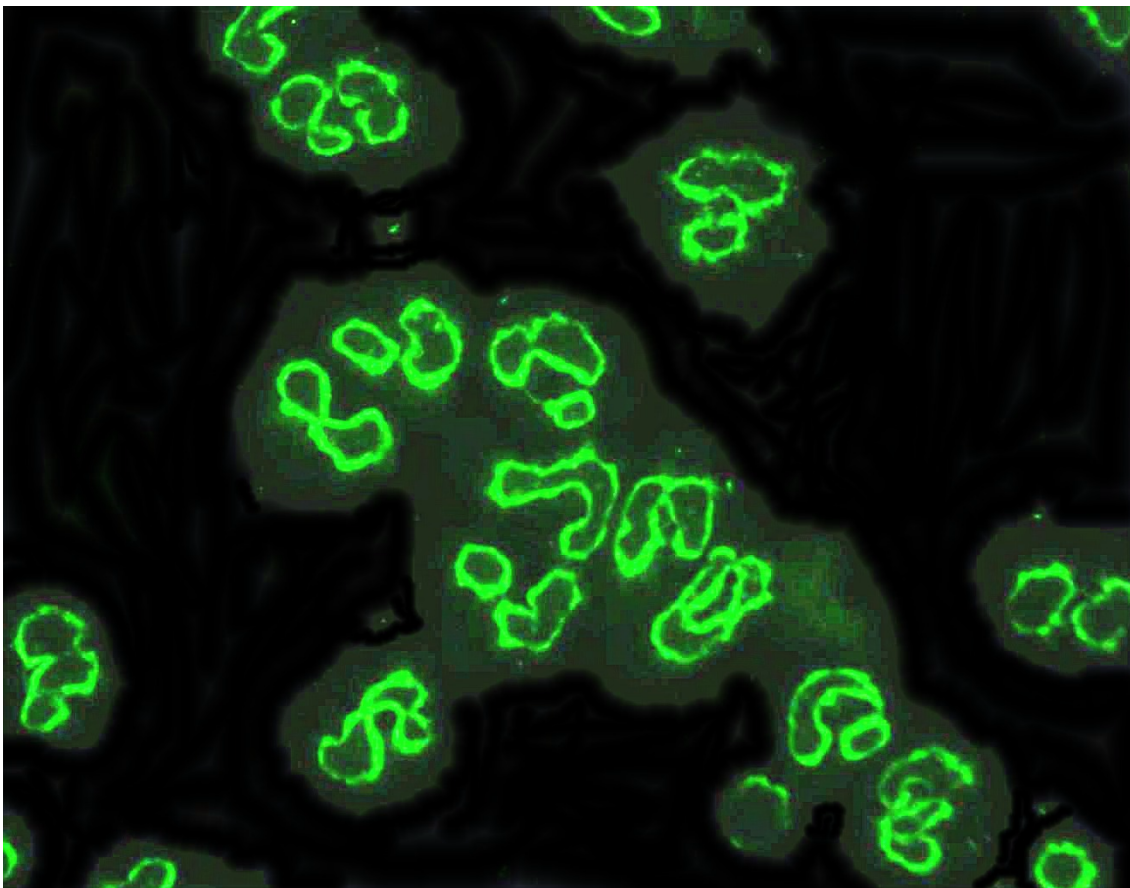
Anhand des **positiven Vorhersagewertes** wurde die Wahrscheinlichkeit ermittelt, bei Vorliegen eines positiven Testergebnisses auch wirklich erkrankt zu sein. Er wurde definiert als Zahl der erkrankten Testpositiven dividiert durch die Gesamtzahl aller Testpositiven.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Autoantikörper gegen neutrophile Granulozyten im indirekten Immunfluoreszenztest

##### 3.1.1 Prävalenz von pANCA bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Perinukleäre Antikörper gegen neutrophile Granulozyten (pANCA) sind durch eine perinukleäre Anfärbung in der Immunfluoreszenz charakterisiert (siehe Abb. 1).



**Abbildung 1:** Antikörper gegen neutrophile Granulozyten (pANCA): Perinukleäre Anfärbung der Granulozyten in der indirekten Immunfluoreszenz

Insgesamt wurden 376 Seren von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen auf diesen Antikörper getestet, davon waren 91 (24,2 %) pANCA positiv.

Für Patienten mit Colitis ulcerosa war pANCA ein serologischer Marker, der bei 67 der 110 (60,9 %) Patienten mit dieser Erkrankung auftrat.

Allerdings zeigte sich auch bei 24 von 266 (9%) Patienten mit Morbus Crohn pANCA im Serum.

Wurden nur die antikörperpositiven Seren berücksichtigt, so konnte die Diagnose Colitis ulcerosa zu 73,6% korrekt gestellt werden.

<b>n = 376</b>	<b>M. Crohn</b> (n = 266)	<b>C. ulcerosa</b> (n = 110)	<b>Spezifität</b>	<b>PVW</b> (C. ulcerosa)
<b>pANCA positiv</b>	24 (9%)	67 (60,9%)	91%	73,6%

**Tabelle 1:** Prävalenz, Spezifität und positiver Vorhersagewert (PVW) von pANCA bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen in der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie

### 3.1.2 Regionale Unterschiede in der Prävalenz von pANCA

Die insgesamt 376 Seren von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wurden gemäß ihrer regionalen Herkunft in 3 Gruppen (Würzburg, Tübingen, Ulm) aufgeteilt.

Es zeigten sich sowohl in der Prävalenz von pANCA, als auch in der Spezifität und im positiven Vorhersagewert teils deutliche Unterschiede.

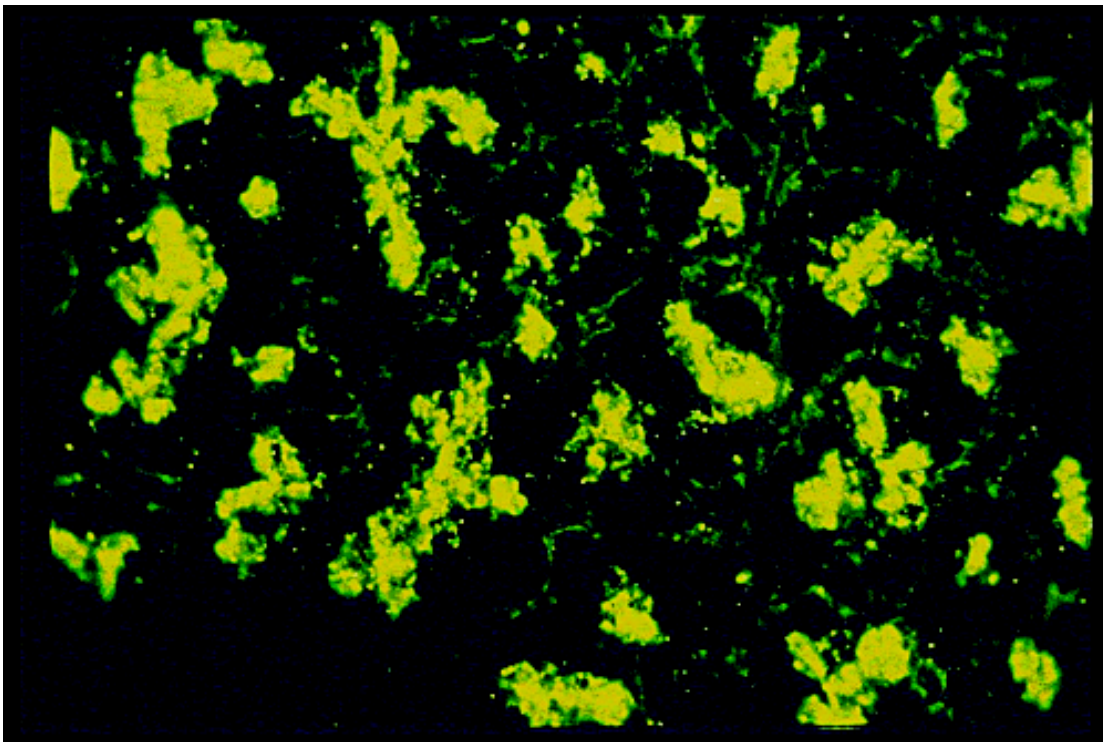
n = 376	M. Crohn (n = 266)	C. ulcerosa (n = 110)	Spezifität	PVW (C. ulcerosa)
	pANCA positiv			
<b>Seren aus Würzburg</b> (MC=38/CU=22)	3 (7,9%)	17 (77,3%)	92,1%	85%
<b>Seren aus Tübingen</b> (MC=90/CU=21)	16 (17,8%)	15 (71,4%)	82,2%	48,4%
<b>Seren aus Ulm</b> (MC=138/CU=67)	5 (3,6%)	35 (52,2%)	96,4%	87,5%

**Tabelle 2:** Prävalenz, Spezifität und positiver Vorhersagewert (PVW) von pANCA bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen unterschiedlicher regionaler Herkunft in der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie

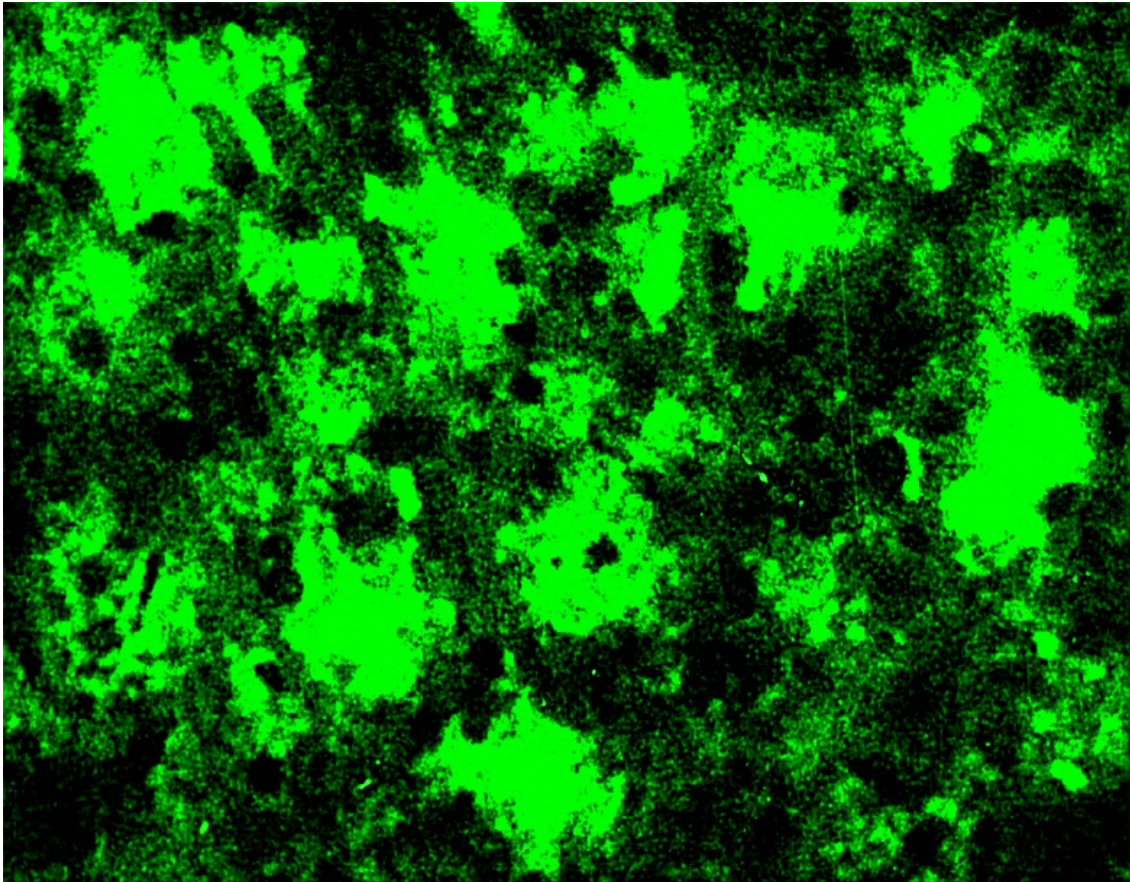
## 3.2 Autoantikörper gegen Pankreassekret im indirekten Immunfluoreszenztest

### 3.2.1 Prävalenz von PAK bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Antikörper gegen Pankreassekret (PAK) sind in der Immunfluoreszenz durch eine Anfärbung in den Azini, z.T. auch in den Ausführungsgängen, charakterisiert (PAK I, siehe Abb. 2). Zum Teil liegt auch eine feingranuläre Fluoreszenz über den Azinuszellen vor. Diese ebenfalls Morbus Crohn spezifische Anfärbung wird als PAK Typ II klassifiziert (siehe Abb. 3).



**Abbildung 2:** Antikörper gegen Pankreassekret Subtyp I (PAK I): Großtropfige Anfärbung im Lumen der Azini in der indirekten Immunfluoreszenz



**Abbildung 3:** Antikörper gegen Pankreassekret Subtyp II (PAK II): „Puderzucker“-ähnliche fein verteilte Anfärbung über dem gesamten Pankreasgewebe mit großtropfigen Anteilen im Azinislumen; indirekte Immunfluoreszenz

Insgesamt wurden 274 Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen auf PAK untersucht, 69 (25,2%) davon waren antikörperpositiv.

Von den 206 Patienten mit Morbus Crohn waren 67 (32,5%) PAK positiv, wobei 35 (17%) Patienten nur PAK I und 18 Patienten (8,7%) nur PAK II positiv waren.

Bei 14 Patienten (6,8%) wurden beide Antikörper-Subtypen nachgewiesen.

In der Gruppe von 68 Patienten mit Colitis ulcerosa zeigte sich nur in 2 Fällen (2,9%) ein PAK positives Ergebnis.

Betrachtete man nur die antikörperpositiven Seren, so waren 52,2% PAK I positiv, 27,5% PAK II positiv und 20,3% wiesen beide Antikörper-Subtypen auf.

Bei hoher Spezifität (97,1%), aber relativ niedriger Sensitivität (32,5%) war der positive Vorhersagewert für Morbus Crohn 97,1%.

<b>n = 274</b>	<b>M. Crohn</b> (n = 206)	<b>C. ulcerosa</b> (n = 68)	<b>Spezifität</b>	<b>PVW</b> (M. Crohn)
<b>PAK I positiv</b>	35 (17%)	1 (1,5%)		
<b>PAK II positiv</b>	18 (8,7%)	1 (1,5%)		
<b>PAK I + PAK II positiv</b>	14 (6,8%)	0 (0%)		
<b>Gesamt-PAK positiv</b>	<b>67</b> <b>(32,5%)</b>	<b>2</b> <b>(2,9%)</b>	<b>97,1%</b>	<b>97,1%</b>

**Tabelle 3:** Prävalenz, Spezifität und positiver Vorhersagewert (PVW) von PAK bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen in der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie

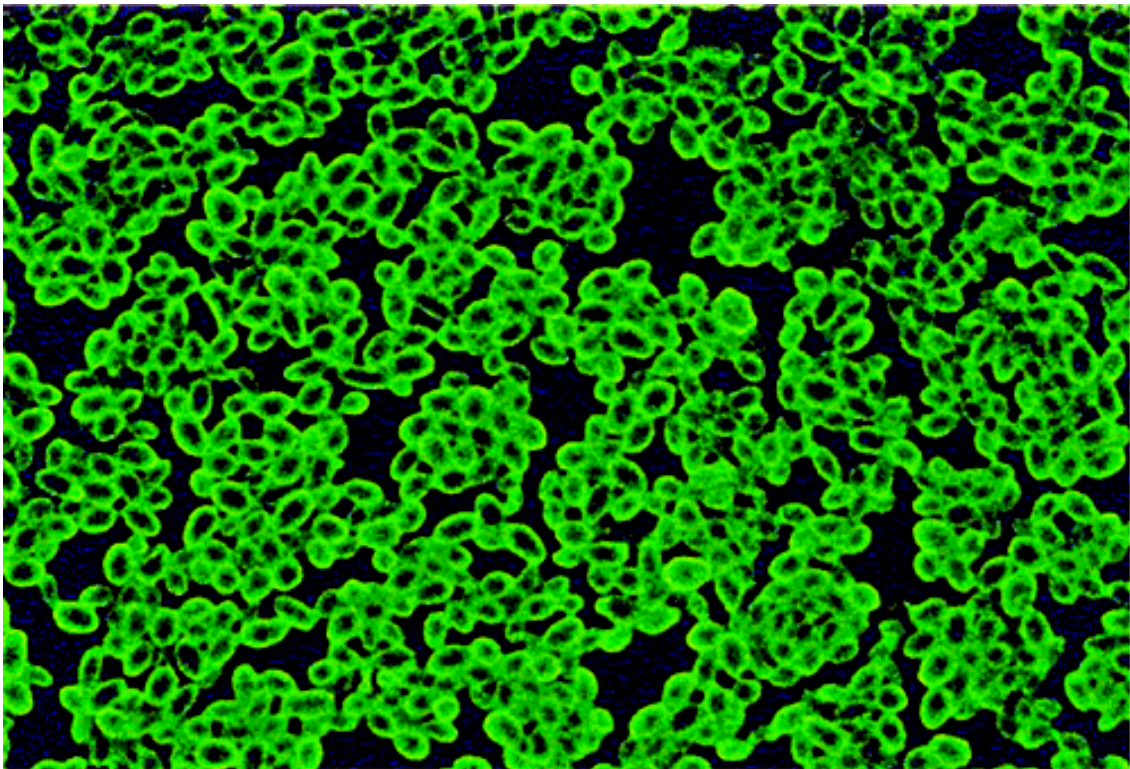


### 3.3 Autoantikörper gegen *Saccharomyces cerevisiae*

#### 3.3.1 Etablierung von ASCA im indirekten Immunfluoreszenztest

##### 3.3.1.1 Prävalenz von ASCA bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und anderen Autoimmunerkrankungen

Antikörper gegen *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) zeichnen sich in der Immunfluoreszenz durch eine Anfärbung der Hefezellwand aus (siehe Abb. 4).



**Abbildung 4:** Antikörper gegen *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA): Anfärbung der Zellwände der Hefen in der indirekten Immunfluoreszenz

Insgesamt wurden 233 Personen auf ASCA getestet, neben 165 Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen auch 38 Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen (AIE; genaue Differenzierung unter 2.1.1.) und 30 gesunde Probanden. Von diesem Gesamtkollektiv waren 93 Personen (39,9%) ASCA positiv.

90 von 125 Patienten (72%) mit Morbus Crohn waren positiv in Bezug auf ASCA, wobei dieser Antikörper bei keinem Patienten mit Colitis ulcerosa oder anderen Autoimmunerkrankungen nachzuweisen war.

3 gesunde Personen hatten niedrige Antikörper-Titer in der indirekten Immunfluoreszenz.

Bei hoher Spezifität (97,2%) konnte mit diesem Testverfahren bei 96,8% der Testpositiven die Diagnose Morbus Crohn korrekt gestellt werden.

<b>n = 233</b>	<b>M. Crohn</b> (n = 125)	<b>C. ulcerosa</b> (n = 40)	<b>Kontrollen</b> (n = 30)	<b>AIE</b> (n = 38)	<b>Spezifität</b>	<b>PVW</b> (M. Crohn)
<b>ASCA positiv</b>	90 (72%)	0 (0%)	3 (10%)	0 (0%)	97,2 %	96,8%

**Tabelle 4:** Prävalenz, Spezifität und positiver Vorhersagewert (PVW) von ASCA bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und anderen Autoimmunerkrankungen (AIE) in der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie

### 3.3.1.2 Vergleich verschiedener Stämme von *Saccharomyces cerevisiae*

Um die Eignung als Antigen für ASCA zu ermitteln, wurden 5 Stämme von *Saccharomyces cerevisiae* (genaue Beschreibung der verwendeten Hefen unter 2.1.3.) untersucht.

Die beste Diskrimination zwischen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa bzw. Kontrollseren gesunder Patienten wurde mit der Backhefe Vital Gold (*Saccharomyces cerevisiae cerevisiae*) erzielt, die deshalb in dieser Studie zum Nachweis von ASCA diente.

n = 20	Backhefe (Vital gold)	Bierhefe (obergährig)	Bierhefe (untergährig)	Weinhefe 1	Weinhefe 2
	ASCA positiv				
<b>M. Crohn</b> (n = 11)	8 (72,7%)	8 (72,7%)	8 (72,7%)	8 (72,7%)	9 (81,8%)
<b>C. ulcerosa</b> (n = 5)	0 (0%)	3 (60%)	1 (20%)	2 (40%)	2 (40%)
<b>Kontrollen</b> (n = 4)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (25%)	2 (50%)

**Tabelle 5:** Prävalenz von ASCA bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen unter Verwendung verschiedener Hefezellstämme als Antigen in der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie

### **3.3.1.3 Antikörpertiter von ASCA bei Morbus Crohn Patienten**

In dieser Untersuchung wurden 30 ASCA positive Seren von Morbus Crohn Patienten nach der Intensität der Zellwandfluoreszenz bei Standardverdünnung (1/100) in drei Gruppen aufgeteilt und auf ihre Antikörpertiter getestet.

Die Titer bewegten sich zwischen 1/100 (Cut-off) und 1/800.

Der Mittelwert der Antikörpertiter betrug bei schwacher Zellwandanfärbung (n = 8) 1/130, bei mittelstarker Anfärbung (n = 13) 1/400 sowie bei starker Anfärbung (n = 9) 1/650.

### **3.3.1.4 Antikörperklassen und Subklassen von ASCA bei Morbus Crohn Patienten**

In dieser Studie wurden insgesamt 16 ASCA positive Seren von Morbus Crohn Patienten auf ihre Antikörperisotypen untersucht.

In allen Patientenserum war ASCA vom IgG-Subtyp, in den meisten Seren (94%) vom IgG<sub>1</sub>-Typ, weniger häufig (37,5%) vom IgG<sub>2</sub>-Typ.

IgA Antikörper fanden sich lediglich in 19% der untersuchten Seren, IgM Antikörper waren nicht nachweisbar.

### **3.3.2 Etablierung eines ASCA-ELISA-Tests**

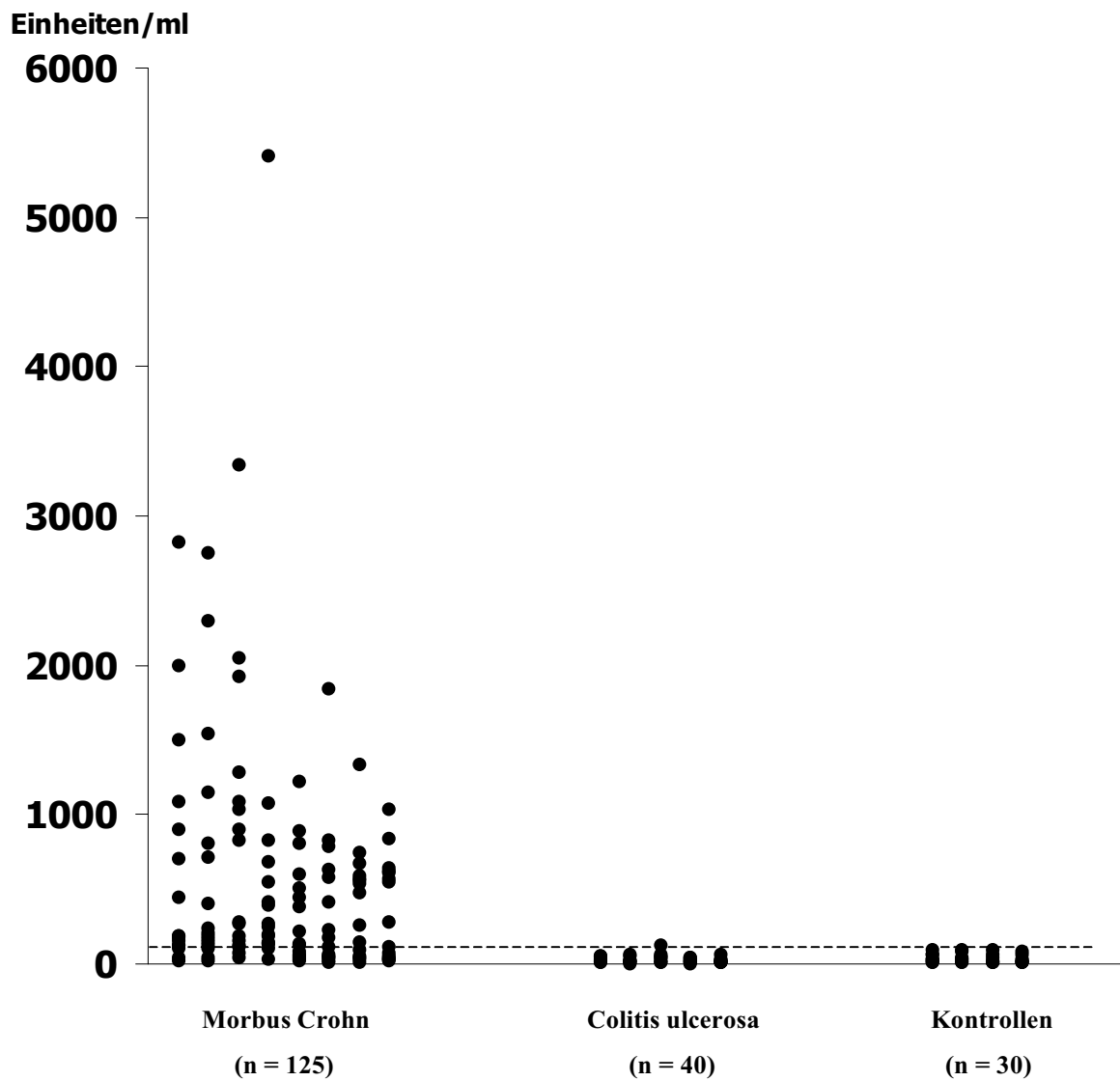
#### **3.3.2.1 Prävalenz von ASCA bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen**

Als Cut-off (94 Einheiten/ml; siehe gestrichelte Linie) verwendeten wir den Mittelwert plus die zweifache Standardabweichung von 30 Seren gesunder Personen (Kontrollen). Insgesamt wurden 165 Seren von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen im Antimannan-ELISA untersucht.

95 (76%) der 125 Patienten mit Morbus Crohn waren ASCA positiv, während nur bei einem (2,5%) von 40 Patienten mit Colitis ulcerosa dieser Antikörper in niedriger Konzentration nachgewiesen werden konnte.

Der Mittelwert aller Seren von Morbus Crohn Patienten entsprach 552 Einheiten/ml, während der Mittelwert aller Seren von Patienten mit Colitis ulcerosa bei 34 Einheiten/ml lag.

ASCA erwies sich damit im ELISA-Test als sehr spezifisch (98,6%) für Morbus Crohn, der positive Vorhersagewert für diese Erkrankung betrug 99%.



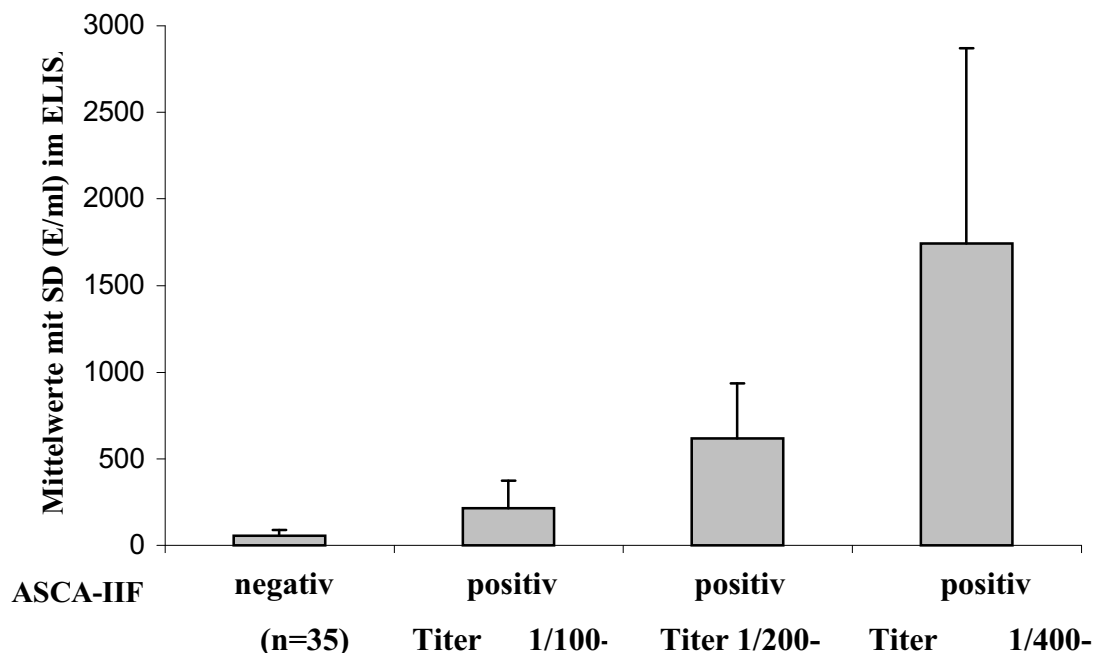
**Abbildung 5:** Darstellung der Prävalenz von ASCA bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen im ELISA-Test

### 3.3.2.2 Vergleich der ELISA-Werte mit den Ergebnissen der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie

Insgesamt wurden die Seren von 165 Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Morbus Crohn = 125; Colitis ulcerosa = 40) und von 30 gesunden Kontrollpersonen sowohl in der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie (IIF), als auch mittels ELISA auf ASCA untersucht (siehe auch 3.3.1.1. und 3.3.2.1.).

Die im indirekten Immunfluoreszenztest positiven Seren von Morbus Crohn Patienten wurden nochmals nach der Höhe der Antikörpertiter in drei Gruppen aufgeteilt (siehe Abb. 6).

Anschließend wurden alle Ergebnisse der beiden Testverfahren miteinander verglichen. Bei insgesamt hoher Korrelation (Korrelationskoeffizient = 0,99) zwischen beiden Methoden erlaubte es der semiquantitative ELISA die getesteten Seren genauer in Bezug auf ASCA zu vergleichen. Auch im Bereich Sensitivität, Spezifität und positivem Vorhersagewert für Morbus Crohn zeigte sich dieses Verfahren der indirekten Immunfluoreszenztechnik leicht überlegen (siehe Tabelle 6).



**Abbildung 6:** Vergleich der ELISA-Werte bezüglich Mittelwert und Standardabweichung (SD) mit den Ergebnissen der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie (IIF) bei 125 Morbus Crohn Patienten

<b>n = 195</b>	<b>M. Crohn</b> (n = 125)	<b>C. ulcerosa</b> (n = 40)	<b>Kontrollen</b> (n = 30)	<b>Spezifität</b>	<b>PVW</b> (M. Crohn)
<b>IIF</b> <b>ASCA positiv</b>	90 (72%)	0 (0%)	3 (10%)	95,7%	96,8%
<b>ELISA</b> <b>ASCA positiv</b>	95 (76%)	1 (2,5%)	0 (0%)	98,6%	99%

**Tabelle 6:** Vergleich zwischen indirekter Immunfluoreszenz (IIF) und ELISA bezüglich Prävalenz, Spezifität und positivem Vorhersagewert (PVW) von ASCA bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen



### 3.3.2.3 Vergleich unterschiedlicher Mannanpräparate

In dieser Untersuchung wurden zwei Mannane bezüglich ihrer Eignung als Antigen für ASCA verglichen. Einmal ein Mannan, daß nach der Methode von Kocourek et al. [39] aus Hefezellen vom Stamm *Saccharomyces cerevisiae cerevisiae* (Backhefe Vital Gold) extrahiert wurde, zum anderen ein Mannan aus *Saccharomyces cerevisiae* der Firma Sigma (M 3640).

Getestet wurden insgesamt 33 im indirekten Immunfluoreszenztest ASCA positive bzw. negative Seren von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa Patienten sowie ASCA negativen gesunden Probanden. Die ASCA positiven Seren von Morbus Crohn Patienten wurden nochmals nach der Höhe der Antikörpertiter in drei Gruppen aufgeteilt (siehe Tabelle 7).

Die Ergebnisse im ELISA-Test zeigten zwischen beiden Mannanen eine hohe Korrelation (Korrelationskoeffizient = 0,99) bei ähnlich guter Diskrimination zwischen den einzelnen Patientengruppen. Lediglich bei den Standardabweichungen (SD) ergaben sich bei Verwendung des von uns extrahierten Mannans bei 4 von 7 untersuchten Patientenkollektiven teils deutlich niedrigere Werte.

Deshalb wurde dieses Mannan in der vorliegenden Studie zum Nachweis von ASCA mittels ELISA-Technik verwendet.

n = 33	ASCA-IIF	Extinktionen im ELISA (E/ml)			
		Selbstextrahiertes Mannan		Sigma-Mannan	
		Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
M. Crohn	<b>positiv</b> <b>Titer 1/400-1/800</b> (n = 7)	708	152	803	254
	<b>positiv</b> <b>Titer 1/200-1/400</b> (n = 6)	420	90	404	175
	<b>positiv</b> <b>Titer 1/100-1/200</b> (n = 5)	187	35	162	89
	<b>negativ</b> (n = 4)	65	21	61	18
C. ulcerosa	<b>positiv</b> (n = 2)	123	66	89	43
	<b>negativ</b> (n = 7)	42	22	45	22
<b>Kontrollen</b>	<b>negativ</b> (n = 2)	14	1	21	6

**Tabelle 7:** Vergleich zweier Mannanpräparate anhand der Extinktionen im ELISA. Getestet wurden insgesamt 33 im indirekten Immunfluoreszenztest (IIF) ASCA positive bzw. negative Seren von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa Patienten sowie ASCA negativen gesunden Probanden. Die ASCA positiven Seren von Morbus Crohn Patienten wurden nochmals nach der Höhe der Antikörpertiter in drei Gruppen aufgeteilt.

### 3.3.2.4 Abhängigkeit des ASCA-Titers von der Krankheitsaktivität

Untersucht wurden insgesamt 40 Patienten mit Morbus Crohn.

20 Patienten wiesen eine hohe Krankheitsaktivität auf (CDAI > 100), 14 davon wurden mit Steroiden behandelt.

Die anderen 20 Patienten zeigten eine niedrige Krankheitsaktivität (CDAI < 100) und befanden sich nicht unter Steroidtherapie.

Weder in der Prävalenz von ASCA, noch im Bereich der Meßwerte sowie in Mittelwert und Standardabweichung (SD) ließ sich im ELISA-Test ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Patientenkollektiven feststellen.

<b>n = 40</b>	<b>Hohe Krankheitsaktivität</b> CDAI > 100 (+ Steroidgabe) (n = 20)	<b>Niedrige Krankheitsaktivität</b> CDAI < 100 Keine Steroidgabe (n = 20)
<b>ASCA positiv</b>	16 (80%)	18 (90%)
<b>Bereich (E/ml)</b>	26 - 1840	16 - 2284
<b>Mittelwert (E/ml)</b>	429	672
<b>SD (E/ml)</b>	530	637

**Tabelle 8:** Vergleich von Morbus Crohn Patienten mit hoher bzw. niedriger Krankheitsaktivität im ELISA-Verfahren. Es ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Patientenkollektiven.

### **3.4 Bedeutung einer kombinierten serologischen Untersuchung für die Differentialdiagnose chronisch entzündlicher Darmerkrankungen**

Aus dem Gesamtkollektiv der 510 Seren von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wurden 165 stichprobenartig ausgewählt und kombiniert auf pANCA und ASCA sowie auf pANCA, PAK und ASCA untersucht. Aufgrund der höheren Sensitivität und Spezifität wurde zum Nachweis von ASCA die ELISA-Technik verwendet.

Die drei untersuchten Antikörper konnten bei insgesamt 141 (85,4%) der CED-Patienten nachgewiesen werden. Bei 24 (14,6%) Patienten ließen sich keine Antikörper finden.

Insgesamt waren 95 (76%) der 125 Seren von Morbus Crohn Patienten ASCA positiv (siehe auch 3.3.2.1. und 3.3.2.2.).

Was die Korrelation von ASCA mit den anderen CED-spezifischen Antikörpern betraf, so ergaben sich folgende Ergebnisse: 37 (29,6%) der Seren von Morbus Crohn Patienten waren PAK positiv, 30 dieser Seren (81,1%) auch positiv in Bezug auf ASCA. Von den 40 Seren von Patienten mit Colitis ulcerosa waren 27 (67,5%) pANCA positiv, davon nur ein Serum (3,7%) in niedriger Konzentration auch ASCA positiv.

Seren mit hohen Titern für pANCA und gleichzeitig hohen ASCA-Konzentrationen wurden in dieser Studie nicht gefunden.

Bei gleichzeitiger Bestimmung von zwei bzw. drei Antikörpern konnte im Vergleich zum Einzeltest eine Verbesserung der Spezifität und des positiven Vorhersagewertes erzielt werden, allerdings beim dreifach kombinierten Antikörpertest auf Morbus Crohn deutlich zu Lasten der Sensitivität (23,2%) gegenüber dem alleinigen ASCA-Nachweis (76% im ELISA).

<b>n = 165</b>	<b>M. Crohn</b> (n = 125)	<b>C. ulcerosa</b> (n = 40)	<b>Spezifität</b>	<b>PVW</b>	
				<b>M. Crohn</b>	<b>C. ulcerosa</b>
<b>pANCA negativ ASCA (ELISA) positiv</b>	88 (70,4%)	0 (0%)	100%	100%	
<b>pANCA positiv ASCA (ELISA) negativ</b>	9 (7,2%)	26 (65%)	92,8%		74,3%
<b>pANCA negativ PAK positiv ASCA (ELISA) positiv</b>	29 (23,2%)	0 (0%)	100%	100%	
<b>pANCA positiv PAK negativ ASCA (ELISA) negativ</b>	9 (7,2%)	26 (65%)	92,8%		74,3%

**Tabelle 9:** Sensitivität, Spezifität und positiver Vorhersagewert (PVW) einer kombinierten serologischen Untersuchung bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Die Detektion von pANCA und PAK erfolgte mittels der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie, ASCA wurden im ELISA-Test nachgewiesen.

## **4 Diskussion**

In der vorliegenden Studie befassten wir uns mit der Frage, ob spezifische Autoantikörper allein und in Kombination miteinander für die Differentialdiagnose chronisch entzündlicher Darmerkrankungen hilfreich sein können.

Um als diagnostischer Marker von maximalem Nutzen zu sein, sollten die Autoantikörper eine möglichst hohe Sensitivität und Spezifität bezüglich der betreffenden Krankheit besitzen. Auch sollte der Vorhersagewert bezüglich der Erkrankung hoch sein und ein negatives Testergebnis sollte die Krankheit idealerweise sicher ausschließen.

Inwieweit diese Kriterien mit den drei untersuchten serologischen Markern erfüllt werden können, soll nun im folgenden näher erörtert werden.

### **4.1 Autoantikörper gegen *Saccharomyces cerevisiae***

Verschiedene Arbeitsgruppen haben Antikörper gegen *Saccharomyces cerevisiae* bei Morbus Crohn beschrieben [33, 34, 35, 40]. Die Antikörper-Titer gegen *Saccharomyces cerevisiae* bei Patienten mit Morbus Crohn waren signifikant höher als bei Patienten mit Colitis ulcerosa oder bei Kontrollen.

Wir konnten in unserer Studie diese Ergebnisse bestätigen, wobei wir zur Detektion von ASCA zwei unterschiedliche Methoden verwendeten.

In der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie konnten wir ASCA bei 72% der Morbus Crohn Patienten nachweisen, jedoch bei keinem Patienten mit Colitis ulcerosa oder anderen Autoimmunerkrankungen. 3 gesunde Probanden (10%) wiesen niedrige Antikörpertiter auf.

Im ELISA-Test mit Mannan aus *Saccharomyces cerevisiae* ließ sich ASCA sogar bei 76% der Patienten mit Morbus Crohn nachweisen, hingegen nur bei einem Patienten mit Colitis ulcerosa (2,5%) und bei keiner gesunden Kontrollperson.

Die Ergebnisse der beiden Detektionsverfahren korrelierten insgesamt gut miteinander (Korrelationskoeffizient = 0,99), allerdings erlaubte der ELISA eine semiquantitative Analyse und zeigte sich der indirekten Immunfluoreszenztechnik sowohl in Bezug auf Sensitivität (76% zu 72%), als auch bezüglich Spezifität (98,6% zu 97,2%) und positivem Vorhersagewert (99% zu 96,8%) leicht überlegen und ist deshalb zur Detektion von ASCA zu präferieren.

ASCA stellte sich somit, im Gegensatz zu PAK, nicht nur als hochspezifischer, sondern auch als relativ sensitiver serologischer Marker für Morbus Crohn heraus.

Diese hohe Sensitivität und Spezifität wurde auch schon von anderen Autoren beschrieben [33, 34, 35].

Um die Eignung als Antigen für ASCA zu testen, verglichen wir 5 verschiedene Stämme von Hefezellen (1 Backhefe, 2 Bierhefen, 2 Weinhefen) in der indirekten Immunfluoreszenz miteinander sowie im ELISA ein von uns selbst extrahiertes Mannan mit einem kommerziell vertriebenen Mannan der Firma Sigma.

Wir fanden heraus, daß sich in der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie die beste Diskrimination zwischen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa bzw. gesunden Personen mit einem bestimmten Backhefestamm (*Saccharomyces cerevisiae cerevisiae*) erzielen läßt. Dieser Unterschied in der antigenen Wirkung verschiedener Stämme von *Saccharomyces cerevisiae* wurde schon in anderen Arbeiten beschrieben [34, 35] und ist wahrscheinlich auf den unterschiedlichen Mannangehalt der Hefezellstämme zurückzuführen.

Die Ergebnisse im ELISA-Test zeigten zwischen den beiden getesteten Mannanen eine hohe Korrelation (Korrelationskoeffizient = 0,99) bei ähnlich guter Diskrimination zwischen den einzelnen Patientengruppen. Lediglich bei den Standardabweichungen (SD) ergaben sich bei Verwendung des von uns extrahierten Mannans bei 4 von 7 untersuchten Patientenkollektiven teils deutlich niedrigere Werte. Allerdings wäre wohl bei weiterer Optimierung der Testmethode kein signifikanter Unterschied mehr in den Standardabweichungen nachweisbar.

Bei näherer Betrachtung von ASCA bezüglich ihrer Antikörperklassen und Subklassen fanden wir in allen untersuchten ASCA positiven Seren Antikörper vom IgG-Isotyp (zum überwiegenden Teil IgG<sub>1</sub>), in 19% der Seren IgA und in keinem Patientenserum IgM. Schon 1988 haben Main et al. signifikant erhöhte IgG und IgA Titer gegen *Saccharomyces cerevisiae* bei Morbus Crohn Patienten im Vergleich zu Colitis ulcerosa Patienten und Kontrollen beschrieben [33]. Nach Barnes und Gjaffer hat die IgA-Antwort auf *Saccharomyces cerevisiae* eine wichtige Bedeutung für die Differentialdiagnose Morbus Crohn – Colitis ulcerosa [40, 41].

In unserer Untersuchung ließ sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen ASCA-Titer und Krankheitsaktivität feststellen.

Auch in den meisten Studien anderer Autoren korrelierte ein positiver ASCA-Titer nicht mit klinischen Parametern wie Lokalisation des Darmbefalls und Krankheitsaktivität, obwohl ASCA nach den Ergebnissen zweier Studien bei Patienten mit Dünndarmbefall häufiger vorzukommen scheint [35, 40].

Es gibt deshalb momentan keinen Anhalt dafür, daß ASCA eine Rolle in der Pathogenese von Morbus Crohn spielt, jedoch könnte nach einer klinischen Studie die Aufnahme von Bäckerhefe durch die Induktion einer Hypersensitivitäts-Reaktion einen Einfluß auf die Krankheitsaktivität von Morbus Crohn haben. Diese Reaktion könnte nach Meinung der Autoren entweder durch einen direkten Effekt auf die Darmschleimhaut oder als Folge einer Kreuzreaktivität zwischen *Saccharomyces cerevisiae* und einem noch unbekanntem Mikroorganismus, z.B. den ebenfalls mannanhaltigen atypischen Mykobakterien, ausgelöst werden [42].

Intestinale Antigene, wie Nahrungs- oder Bakterienantigene, scheinen eine wichtige Rolle in der Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen spielen. Der Verlust der immunologischen Toleranz gegenüber solchen Antigenen gilt derzeit als eines der wichtigsten pathogenetischen Konzepte bei diesen Erkrankungen. Seibold et al. konnten nachweisen, daß andere Antikörper wie pANCA möglicherweise aufgrund einer Kreuzreaktivität mit bakteriellen Antigenen entstanden sein könnten [43].

So könnte man ASCA als pathologische Reaktion auf Zellwandkomponenten von Hefezellen, Bakterien oder Mykobakterien sowie auf ähnliche menschliche Antigene erklären.



In zwei anderen Arbeiten zeigte sich die Antikörperreaktion nur auf *Saccharomyces cerevisiae*, nicht aber auf andere Antigene wie Gliadin, Ovalbumin oder *Candida albicans*. Das wirft die Vermutung auf, daß die Entwicklung dieser Antikörper nicht einfach das Resultat einer generalisierten Erhöhung der intestinalen Permeabilität darstellt [34, 44].

Zusammenfassend kann man sagen, daß ASCA aufgrund seiner hohen Spezifität und wegen des hohen positiven Vorhersagewertes für die Differentialdiagnose chronisch entzündlicher Darmerkrankungen durchaus hilfreich sein kann und im Vergleich zu PAK auch eine deutlich höhere Sensitivität aufweist. Im Gegensatz zu PAK könnte man ASCA deshalb möglicherweise auch zur Erstdiagnose eines Morbus Crohn nutzbringend einsetzen.

Außerdem scheint sich mittels ASCA in Verbindung mit einem bestimmten Tumornekrosefaktor (TNF) Mikrosatelliten auch eine Subgruppe von Colitis ulcerosa Patienten definieren zu lassen, die resistent gegenüber Anti-TNF-Therapie ist [45].

## 4.2 Autoantikörper gegen neutrophile Granulozyten

Perinukleäre antineutrophile zytoplasmatische Antikörper (pANCA) wurden in der Vergangenheit aufgrund ihrer hohen Prävalenz bei Patienten mit Colitis ulcerosa intensiv untersucht.

In dieser Studie konnte pANCA bei rund 61% der Patienten mit Colitis ulcerosa nachgewiesen werden, wenn nur Titer höher 1/10 Berücksichtigung fanden.

Von den Patienten mit Morbus Crohn waren hingegen nur 9% pANCA positiv.

In Studien anderer Autoren variierte die Prävalenz von pANCA zwischen 23% und 88% bei Colitis ulcerosa und 0% bis 43 % bei Morbus Crohn [19, 20, 21, 23, 25, 26, 27, 28, 46, 47, 48, 49].

Diese hohe Variationsbreite in den Ergebnissen verschiedener Studien scheint hauptsächlich zwei Gründe zu haben.

Zum einen methodische Unterschiede in der pANCA-Detektion, wobei man die höchste Sensitivität für pANCA mit Zytozentrifugenpräparaten von sorgfältig gewaschenen Granulozyten erreicht.

Zum anderen gibt es Hinweise darauf, daß die Prävalenz von pANCA populationsabhängig ist. Vergleicht man Studien aus unterschiedlichen Regionen der Erde (Australien, Nordamerika, Frankreich, Großbritannien, Spanien und Deutschland), so stellt man fest, daß die Frequenzen von pANCA bei CU-Patienten teilweise erheblich differieren [19, 20, 21, 23, 25, 26, 27, 47, 48, 49].

In unserer Studie konnten wir nachweisen, daß es auch innerhalb einer Population regionale Unterschiede in der Häufigkeit von pANCA gibt.

So bewegten sich die Prävalenzen von pANCA in drei deutschen Regionen (Würzburg, Tübingen, Ulm) bei CU-Patienten zwischen 52% und 77% und bei MC-Patienten zwischen 4% und 8%. Auch in Bezug auf Spezifität und positiven Vorhersagewert für Colitis ulcerosa zeigten sich teilweise deutliche Unterschiede zwischen den Patientengruppen. Nach Yang et al. könnten diese Differenzen in der Prävalenz von pANCA im unterschiedlichen genetischen Hintergrund der untersuchten Populationen liegen und möglicherweise mit den HLA Klasse II Genen in diesen Bevölkerungen verknüpft sein [50].

Aufgrund der nur mittelmäßigen Sensitivität von 61% ist der pANCA-Test zur Diagnose einer Colitis ulcerosa als Screening-Untersuchung bei Patienten mit Durchfallerkrankungen weniger geeignet.

Die Spezifität von pANCA bezüglich der Differentialdiagnose Morbus Crohn – Colitis ulcerosa ist mit 91% als hoch zu bewerten, jedoch liegt der positive Vorhersagewert für Colitis ulcerosa nur bei rund 74%.

Durch weiteres Anheben der Cut-off-Titer könnte diese Spezifität noch weiter gesteigert werden, was aber mit einem deutlichen Verlust an Sensitivität einhergehen würde.

Auch muß berücksichtigt werden, daß pANCA auch bei anderen Erkrankungen wie PSC (primär sklerosierende Cholangitis), PBC (primär biliäre Zirrhose) und autoimmuner Hepatitis vorkommen können [21, 23], auch bei Patienten mit anteriorer Uveitis [51], bei HIV-Infizierten [52] sowie bei Patienten mit mikroskopischer Panarteriitis wurde dieser Antikörper gefunden.

Bei Bestehen einer solchen Erkrankung können pANCA nicht zuverlässig für die Differentialdiagnose chronisch entzündlicher Darmerkrankungen verwendet werden.

Weiterhin ist zu beachten, daß es bei pANCA positiven MC-Patienten eine Subgruppe mit linksseitiger Colitis zu geben scheint, die CU-Kennzeichen aufweist [53].

Leider ist derzeit das Antigen, mit welchem pANCA reagieren, noch nicht bekannt. Es ist zu erwarten, daß nach der Charakterisierung des Antigens sensitivere Tests, z.B. in Form eines ELISA, entwickelt werden können. Weitere Studien müssen dann zeigen, ob diese Tests in der Lage sind, die Spezifität und vor allem die Sensitivität gegenüber der Immunfluoreszenz zu erhöhen.

### 4.3 Autoantikörper gegen Pankreassekret

In der vorliegenden Untersuchung konnten wir PAK mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie bei rund einem Drittel (32%) der Patienten mit Morbus Crohn nachweisen. Hingegen waren nur 2 Patienten mit Colitis ulcerosa (ca. 3%) positiv bezüglich dieses Antikörpers. Damit korrelierten unsere Ergebnisse gut mit den Ergebnissen früherer Studien [29, 30, 32].

Die PAK verteilten sich zu ca. 52% auf PAK I, zu ca. 28% auf PAK II und rund 20% der antikörperpositiven Seren zeigten beide PAK-Unterformen, wobei die Bedeutung dieser unterschiedlichen Fluoreszenzmuster noch unklar ist.

Mit einer Spezifität von rund 97% konnten wir die Meinung anderer Autoren bestätigen, daß es sich bei PAK um einen hochspezifischen Marker für Morbus Crohn handelt [29,30,32]. Seibold et al. zeigten in einer Arbeit, daß sich PAK bei anderen gastrointestinalen Erkrankungen (Sprue, Kolon-Ca, Pankreatiden, Hepatitiden, PBC, PSC), bei Autoimmunerkrankungen (Hashimoto-Thyreoiditis, Lupus erythematodes, Rheumatoide Arthritis, Sjögren Syndrom) sowie bei Gesunden nicht nachweisen lassen [30].

Aufgrund der niedrigen Sensitivität von rund 32% ist die serologische Untersuchung auf PAK zur Erstdiagnose eines Morbus Crohn nur unzureichend geeignet, da bei Verdacht auf diese Erkrankung immerhin zwei Drittel der tatsächlich Erkrankten nicht erfasst werden würden.

Im Falle eines positiven Antikörpernachweises kann der PAK-Test allerdings aufgrund der hohen Spezifität durchaus sehr hilfreich bezüglich der Differentialdiagnose chronisch entzündlicher Darmerkrankungen sein und ermöglicht dann tatsächlich bei ca. 97% der Patienten eine korrekte Zuordnung der Diagnose.

#### **4.4 Bedeutung einer kombinierten serologischen Untersuchung für die Differentialdiagnose chronisch entzündlicher Darmerkrankungen**

In unserer Studie führten wir eine kombinierte Untersuchung auf pANCA und ASCA bzw. auf pANCA, PAK und ASCA durch, wobei wir zur Detektion von ASCA den ELISA-Test verwendeten.

Die drei untersuchten Antikörper konnten bei insgesamt 141 (85,4%) der 165 getesteten CED-Patienten nachgewiesen werden. Bei 24 (14,6%) Patienten ließen sich keine Antikörper finden.

In Bezug auf Morbus Crohn führte die gleichzeitige Bestimmung von pANCA und ASCA im Vergleich zum Einzeltest (auf ASCA) zu einer Zunahme der Spezifität und des positiven Vorhersagewertes auf 100%. Die Sensitivität (rund 70%) verminderte sich im Vergleich zum alleinigen ASCA-Nachweis (76% im ELISA) dabei nicht bedeutend. Bei einem pANCA negativen und ASCA positiven Testergebnis der Zweierkombination ließ sich in allen Fällen Morbus Crohn korrekt von Colitis ulcerosa abgrenzen, was für die wichtige Bedeutung dieser Testmethode bezüglich der Differentialdiagnose chronisch entzündlicher Darmerkrankungen spricht.

Hinsichtlich der Diagnose eines Morbus Crohn brachte eine kombinierte Testung auf alle drei Antikörper im Vergleich zur Zweierkombination, bei identischer Spezifität und positivem Vorhersagewert, einen deutlichen Abfall der Sensitivität von rund 70% auf rund 23%.

Im Hinblick auf Colitis ulcerosa konnte man mit einer kombinierten Detektion von pANCA und ASCA eine Erhöhung der Spezifität auf rund 93% und des positiven Vorhersagewertes auf rund 74% im Vergleich zum Einzeltest (auf pANCA) erzielen. Der zusätzliche Nachweis von PAK lieferte im Vergleich zur Zweierkombination unveränderte Ergebnisse.

Die kombinierte Untersuchung auf pANCA und ASCA wurde schon von Quinton et al. als hilfreich für die Differentialdiagnose chronisch entzündlicher Darmerkrankungen beschrieben: Ein positiver ASCA-Test kombiniert mit einem negativen pANCA-Test wies in dieser Arbeit eine Spezifität von 97% und einen positiven Vorhersagewert von 96% für Morbus Crohn auf. Ein negativer ASCA-Test zusammen mit einem positiven pANCA-Test hatte ebenfalls eine Spezifität von 97% und einen positiven Vorhersagewert von 92,5% für Colitis ulcerosa [54]. Gegenüber dem Einzeltest ließ sich damit eine Zunahme der Spezifität und des positiven Vorhersagewertes erreichen, allerdings auf Kosten der Sensitivität.

In Analogie zu der oben besprochenen Kombinationstestung konnten wir auch bezüglich unserer kombinierten Untersuchungen auf pANCA und ASCA bzw. auf pANCA, PAK und ASCA einen hohen diagnostischen Wert für die Differentialdiagnose chronisch entzündlicher Darmerkrankungen nachweisen. Die gemeinsame Bestimmung von pANCA und ASCA erwies sich dabei der kombinierten Untersuchung auf alle drei Antikörper überlegen, da die Hinzunahme von PAK lediglich zu einer deutlichen Verminderung der Sensitivität auf Morbus Crohn führte.

## 5 Zusammenfassung

Die Differentialdiagnose Morbus Crohn – Colitis ulcerosa kann gelegentlich Schwierigkeiten bereiten. Bisher gibt es keine serologischen Marker, die ausreichend spezifisch und sensitiv sind, um eine sichere Diagnosestellung dieser Erkrankungen zu ermöglichen.

In der vorliegenden Studie wurde die Bedeutung der drei Autoantikörper pANCA, PAK und ASCA für die Differentialdiagnose dieser chronisch entzündlichen Darmerkrankungen untersucht. Als Detektionsverfahren wurde die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie verwendet und zum Nachweis von ASCA auch ein ELISA-Test etabliert.

Im Gegensatz zu anderen bisher bei CED beschriebenen Antikörpern zeichneten sich die drei untersuchten Antikörper durch eine hohe Krankheitsspezifität aus (pANCA = 91%; PAK = rund 97%; ASCA = rund 97% (IIF), 98,6% (ELISA)).

Aufgrund der eingeschränkten Sensitivität, besonders bei PAK (32,5%) und pANCA (ca. 61%), scheinen diese Marker zur Erstdiagnose eines Morbus Crohn bzw. einer Colitis ulcerosa bei Erkrankungsverdacht weniger geeignet zu sein, da bei antikörpernegativen Patienten nicht sicher eine CED ausgeschlossen werden kann. Lediglich der ASCA-Test, vor allem im ELISA-Verfahren, könnte mit einer recht hohen Sensitivität von 76% im ELISA und 72% in der IIF auch zu diesem Zweck geeignet sein. Die Ergebnisse der beiden Detektionsverfahren korrelierten insgesamt gut miteinander (Korrelationskoeffizient = 0,99), allerdings erlaubte der ELISA eine semiquantitative Analyse und zeigte sich der indirekten Immunfluoreszenztechnik in den Testergebnissen leicht überlegen und ist deshalb zur Detektion von ASCA zu präferieren.

ASCA stellte sich somit, im Gegensatz zu PAK, nicht nur als hochspezifischer, sondern auch als vergleichsweise sensitiver serologischer Marker für Morbus Crohn heraus.

Wir konnten in unserer Studie keinen signifikanten Zusammenhang zwischen ASCA-Titer und Krankheitsaktivität feststellen, was gegen eine Beteiligung dieses Antikörpers an der Pathogenese von Morbus Crohn spricht. Erklären könnte man ASCA als pathologische Reaktion auf Zellwandkomponenten von Hefezellen, Bakterien oder Mykobakterien sowie auf ähnliche menschliche Antigene. Die Entwicklung dieser Antikörper scheint jedenfalls nicht einfach das Resultat einer generalisierten Erhöhung der intestinalen Permeabilität zu sein.

Bei einem positivem Antikörpernachweis ließ sich mit den untersuchten serologischen Markern, besonders mit PAK und ASCA, bei den meisten Patienten eine korrekte Zuordnung der Diagnose erzielen (pANCA = 73,6%; PAK = rund 97%; ASCA = 96,8% (IIF), 99% (ELISA)). Bei pANCA sind allerdings teils deutliche regionale Differenzen in den Ergebnissen zu berücksichtigen, die wahrscheinlich im unterschiedlichen genetischen Hintergrund der untersuchten Populationen liegen.

Die gleichzeitige Bestimmung von zwei (pANCA und ASCA) bzw. aller drei Antikörper führte zu einer weiteren Verbesserung der Spezifität und des positiven Vorhersagewerts bezüglich einer der beiden Erkrankungen. Mit Hilfe der kombinierten serologischen Untersuchungen auf Morbus Crohn konnte eine Spezifität und ein positiver Vorhersagewert von jeweils 100% bezüglich dieser Krankheit erreicht werden. Mit der vorliegende Arbeit konnte gezeigt werden, daß die untersuchten Antikörper eine klinisch relevante Bedeutung für die Differentialdiagnose chronisch entzündlicher Darmerkrankungen haben. Selbstverständlich können diese serologischen Parameter keinesfalls einen Ersatz für klinische, endoskopische, radiologische und histologische Diagnosekriterien darstellen. Dennoch können sie bei einer Colitis indeterminata oder auch bei der Erstdiagnose von CED wichtige diagnostische Hinweise geben.



## 6 Literaturverzeichnis

- [1] **Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD.**  
Regional enteritis: A pathological and clinical entity.  
*The Journal of the American Medical Association* 1932; **99**: 1323-1329.
- [2] **Wilks S.**  
Morbid appearances in the intestines of Miss Banks.  
*Medical times and gazette* 1859; **2**: 264-265.
- [3] **Daiss W, Scheurlen M, Malchow H.**  
Epidemiology of inflammatory bowel disease in the county of Tübingen (West Germany).  
*Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1989; **24 (Suppl. 170)**: 39-43.
- [4] **Yang H, McElree C, Roth MP, Shanahan F, Targan SR, Rotter JI.**  
Familial empiric risks of inflammatory bowel disease: differences between Jews and non-Jews.  
*Gut* 1993; **34**: 517-524.
- [5] **Korelitz BI.**  
From Crohn to Crohn's disease-1979: an epidemiology study in New York City.  
*Mount Sinai Journal of Medicine* 1979; **46**: 533-540.
- [6] **Mayberry JF, Rhodes J, Newcombe RG.**  
Familial prevalence of inflammatory bowel disease in relatives of patients with Crohn's disease.  
*British Medical Journal* 1980; **280**: 84.
- [7] **Sedlack RE, Whisnant J, Elveback LR, Kurland LT.**  
Incidence of Crohn's disease in Olmsted County, Minnesota, 1935-1975.  
*American Journal of Epidemiology* 1980; **112**: 759-763.

- [8] **Weterman IT, Pena AS.**  
Familial incidence of Crohn's Disease in the Netherlands and a review of the literature.  
*Gastroenterology* 1984; **86**: 449-452.
- [9] **Bennet RA, Rubin PH, Present DH.**  
Frequency of inflammatory bowel disease of offspring of couples both presenting with inflammatory bowel disease.  
*Gastroenterology* 1988; **100**: 1638-1643.
- [10] **Farmer RG.**  
Study of family history among patients with inflammatory bowel disease.  
*Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1989; **24 (Suppl. 170)**: 64-68.
- [11] **Gilat T, Hacoheh D, Lilos P, Langman MJS.**  
Childhood factors in ulcerative colitis and Crohn's disease. An international cooperative study.  
*Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1987; **22**: 1009-1027.
- [12] **Roth MP, Petersen GM, McElree C, Vadheim CM, Panish JF, Rotter JI.**  
Familial empiric risks estimates of inflammatory bowel disease in Ashkenazy Jews.  
*Gastroenterology* 1989; **96**: 1016-1020.
- [13] **Murray C, Thompson A.**  
Marital idiopathic inflammatory disease. Crohn's disease in a husband and wife.  
*Journal of Clinical Gastroenterology* 1988; **10**: 95-97.
- [14] **Tysk C, Lindberg E, Järnerot G, Floderus-Myrhed AB.**  
Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking.  
*Gut* 1988; **29**: 990-996.

- [15] **Purrmann J, Cleveland S, Hengels KJ.**  
Untersuchungen zu verschiedenen Vererbungsmodellen beim Morbus Crohn.  
*Zeitschrift für Gastroenterologie* 1991; **29**: 278-282.
- [16] **Curran ME, Lau KF, Hampe J, Schreiber S, Bridger S, et al.**  
Genetic analysis of inflammatory bowel disease in a large European cohort supports linkage to chromosomes 12 and 16.  
*Gastroenterology* 1998; **115**: 1066-1071.
- [17] **Duchmann R, Schmitt R, Knolle P, Meyer zum Büschenfelde KH, et al.**  
Tolerance towards resident intestinal flora in mice is abrogated in experimental colitis and restored by treatment with interleukin-10 or antibodies to interleukin-12.  
*European Journal of Immunology* 1996; **934**: 938-982.
- [18] **Broberger O, Perlmann P.**  
Autoantibodies in human ulcerative colitis.  
*Journal of Exp Medicine* 1959; **110**: 657-674.
- [19] **Saxon A, Shanahan F, Landers C, Ganz T, Targan S.**  
A distinct subset of antineutrophil cytoplasmic antibodies is associated with inflammatory bowel disease.  
*Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1990; **86**: 202-210.
- [20] **Duerr RH, Targan SR, Landers CL, LaRusso NF, Lindsay KL, et al.**  
Neutrophil cytoplasmic antibodies: a link between primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis.  
*Gastroenterology* 1991; **100**: 1385-1391.

- [21] **Seibold F, Weber P, Schöning A, Mörk H, Goppel S, Scheurlen M.**  
Neutrophil antibodies in chronic liver disease and inflammatory bowel disease: do they react with different antigens?  
*European Journal of Gastroenterology and Hepatology* 1996; **8**: 1095-1100.
- [22] **Walsmley RS, Zhao MH, Hamilton MI, et al.**  
Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies against bactericidal/permeability increasing protein in inflammatory bowel disease.  
*Gut* 1997; **40**: 105-109.
- [23] **Seibold F, Weber P, Klein R, Berg PA, Wiedmann KH.**  
Clinical significance of antibodies against neutrophils in patients with inflammatory bowel disease and primary sclerosing cholangitis.  
*Gut* 1992; **33**: 657-662.
- [24] **Sandborn WJ, Landers CJ, Tremaine WJ, Targan SR.**  
The presence of antineutrophil cytoplasmic antibodies correlates with pouchitis after ileal pouch-anal anastomosis for ulcerative colitis.  
*Gastroenterology* 1993; **104**: A774.
- [25] **Shanahan F, Duerr R, Rotter JI., et al.**  
Neutrophil autoantibodies in ulcerative colitis: familial aggregation and genetic heterogeneity.  
*Gastroenterology* 1992; **103**: 456-461.
- [26] **Seibold F, Slametschka D, Gregor M, Weber P.**  
Neutrophil autoantibodies: genetic marker in primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis.  
*Gastroenterology* 1994; **107**: 532-536.

- [27] **Reumaux D, Colombel JF, Delecourt L, Noel LH, Cortot A, Duthilleul P.**  
Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in relatives of patients with ulcerative colitis.  
*Gastroenterology* 1992; **103**: 1706.
- [28] **Lee CW, Lennard-Jones JE, Cambridge G.**  
Antineutrophil antibodies in familial inflammatory bowel disease.  
*Gastroenterology* 1995; **108**: 428-433.
- [29] **Stöcker W, Otte M, Ulrich S, Normann D, Stöcker K, Jantschek G.**  
Autoantikörper gegen exokrines Pankreas und gegen intestinale Becherzellen in der Diagnostik des Morbus Crohn und der Colitis ulcerosa.  
*Deutsche medizinische Wochenschrift* 1984; **109**: 1963-1969.
- [30] **Seibold F, Weber P, Jenss H, Wiedmann KH.**  
Antibodies to a trypsin sensitive pancreatic antigen in chronic inflammatory bowel disease: specific markers for a subgroup of patients with Crohn's disease.  
*Gut* 1991; **32**: 1192-1197.
- [31] **Seibold F, Scheurlen M, Müller A, Jenss H, Weber P.**  
Impaired pancreatic function in patients with Crohn's disease with and without pancreatic antibodies.  
*Journal of Clinical Gastroenterology* 1996; **22**: 202-206.
- [32] **Seibold F, Mörk H, Tanza S, Müller A, Holzhüter C, Weber P, Scheurlen M.**  
Pancreatic Autoantibodies in Crohn's disease: a family study.  
*Gut* 1997; **40**: 481-484.
- [33] **Main J, McKenzie H, Yeaman GR, et al.**  
Antibody to *Saccharomyces cerevisiae* (baker's yeast) in Crohn's disease.  
*British Medical Journal* 1988; **297**: 1105-1106.

- [34] **McKenzie H, Main J, Pennington CR, Parratt D.**  
Antibodies to selected strains of *Saccharomyces cerevisiae* (baker's and brewer's yeast) and *Candida albicans* in Crohn's disease.  
*Gut* 1990; **31**: 536-538.
- [35] **Sendid B, Colombel JF, Jacquinot PM, Faille C, et al.**  
Specific antibody response to oligomannosidic epitopes in Crohn's disease.  
*Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 1996; **3**: 219-226.
- [36] **Malchow H, Ewe K, Brandes JW.**  
European cooperative Crohn's disease study (ECCDS): results of drug treatment.  
*Gastroenterology* 1984; **86**: 249-266.
- [37] **Best WJ, Bechtel J, Singleton J, Kern F.**  
Development of a Crohn's disease activity index.  
*Gastroenterology* 1976; **70**: 439-444.
- [38] **Truelove SC, Witts LJ.**  
Cortisone in ulcerative colitis: final report of a therapeutic trial.  
*British Medical Journal* 1955; **2**: 1041-1048.
- [39] **Kocourek J, Ballou CE.**  
Method for fingerprinting yeast cell wall mannans.  
*Journal of Bacteriology* 1969; **100**: 1175-1181.
- [40] **Giaffer MH, Clark A, Holdsworth CD.**  
Antibodies to *Saccharomyces cerevisiae* in patients with Crohn's disease and their possible pathogenetic importance.  
*Gut* 1992; **33**: 1071-1075.

- [41] **Barnes RMR, Allan S, Taylor-Robinson CH, Finn R, Johnson PM.**  
Serum antibodies reactive with *Saccharomyces cerevisiae* in inflammatory bowel disease: is IgA antibody a marker for Crohn's disease.  
*Int Arch Allergy Appl Immunology* 1990; **92**: 9-15.
- [42] **Barclay GR, McKenzie H, Pennington J, et al.**  
The effect of dietary yeast on the activity of stable chronic Crohn's disease.  
*Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1992; **27**: 196-200.
- [43] **Seibold F, Brandwein S, Simpson S, Terhorst S, Elson CO.**  
pANCA represents a cross-reactivity to enteric bacterial antigens.  
*Journal of Clinical Immunology* 1998; **18**: 153-160.
- [44] **Lindberg E, Magnusson KE, Tysk C, Järnerot G.**  
Antibody (IgG, IgA, and IgM) to baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), yeast mannan, gliadin, ovalbumin and betalactoglobulin in monozygotic twins with inflammatory bowel disease.  
*Gut* 1992; **33**: 909-913.
- [45] **Plevy SE, Vasiliauskas EA, Taylor K, et al.**  
The Crohn's disease associated tumor necrosis factor microsatellite A2B1C2D4E1 haplotype and anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibody define medically resistant forms of ulcerative colitis.  
*Gastroenterology* 1997; **112**: 1112.
- [46] **Oudkerk Pool M, Ellerbroek PM, Ridwan BU, et al.**  
Serum antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease are mainly associated with ulcerative colitis. A correlation study between perinuclear antineutrophil cytoplasmic autoantibodies and clinical parameters, medical, and surgical treatment.  
*Gut* 1993; **34**: 46-50.

- [47] **Cambridge G, Rampton DS, Stevens TR, et al.**  
Anti-neutrophil antibodies in inflammatory bowel disease: prevalence and diagnostic role.  
*Gut* 1992; **33**: 668-674.
- [48] **Romas, E, Paspaliaris B, d'Apice AJ, Elliott PR.**  
Autoantibodies to neutrophil cytoplasmic (ANCA) and endothelial cell surface antigens (AECA) in chronic inflammatory bowel disease.  
*Aust N Z J Med* 1992; **22**: 652-659.
- [49] **Papo M, Quer JC, Pastor RM, et al.**  
Antineutrophil cytoplasmic antibodies in relatives of patients with inflammatory bowel disease.  
*American Journal of Gastroenterology* 1996; **91**: 1512-1515.
- [50] **Yang H, Rotter JI, Toyoda H, Landers C, et al.**  
Ulcerative colitis: a genetically heterogeneous disorder defined by genetic (HLA class II) and subclinical (antineutrophil cytoplasmic antibodies) markers.  
*Journal of Clinical Investigation* 1993; **92**: 1080-1084.
- [51] **Gordon LK, Eggena M, Holland GN, Weisz JM, Braun J.**  
pANCA antibodies in patients with anterior uveitis: identification of a marker antibody usually associated with ulcerative colitis.  
*Journal of Clinical Immunology* 1998; **18**: 264-271.
- [52] **Cornely OA, Hauschild S, Weise C, et al.**  
Seroprevalence and disease association of antineutrophil cytoplasmic autoantibodies and antigens in HIV infection.  
*Infection* 1999; **27**: 92-96.



**[53] Vasiliauskas EA, Plevy SE, Landers CJ, et al.**

Perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies in patients with Crohn's disease define a clinical subgroup.

*Gastroenterology* 1996; **110**: 1810-1819.

**[54] Quinton JF, Sendid B, Reumaux D, Duthilleul P, et al.**

Anti-Saccharomyces cerevisiae mannan antibodies combined with antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease: prevalence and diagnostic role.

*Gut* 1998; **42**: 788-791.

**Folgende Lehrbücher wurden verwendet:**

**1.) Feldman M, Scharschmidt BF, Sleisenger MH.**

Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease.

6<sup>th</sup> Edition (Vol 2) 1998; WB Saunders Company, Philadelphia.

**2.) Lehnert H, Schuster HP.**

essentials Innere Medizin.

1<sup>th</sup> Edition 1998; Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.

## **Danksagung**

Für die Überlassung des Dissertationsthemas und die freundliche engagierte Betreuung danke ich Herrn Priv.-Doz. Dr. med. F. Seibold und Herrn Prof. Dr. med. M. Scheurlen.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Rainer Hufnagl  
Geburtsdatum/-ort: 09.05.1972 in Würzburg  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

## Schulbildung

1978 – 1982 Grundschole Kitzingen  
1982 – 1991 Armin-Knab-Gymnasium Kitzingen  
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

## Zivildienst

1991 – 1992 8 Monate im Krankenpflagedienst,  
Kreiskrankenhaus Kitzingen  
7 Monate im Behindertenfahrdienst,  
Johanniter-Unfall-Hilfe Würzburg

## Hochschulausbildung

1993 – 2000 Studium der Humanmedizin an der Universität Würzburg  
31.05.2000 Ärztliche Prüfung  
1999 – 2000 Praktisches Jahr:  
1. Tertial: Kinder- u. Jugendpsychiatrie  
an der Universitätsklinik Würzburg  
2. Tertial: Innere Medizin am Kantonsspital Glarus,  
Schweiz  
3. Tertial: Chirurgie an der Universitätsklinik Würzburg  
1997 – 2000 Promotion bei Prof. Dr. M. Scheurlen,  
Medizinische Poliklinik der Universität Würzburg

## Arzt im Praktikum

11/2000 – 05/2000 Praxis für Haut- und Geschlechtskrankheiten  
(Allergologie, Phlebologie, NHV, Umweltmedizin)  
Dr. med. J. Müller-Steinmann, Kiel  
07/2001 – 12/2001 PsoriSol Therapiezentrum GmbH, Hersbruck  
Fachklinik für Dermatologie und Allergologie,  
Lehrklinik für Ernährungsmedizin DAEM  
Seit 03/2002 Universitätsklinik für Dermatologie und Allergologie, Ulm

Kitzingen, 06. Juli 2002