

Aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Endomikroskopie: Identifikation und Prävalenz intramukosaler, enteraler Bakterien bei  
chronisch entzündlichen Darmerkrankungen**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Medizin der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Marcus Kerner  
aus Mainz

Mainz, 2019

Tag der Promotion: 30. Juni 2020

## Inhaltsverzeichnis

|            |                                                                                               |           |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b>   | <b>Einleitung</b> .....                                                                       | <b>5</b>  |
| <b>1.1</b> | <b>Chronisch entzündliche Darmerkrankungen</b> .....                                          | <b>6</b>  |
| <b>1.2</b> | <b>Morbus Crohn</b> .....                                                                     | <b>6</b>  |
| 1.2.1      | Epidemiologie des Morbus Crohn.....                                                           | 6         |
| 1.2.2      | Pathogenese.....                                                                              | 6         |
| <b>1.3</b> | <b>Colitis ulcerosa</b> .....                                                                 | <b>7</b>  |
| 1.3.1      | Epidemiologie der Colitis ulcerosa.....                                                       | 7         |
| 1.3.2      | Pathogenese.....                                                                              | 8         |
| <b>1.4</b> | <b>Ätiologie von CED</b> .....                                                                | <b>9</b>  |
| 1.4.1      | Das Mikrobiom und die Barrierefunktion der Darmschleimhaut.....                               | 9         |
| 1.4.2      | Umweltfaktoren.....                                                                           | 10        |
| 1.4.3      | Genetische Dispositionen von CED.....                                                         | 11        |
| 1.4.4      | Immunologische Faktoren.....                                                                  | 12        |
| 1.4.5      | Infektionen und die luminalen Darmflora als Auslöser von CED.....                             | 13        |
| <b>1.5</b> | <b>Diagnostik von CED</b> .....                                                               | <b>15</b> |
| 1.5.1      | Anamnese und klinisches Erscheinungsbild des Morbus Crohn.....                                | 16        |
| 1.5.1.1    | Komplikationen des Morbus Crohn.....                                                          | 16        |
| 1.5.1.1.1  | Fisteln.....                                                                                  | 17        |
| 1.5.1.1.2  | Stenosen.....                                                                                 | 17        |
| 1.5.1.1.3  | Extraintestinale Manifestationen.....                                                         | 18        |
| 1.5.1.1.4  | Malignität.....                                                                               | 19        |
| 1.5.1.2    | Anamnese und klinisches Erscheinungsbild der Colitis ulcerosa.....                            | 19        |
| 1.5.1.2.1  | Komplikationen.....                                                                           | 20        |
| 1.5.1.2.2  | Fulminante Colitis.....                                                                       | 20        |
| 1.5.1.2.3  | Strikturen.....                                                                               | 20        |
| 1.5.1.2.4  | Intestinale Blutungen.....                                                                    | 20        |
| 1.5.1.2.5  | Colonkarzinom bedingt durch Colitis ulcerosa.....                                             | 21        |
| 1.5.2      | Endoskopie und Histologie.....                                                                | 21        |
| 1.5.3      | Stellenwert von fäkalen Entzündungsmarkern in der Verlaufsdagnostik.....                      | 24        |
| 1.5.4      | Mikrobiologische Analyse.....                                                                 | 24        |
| 1.5.5      | Radiologische und sonographische Diagnostik.....                                              | 25        |
| 1.5.6      | Darstellung der intramukosal gelegenen Bakterien mittels konfokaler Laserendomikroskopie..... | 27        |
| <b>2</b>   | <b>Ziel der aktuellen Studie</b> .....                                                        | <b>28</b> |
| <b>3</b>   | <b>Materialien und Methoden</b> .....                                                         | <b>29</b> |
| 3.1        | Endomikroskopie.....                                                                          | 29        |
| 3.1.1      | Konfokale Laserendomikroskopie.....                                                           | 29        |
| 3.1.2      | Kontraststoffe.....                                                                           | 30        |
| 3.1.3      | Erkennen und Charakterisierung von intramukosalen Bakterien in vivo mittels CLE.....          | 31        |
| 3.1.4      | Erkennen und Beurteilen von Leckage und Inflammation.....                                     | 32        |
| 3.1.5      | Farbstoff Fluorescein.....                                                                    | 34        |
| 3.1.6      | Untersuchungstechnik.....                                                                     | 35        |
| 3.2        | Studiendesign und Patientenkollektiv.....                                                     | 35        |
| 3.2.1      | Einschlusskriterien.....                                                                      | 36        |
| 3.2.2      | Datenerfassung.....                                                                           | 36        |
| 3.3        | Statistische Methoden.....                                                                    | 37        |
| <b>4</b>   | <b>Ergebnisse</b> .....                                                                       | <b>38</b> |

|   |                           |    |
|---|---------------------------|----|
| 5 | Diskussion .....          | 49 |
| 6 | Zusammenfassung.....      | 53 |
| 7 | Literaturverzeichnis..... | 55 |

## Abkürzungsverzeichnis

|      |                                                                                |
|------|--------------------------------------------------------------------------------|
| ASA  | Aminosalizylsäure                                                              |
| AWMF | Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen medizinischen<br>Fachgesellschaften |
| BMI  | Body Mass Index                                                                |
| CED  | chronisch entzündliche Darmerkrankungen                                        |
| CDI  | Clostridien-difficile-Infektion                                                |
| CLE  | konfokale Laserendomikroskopie                                                 |
| CMV  | Zytomegalie- Virus                                                             |
| CRC  | kolorektales Karzinom                                                          |
| CRP  | C-reaktives Protein                                                            |
| CT   | Computertomographie                                                            |
| CU   | Colitis ulcerosa                                                               |
| DNA  | Desoxyribonukleinsäure                                                         |
| FMT  | Fäkaler Mikrobiomtransfer                                                      |
| HGIN | hochgradige intraepitheliale Neoplasie                                         |
| HLA  | humanes Leukozyten Antigen                                                     |
| IBD  | inflammatory bowel disease                                                     |
| IL   | Interleukin                                                                    |
| IN   | intraepitheliale Neoplasie                                                     |

|       |                                                          |
|-------|----------------------------------------------------------|
| MC    | Morbus Crohn                                             |
| MRT   | Magnetresonanztomographie                                |
| NBI   | Narrow Band Imaging                                      |
| pANCA | perinukleäre antineutrophile zytoplasmatische Antikörper |
| PCR   | Polymerase-Kettenreaktion                                |
| PSC   | primär sklerosierende Cholangitis                        |
| TNF   | Tumor-Nekrose-Faktor                                     |
| Tregs | regulatorische T-Zellen                                  |
| WHO   | Weltgesundheitsorganisation                              |

## 1 Einleitung

Der Morbus Crohn (MC) und die Colitis ulcerosa (CU) als wichtigste Vertreter der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) ähneln sich in ihrer klinischen Präsentation sehr und meistens ist eine Unterscheidung beider Krankheiten voneinander schwierig. Generell ist zu sagen, dass es sich bei CED um multifaktorielle Erkrankungen handelt, welche sich nicht auf einzelne Ursachen zurückführen lassen. Gründe für die Entstehung einer CED beruhen am ehesten auf einer genetischen Veranlagung, verschiedenen Risikofaktoren sowie einer Störung der Barrierefunktion der Darmschleimhaut mit der Konsequenz, dass sich Darmbakterien auf der Darmwand ansiedeln können und dort eine krankhafte Immunreaktion auslösen. Mittels der Laserendomikroskopie gelingt es, diese intramukosal gelegenen Bakterien darzustellen und deren Häufung im Zusammenhang mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa zu untersuchen.

## **1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen**

Unter chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) versteht man wiederkehrende oder kontinuierlich bestehende Entzündungen des Darms. Die zwei häufigsten Vertreter stellen einmal den Morbus Crohn und zum anderen die Colitis ulcerosa dar [1,2,3]. Schon in frühen Jahrhunderten wurden bei verschiedenen Patienten Symptome und Befunde beschrieben, die sich mit denen einer Colitis ulcerosa oder eines Morbus Crohn vereinbaren lassen. So beschrieb Wilhelm Fabry um 1612 in einem Bericht in der Autopsie eines Jungen einen Befund, der mit einem Morbus Crohn vereinbar ist [4,5]. Bis heute ist die Ätiologie der CED noch nicht vollständig geklärt. Jedoch geht man davon aus, dass die Darmflora eine essentielle Rolle in der Pathogenese spielt [6,7,8,9].

## **1.2 Morbus Crohn**

### **1.2.1 Epidemiologie des Morbus Crohn**

Pro Jahr treten in Deutschland etwa 6 neue Fälle von Morbus Crohn pro 100.000 Einwohner auf. [115] Die Prävalenz liegt bei 100-200 pro 100.000 Einwohnern. [116,117] Männer und Frauen sind gleich häufig betroffen. Morbus Crohn kann sich in jedem Alter manifestieren. Am häufigsten ist ein Erkrankungsbeginn zwischen dem 15. und 35. Lebensjahr. [118] In 15 bis 25 Prozent der Fälle zeigen sich die ersten Symptome vor dem 20. Lebensjahr, vereinzelt sogar schon im Säuglingsalter. In den letzten 20 Jahren hat die Zahl der Erstdiagnosen insgesamt zugenommen.[118]

### **1.2.2 Pathogenese**

Charakteristisch für den Morbus Crohn ist ein transmuraler Befall der Darmschleimhaut, so dass alle Darmwandschichten von der Tunica mucosa bis zur Tunica serosa sowie

angrenzende Strukturen betroffen sind. Grundsätzlich können jedoch alle Abschnitte des Gastrointestinaltraktes vom Mund bis zum Anus befallen sein. Bei 80% der Erkrankten liegt im terminalen Ileum oder proximalen Kolon eine Entzündung vor. Es zeigt sich als typisches Befallsmuster des Morbus Crohn eine diskontinuierliche, segmental betroffene (sog. "skip lesions") Darmmukosa.

Die transmurale Entzündung führt zu dem typischen makroskopischen Erscheinungsbild des Morbus Crohn mit ödematöser und fibrotischer Verdickung der Darmwand der betroffenen Segmente des Intestinaltraktes und der Ausbildung von Mikroperforationen der Darmwand, Fisteln, Fissuren, Fibrosierungen und Stenosen. Eine Penetration der Entzündung in benachbarte Strukturen kann hauptsächlich im Bereich des terminalen Ileums zur Ausbildung von entzündlichen Verbackungen einzelner Darmabschnitte, sogenannten Konglomerattumoren ("fibrostenotic lesions"), führen. Auch eine Abkapselung des Entzündungsprozesses mit konsekutiver Ausbildung von Abszessen ist typisch für den Morbus Crohn. [119]

### **1.3 Colitis ulcerosa**

#### **1.3.1 Epidemiologie der Colitis ulcerosa**

Die Colitis ulcerosa (CU) wird zu den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen gezählt. Erstmals wurde die CU 1859 von Samuel Wilks aus London erwähnt [11].

Die CU ist in allen Altersstufen anzutreffen, d.h. von den ersten Lebensjahren bis ins hohe Lebensalter. Mit einer Inzidenz von 6 Fällen pro 100.000 Einwohner pro Jahr ergibt dies eine Prävalenz von 210 Patienten pro 100.000 Einwohner und eine Zahl von 168.000 Betroffenen in Deutschland [12]. Somit tritt diese Erkrankung gehäuft auf. Meist betroffen sind junge Erwachsene im Alter zwischen 20 und 40 Jahren. [10]

### 1.3.2 Pathogenese

Die Colitis ulcerosa ist eine Erkrankung von Kolon, Rektum und in Ausnahmefällen auch des terminalen Ileum („backwash ileitis“), die durch eine chronische Entzündung der einzelnen Abschnitte charakterisiert ist. Bis heute sind die genaue Ätiologie und Pathogenese ungeklärt, doch vermutet man, dass die eigene Darmflora durch inadäquate und chronische Aktivierung des mukosalen Immunsystems eine entscheidende Rolle bei der Entstehung spielt. [6,7,8,9] Diese anormale Reaktion wird vermutlich durch Defekte in der Barrierefunktion des Darmepithels und des mukosalen Immunsystems getriggert. [15] Weitere Studien gaben Hinweise auf einen Zusammenhang des Auftretens der Erkrankung mit immunologischen Faktoren, verschiedenen Umwelteinflüssen, wie z.B. Stress, Diät und Infektionen, oder einer genetischen Disposition.

Je nach Ausdehnungsgrad des Entzündungsprozesses wird die Colitis ulcerosa unterschiedlich beschrieben:

- Proktitis im Sinne einer auf das Rektum limitierten Entzündung;
- distale Colitis oder Proktosigmoiditis, wenn sich der Entzündungsprozess maximal bis zum mittleren Sigmoid ausdehnt;
- linksseitige Colitis bei Ausdehnung des Entzündungsprozesses bis zur linken Colonflexur;
- ausgedehnte Colitis, wenn der Entzündungsprozess über die rechte Colonflexur nach proximal, aber nicht bis zum Coecum reicht;
- Pancolitis bei Ausdehnung der Entzündung bis zum Coecum.



## **1.4 Ätiologie von CED**

Den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen liegt wahrscheinlich eine komplexe Ätiologie zugrunde, die im Wesentlichen auf dem Zusammenspiel dreier Hauptfaktoren basiert: erstens auf dem Einfluss von Umweltfaktoren, zweitens auf einer genetischen Prädisposition, drittens spielen die intestinale Mikroflora und eine Dysregulation des Immunsystems eine wichtige Rolle [20, 27, 28, 6].

### **1.4.1 Das Mikrobiom und die Barrierefunktion der Darmschleimhaut**

Ein Barrieredefekt der Darmschleimhaut gilt heute als sichere Ursache bei der Krankheitsentstehung der CED.[120]

Aufgrund eines Mangels an körpereigenen Antibiotika kommt es zu einer Störung der Darmschleimhaut. Diese Barriestörung macht es erst möglich, dass Bakterien in Bereiche der Darmwand vordringen können, die sie bei intakter Barriere nicht erreichen können, dort als Aggressor (unabhängig von ihrer Pathogenität) wahrgenommen werden und eine entsprechende Immunantwort induzieren.

Beim gesunden Mensch werden hohe Mengen antimikrobieller Peptide, sogenannte „Defensine“, produziert und über Panethzellen an der Basis der Dünndarmkrypten in das Darminnere abgegeben. Diese Defensine (HD5/HD6) regulieren die Zusammensetzung der Darmflora und schaffen damit eine Barriere, welche verhindert, dass Mikroorganismen in die Darmschleimhaut eindringen und eine Entzündung auslösen können. [120 ,121]

Es konnte gezeigt werden, dass bei Morbus Crohn-Patienten eine verminderte Produktion an Panethzelldefensinen besteht. Diese Tatsache hat nicht nur eine Verminderung der direkten Abwehrmechanismen der Darmschleimhaut gegenüber Mikroorganismen zur Folge, sondern auch einen Einfluss auf die antimikrobielle Funktion

des gesamten Dünndarms. Hieraus resultiert eine Veränderung der Zusammensetzung des Mikrobioms. Ähnliches konnte in einer Studie von R.a. Flavell für die Colitis ulcerosa gezeigt werden. [142]

Durch die CLE ist es möglich, diese Barrierestörung und den Übertritt der Bakterien nach intramukosal zu untersuchen und darzustellen.

#### **1.4.2 Umweltfaktoren**

Ergebnisse aus epidemiologischen Untersuchungen geben Hinweise auf ein enges Zusammenspiel von Umweltfaktoren und einer genetischen Prädisposition. [19] Die zeitliche Entwicklung der Inzidenzen, besonders die ansteigende Inzidenz der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen bei jungen Menschen im Zeitraum der letzten drei Jahrzehnte, kann nicht nur durch den alleinigen Einfluss von genetischen Faktoren erklärt werden. [19] Zum Beispiel haben die Rauchgewohnheiten der Patienten schon frühzeitig einen Einfluss auf die Krankheitsentstehung eines Morbus Crohn und auch einer Colitis ulcerosa durch eine Veränderung der Prädisposition für diese Erkrankungen [122, 34, 29]. Dabei zeigen sich gegensätzliche Effekte. Bei einem Morbus Crohn ist Rauchen assoziiert mit einer erhöhten Prädisposition für die Erkrankung, im Falle der Erkrankung mit einem raschen, progredienten Krankheitsverlauf und einer häufigeren Notwendigkeit operativer Interventionen und immunsuppressiver Therapien. Dagegen scheint das Rauchen bei der Colitis ulcerosa hinsichtlich der Krankheitsentstehung protektiv zu wirken, wobei sogar Dosis-Wirkungs-Beziehungen ermittelt werden konnten. Da die meisten Kinder und Jugendlichen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung der CED noch nicht rauchen, scheint hier das Passivrauchen eine größere Rolle zu spielen. Eine Studie von Lashner et al. konnte zeigen, dass Rauchen der Mutter zum Zeitpunkt der Geburt eher einen Risikofaktor für die Entstehung eines Morbus Crohn sowie einer Colitis ulcerosa darstellt, als das Rauchen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung der Erkrankung [35].

Weiterhin konnte ein Zusammenhang zwischen Colitis ulcerosa und mikrobiellen Faktoren festgestellt werden. In entzündeten Darmabschnitten findet sich eine erhöhte Anzahl dem Epithel anhaftender, aber auch intrazellulärer Bakterien, u.a. Bacteroides spp. und Enterobacteriaceae spp. [13]. Es wird angenommen, dass die normale intestinale Bakterienflora, die hier als Antigen wirkt, eine überschießende und kontinuierliche Aktivierung des Immunsystems hervorruft und somit die chronische Entzündung triggert. [15] Was die Ursache für die erhöhte Konzentration der Bakterien in der Darmflora ist, bleibt allerdings unklar.

### **1.4.3 Genetische Dispositionen von CED**

Resultate epidemiologischer Untersuchungen lassen eine genetische Komponente bei der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen vermuten. [19, 28]. Außerdem zeigten sich Unterschiede hinsichtlich der Prädisposition in ethnisch unterschiedlichen Bevölkerungsgruppen. Bei Zwillingspaaren lässt sich hohe Konkordanz beobachten und eine familiäre Häufung bei positiver Familienanamnese ist auffällig [138, 139, 19].

Auffällig ist eine hohe Prävalenz für eine sporadisch auftretende CED und für eine familiär gehäuft auftretende CED bei in Westeuropa und Nordamerika lebenden Ashkenazi-Juden [31]. Die niedrigsten Prävalenzraten, die jemals in einer Bevölkerungsgruppe beobachtet wurden, traten dagegen bei Afro-Amerikanern auf [32].

Die untersuchten Prävalenzen bezüglich der familiären Häufung von CED ergaben eindeutig, dass eine positive Familienanamnese der am besten nachweisbare Risikofaktor für die Krankheitsentstehung ist [140, 19]. Bei Patienten mit Colitis ulcerosa gibt es für Verwandte ersten Grades ein erhöhtes Erkrankungsrisiko (2-5%), beim Morbus Crohn besteht in 5-10% der Fälle eine familiäre Häufung [15], was einen Einfluss des Genoms auf das Auftreten der Krankheit nahelegt.

Mithilfe von Mikrosatellitenanalysen konnten verschiedene Genorte, *IBD1-9*, identifiziert werden, die mit der Veranlagung für chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) assoziiert sind. Hierbei scheint es spezifische Loci für Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn (MC) zu geben sowie auch solche, die die Empfindlichkeit für CED allgemein erhöhen [33]. In mehreren Studien konnte bestätigt werden, dass bestimmte HLA Klasse-II-Strukturen des *IBD3* Locus auf Chromosom 6p mit einer erhöhten Empfänglichkeit für Colitis ulcerosa und Morbus Crohn verknüpft sind.

In einer internationalen genetischen Assoziationsstudie von CED-Subphänotypen im Jahre 2016 konnten keine genetischen Assoziationen mit dem Krankheitsverlauf oder Komplikationen gefunden werden. [141]

#### **1.4.4 Immunologische Faktoren**

Wie bereits oben angesprochen, ist die Ätiologie der CED weitgehend unbekannt. Überwiegende Einstimmigkeit herrscht in der Literatur jedoch bezüglich der Pathogenese dieser Erkrankung. Wie sich gezeigt hat, spielt die chronische Entzündung der Darmmukosa, unter Beteiligung von Mediatoren des Immunsystems, eine maßgebliche Rolle bei diesem Krankheitsbild [144, 20, 21]. Durch ein Ungleichgewicht zwischen proinflammatorischen T-Helfer-Zellen und regulatorischen T-Helfer-Zellen kommt es vermutlich zu einer überschießenden Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen und/oder zu einer verminderten Down-Regulation der Zytokinproduktion. [143] Bei Patienten mit Morbus Crohn zeigt sich ein vermehrtes Vorkommen von TH1 Zellen, welche die Produktion von Interferon gamma ( $\text{INF-}\gamma$ ) und Interleukin-2 stimulieren. Bei Patienten mit Colitis ulcerosa hingegen zeigen sich vermehrt TH2 Zellen, welche typischerweise TGF- $\beta$  und Interleukin-5 produzieren.[145] In einer Studie von Neurath et al. zeigte sich, dass das Zytokin IL-23 bei der Immunpathogenese der CED eine wichtige Rolle einnimmt, indem es die chronische Entzündung zu unterhalten scheint. [26] Es konnte gezeigt werden, dass

es auf Grund einer Mutation des IL-23-Rezeptors und einem damit einhergehenden Funktionsverlust zu einer verminderten Aktivierung von T-Zellen kommt. Da das Zytokin auch auf der Oberfläche von Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert wird, kann dieses außerdem direkt die Barrierefunktion der Mukosa und die Immunantwort auf die intestinale Bakterienflora beeinflussen. IL-23 kann somit intestinale Entzündungen auch ohne die Beteiligung von T-Zellen verursachen [30]. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass das Protein Bcl-3 eine Rolle bei der Entstehung von CED spielt. Das BCL-3 Protein verhindert die Aktivierung von regulatorischen T-Zellen (Tregs). Hierdurch bleiben diese Tregs passiv, wodurch eine Regulation des Immunsystems ausbleibt und ein Entzündungsprozess induziert wird.[146]

Bei der Therapie der CED beruht das Behandlungskonzept auf einer ungezielten Hemmung der Entzündungsreaktion mit der Absicht, das oben beschriebene Ungleichgewicht zwischen der pro- und antiinflammatorischen Immunreaktion, vermittelt über Zytokine, wieder auszugleichen. Dieser positive therapeutische Effekt zeigt sich sowohl bei der Colitis ulcerosa als auch bei der Behandlung des Morbus Crohn [21, 101, 144].

#### **1.4.5 Infektionen und die luminaire Darmflora als Auslöser von CED**

Auch Infektionen wurden als mögliche Ursache oder als Einflussfaktor für die Krankheitsentstehung der CED untersucht. So wurden z.B. Infektionen durch das Mycobacterium paratuberculosis und durch Masernviren als Ursache der Entstehung von Morbus Crohn diskutiert [19]. Jedoch konnte nicht eindeutig geklärt werden, welche Rolle diese Mikroorganismen wirklich in der Pathogenese des Morbus Crohn spielen [36, 37, 38].

Eine ganz besondere Rolle in der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen spielt die intestinale Darmflora selbst. Es zeigte sich in Tiermodellen,

dass ein Vorhandensein der physiologischen intestinalen Darmflora und deren Mikroorganismen eine wichtige Voraussetzung für die Manifestation und den Krankheitsausbruch der Colitis bzw. der CED ist. Dies ist unabhängig davon, ob die Krankheit im Tiermodell chemisch induziert war, sich spontan entwickelte oder das Ergebnis eines veränderten genetischen Konstrukts war [6, 7, 8, 9,39].

Bestärkt bzw. ergänzt wird diese Beobachtung durch Ergebnisse weiterer klinischer Studien. So zeigte sich zum Beispiel, dass es durch eine Umleitung der Faeces über eine enterokutane Stomaanlage nach extrakorporal und einer damit verbundenen Entlastung der nachgeschalteten Darmabschnitte zu einem Anhalten der chronischen Inflammation bei Patienten mit aktivem Morbus Crohn kommt. Jedoch kommt es bei einem Zurückführen von Faeces in die umgangenen Darmabschnitte zu einem schnellen, erneuten Aufflammen der Erkrankung [40, 41, 42]. Antibiotische und probiotische Therapien scheinen zudem mit steigendem Erfolg, den Krankheitsverlauf der CED zu mildern und damit positiv zu beeinflussen [43]. Ein bereits nachgewiesener Erfolg hat der sogenannte fäkale Mikrobiomtransfer (FMT, „Stuhltransplantation“). Der FMT wird als hocheffektive Behandlungsoption der rekurrierenden Clostridien-difficile-Infektion (CDI) eingesetzt. Eine Überlegenheit der FMT im Vergleich zur klassischen antibiotischen Therapie konnte in Studien belegt werden. Durch den Mikrobiomtransfer können über 90% der rekurrierenden CDI dauerhaft geheilt werden. [135-137]

Physiologisch betrachtet befindet sich bei gesunden Individuen die intestinale Mucosa im Zustand einer ständigen kontrollierten, physiologischen Entzündung. Hierbei entsteht ein Gleichgewicht zwischen entzündlichen und antientzündlichen Mechanismen [28]. Das Immunsystem der Mucosa stellt insofern eine Barrierefunktion dar, indem sie ihre Mikroumgebung ständig auf Antigene untersucht und diese auf ihre Schädlichkeit kritisch überprüft. Für den Erhalt dieser mucosalen Homöostase mit ihrer Schutzfunktion bedarf es einer ständigen Reaktionsbereitschaft des Immunsystems zum einen auf Antigene der

residenten intestinalen Mikroflora und zum anderen auf Antigene aus der aufgenommenen Nahrung. Gleichzeitig muss eine wirkungsvolle Reaktionsfähigkeit des Immunsystems gegen episodisch auftretende Bedrohungen durch Pathogene gewährleistet sein. Auf Grund dieser Tatsache kann ein Fehlinterpretieren oder eine Fehlregulation der immunologischen Wahrnehmung von Antigenen und der immunologischen Antwort darauf zu einer Störung der mucosalen Homöostase führen und den Organismus zu einer unkontrollierten bzw. pathologischen Entzündung des Darmes prädisponieren [28]. Hierbei ist die genetische Prädisposition des Individuums und eine damit verbundene Anfälligkeit für eine immunologische Dysregulation entscheidend dafür, dass die normale, nicht pathogene intestinale Darmbesiedlung durch Mikroorganismen zu einer antigenen Bedrohung wird und die Unterscheidung zwischen pathogenen und nicht pathogenen Mikroorganismen durch das Immunsystem nicht mehr möglich ist. In diesem Ungleichgewicht liegt sicherlich der Schlüssel zum Verständnis des Mechanismus der Zerstörung des Gewebes und der erleichterten Translokation von Mikroorganismen, die bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen beobachtet wird [28].

### **1.5 Diagnostik von CED**

Bei der Diagnostik von CED sind die genaue Anamnese und eine klinische Statuserhebung besonders wichtig, da klinische Symptome der Diagnosestellung oft jahrelang vorausgehen [71].

### **1.5.1 Anamnese und klinisches Erscheinungsbild des Morbus Crohn**

Da das Befallsmuster des M. Crohn sehr variabel ist und den ganzen Gastrointestinaltrakt betreffen kann, zeigen sich im Vergleich zur Colitis ulcerosa auch variabelere klinische Erscheinungsbilder.

Klinische Hauptsymptome des Morbus Crohn mit geringer Spezifität sind Abdominalschmerzen und langanhaltende Durchfälle (meist ohne Blutbeimengung), Meteorismus und Flatulenz, Abgeschlagenheit und Müdigkeit, Gewichtsverlust und Fieber [70].

Symptomatisch zeigen sich auch typische Anzeichen einer Appendizitis mit kolikartigen Schmerzen im rechten Unterbauch, die aber auch, je nach Höhe des Befallsmusters, weiter kranial lokalisiert sein können. Oft lässt sich vom Untersucher auch eine schmerzhafte Resistenz tasten.

Bei Kindern können Wachstumsstörungen im Sinne eines retardierten Wachstums hinweisend auf einen Morbus Crohn sein, lange bevor sich die oben genannten typischen, aber unspezifischen Symptome manifestieren. Auch das Auftreten von Fisteln (vor allem Analfisteln) oder Abszessen (v.a. anorektale Abszesse) ist bei vielen Patienten Erstsymptom der Erkrankung.

Eine Studie von Pimentel et al. konnte bei 45 Patienten mit Morbus Crohn und 21 Patienten mit Colitis ulcerosa zeigen, dass unspezifische Symptome, wie sie für ein Reizdarmsyndrom charakteristisch sind, bei den Patienten mit M. Crohn im Mittel 7,7 Jahre vor der Diagnosestellung der Erkrankung auftraten, während diese Latenzzeit bei den Patienten mit Colitis ulcerosa im Mittel nur 1,2 Jahre betrug [71].

#### **1.5.1.1 Komplikationen des Morbus Crohn**

Zahlreiche Komplikationen sind mit dem Morbus Crohn assoziiert. Dazu zählen Komplikationen in situ wie z.B. Fistelbildungen, Stenosen, die Bildung von



Konglomerattumoren und die erhöhte Gefahr einer Darmwandperforation. Des Weiteren kann es auch zu extraintestinalen Manifestationen kommen.

#### **1.5.1.1.1 Fisteln**

Die klinische Symptomatik von Fisteln ist zum einen davon abhängig, von welchem Abschnitt des Gastrointestinaltraktes die Fistel ausgeht und zum anderen abhängig von weiteren intra- oder extraintestinalen Strukturen, die bei der Fistelbildung involviert sind. So kann es zum Beispiel bei entero-enterischen Fisteln zu einem vollkommen asymptomatischen Verlauf kommen; in manchen Fällen lassen sich abdominelle Resistenzen palpieren. Bei Fisteln zwischen dem Darm und der Blase resultieren rezidivierende Harnwegsinfektionen durch multiple Erreger. Entero-peritoneale Fisteln (meist zwischen Darm und Retroperitoneum) führen möglicherweise zur Bildung von Psoas-Abszessen und/oder zu Obstruktionen der Ureter mit konsekutiver Entwicklung einer Hydronephrose der betroffenen Niere. Häufig leiden Crohn-Patienten unter kosmetisch mitunter außerordentlich entstellenden entero-kutanen Fisteln, wobei der Darminhalt direkt auf die Hautoberfläche drainiert wird.

#### **1.5.1.1.2 Stenosen**

Studien, die den Krankheitsverlauf bei Patienten mit einem Morbus Crohn über mehrere Jahre retrospektiv untersuchten, konnten bei 27 – 33% der Crohn-Patienten einen stenosierenden Verlauf der Erkrankung beobachten [89, 90]. Durch den Befall des Dünndarmes von Morbus Crohn-Patienten kann es zu einer Obstruktion bzw. Stenosierung des Darmabschnittes kommen. Diese Folge ist die häufigste Indikation für eine operative Intervention. Die Obstruktion entsteht im Rahmen einer Inflammation und der Ausbildung eines Ödems in bereits verengten Darmabschnitten. Dabei kann es sich

oft nur um eine partielle und auch temporäre Obstruktion des Darmlumens handeln, besonders dann, wenn der Ödembildung und der Entzündung therapeutisch schon entgegengewirkt wurde. Durch fibrosierende Prozesse verläuft die Stenosierung des Darmlumens allerdings zumeist langsam, jedoch progressiv ab. Eine plötzliche und komplette Obstruktion des Darmlumens wird dagegen sehr häufig bei Entzündungsprozessen mit einer Adhäsion von Darmschlingen mit konsekutiver Verbackung und der Ausbildung von sogenannten Konglomerattumoren beobachtet

#### 1.5.1.1.3 Extraintestinale Manifestationen

Extraintestinale Manifestationen des Morbus Crohn betreffen vor allem die Haut, die Augen, die Gelenke und die Leber, aber auch das Gefäßsystem und die Nieren **[88]**:

- Haut: vor allem Zinkmangeldermatosen (Akrodermatitis enteropathica), Aphten, Erythema nodosum und Pyoderma gangraenosum **[79]**;
- Augen: vor allem Episkleritis, Iritis, Uveitis und Keratitis **[80]**;
- Gelenke: Arthritis vor allem der großen Gelenke ohne Destruktion der Synovialis, undifferenzierte Spondylarthropathien und ankylosierende Spondylitis (meist HLA-B27-positiv) **[82, 81]**;
- Leber: primär sklerosierende Cholangitis (PSC) seltener als bei der Colitis ulcerosa **[83]**;
- vaskulär: venöse und arterielle Thrombembolien **[86, 85, 84]**;
- renal: sekundäre Amyloidose der Nieren mit Entwicklung einer Niereninsuffizienz **[87]**.

#### **1.5.1.1.4 Malignität**

Bei einem ausgedehnten Befall des Kolons durch den Morbus Crohn scheint das Risiko für die Entstehung eines Colonkarzinoms nicht nur bei der Colitis ulcerosa, sondern auch beim Morbus Crohn erhöht zu sein [91]. Bei gleicher Ausdehnung und gleicher Krankheitsdauer kann dieses Risiko genauso hoch sein wie bei der Colitis ulcerosa [91]. Studien, die die Inzidenz von Lymphomen bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen untersuchten, berichteten von einem relativen Risiko zwischen 0,4 und 2,4 % [92, 98, 98, 95, 96, 93, 99]. Betrachtet man diese Ergebnisse im Überblick, so ist ein erhöhtes Risiko der Entstehung von Lymphomen bei CED-Patienten im Vergleich zur Normalbevölkerung nicht sicher belegt [94].

#### **1.5.1.2 Anamnese und klinisches Erscheinungsbild der Colitis ulcerosa**

Die Colitis ulcerosa manifestiert sich mit sehr unterschiedlicher Symptomatik bei den betroffenen Patienten. Hinsichtlich der Prognose und Therapie scheint es sinnvoll zu sein, die Erkrankung in unterschiedliche Grade einzuteilen: mild, moderat und schwer [72].

Besonders blutige Diarrhoen, erhöhte Stuhlfrequenz, vermehrter Stuhldrang, nächtliche Defäkation und Tenesmen sind charakteristische Symptome [73]. Allerdings liegen zu ihrer jeweiligen Häufigkeit und Relevanz nur wenige Studiendaten vor.

Die körperliche Untersuchung ist oft noch beim ersten Auftreten von Symptomen relativ unauffällig. Möglicherweise wird eine Blässe des Patienten beobachtet. Weitere Hinweise sind ein Gewichtsverlust oder der Nachweis von frischem Blut bei der rektalen Untersuchung.

#### 1.5.1.2.1 **Komplikationen**

Komplikationen, die bei einer Colitis ulcerosa auftreten können, sind:

- Ein fulminanter Verlauf der Colitis
- Intestinale Perforationen und Strikturen
- Massive Hämorrhagien
- Entstehung eines Colonicarcinoms

#### 1.5.1.2.2 **Fulminante Colitis**

Ein fulminanter Verlauf der Erkrankung wird bei bis zu 15% der Colitis ulcerosa-Patienten beobachtet. Dabei entwickeln bis zu 20% dieser Patienten ein toxisches Megakolon mit konsekutiv erhöhtem Risiko einer Darmperforation und potentiell tödlichem Krankheitsverlauf [74]. Eine Perforation mit begleitender Peritonitis wurde dabei mit einer 50%igen Mortalität assoziiert.

#### 1.5.1.2.3 **Strikturen**

Durch immer wiederkehrende Entzündungsperioden können Strikturen entstehen. Strikturen, die im Rahmen der Colitis ulcerosa auftreten, sollten solange als maligne betrachtet werden, bis nicht das Gegenteil durch eine endoskopische Evaluation einschließlich Biopsie bewiesen worden ist. Eine OP ist bei Strikturen indiziert, die eine anhaltende Obstruktionssymptomatik verursachen, oder wenn eine Malignität nicht vollständig ausgeschlossen werden kann.

#### 1.5.1.2.4 **Intestinale Blutungen**

Massive Hämorrhagien bei Patienten mit Colitis ulcerosa, die zu einer notfallmäßigen Kolektomie führen können, treten mit einer Häufigkeit von bis zu 3 % auf [75].

#### 1.5.1.2.5 Colonkarzinom bedingt durch Colitis ulcerosa

Da bei Patienten mit Colitis ulcerosa ein deutlich erhöhtes Risiko besteht, am kolorektalen Karzinom zu erkranken, hat eine kontinuierliche Überwachung und die Vorsorgeuntersuchung auf neoplastische Veränderungen im Darm eine hohe klinische Relevanz. Nach 10-jähriger Krankheitsdauer beträgt die Wahrscheinlichkeit, Darmkrebs zu entwickeln, 2%, nach 20 Jahren steigt sie auf 8% und nach 30 Jahren auf 18% [76].

Bei Colitis ulcerosa-Patienten mit einem Colonkarzinom in der Familienanamnese ist das Risiko ebenfalls erhöht [77, 78].

#### 1.5.2 Endoskopie und Histologie

Als wichtiges diagnostisches Mittel zur initialen Diagnostik und zur Nachuntersuchung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen dient eine komplette Ileokoloskopie mit Stufenbiopsien. Hierbei kann anhand typischer Schleimhautveränderungen die Diagnose Colitis ulcerosa oder M. Crohn gestellt werden. Als endoskopische Charakteristika des Morbus Crohn zeigen sich der diskontinuierliche Befall der Darmmukosa ("skip lesions"), aphtoide Läsionen, scharf begrenzte, landkartenähnliche Ulzera oder unregelmäßig länglich geformte Ulzerationen ("snail trails" = Schneckenspuren), Strikturen, ein Pflastersteinrelief der Schleimhaut ("cobble-stone-pattern") und kleinste hämorrhagische Läsionen ("pin-point-lesions"). Bei der Colitis ulcerosa sind unter anderem ein kontinuierlicher Befall der Schleimhaut, beginnend am Anus, Erosionen, ein Verlust der Gefäßzeichnung, Kontaktblutungen und eine diffuse Kryptitis charakteristisch.

Die Unterscheidung zwischen der Colitis ulcerosa und M. Crohn bei der Koloskopie gelingt in 89% der Fälle eindeutig [44]. Ist eine eindeutige Zuordnung nicht möglich, soll die Diagnose „nicht klassifizierbare Kolitis“ vergeben werden. Dies kommt in 10% der Fälle bei der endoskopischen Beurteilung von Schleimhauveränderungen vor [44]. Ein weiterer wichtiger Aspekt neben der Differentialdiagnose ist die Untersuchung der Ausdehnung des

Befundes, die Aktivität der Entzündung und das Vorhandensein von Dysplasien, Polypen und Tumoren.

Zusätzlich zu der endoskopischen Untersuchung erfolgt bei Verdacht auf eine chronisch-entzündliche Darmerkrankung eine Probeentnahme von Gewebe zur histologischen Beurteilung des Befundes. Diese sogenannte, nach AWMF-Leitlinien [45] empfohlene Stufenbiopsie aus jedem Darmabschnitt kann Auskunft über die Entzündungsaktivität und – ausbreitung geben. Da es aber keinen spezifischen Befund gibt, ist das Zusammentreffen verschiedener histopathologischer Veränderungen entscheidend. So zeigen sich bei einem Morbus Crohn in 40% der Fälle Epitheloidzellgranulome und mehrkernige Riesenzellen, dabei in 70% mit einer Hyperplasie der zugehörigen Lymphknoten. Weitere histologische Merkmale sind ein diskontinuierlicher Befall des Darmes, Lymphangiectasien und aphtenähnliche Geschwüre der Schleimhaut mit Fissuren und Fistelbildung [46]. Bei der Colitis ulcerosa hingegen zeigen sich unter anderem eine Störung der Kryptenarchitektur, eine Kryptenatrophie und eine Plasmazytose im basalen Schleimhautstroma [47]. Diese hier erwähnten Charakteristika können aber auch bei einem Morbus Crohn bestehen und sind somit nicht pathognomonische pathologische Veränderungen. Ebenso können aber auch typische Merkmale des M. Crohns bei der Colitis ulcerosa beobachtet werden [46]. Daher kann in ca. 5% der Fälle anhand der Schleimhautbiopsien histologisch nicht zwischen der Colitis ulcerosa und einem M. Crohn unterschieden werden. Hier kann lediglich die Diagnose „nicht klassifizierbare Kolitis“ gestellt werden. Somit bekommen die Follow-up-Untersuchungen einen besonderen Stellenwert. Zum einen gelingt bei diesen in 80% der Fälle durch weitere bzw. erneute Biopsien eine mögliche Zuordnung zu einer der beiden Krankheiten und zum anderen können die Schleimhaut betreffende Neubildungen frühzeitig erkannt werden [46].

|                                                                                                                                                      | <b>Colitis ulcerosa</b>                                                                                                                                                                                                                         | <b>M. Crohn</b>                                                                                                                                                                                         |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Allgemeine Kriterien</b><br>Lokalisation<br>Befallsmuster<br>Rektumbeteiligung<br>Ileumbeteiligung<br>Darmwandbefall<br>Fissuren<br>Fistelbildung | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Kolon</li> <li>▪ Kontinuierlich</li> <li>▪ Immer</li> <li>▪ Gelegentlich</li> <li>▪ Oberflächlich (Mukosa)</li> <li>▪ Selten, oberflächlich</li> <li>▪ Fehlend</li> </ul>                              | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Gesamter Verdauungstrakt</li> <li>▪ Segmental</li> <li>▪ Gelegentlich</li> <li>▪ Häufig</li> <li>▪ Transmural</li> <li>▪ Tief</li> <li>▪ Vorhanden</li> </ul>  |
| <b>Endoskopische Kriterien</b>                                                                                                                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Kontinuierlicher Befall</li> <li>▪ Erosionen</li> <li>▪ Fibrinbeläge</li> <li>▪ Verlust der Gefäßzeichnung</li> <li>▪ Erythem</li> <li>▪ Kontaktvulnerabilität</li> <li>▪ Diffuse Kryptitis</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Diskontinuierlicher Befall</li> <li>▪ Pflastersteinrelief</li> <li>▪ Aphthöse Läsionen</li> <li>▪ Längsgerichtete Ulzerationen</li> </ul>                      |
| <b>Histopathologische Kriterien</b>                                                                                                                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Kriptenarchitekturstörungen</li> <li>▪ Kriptenabszesse</li> <li>▪ Kriptenatrophie</li> <li>▪ Plasmozytose im basalen Schleimhautstroma</li> <li>▪ Erhöhte Anzahl an Lymphfollikeln</li> </ul>          | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Epitheloidzellgranulome</li> <li>▪ Ulzerationen mit Fissurenbildung</li> <li>▪ Transmurale Lymphozytenaggregate</li> <li>▪ Mehrkernige Riesenzellen</li> </ul> |

**Tab. 1:** Unterscheidungskriterien M. Crohn – Colitis ulcerosa  
[Hommes, Van Deventer 2004, Wittekind, Rogler 2004, Yantiss, Odze 2006]

### **1.5.3 Stellenwert von fäkalen Entzündungsmarkern in der Verlaufsdagnostik**

Ein weiteres wichtiges Werkzeug in der Verlaufsdagnostik stellt neben der Bestimmung von Infektparametern aus dem Serum (z.B. CRP) der Nachweis von fäkalen Entzündungsmarkern dar. In den meisten Fällen zeigt sich eine Korrelation des Serum-CRP mit der Krankheitsaktivität bei CED [123-125]. Die Bestimmung des CRP kann hilfreich sein bei Therapieentscheidungen und in der Verlaufsbeurteilung wie auch zur Risikoabschätzung eines Rezidivs [126]. Es ist jedoch zu erwähnen, dass es eine relevante Zahl von M. Crohn-Patienten gibt, die trotz Entzündungsaktivität keine CRP-Erhöhung entwickeln, was in einem niedrigen prädiktiven Wert wiedergespiegelt wird [127]. Der fäkale Entzündungsmarker, das sogenannte Calprotectin, ist ein zytosolisches Neutrophilenprotein mit antimikrobiellen Eigenschaften, das im Falle einer intestinalen Entzündung im Stuhl ausgeschieden wird [128]. Studien haben gezeigt, dass die Calprotectin-Konzentration im Stuhl mit der endoskopisch nachweisbaren und klinischen Krankheitsaktivität korreliert. [129, 130, 131]

Fäkale Marker sind nicht in der Lage, zwischen verschiedenen Ursachen einer intestinalen Entzündung zu unterscheiden. Aus diesem Grund ist der diagnostische Nutzen in der Primärdiagnostik des M. Crohn limitiert.

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass der fäkale Marker Calprotectin zur Früherkennung von Rezidiven bei M. Crohn herangezogen werden kann. [132-134]

Im Gegensatz zum CRP hat der Stuhl- Calprotectinwert einen guten negativ prädiktiven Wert [127].

### **1.5.4 Mikrobiologische Analyse**

Gerade in der initialen Diagnosestellung, aber auch bei Verschlechterung sind mikrobiologische Untersuchungen einschließlich Stuhlkultur und Stuhluntersuchungen auf



Clostridium-difficile-Toxin A unverzichtbar. Dies betrifft in besonderem Maße den fulminanten Schub, bei dem zum frühestmöglichen Zeitpunkt eine begleitende oder zugrundeliegende intestinale Infektion mit pathogenen Keimen, Clostridium difficile, speziell bei der Therapie mit Antibiotika und CMV ausgeschlossen werden muss. Eine CMV-Infektion kann durch eine Immunhistologie an einer Biopsie, durch Antigennachweis im Blut (pp65) oder eine PCR-Untersuchung (Blut, Stuhl oder Biopsie) erfolgen [48-53]. Die CMV-Colitis scheint beim Morbus Crohn seltener vorzukommen als bei der Colitis ulcerosa [58, 59], stellt aber bei steroidrefraktärem Verlauf eine wichtige Komplikation dar [60]. Gleiches gilt für Situationen, bei denen es trotz adäquater Therapie zu einer Krankheitsverschlechterung kommt. Dabei muss stets eine kritische Bewertung der pathogenetischen Relevanz nachgewiesener Keime und der sich daraus ergebenden therapeutischen Konsequenzen erfolgen, da sich das Spektrum pathogener oder fakultativ pathogener Keime grundsätzlich nicht von dem der Normalbevölkerung (Yersinia enterocolitica, Salmonella, Shigella, Campylobacter, E. coli, Clostridium difficile) unterscheidet. Gegebenenfalls sind bei klinischem Verdacht ergänzende mikrobiologische Untersuchungen in Blut, Stuhl und Biopsie (z.B. Amöben, Parasiten etc.) erforderlich [49, 54]. Infektiöse Enteritiden können das klinische Bild einer Colitis ulcerosa imitieren [55-57]. Insbesondere im Kindesalter sind infektiöse Gastroenteritiden sehr häufig und differentialdiagnostisch abzugrenzen.

### **1.5.5 Radiologische und sonographische Diagnostik**

Die hochauflösende abdominelle Sonographie hat in der Initialdiagnostik von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen ihren Platz. Vor allem die gute Verfügbarkeit, die fehlenden Nebenwirkungen, die für den Patienten nicht invasive Untersuchung und die damit verbundenen geringen Risiken sowie die geringen Kosten sind Vorteile der Sonographie [61,62]. Eine Steigerung der Sensitivität wird durch die

Hydrokolonsonographie erreicht [63]. Die Sonographie ermöglicht eine Beurteilung der Ausdehnung der Entzündung im Darm, Fistelbildungen und eventueller Komplikationen wie zum Beispiel endoskopisch nicht passierbare Stenosen. Vor allem sollte auf Grund der fehlenden Strahlenbelastung die Sonographie bei Kindern eingesetzt werden [64].

Alternativ können radiologische Schnittbildverfahren wie die CT- und MR-Colonographie eingesetzt werden. Sie bieten neben der Abbildung des Darms zusätzliche Informationen über die intraabdominellen Organe und mögliche Begleitreaktionen bzw. Komplikationen [65, 66, 67]. Zum Standardverfahren in der Diagnostik und in der Verlaufskontrolle von CED gehören die Koloskopie und das Enteroklysma. Die Hydro-MRT erlaubt die Abbildung intestinaler und extraintestinaler pathologischer Veränderungen beim M. Crohn. Hierzu rechnen einerseits entzündliche Darmwandverdickungen und Stenosen, andererseits Fisteln, entzündliche Konglomerate und Abszesse. Bei der Colitis ulcerosa ist im Gegensatz zum Morbus Crohn in der Hydro-MRT eine deutlich geringere entzündliche Wandverdickung typisch. Ferner ist bei der Colitis ulcerosa die Ausdehnung der Befunde in der MRT regelmäßig geringer als in der Endoskopie [68].

Scheyer et al. zeigten in einer Studie über den Vergleich zwischen der konventionellen Koloskopie und der MR-Kolonographie, dass die MR nicht alltagsgebräuchlich zur Beurteilung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen ist. Eine besondere Schwäche der MR-Kolonographie liegt in der unzureichenden Genauigkeit, leichtgradige Entzündungen zu diagnostizieren [69], welche bei Colitis ulcerosa häufig zu finden sind.

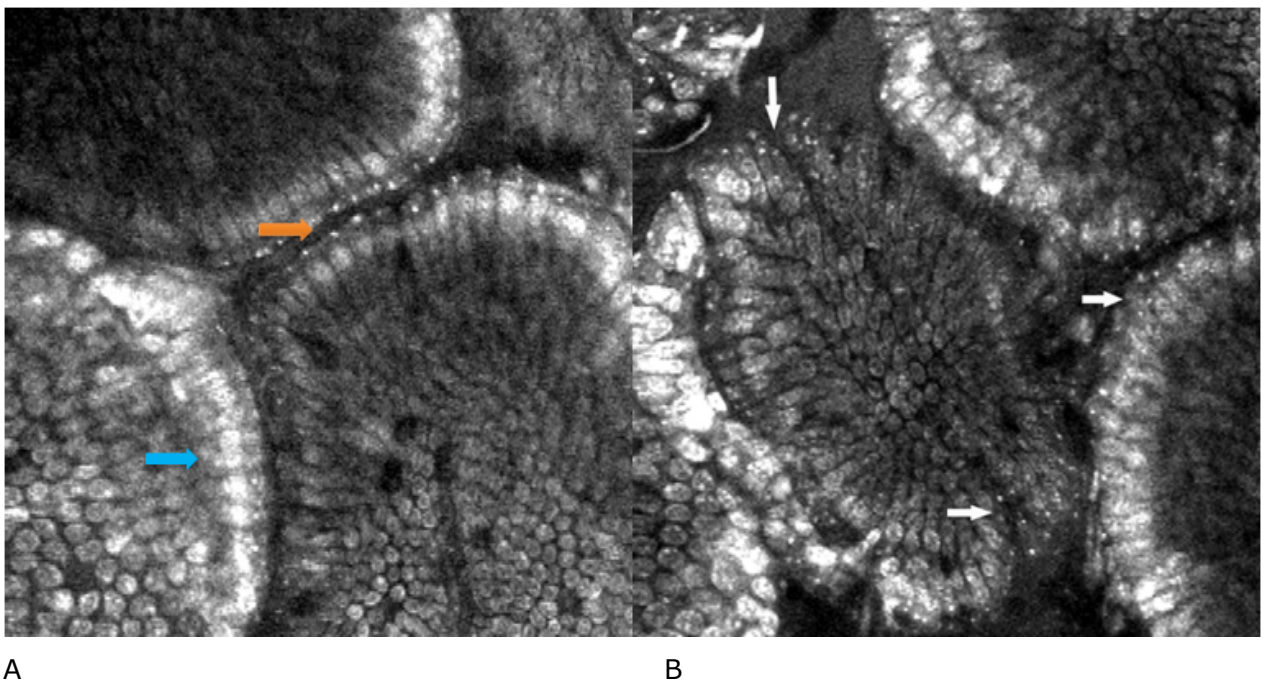
Wertigkeit bildgebender Verfahren in der Diagnostik entzündlicher Darmerkrankungen.

|                                | Koloskopie | Koloskopie + Histologie | Enteroklysma | Kolon-KE | Sonographie | CT  | MRT Becken | Hydro-MRT |
|--------------------------------|------------|-------------------------|--------------|----------|-------------|-----|------------|-----------|
| Differentialdiagnose MC vs. CU | ++         | +++                     | ++           | +        | +           | +   | -          | +         |
| Stenosen                       | ++         | ++                      | +++          | ++       | (+)         | ++  | -          | +         |
| Fisteln                        | +          | +                       | ++           | ++       | (+)         | +   | +++        | ++        |
| Abszesse                       | -          | (-)                     | (+)          | (+)      | ++          | +++ | +++        | +++       |
| Konglomerattumoren             | -          | -                       | +            | -        | ++          | +++ | +++        | +++       |
| Verlaufsbeurteilung            | ++         | +++                     | ++           | +++      | +           | +   | (+)        | ++        |
| Mesenteriale LK                | -          | -                       | -            | -        | +           | +++ | ++         | +++       |
| Mesenteritis                   | -          | -                       | -            | -        | -           | +   | ++         | +++       |

Tab. 2 : MRT in IBD (Hansmann 2001)

### 1.5.6 Darstellung der intramukosal gelegenen Bakterien mittels konfokaler Laserendomikroskopie

Die Darstellung von E.Coli Bakterien mittels konfokaler Laserendomikroskopie (CLE) gelang erstmals im experimentellen Versuch an Mäusen. Hierfür wurde ein den Tieren zuvor entnommenes Darmsegment mit einem Kontraststoff versehen und mittels CLE untersucht. Anschließend erfolgte die Besiedelung des gleichen Darmsegmentes mit speziell präparierten E.Coli Bakterien und eine erneute endomikroskopische Untersuchung. Hierbei zeigten sich die Bakterien als helle Punkte [102].

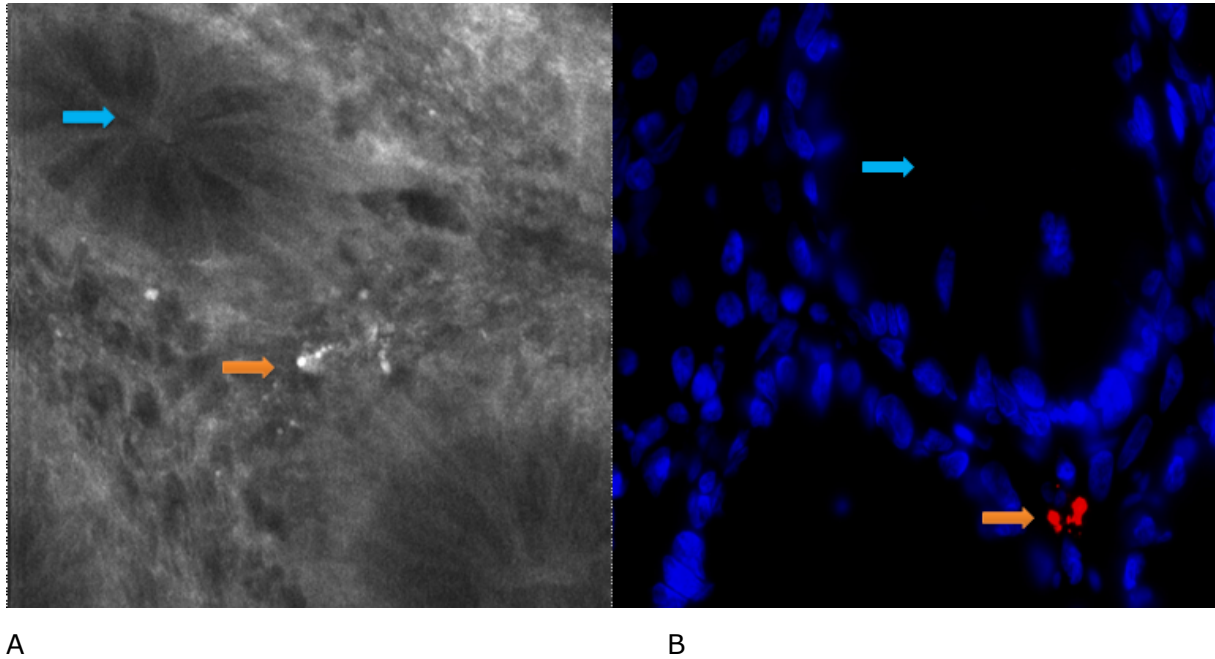


**Abb 1: Darstellung von intramucosal gelegenen Bakterien im Rahmen der konfokalen Laserendomikroskopie**

Blauer Pfeil: sich hell darstellende Zellkerne; orangener Pfeil: an der Oberfläche der Epithelzellen gelegene Bakterien; weiße Pfeile: intraepithelial gelegene Bakterien

Zur Validierung der Übertragbarkeit in den humanen Bereich erfolgte die Markierung menschlicher Stuhlproben mit einem Kontraststoff. Anschließend wurden diese Proben zum einen in vivo auf die Schleimhaut der Patienten aufgetragen und gleichzeitig auf Agar-Platten kultiviert. In beiden Fällen ließen sich nun die in den Proben enthaltenen Bakterien der normalen Schleimhautflora mittels konfokaler Laserendomikroskopie ebenso als helle Punkte darstellen.

Diese Ergebnisse ließen sich durch eine weiterführende Testung mittels FISH (Fluoreszenz in situ Hybridisierung) bestätigen.



**Abb. 2: Intramucosal gelegene Bakterien in den Kryptenzwischenräumen.**

A: Krypte mit typischem rundlichem Erscheinungsmuster (blauer Pfeil), Bakterien als helle Punkte innerhalb der Lamina propria zwischen zwei Krypten gelegen (orangener Pfeil)  
B: Nachweis der intramucosal gelegenen Bakterien mittels FISH (orangener Pfeil), Krypte (blauer Pfeil)

## 2 Ziel der aktuellen Studie

Das Ziel dieser Studie war es, die mit Hilfe der konfokalen Laserendomikroskopie dargestellten intramucosal gelegenen Bakterien bezüglich deren Häufung zu untersuchen und einen eventuellen Zusammenhang mit der Krankheitsaktivität und dem Krankheitsverlauf bei CED zu diskutieren.

## **3 Materialien und Methoden**

### **3.1 Endomikroskopie**

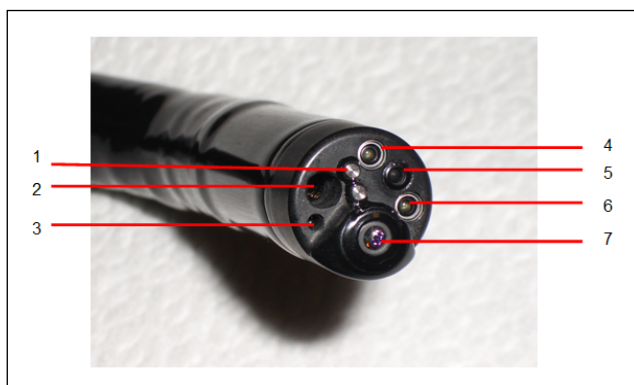
Die Endomikroskopie ist ein diagnostisches Verfahren, das es dem Untersucher ermöglicht, während einer endoskopischen Untersuchung zusätzlich in vivo zu mikroskopieren. So können auffällige Areale mittels Videoendoskopie entdeckt und durch hochauflösende konfokale Mikroskopie vor Ort beurteilt werden.

#### **3.1.1 Konfokale Laserendomikroskopie**

Bei der konfokalen Laserendomikroskopie handelt es sich um eine Abwandlung der Lichtmikroskopie. Für die Erzeugung konfokaler Bilder wird ein Punkt im Gewebe fokussiert und mittels Licht einer bestimmten Wellenlänge über eine optische Faser bestrahlt. Diese Faser erfasst nur das reflektierte Licht eines spezifischen Spektrums und zeigt so, je nach Lichtintensität, verschiedene Graustufen an, welche digital gespeichert werden. Das reflektierte Licht außerhalb des Fokus wird nicht erfasst. Das Zusammenführen der einzelnen Bildpunkte ergibt somit ein Graustufenbild von einer horizontalen Ebene mit hoher Tiefenschärfe. So ist bei hoher Auflösung eine Darstellung von zellulären und subzellulären Strukturen möglich. Erreichen lässt sich dies durch die Kombination eines herkömmlichen Endoskops mit einem konfokalen Mikroskop (Joint venture Optiscan, Australien & Pentax, Japan).

Das konfokale Mikroskop ist in das Ende eines konventionellen Videoendoskops (EC3870K; Pentax, Tokyo, Japan) integriert, was neben der herkömmlichen Videoendoskopie gleichzeitig auf einem separaten Monitor die konfokale Mikroskopie ermöglicht. Der Durchmesser des distalen Endes des Endoskops beträgt 12,8 mm und enthält, neben dem integrierten Mikroskop, einen Wasser- und Luftkanal, zwei Lichtquellen, einen zusätzlichen Wasserkanal und einen Arbeitskanal mit 2,8 mm

Durchmesser. Durch die Verwendung eines Blaulichtlasers mit einer Wellenlänge von 488 nm wird ein Bild generiert, das mittels zweier zusätzlicher Knöpfe am Handstück des Endoskops in der Eindringtiefe variiert werden kann. Hierbei reicht die Variation der Eindringtiefe von der Schleimhautoberfläche bis in die tiefe Mukosa (250  $\mu\text{m}$ ). Es besteht die Möglichkeit, mit einer Geschwindigkeit von 0,8 Bildern pro Sekunde bei 1024x1024 einzelnen Bildpunkten oder mit 1,6 Bildern pro Sekunde bei 1024x512 einzelnen Bildpunkten konfokale Bilder zu erstellen. Das Gesichtsfeld jedes einzelnen Bildes beträgt 500x500  $\mu\text{m}$ . Die laterale Auflösung des Systems ist geringer als 1  $\mu\text{m}$ , sodass Kapillaren, Bindegewebe und Epithelzellen in einer optischen Schichtdicke von 7  $\mu\text{m}$  dargestellt werden können [16,17].



**Abb. 3:** Spitze des Endoskops mit integriertem konfokalen Lasermikroskop

**1** Luft-Wasser Düse, **2** Arbeitskanal, **3** Zusätzlicher Wasserkanal, **4&6** Lichtleiter, **5** CCD, **7** Endomikroskop

### 3.1.2 Kontraststoffe

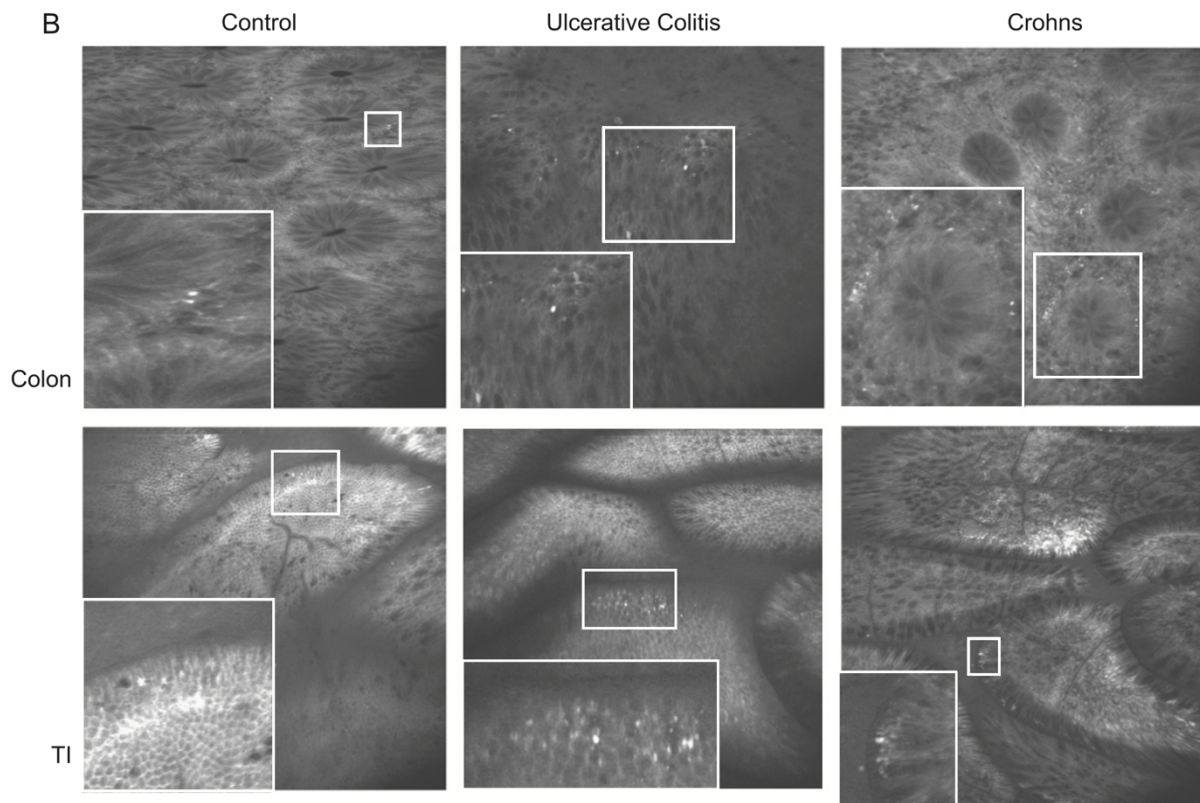
Die Endomikroskopie kommt nicht ohne bestimmte Kontraststoffe aus, die durch den blauen Laser zum Leuchten gebracht werden. Diese Kontraststoffe können dem Patienten entweder systemisch appliziert oder topisch aufgetragen werden. Diese werden bei Anwendung von den Darmepithelzellen aufgenommen und machen nach kurzer Einwirkzeit die zellulären, vaskulären und bindegewebigen Strukturen sichtbar. Bei der Laserendoskopie wird die Oberfläche des Gewebes mit einem Laserstrahl der Wellenlänge

488 nm und maximaler Leistung von  $\leq 1$  mW bestrahlt. Erst dieses Prinzip der Fluoreszenztechnologie ermöglicht das Generieren eines Bildes [17,18,100,101]. Kontraststoffe, die am Menschen eingesetzt werden können, sind Fluorescein, Akriflavin, Tetrazyklin und Kresylviolett, wobei systemisches Fluorescein (10%, 5ml, Kolon, Esophagus, Magen) und topisches Akriflavin (0.2%, 1-15 ml, Magen) als gängigste Mittel zum Einsatz kommen [17].

### **3.1.3 Erkennen und Charakterisierung von intramukosalen Bakterien in vivo mittels CLE**

Anhand der vorliegenden konfokalen Bilddatenbank der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Universitätsklinik Mainz erfolgte die Auswertung nach dem Vorkommen von Bakterien. Das Vorhandensein oder nicht Vorhandensein von Bakterien im Colon wurde von zwei unabhängigen Untersuchern in jeder „optischen Biopsie“ (konfokale Bildserie pro Untersuchungsregion) beurteilt. Hierbei wurden Bakterien identifiziert, wie es bereits in vorangegangenen Tier- und Menschenexperimenten spezifiziert wurde, anhand ihrer Größe und Gestalt (zylindrisch oder rund; Größe zwischen 1-2  $\mu\text{m}$ ).

Es erfolgte das Auszählen der Bakterien innerhalb des sichtbaren Feldes, welches zentral im Bereich des höchsten Vorkommens an fluoreszierendem Bakteriensignal platziert wurde. Zur Quantifizierung erfolgte eine Einteilung in: „keine Besiedelung“ (0 Bakterien pro Bild), „geringe Besiedelung“ (1-10 Bakterien pro Bild), „mittlere Besiedelung“ (11 – 50 Bakterien pro Bild) und „starke Besiedelung“ (> 50 Bakterien pro Bild).



**Abb 4** : Beispiele der Darstellung von intramukosal gelegenen Bakterien bei Patienten mit Colitis ulcerosa Morbus Crohn und der Kontrollgruppe. Die Vergrößerung in der unteren linken Ecke zeigt die Bakterien als helle Punkte. TI, terminales Ileum. [147, Driffa Moussata,]

### 3.1.4 Erkennen und Beurteilen von Leckage und Inflammation

Ein weiterer wichtiger Aspekt war die Beurteilung von Zeichen einer Inflammation und dem Vorkommen einer Leckage des Fluorescein aus den Gefäßen als Zeichen der Aktivität. Hierfür erfolgte eine Beurteilung der Bilder unter Zuhilfenahme einer konfokalen Klassifikation zur Vorhersage kolorektaler Pathologien hinsichtlich Veränderungen der Gefäßarchitektur und der Kriptenarchitektur. [16, **Abb. 5**]



| <b>Einteilung</b>                | <b>Gefäßarchitektur</b>                                                                                                                                   | <b>Kryptenarchitektur</b>                                                                                                                                             |
|----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>normal</b>                    | Hexagonale Wabenstruktur mit einem Netzwerk von Kapillaren innerhalb der Lamina propria, die die Kryptenöffnungen umgeben                                 | Regelmäßige luminale Öffnungen und Verteilung der Krypten, welche von einer homogenen Schicht von Epithel- und Becherzellen ausgekleidet sind                         |
| <b>Inflammation-Regeneration</b> | Hexagonale Wabenstruktur ohne oder mit einer gering erhöhten Anzahl von Kapillaren                                                                        | Sternförmige luminale Kryptenöffnungen oder fokale Aggregation von regulär geformten Krypten mit einer normalen oder geringgradig reduzierten Anzahl von Becherzellen |
| <b>Dysplasie</b>                 | Erweiterte und verformte Gefäße mit erhöhter Durchlässigkeit, „Leckage“; irreguläre Architektur mit wenig oder keiner Orientierung zum umliegenden Gewebe | Tubuläre oder irreguläre Schicht von Epithelzellen mit Verlust von Krypten und Becherzellen; irreguläre Zellarchitektur mit wenig oder fehlenden Becherzellen         |

**Tab. 3:** Mikrovaskuläre Architektur in der CLE bei CED Patienten, Konfokale Klassifikation kolorektaler Läsionen (Confocal Pattern Classification)

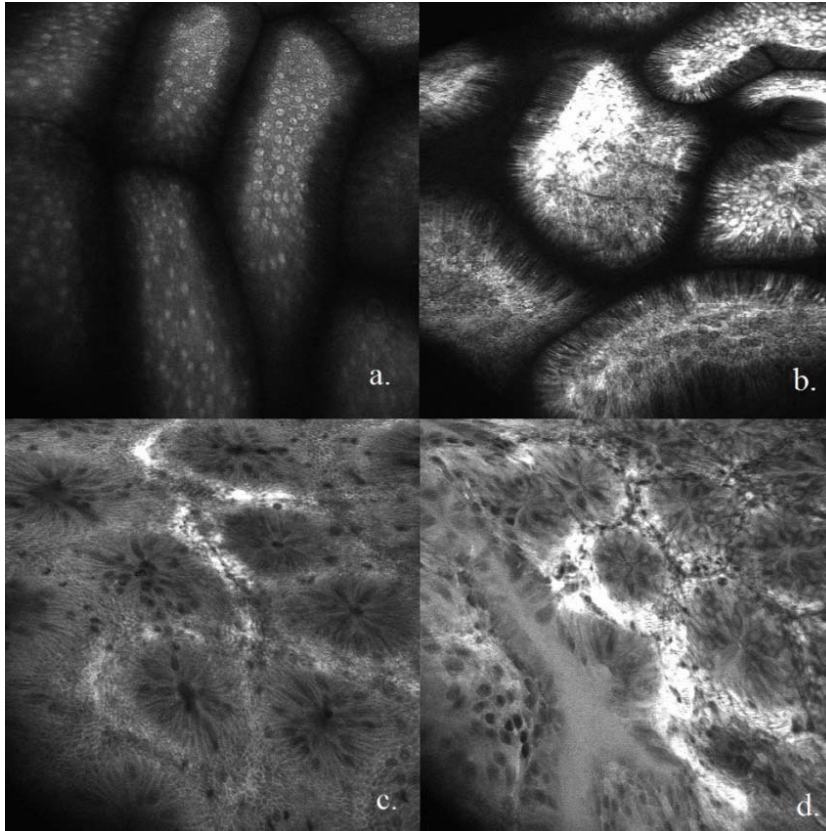


Abb. 5: Darstellung von Inflammation und Leckage im Rahmen der CLE des unteren GI-Traktes mit 10% Fluorescein Kontrastmittel, (a) regelrechtes Ileum mit longitudinalen Villi; (b) M. Crohn: Ileitis, die Inflammation ist definiert als Mehranreicherung von Fluorescein in den Villi. (c) regelrechtes Colon mit klaren runden Krypten in gleichem Abstand voneinander und feinen regelrechten Gefäßen; (d) CU: Charakteristische Inflammation mit Aufhebung der regelrechten Kryptenarchitektur und des gleichmäßigen Abstands. Deutlich dilatierte Blutgefäßstruktur mit gesteigerter Leckage von Fluorescein.

### 3.1.5 Farbstoff Fluorescein

Für die konfokale Laserendomikroskopie werden dem Patienten 5ml Fluorescein (Fluorescein Alcon ® 10% Injektionslösung, Alcon Pharma GmbH, Freiburg) in einer Konzentration von 10% intravenös injiziert. Danach werden zelluläre, vaskuläre und bindegewebige Strukturen mit dem Endomikroskop detailgenau sichtbar. Es entsteht eine homogene Färbung bis in tiefere Schichten der Mukosa, welche durch das Variieren der Eindringtiefe des Lasers am Endoskop analysiert werden können. Lediglich die Zellkerne

der Zellen werden auf Grund der pharmakokinetischen Eigenschaften des Fluoresceins nicht angefärbt. Die Färbung bleibt für ca. 60 Minuten bestehen.

Fluorescein ist nicht mutagen, nicht phototoxisch und weist insgesamt nur geringe unerwünschte Wirkungen auf. In seltenen Fällen wurden allergische Reaktionen gegen den Farbstoff beobachtet [17].

### **3.1.6 Untersuchungstechnik**

Bei der Untersuchung mittels konfokalem Laserendoskops handelt es sich um die gleiche Vorgehensweise wie bei einer üblichen Endoskopie. Primär erfolgt die Identifikation von relevanten oder auffälligen Strukturen bzw. Läsionen mittels Weißlichtvideoendoskopie oder Chromoendoskopie. Nach der zunächst konventionellen Beurteilung erfolgt die gezielte endomikroskopische Untersuchung. Hierbei wird das distale Ende des Endoskops mit leichtem Druck auf die Schleimhautoberfläche aufgesetzt. Da es sich generell um ein beschränktes Sichtfeld handelt (500\*500µm), wird die Untersuchung auf ausgewählte Schleimhautareale beschränkt. Um Bewegungsartefakte zu vermeiden, ist eine stabile Endoskopposition entscheidend, die durch sanften Druck oder leichtes Ansaugen der Schleimhaut an das Endoskop erreicht werden kann. Die Bilder werden dann auf einem zweiten Bildschirm simultan zum videoendoskopischen Bild angezeigt.

### **3.2 Studiendesign und Patientenkollektiv**

In dieser retrospektiven Studie erfolgte eine Analyse der mittels konfokaler Laserendomikroskopie gewonnen Bilddaten im Zeitraum von 2003 - 2007 aus dem Patientengut der Ambulanzen der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Universitätsklinik Mainz. Hierbei wurden im Rahmen der 180 durchgeführten

Untersuchungen insgesamt 27.630 Bilder gesichtet und die Anzahl der Bakterien bei Patienten mit Colitis ulcerosa, Morbus Crohn und einem gesunden Patientenkollektiv quantifiziert und mit der Grunderkrankung korreliert.

### **3.2.1 Einschlusskriterien**

Eingeschlossen wurden alle Patienten, die im Zeitraum von 2003 bis 2007 mittels konfokaler Laserendoskopie untersucht und erfasst wurden. Alle endomikroskopisch erfassten Bilder wurden analysiert. Die Patienten, deren Aufnahmen eine für die Auswertung zu schlechte Bildqualität aufwiesen, wurden von der Studie ausgeschlossen.

### **3.2.2 Datenerfassung**

Als Grundlage zur Datenerfassung erfolgte die quantitative Bestimmung von mucosal gelegenen Bakterien im Rahmen der in vivo Diagnostik.

Es erfolgte die Sichtung aller im Rahmen der konfokalen Laserendomikroskopie erhobenen Bilder. Diese Bilder wurden am Computer makroskopisch nach dem Vorkommen von Bakterien auf der Darmschleimhaut beurteilt.

Hierbei präsentierten sich die Bakterien als helle Punkte in den epithelialen Zellen an der Oberfläche der Colonschleimhaut (**siehe Abb. 4**).

Zur Quantifizierung erfolgte eine semiquantitative Einteilung in

„0“ oder „keine Besiedelung“: keine Bakterien pro Bild

„1“ oder „geringe Besiedelung“: 1-10 Bakterien pro Bild

„2“ oder „mittlere Besiedelung“: 11 – 50 Bakterien pro Bild

„3“ oder „starke Besiedelung“: > 50 Bakterien pro Bild

Weiterhin erfolgte die Beurteilung der Bilder im Hinblick auf vorliegende Krankheitsaktivität im Sinne von Inflammationsreaktionen und Leckage von Fluorescein.

Im Rahmen der Koloskopie mit CLE erfolgte eine Beurteilung der Schleimhaut alle 10 cm bis einschließlich des terminalen Ileums. Jede zusätzlich makroskopisch auffällige Schleimhautläsion wurde ebenfalls mittels konfokaler Laserendomikroskopie untersucht. Zur Identifikation entzündlich veränderter Schleimhautläsionen wurden die Baron´s-Klassifikation und die Rutgeert´s-Klassifikation für Colitis ulcerosa und Morbus Crohn herangezogen.

Die Ausprägung der Entzündung wurde anhand der „Mainz-Kriterien“ bezüglich der Architektur der Krypten (Form, Größe und Verteilung der Krypten) sowie Zellinfiltration in die Lamina propria und Gefäßarchitektur (Nachweis von, Verteilung und Leckage von Fluorescein) eingeteilt (**Tab 3**). [16]

Wir untersuchten einen möglichen Zusammenhang einer Fluorescein-Leckage mit der Inflammationsreaktion.

### **3.3 Statistische Methoden**

Chi-Quadrat nach Pearson:

- Gruppenvergleich der Patientenkollektive und Vorkommen von Bakterien
- Vergleich der Lokalisationen von Bakterien
- Gruppenvergleich: Inflammation und Leckage

Kruskal-Wallis-Test (Vergleich der Erkrankungsgruppen bezüglich der Anzahl der Bilder - zunächst global über alle Erkrankungsgruppen), dann Mann-Whitney-Test

Exakter Test nach Fisher:

- Vergleich der Lokalisationen von Bakterien

## 4 Ergebnisse

### Patienten

Zur Datenerhebung erfolgten Untersuchungen an 180 Patienten, davon bei 101 männlichen und 79 weiblichen Patienten. Das mittlere Alter des untersuchten Patientenkollektivs betrug  $63,8 \pm 6$  Jahre.

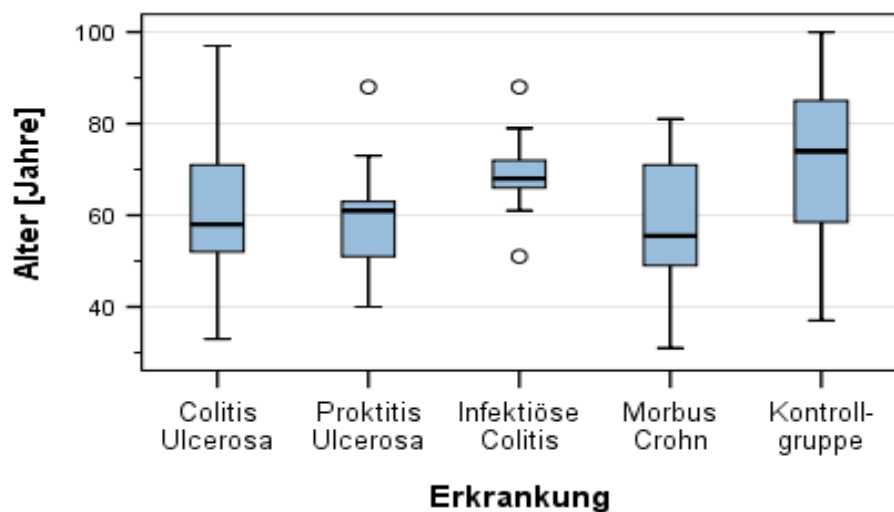
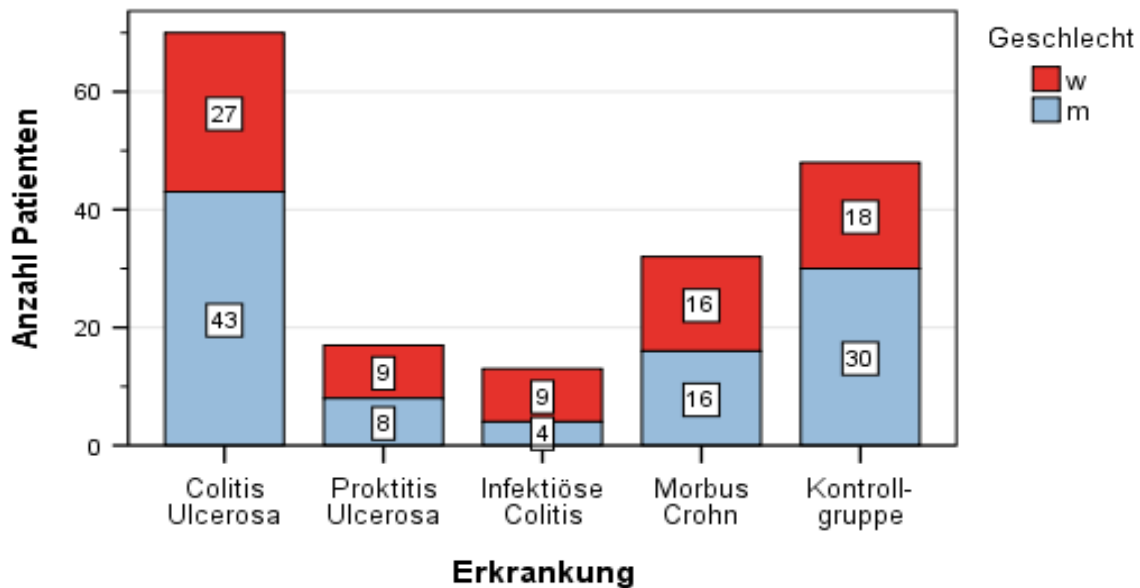


Abb. 6: Altersverteilung im Patientenkollektiv

Es erfolgten 70 Untersuchungen bei Patienten mit Colitis ulcerosa, 17 Untersuchungen bei Patienten mit Proktitis, 13 Untersuchungen bei Patienten mit infektiöser Colitis, 32 Untersuchungen bei Patienten mit dem klinischen Bild eines Morbus Crohn. In der Kontrollgruppe erfolgten 48 Untersuchungen.



**Abb. 7:** Geschlechterverteilung der Patienten innerhalb der einzelnen Erkrankungen.

### **Darstellung der Bakterien**

In den erstellten Bildern im Rahmen der konfokalen Endomikroskopie erschienen die Bakterien als helle Punkte. Die Bakterien fanden sich in allen Fällen in der Lamina propria. Im Ileum konnten die Bakterien hauptsächlich an der Spitze der Zotten innerhalb der Zellen gefunden werden.

### **Quantifizierung von in der Mucosa gelegenen Bakterien**

Vergleicht man die Anzahl an in der Mucosa gelegenen Bakterien, so finden sich signifikant weniger Bakterien bei gesunden Patienten als bei Patienten mit Colitis ulcerosa, Proktitis ulcerosa, infektiöser Colitis oder Morbus Crohn. ( $p < 0,001$ )

Insgesamt zeigte sich bei 55,7% der Patienten mit Colitis ulcerosa, bei 61,5% mit Colitis, bei 62,5% mit Morbus Crohn, und bei 14,6% in der Kontrollgruppe das Auftreten von Bakterien.

| Kreuztabelle: Bakterienverteilung |      |                  |                  |                    |                    |              |                |        |
|-----------------------------------|------|------------------|------------------|--------------------|--------------------|--------------|----------------|--------|
|                                   |      |                  | Erkrankung       |                    |                    |              |                | Gesamt |
|                                   |      |                  | Colitis ulcerosa | Proktitis ulcerosa | Infektiöse Colitis | Morbus Crohn | Kontrollgruppe |        |
| Bakterien                         | nein | Anzahl           | 31               | 6                  | 5                  | 12           | 41             | 95     |
|                                   |      | % von Erkrankten | 44,3%            | 35,3%              | 38,5%              | 37,5%        | 85,4%          | 52,8%  |
|                                   | ja   | Anzahl           | 39               | 11                 | 8                  | 20           | 7              | 85     |
|                                   |      | % von Erkrankten | 55,7%            | 64,7%              | 61,5%              | 62,5%        | 14,6%          | 47,2%  |
| Gesamt                            |      | Anzahl           | 70               | 17                 | 13                 | 32           | 48             | 180    |
|                                   |      | % von Erkrankten | 100,0%           | 100,0%             | 100,0%             | 100,0%       | 100,0%         | 100,0% |

Tab. 4 : Bakterienverteilung der Erkrankungsgruppen.

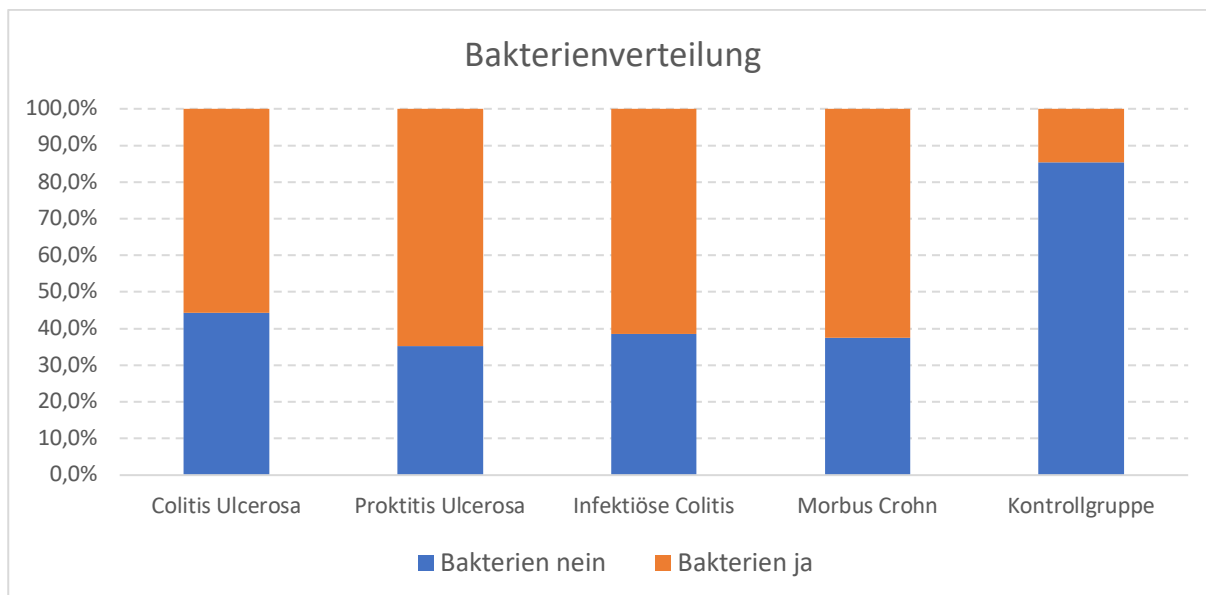


Abb. 8: Bakterienverteilung der Erkrankungsgruppen.

Ein signifikanter Unterschied bestand zwischen den Patienten mit einer Colitis und der Kontrollgruppe.

Vergleicht man die Patienten mit Colitis ulcerosa, Morbus Crohn und infektiöser Colitis untereinander, war der Unterschied nicht signifikant. In einer weiteren Gruppe von Patienten mit Proktitis fanden sich in 64,7% Bakterien.



Bei Betrachtung der Anzahl der dokumentierten Bilder, der Anzahl der Bilder pro untersuchter Region und der Anzahl der untersuchten Regionen pro Untersuchung besteht kein Unterschied zwischen den einzelnen Patientengruppen.

| Erkrankung         |                              | Perzentile |                 |         |
|--------------------|------------------------------|------------|-----------------|---------|
|                    |                              | 25.        | 50.<br>(Median) | 75.     |
| Colitis ulcerosa   | Anzahl der Bilder            | 93,75      | 141,00          | 210,25  |
|                    | Anzahl Bilder / Lokalisation | 34,125     | 49,167          | 89,813  |
|                    | Anzahl der Lokalisation      | 1,75       | 3,00            | 4,00    |
|                    | Bilder mit Bakterien         | 0,00       | 1,00            | 2,00    |
| Proktitis ulcerosa | Anzahl der Bilder            | 70,00      | 149,00          | 256,00  |
|                    | Anzahl Bilder / Lokalisation | 21,667     | 44,750          | 143,833 |
|                    | Anzahl der Lokalisation      | 2,00       | 3,00            | 3,50    |
|                    | Bilder mit Bakterien         | 0,00       | 1,00            | 2,00    |
| Infektiöse Colitis | Anzahl der Bilder            | 86,00      | 134,00          | 168,00  |
|                    | Anzahl Bilder / Lokalisation | 37,500     | 56,000          | 86,000  |
|                    | Anzahl der Lokalisation      | 1,00       | 3,00            | 4,00    |
|                    | Bilder mit Bakterien         | 0,00       | 1,00            | 1,50    |
| Morbus Crohn       | Anzahl der Bilder            | 105,00     | 144,00          | 215,50  |
|                    | Anzahl Bilder / Lokalisation | 44,338     | 61,250          | 122,000 |
|                    | Anzahl der Lokalisation      | 1,00       | 2,00            | 3,00    |
|                    | Bilder mit Bakterien         | 0,00       | 1,00            | 2,00    |
| Kontrollgruppe     | Anzahl der Bilder            | 66,75      | 127,00          | 186,50  |
|                    | Anzahl Bilder / Lokalisation | 47,867     | 66,500          | 97,250  |
|                    | Anzahl der Lokalisation      | 1,00       | 2,00            | 3,00    |
|                    | Bilder mit Bakterien         | 0,00       | 0,00            | 0,00    |

**Tab. 5:** Verteilung Anzahl der Bilder pro Untersuchungsregion.

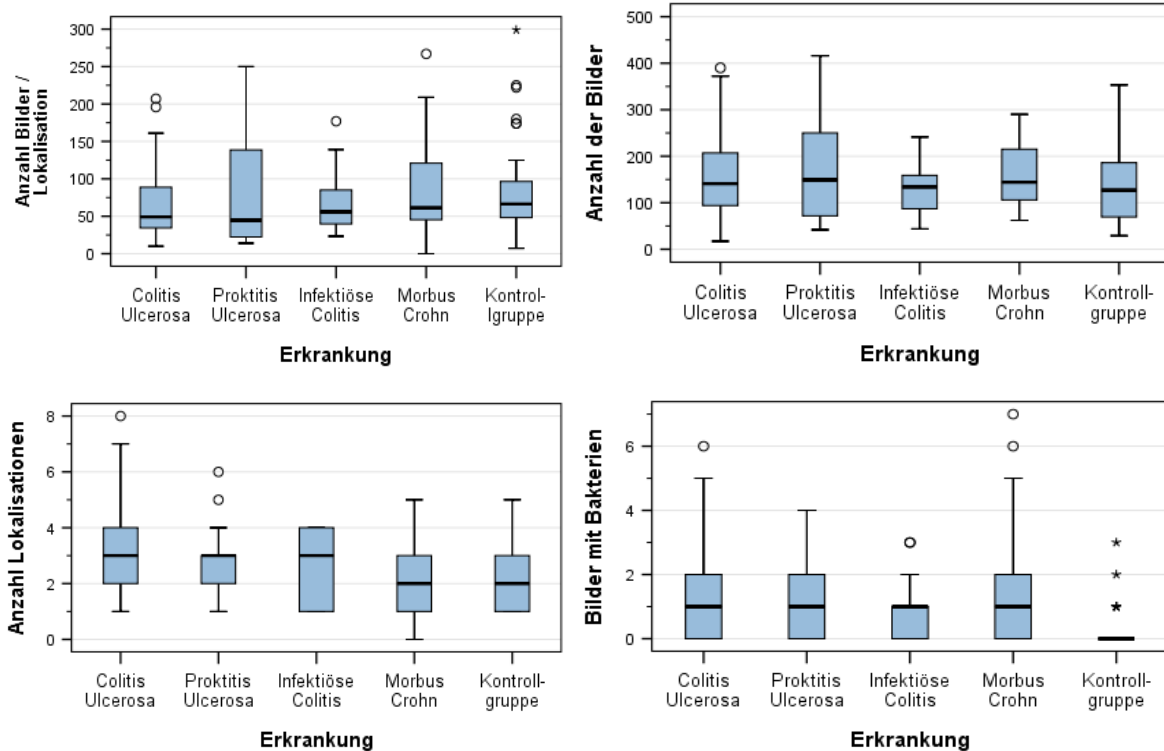


Abb. 9: Verteilung der Bilder und Untersuchungsregionen.

Bei Betrachtung der Verteilung und Besiedelung mit Bakterien in den einzelnen Gruppen zeigt sich, dass 8,6% (6/70) der Patienten mit Colitis ulcerosa mehr als 50 Bakterien pro Bild aufweisen, 28,6% (20/70) zwischen 11 und 49 Bakterien und 18,6% (13/70) weniger als 10 Bakterien pro Bild.

12,5 % (4/32) der Patienten mit Morbus Crohn zeigen mehr als 50 Bakterien pro Bild, 36% (8/22) 11 bis 49 Bakterien und 45,5% (10/22) weniger als 10 Bakterien pro Bild.

12,5 % (1/8) der Patienten mit Colitis zeigen mehr als 50 Bakterien pro Bild, 25% (8/32) zwischen 11 und 49 Bakterien und 25% (8/32) weniger als 10 Bakterien pro Bild.

8,3 % der Kontrollgruppe (4/48) zeigen mehr als 50 Bakterien pro Bild, 4,2% (2/48) zwischen 11 und 49 Bakterien und 2,1% (1/48) weniger als 10 Bakterien pro Bild.

In der Gruppe der Patienten mit Colitis ulcerosa gab es zusätzlich bei 8 Patienten Bilder des terminalen Ileums. Bei zwei dieser Patienten (25%) zeigten sich ebenfalls Bakterien in einer Häufung von 11 bis 49 Bakterien pro Bild.

| Kreuztabelle : Verteilung der Bakterienbesiedelung |                  |                  |                  |                    |                    |              |                |        |
|----------------------------------------------------|------------------|------------------|------------------|--------------------|--------------------|--------------|----------------|--------|
|                                                    |                  |                  | Erkrankung       |                    |                    |              |                | Gesamt |
|                                                    |                  |                  | Colitis ulcerosa | Proktitis ulcerosa | Infektiöse Colitis | Morbus Crohn | Kontrollgruppe |        |
| Besiedelung Bakterien                              | keine            | Anzahl           | 31               | 6                  | 5                  | 12           | 41             | 95     |
|                                                    |                  | % von Erkrankung | 44,3%            | 35,3%              | 38,5%              | 37,5%        | 85,4%          | 52,8%  |
|                                                    | geringe (1-10)   | Anzahl           | 13               | 4                  | 3                  | 8            | 1              | 29     |
|                                                    |                  | % von Erkrankung | 18,6%            | 23,5%              | 23,1%              | 25,0%        | 2,1%           | 16,1%  |
|                                                    | mittlere (11-49) | Anzahl           | 20               | 5                  | 4                  | 8            | 2              | 39     |
|                                                    |                  | % von Erkrankung | 28,6%            | 29,4%              | 30,8%              | 25,0%        | 4,2%           | 21,7%  |
|                                                    | starke (>50)     | Anzahl           | 6                | 2                  | 1                  | 4            | 4              | 17     |
|                                                    |                  | % von Erkrankung | 8,6%             | 11,8%              | 7,7%               | 12,5%        | 8,3%           | 9,4%   |
| Gesamt                                             |                  | Anzahl           | 70               | 17                 | 13                 | 32           | 48             | 180    |
|                                                    |                  | % von Erkrankung | 100,0%           | 100,0%             | 100,0%             | 100,0%       | 100,0%         | 100,0% |

Tab. 6: Verteilung der Bakterienbesiedelung

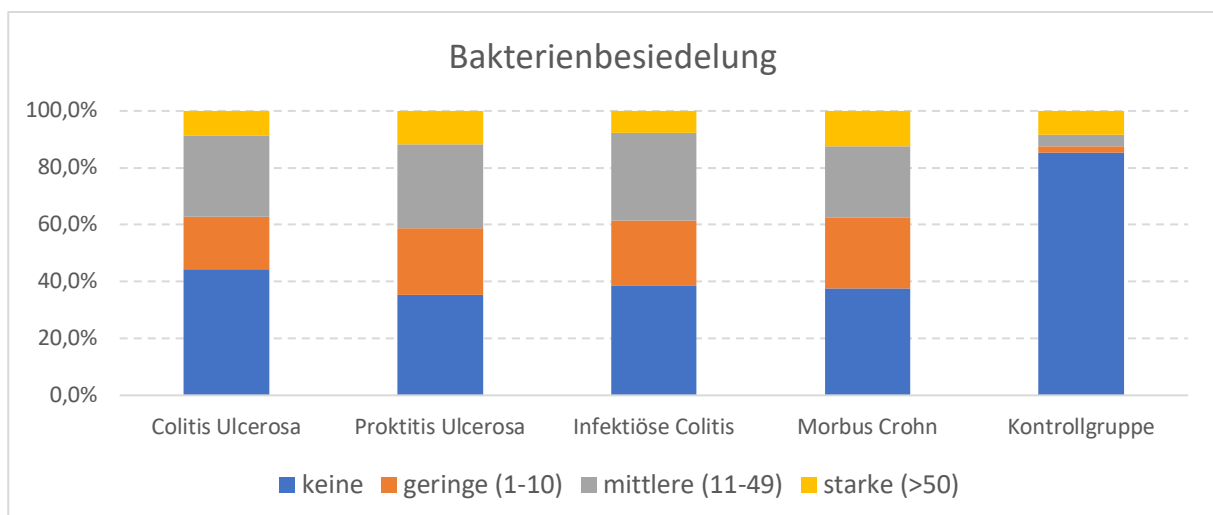


Abb. 10: Verteilung der Bakterienbesiedelung innerhalb der Erkrankungsgruppen.

### Korrelation mit der Lokalisation der Bakterien

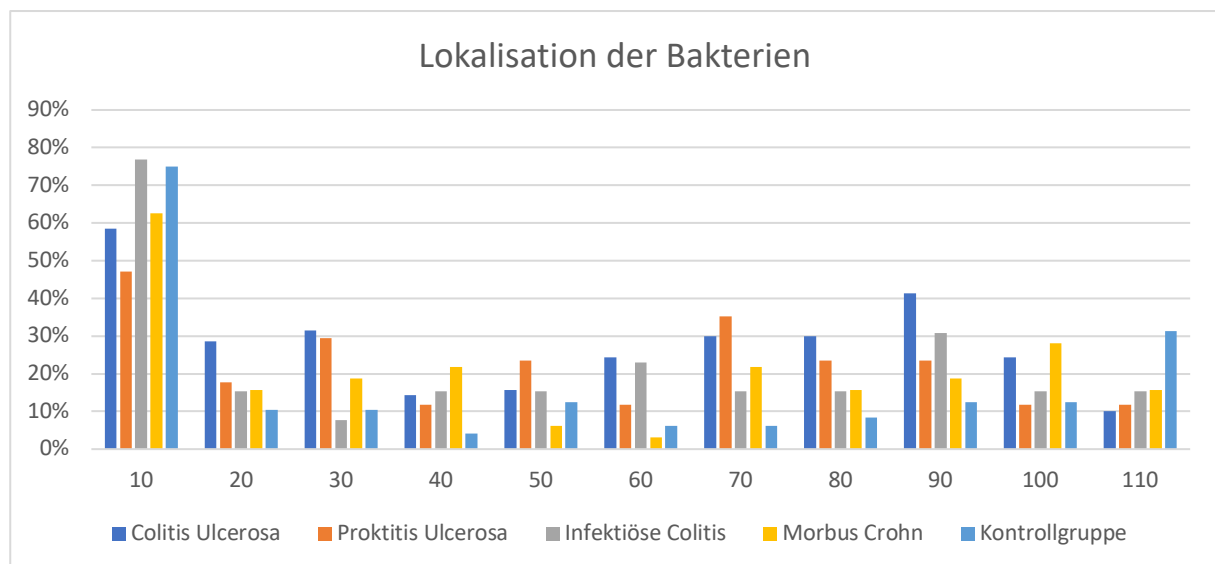
In der Morbus Crohn Gruppe konnten bei der Mehrzahl der Patienten (62,5%) Bakterien bei 10 cm nachgewiesen werden, obwohl aufgrund der klinischen Ausprägung eher eine Häufung in der Colitis ulcerosa Gruppe zu erwarten gewesen wäre. Bei 40 cm und 70 cm

zeigten sich bei jeweils 21,9% der Patienten Bakterien. Im terminalen Ileum fanden sich bei den meisten Untersuchten (84,4%) keine Bakterien.

Bei allen Patienten der Colitis-Gruppe konnten bei 20 cm und 30 cm Bakterien nachgewiesen werden, bezüglich der restlichen untersuchten Darmregionen bestand eine gleichmäßige Verteilung innerhalb dieser Patientengruppe. Bei 2 der Patienten der Colitis-Gruppe fanden sich Bakterien im terminalen Ileum.

In der Colitis ulcerosa-Gruppe zeigte sich eine gleichmäßige Verteilung der Bakterien im gesamten Colon, lediglich bei 40 cm und 50 cm präsentierten weniger als 20% der Patienten Bakterien.

In der Kontrollgruppe bestand eine unregelmäßige Verteilung der Bakterien. Die Mehrheit der Patienten (10% bis 31%) zeigten Bakterien bei 50 cm und 90 bis 110 cm. Bei 40 cm, 60 cm und 70 cm fanden sich Bakterien mit einer Häufung zwischen 4% und 6%.



**Abb. 11:** Verteilung der Lokalisation und Vorhandensein von Bakterien innerhalb der Erkrankungsgruppen.

| Lokalisation<br>[cm] | Erkrankung: Lokalisation der Bakterien |                       |                       |                 |                | Gesamt |
|----------------------|----------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------|----------------|--------|
|                      | Colitis<br>ulcerosa                    | Proktitis<br>ulcerosa | Infektiöse<br>Colitis | Morbus<br>Crohn | Kontrollgruppe |        |
| 10                   | 59%                                    | 47%                   | 77%                   | 63%             | 75%            | 64%    |
| 20                   | 29%                                    | 18%                   | 15%                   | 16%             | 10%            | 19%    |
| 30                   | 31%                                    | 29%                   | 8%                    | 19%             | 10%            | 22%    |
| 40                   | 14%                                    | 12%                   | 15%                   | 22%             | 4%             | 13%    |
| 50                   | 16%                                    | 24%                   | 15%                   | 6%              | 13%            | 14%    |
| 60                   | 24%                                    | 12%                   | 23%                   | 3%              | 6%             | 14%    |
| 70                   | 30%                                    | 35%                   | 15%                   | 22%             | 6%             | 22%    |
| 80                   | 30%                                    | 24%                   | 15%                   | 16%             | 8%             | 20%    |
| 90                   | 41%                                    | 24%                   | 31%                   | 19%             | 13%            | 27%    |
| 100                  | 24%                                    | 12%                   | 15%                   | 28%             | 13%            | 20%    |
| 110                  | 10%                                    | 12%                   | 15%                   | 16%             | 31%            | 17%    |

**Tab. 7:** Vorkommen und Lokalisation von Bakterien in den einzelnen Patientenkollektiven.

### **Korrelation zwischen endoskopisch und endomikroskopisch erhobener Inflammation und Anzahl der in der Mucosa gelegenen Bakterien**

In der Colitis ulcerosa-Gruppe fanden sich mehr Patienten mit Bakterien (65,7%), welche eine endoskopische Entzündungsreaktion aufwiesen im Vergleich zu Patienten ohne Bakterien (34,3%).

Weiterhin zeigte sich endoskopisch bei Patienten mit Bakteriennachweis häufiger ein Vorkommen von Leckage (78,6%) als bei Patienten ohne Nachweis von Bakterien (21,4%).

In der Morbus Crohn Gruppe fanden sich mehr Patienten mit Bakterien (87,5% vs. 12,5%) in dem Kollektiv mit endoskopisch nachgewiesener Entzündungsreaktion als in dem

Kollektiv, bei dem keine Entzündung nachgewiesen wurde. Auch hier zeigte sich ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer Leckage und dem Vorkommen von Bakterien (59,4% vs. 40,6%).

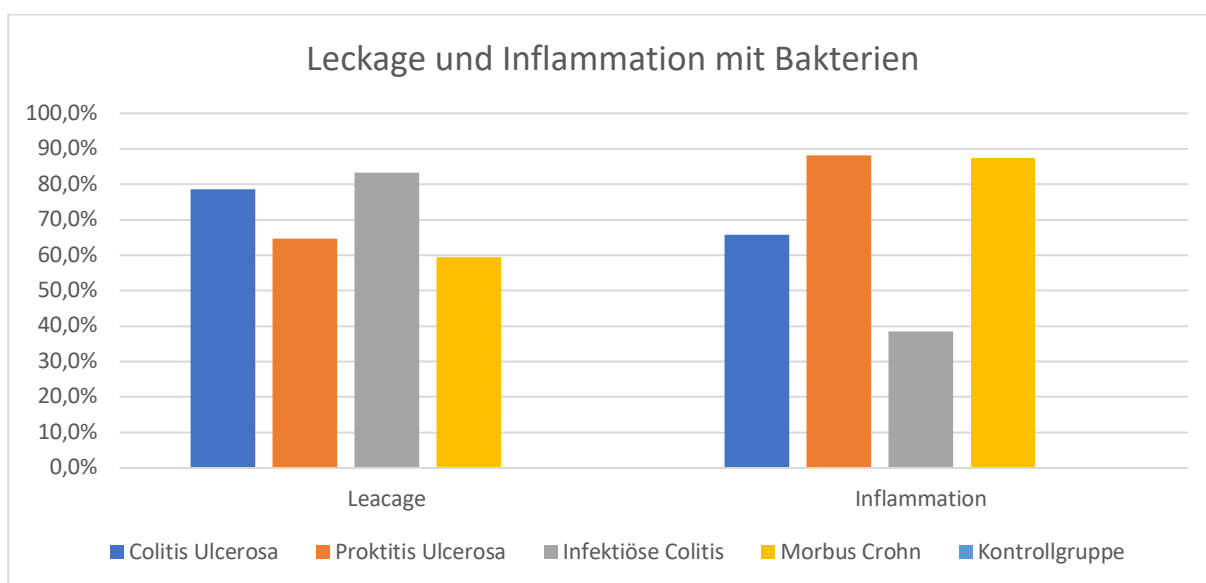
In der Colitis-Gruppe konnten bei 38,5% der Patienten mit Entzündung auch Bakterien nachgewiesen werden. Weiterhin zeigte sich auch hier endoskopisch bei mehr Patienten mit Bakterien ein Vorkommen von Leckage als bei Patienten ohne Bakteriennachweis (83,3% vs. 16,7%).

Bei keinem der Patienten ohne Leckage konnten Bakterien detektiert werden.

Es zeigte sich somit ein signifikanter (Chi-Quadrat-Test,  $p < 0,001$ ) Zusammenhang zwischen der Anzahl der Patienten mit Bakteriennachweis und dem Ort der Entzündung, unabhängig von der Colitisform.

| Erkrankung: Leckage und Inflammation bei Patienten mit Bakterien |                  |                    |                    |              |                |        |
|------------------------------------------------------------------|------------------|--------------------|--------------------|--------------|----------------|--------|
| Gruppe                                                           | Colitis ulcerosa | Proktitis ulcerosa | Infektiöse Colitis | Morbus Crohn | Kontrollgruppe | Gesamt |
| Leckage                                                          | 78,6%            | 64,7%              | 83,3%              | 59,4%        | 0,0%           | 59,0%  |
| Inflammation                                                     | 65,7%            | 88,2%              | 38,5%              | 87,5%        | 0,0%           | 58,0%  |

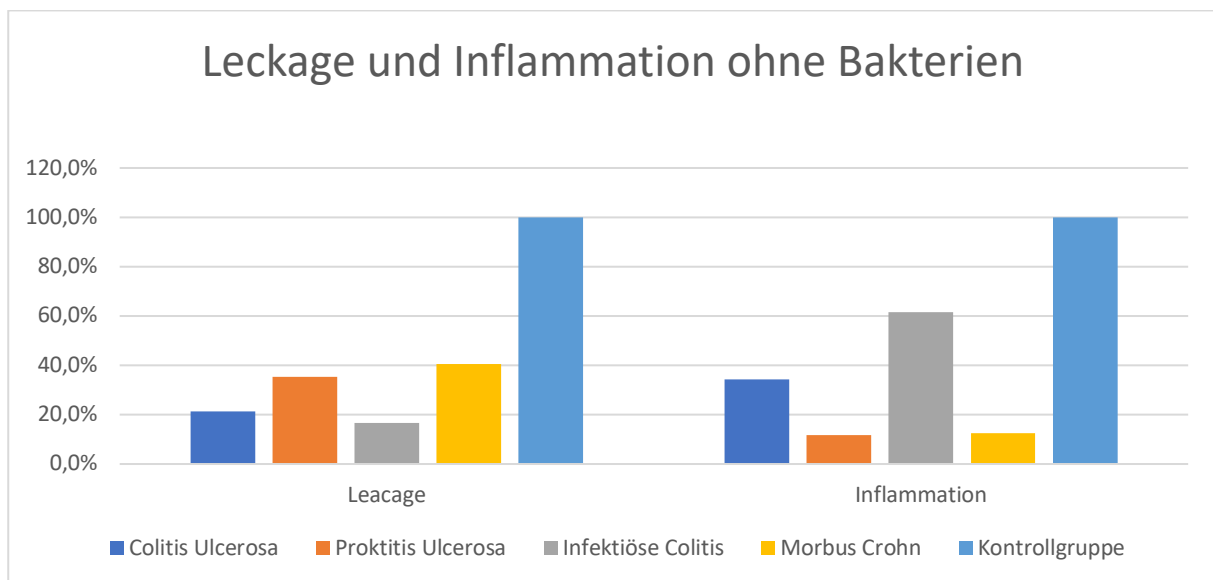
**Tab. 8:** Vorkommen von Inflammation und Leckage bei Patienten mit Bakterien in den einzelnen Patientenkollektiven.



**Abb. 12:** Verteilung / Vorkommen von Leckage und Inflammation bei Patienten mit Bakterien innerhalb der Erkrankungsgruppen.

|              | Erkrankung ohne Bakterien |                    |                    |              |                |        |
|--------------|---------------------------|--------------------|--------------------|--------------|----------------|--------|
| Gruppe       | Colitis ulcerosa          | Proktitis ulcerosa | Infektiöse Colitis | Morbus Crohn | Kontrollgruppe | Gesamt |
| Leckage      | 21,4%                     | 35,3%              | 16,7%              | 40,6%        | 100,0%         | 41,0%  |
| Inflammation | 34,3%                     | 11,8%              | 61,5%              | 12,5%        | 100,0%         | 42,0%  |

**Tab. 9:** Vorkommen von Inflammation und Leckage bei Patienten ohne Bakterien in den einzelnen Patientenkollektiven



**Abb. 13:** Verteilung / Vorkommen von Leckage und Inflammation bei Patienten ohne Bakterien innerhalb der Erkrankungsgruppen.



## 5 Diskussion

In dieser Studie haben wir die konfokale Endomikroskopie genutzt, um Patienten mit im Colon oder im Ileum gelegenen intramucosalen Bakterien zu identifizieren. Im Rahmen der Auswertung zeigten sich vermehrt intramucosal gelegene Bakterien bei Patienten mit einer Colitis verglichen mit den Patienten ohne Colitis. Durch die konfokale Laserendomikroskopie im Vergleich zur konventionellen Endomikroskopie ergibt sich die Möglichkeit, nicht nur die oberflächlichen Strukturen zu identifizieren, sondern auch, Bakterien, welche sich in den Epithelzellen oder der Lamina propria befinden, sichtbar werden zu lassen.

Andere Studien haben bereits die zentrale Rolle der Microflora des Darmes bei der Entstehung von CED gezeigt [105, 106]. In diesen Fällen vermag die Microflora eine gesteigerte Zytokin-Produktion zu initiieren und somit die Entstehung einer intestinalen Inflammation herbeizuführen und aufrecht zu erhalten [14].

Die Laserendomikroskopie ist die erste Technik, welche erlaubt, Bakterien in vivo zu erforschen. Dies gelingt durch die Anwendung von Fluorescein, welches aus den mucosalen Kapillaren durch die Lamina propria und die Epithelzellen ins Darmlumen diffundiert. Die Bakterien absorbieren das Fluorescein und demarkieren sich so im Lumen, innerhalb der Epithelzellen oder in der Lamina propria. Bereits in früheren Studien wurde gezeigt, dass es bei entzündlichen Darmabschnitten vermehrt zum Austritt von Fluorescein gekommen ist [107].

So wie in vielen anderen Studien zeigte sich auch hier ein vermehrtes Auftreten von Bakterien bei Patienten mit einer CED im Vergleich zu gesunden Patienten. [112, 110, 108, 111]

In einer Studie von Swidinski [110] wurde gezeigt, dass bei Patienten mit einer Darmentzündung eine im Vergleich zu einer Kontrollgruppe hohe Konzentration an mucosal gelegenen Bakterien besteht. Je ausgeprägter der Schweregrad der Erkrankung, desto höhere Bakterienkonzentrationen fanden sich.

In unserem Patientenkollektiv fanden wir in allen Vergleichsgruppen eine ähnliche Verteilung der Bakterienbesiedelung (Morbus Crohn 62,5% der Patienten, Colitis ulcerosa 55,7% der Patienten, infektiöse Colitis 61,5% der Patienten). In einigen Studien [110, 105, 108] wurde weiterhin gezeigt, dass bei gesunden Patienten die mucosale Oberfläche nahezu steril ist. In unserer Auswertung fanden auch wir in der Kontrollgruppe bei lediglich 14,6% der Untersuchten Bakterien.

Im Rahmen unserer Studie versuchten wir, nicht spezifische Arten oder Gruppen von Bakterien zu identifizieren. Mittels Laserendomikroskopie ist es lediglich möglich, die Bakterien darzustellen ohne Berücksichtigung einer Gattung. Bakterien, die kein Fluorescein aufnehmen können, kommen nicht zur Darstellung [108]. Bakterien im intestinalen Lumen können nur dargestellt werden, wenn aufgrund einer fehlenden Barrierefunktion und einer somit erhöhten Leckage Fluorescein in das Darmlumen gelangt. In einer Studie von Kießlich et al. [104] wurde bereits gezeigt, dass durch den Endzündungsmediator Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) der Zellabbau induziert wird, wodurch es zu einer verminderten Barrierefunktion kommt, was somit wahrscheinlich zu einer entzündlichen Darmerkrankung führt.

In unserer Studie fanden sich signifikant weniger Bakterien im gesunden Patientenkollektiv im Vergleich zu den Patienten mit Colitis ulcerosa, infektiöser Colitis oder Morbus Crohn ( $p < 0,001$ ). Betrachtet man die endoskopische Entzündungsreaktion in allen Krankheitsgruppen (MC, IC, CU) zeigte sich bei den Patienten mit Bakterienvorkommen eine vermehrte Inflammation. Gleichzeitig besteht auch hier ein vermehrtes Austreten von Fluorescein im Sinne einer Leckage.

|              | Erkrankung: Leckage und Inflammation bei Patienten mit Bakterien |                    |                    |              |                |        |
|--------------|------------------------------------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------|----------------|--------|
| Gruppe       | Colitis ulcerosa                                                 | Proktitis ulcerosa | Infektiöse Colitis | Morbus Crohn | Kontrollgruppe | Gesamt |
| Leckage      | 78,6%                                                            | 64,7%              | 83,3%              | 59,4%        | 0,0%           | 59,0%  |
| Inflammation | 65,7%                                                            | 88,2%              | 38,5%              | 87,5%        | 0,0%           | 58,0%  |

**Tab. 8:** Vorkommen von Inflammation und Leckage bei Patienten mit Bakterien in den einzelnen Patientenkollektiven.

Insgesamt besteht ein signifikanter ( $p < 0,001$ ) Zusammenhang zwischen der Anzahl der Patienten mit Bakteriennachweis und dem Ort der Entzündung, unabhängig von der Colitisform.

Die Tatsache, dass intramucosal gelegene Bakterien (auch wenn vermindert) auch in der Kontrollgruppe und somit im gesunden Kollektiv gefunden wurden, lässt vermuten, dass das Vorliegen von intramucosalen Bakterien nicht als alleiniger Faktor für das Auslösen einer Immunantwort verantwortlich gemacht werden kann. [113, 114] Ein weiterer Unterschied bei Patienten mit einer CED im Vergleich zur Kontrollgruppe könnte sein, dass die intestinale Microflora der Patienten mit CED anfälliger für eine Invasion von Bakterien ist.

Einen weiteren Aspekt, den wir in unserer Studie untersucht haben, ist das Vorkommen und die Lokalisation der Bakterien im Darm. Swidinsky et al [109] beschreiben in ihrer Studie an Mäusen eine erhöhte Konzentration an Bakterien im Bereich des proximalen Colons und im Coecum. Schultz et al [108] hingegen untersuchte entnommene Biopsien des proximalen und distalen Colons sowie des Rektums bei CED-Patienten und fand eine vergleichbare Bakterienverteilung.

In unserer Studie zeigte sich eine relativ heterogene Verteilung der Bakterienbesiedelung in der Morbus Crohn-Gruppe. Bei einer Tiefe von 10 cm ab After konnten bei 63% der Patienten Bakterien nachgewiesen werden. Bei 40 cm und 70 cm fanden sich bei 22% der

Patienten Bakterien, bei 110 cm im Bereich des terminalen Ileums fanden sich bei nur 16% der Patienten Bakterien. Betrachtet man die Colitis ulcerosa-Gruppe hingegen, zeigt sich eine homogene Verteilung der Bakterien. Lediglich bei 40 cm und 50 cm präsentierten weniger als 20% der Patienten Bakterien. Im Bereich des rechten Colons (bei 90 cm) fanden sich bei mehr als 40% der Patienten Bakterien. Es scheint so, als würde die Lokalisation der Bakterien mit der üblichen Topografie der Erkrankung korrelieren. Unerwarteter Weise fanden sich bei 24% der Colitis ulcerosa Patienten Bakterien im Bereich des terminalen Ileums, wohingegen Klessen et al [105] in diesem Bereich nur wenige Bakterien gefunden hatten.

Zu erwähnen ist, dass die typische Erkrankungsregion der Morbus Crohn Patienten im Bereich des terminalen Ileums liegt. In unserer Auswertung allerdings gelang bei ca. 72% der Patienten mit generellem Bakterienvorkommen kein Bakteriennachweis im terminalen Ileum.

Insgesamt ist zu sagen, dass aufgrund des retrospektiven Studiendesigns keine einheitlich festgelegten Untersuchungsregionen für die jeweiligen Patientengruppen definiert werden konnten und zur präziseren Auswertung ein prospektives Studiendesign notwendig wäre. Zusammenfassend kann man sagen, dass die konfokale Laserendomikroskopie es ermöglicht, intramucosal gelegene Bakterien in vivo sichtbar zu machen. Wir fanden bei Patienten mit einer CED häufiger Bakterien als bei dem Patientenkollektiv, welches im Rahmen eines Screenings ohne gastrointestinale Symptome untersucht wurde. Zur besseren Validierung bedarf es sicherlich weitere prospektive Studien. Nichts desto trotz ist die konfokale Laserendomikroskopie ein wichtiger Baustein in der Untersuchung und beim Erlangen neuer Erkenntnisse bezüglich der Pathophysiologie bei Patienten mit einer CED.

## 6 Zusammenfassung

### Hintergrund

Die Entstehung einer CED ist multifaktoriell. Eine Schlüsselrolle dabei spielt eine Störung der Barrierefunktion der Darmschleimhaut mit der Konsequenz, dass sich Darmbakterien auf der Darmwand ansiedeln können und dort eine krankhafte Immunreaktion auslösen. Mittels der Laserendomikroskopie gelingt es, diese intramukosal gelegenen Bakterien darzustellen und deren Häufung im Zusammenhang mit den wichtigsten Krankheitsbildern der CED, dem Morbus Crohn und der Colitis ulcerosa, zu untersuchen.

### Methode

Zur Datenerhebung erfolgte die Beurteilung der gewonnenen Bilder im Rahmen der Laserendomikroskopie von insgesamt 180 Untersuchungen. Im Rahmen der CLE wurden standardisierte Areale (alle 10 cm) mittels Laserendomikroskopie untersucht. Die insgesamt 27.630 endomikroskopischen Bilder wurden makroskopisch gesichtet und die Anzahl der intramukosal gelegenen Bakterien, die Inflammationsreaktion und vaskulären Veränderungen im Sinne von Leckage bei Patienten mit Colitis ulcerosa, Morbus Crohn und einem gesunden Patientenkollektiv verglichen.

### Ergebnisse

Es zeigten sich signifikant ( $p < 0,001$ ) mehr intramukosal gelegene Bakterien bei Patienten mit Colitis ulcerosa (55,7%), Morbus Crohn (62,5%) oder Colitis (61,5%) im Vergleich zum gesunden Patientenkollektiv (14,6%).

Beim Vergleich der Krankheitsgruppen (CU, MC, Colitis) untereinander war der Unterschied nicht signifikant.

Bei Betrachtung der Lokalisation der Bakterien zeigte sich in der MC-Gruppe ein gehäuftes Vorkommen von Bakterien (21.9%) bei 40 und 70 cm, bei ca. 84% der Untersuchten fanden sich keine Bakterien im terminalen Ileum. In der Colitis-Gruppe war ein vermehrtes Vorkommen bei 20 cm und 30 cm zu sehen. Die CU-Gruppe zeigte eine gleichmäßige Verteilung der Bakterien.

Bei der Betrachtung der endoskopisch und endomikroskopisch erhobenen Inflammation und der Anzahl der intramukosal gelegenen Bakterien zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang unabhängig von der Colitisform.

### **Fazit**

Die konfokale Laserendoskopie ermöglicht in vivo die Darstellung von intramukosal gelegenen Bakterien und ermöglicht eine Beurteilung der Inflammation. Diese neue diagnostische Möglichkeit kann zukünftig genutzt werden, um die Diagnose als auch die Verlaufsbeurteilung der CED zu verbessern.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Baumgart DC, Carding SR: Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology.. In: The Lancet. 369, Nr. 9573, 2007, S. 1627–40.
2. Baumgart DC, Sandborn WJ: Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies.. In: The Lancet. 369, Nr. 9573, 2007, S. 1641–57.
3. Xavier RJ, Podolsky DK: Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease.. In: Nature. 448, Nr. 7152, 2007, S. 427-34.
4. Kirsner JB. Historical aspects of inflammatory bowel disease. J Clin Gastroenterol. 1988 Jun;10(3):286-97.
5. Kirsner JB. Historical origins of current IBD concepts. World J Gastroenterol. 2001 Apr;7(2):175-84. No abstract available.
6. Podolsky DK. Inflammatory bowel Disease. N. Engl. J Med 2002; 347:417-29
7. Sartor RB. Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel diseases. Am J Gastroenterol 1997;92:5S-11S.
8. Shanahan F. Host-flora interactions in inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis 2004;10 Suppl 1:S16-24.
9. Farrell RJ, LaMont JT. Microbial factors in inflammatory bowel disease. Gastroenterol Clin North Am 2002;31:41-62.
10. Jacobsen BA, Fallingborg J, Rasmussen HH, Nielsen KR, Drewes AM, Puho E, Nielsen GL, Sørensen HT, Increase in incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in northern Denmark: a population-based study, 1978-2002. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2006 Jun;18(6):601-6
11. Wilks S. Morbid appearances in the intestine of Miss Bankes. London Medical Times & Gazette 1859; 2: 264
12. Hoffmann J et al. Diagnostik und Therapie Z Gastroenterol 2004; 42: 979–983
13. Hanauer, S.B. (2004) Update on the etiology, pathogenesis and diagnosis of ulcerative colitis. Nature Clinical Practice. Gastroenterology & Hepatology 1: 26-31
14. Hanauer, S.B. (2006) Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and herapeutic opportunities. Inflammatory Bowel Diseases 12: S3-S9
15. Neurath, M.F., Schürmann, G. (2000) Zur Immunpathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Der Chirurg 71: 30-40
16. Kiesslich, R., J. Burg, et al. (2004). "Confocal laser endoscopy for diagnosing intraepithelial neoplasias and colorectal cancer in vivo." Gastroenterology 127(3): 706-13

- 17 Kiesslich, R., M. Gotz, et al. (2006). "[Endomicroscopy--technology with future]." *Internist (Berl)* 47(1): 8-17
- 18 Kiesslich, R., Hoffman, A., Neurath, M.F. (2006b) Colonoscopy, tumours, and inflammatory bowel disease – new diagnostic methods. *Endoscopy* 38: 5-10
- 19 Russel RK, Wilson DC and Satsangi J. Unravelling the complex genetics of inflammatory bowel disease. *Arch Dis Child*. 2004 Jul;89(7):598-603
- 20 Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: Etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998; 115: 182-205
- 21 Ghosh S, Shand A, Ferguson A. Ulcerative colitis. *Br Med J* 2000; 320: 1119-1123
- 22 Guttermann JU. Cytokine therapeutics: Lessons from interferon alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 91: 1198-1205
- 23 Tilg H. New insights into the mechanisms of interferon alpha: An immunoregulatory and anti-inflammatory cytokine. *Gastroenterology* 1997; 112: 1017-1021
- 24 Fuss IJ; Neurath M; Boirivant M; Klein JS; de la Motte C; Strong SA; Fiocchi C; Strober W. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol* 1996; 157: 1261-1270
- 25 Heller F, Boirivant M, Mannon P. IL-13 secretion by CD4+ CD161+ NK-T cells is increased in oxazolone and human ulcerative colitis (UC). *Gastroenterology* 2003; 124: A35 (abstract 276)
- 26 Neurath, M.F. (2007) IL-23: a master regulator in Crohn disease. *Nature Medicine* 13:26-28
- 27 Elson CO. Genes, microbes, and T cells--new therapeutic targets in Crohn's disease. *N Engl J Med*. 2002 Feb 21;346(8):614-6.
- 28 Shanahan F. Crohn's disease. *Lancet*. 2002 Jan 5;359(9300):62-9.
- 29 Rubin DT, Hanauer SB. Smoking and inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2000 Aug;12(8):855-62.
- 30 Uhlig, H.H., McKenzie, B.S., Hue, S., Thompson, C., Joyce-Shaikh, B., Stepankova, R. et al. (2006) Differential activity of IL-12 and IL-23 in mucosal and systemic innate immune pathology. *Immunity* 25 (2): 309-318
- 31 Roth MP, Petersen GM, McElree C, Feldman E, Rotter JI. Geographic origins of Jewish patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1989 Oct;97(4):900-4.
- 32 Bonen DK, Nicolae DL, Moran T et al. Racial differences in Nod2 variation: Characterization of Nod2 in African-Americans with Crohn's disease: a cohort study. *Gastroenterology* 2002; 122(Suppl):A-29.
- 33 Gaya, D.R., Russell, R.K., Nimmo, E.R., Satsangi, J. (2006) New genes in inflammatory bowel disease: lesson for complex disease? *The Lancet* 15: 1271-1284



- 34 Calkins BM. A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci.* 1989 Dec;34(12):1841-54.
- 35 Lashner BA, Shaheen NJ, Hanauer SB, Kirschner BS. Passive smoking is associated with an increased risk of developing inflammatory bowel disease in children. *Am J Gastroenterol.* 1993 Mar;88(3):356-9.
- 36 Ghosh S, Armitage E, Wilson D, Minor PD, Afzal MA. Detection of persistent measles virus infection in Crohn's disease: current status of experimental work. *Gut.* 2001 Jun;48(6):748-52.
- 37 Chamberlin W, Graham DY, Hulten K, El-Zimaity HM, Schwartz MR, Naser S, Shafran I, El-Zaatari FA. Review article: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* as one cause of Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2001 Mar;15(3):337-46.
- 38 Sartor RB. Enteric microflora in IBD: pathogens or commensals? *Inflamm Bowel Dis* 1997;3:230-235.
- 39 Sellon RK, Tonkonogy S, Schultz M, Dieleman LA, Grenther W, Balish E, Rennick DM, Sartor RB. Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun.* 1998 Nov;66(11):5224-31.
- 40 D'Haens GR, Geboes K, Peeters M, et al. Early lesions of recurrent Crohn's disease caused by infusion of intestinal contents in excluded ileum. *Gastroenterology* 1998;114:262-7.
- 41 Rutgeerts P, Geboes K, Peeters M, et al. Effect of faecal stream diversion on recurrence of Crohn's disease in the neoterminal ileum. *Lancet* 1991;338:771-4.
- 42 Winslet MC, Allan A, Poxon V, Youngs D, Keighley MR. Faecal diversion for Crohn's colitis: a model to study the role of the faecal stream in the inflammatory process. *Gut.* 1994 Feb;35(2):236-42.
- 43 Hart AL, Stagg AJ, Kamm MA. Use of probiotics in the treatment of inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol.* 2003 Feb;36(2):111-9.
- 44 Hommes, D.W., Van Deventer, S.J.H. (2004) Endoscopy in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 126: 1561-1573
- 45 Awmf-Leitlinien
- 46 Yantiss, R.K., Odze, R.D. (2006) Diagnostic difficulties in inflammatory bowel disease pathology. *Histopathology* 48: 116-132
- 47 Levine, T.S., Tzardi, M., Mitchell, S., Sowter, C., Price, A.B. (1996) Diagnostic difficulty arising from rectal recovery in ulcerative colitis. *Journal of Clinical Pathology* 49: 319-323
48. Boom R, Sol C, Weel J, et al. Detection and quantitation of human cytomegalovirus DNA in faeces. *J Virol Methods* 2000; 84: 1-14. (IIb)
49. Cottone M, Pietrosi G, Martorana G, et al. Prevalence of cytomegalovirus infection in severe refractory ulcerative and Crohn's colitis. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 773-5. (III)

50. Adani GL, Avital I, Ferrarresso C, Aoki T. CMV infection in severe refractory ulcerative and Crohn's colitis. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 3464-5. (IV)
51. Cooper HS, Raffenberger EC, Jonas L, Fitts WT, Jr. Cytomegalovirus inclusions in patients with ulcerative colitis and toxic dilation requiring colonic resection. *Gastroenterology* 1977; 72: 1253-6. (III)
52. Papadakis KA, Tung JK, Binder SW, et al. Outcome of cytomegalovirus infections in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 2137-42. (III)
53. Kaufman HS, Kahn AC, Iacobuzio-Donahue C, et al. Cytomegaloviral enterocolitis: clinical associations and outcome. *Dis Colon Rectum* 1999; 42: 24-30. (IIb)
54. Lee SD, Cohen RD. Endoscopy in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 2002; 31: 119-32. (IV)
55. Rutgeerts P, Peeters M, Geboes K, Vantrappen G. Infectious agents in inflammatory bowel disease. *Endoscopy* 1992; 24: 565-7. (IV)
56. Horing E, Gopfert D, Schroter G, von Gaisberg U. Frequency and spectrum of microorganisms isolated from biopsy specimens in chronic colitis. *Endoscopy* 1991; 23: 325-7. (IIb)
57. Caradonna L, Amati L, Magrone T, et al. Enteric bacteria, lipopolysaccharides and related cytokines in inflammatory bowel disease: biological and clinical significance. *J Endotoxin Res* 2000; 6: 205-14. (IIb)
58. Takahashi Y, Tange T. Prevalence of cytomegalovirus infection in inflammatory bowel disease patients. *Dis Colon Rectum* 2004; 47:722–726
59. Dimitroulia E, Spanakis N, Konstantinidou AE et al. Frequent detection of cytomegalovirus in the intestine of patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 879–884
60. Cottone M, Pietrosi G, Martorana G et al. Prevalence of cytomegalovirus infection in severe refractory ulcerative and Crohn's colitis. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 773–775
61. Haber HP, Busch A, Ziebach R, et al. Ultrasonographic findings correspond to clinical, endoscopic, and histologic findings in inflammatory bowel disease and other enterocolitides. *J Ultrasound Med* 2002; 21: 375-82. (III)
62. Parente F, Greco S, Molteni M, et al. Role of early ultrasound in detecting inflammatory intestinal disorders and identifying their anatomical location within the bowel. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18: 1009-16. (IIb)
63. Bru C, Sans M, Defelitto MM, et al. Hydrocolonic sonography for evaluating inflammatory bowel disease. *AJR Am J Roentgenol* 2001; 177: 99-105. (IIb) Limberg B. [Diagnosis of chronic inflammatory bowel disease by ultrasonography]. *Z Gastroenterol* 1999; 37: 495-508. (IV)

64. Hollerbach S, Geissler A, Schiegl H, et al. The accuracy of abdominal ultrasound in the assessment of bowel disorders. *Scand J Gastroenterol* 1998; 33: 1201-8. (IIb)
65. Madsen SM, Thomsen HS, Munkholm P, et al. Inflammatory bowel disease evaluated by low-field magnetic resonance imaging. Comparison with endoscopy, 99mTc-HMPAO leucocyte scintigraphy, conventional radiography and surgery. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 307-16. (IIb)
66. Albert J, Scheidt T, Basler B, et al. [Magnetic Resonance Imaging in diagnosis and follow-up of Crohn's Disease--Is conventional enteroclysis still necessary?]. *Z Gastroenterol* 2002; 40: 789-94. (IIb)
67. Rieber A, Nussle K, Reinshagen M, Brambs HJ, Gabelmann A. MRI of the abdomen with positive oral contrast agents for the diagnosis of inflammatory small bowel disease. *Abdom Imaging* 2002; 27: 394-9. (IV)
68. Hansmann HJ, Hess T, Hahmann M, Erb G, Elsing C, Richter GM, Dux M. *Rofo*. [MRI in chronic inflammatory bowel disease] 2001 Jan;173(1):4-11. Review. German. PMID: 11225416 [
69. Schreyer, A.G., Rath, H.C., Kikinis, R., Völk, M., Schölmerich, J., Feuerbach, S., Rogler, G., Seitz, J., Herfarth, H. (2005) Comparison of magnetic resonance imaging colonography with conventional colonoscopy for the assessment of intestinal inflammation in patients with inflammatory bowel disease: a feasibility study. *Gut* 54: 250-256
70. Mekhjian HS, Switz DM, Melnyk CS, Rankin GB, Brooks RK. Clinical features and natural history of Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1979 Oct;77(4 Pt 2):898-906.
71. Pimentel M, Chang M, Chow EJ, Tabibzadeh S, Kirit-Kiriak V, Targan SR, Lin HC. Identification of a prodromal period in Crohn's disease but not ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*. 2000 Dec;95(12):3458-62.
72. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott ID, Bernstein CN, Brant SR, Caprilli R, Colombel JF, Gasche C, Geboes K, Jewell DP, Karban A, Loftus Jr EV, Pena AS, Riddell RH, Sachar DB, Schreiber S, Steinhart AH, Targan SR, Vermeire S, Warren BF. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol*. 2005 Sep;19 Suppl A:5-36.
73. Drossman, D.A., Li, Z., Leserman, J., Patrick, D.L. (1992) Ulcerative colitis and Crohn's disease health status scales for research and clinical practice. *Journal of Clinical Gastroenterology* 15: 104-112
74. Danovitch SH. Fulminant colitis and toxic megacolon. *Gastroenterol Clin North Am* 1989 Mar;18(1):73-82.
75. Becker JM. Surgical management of ulcerative colitis. In: *Inflammatory Bowel Disease*, MacDermott, RP, Stenson, WF (Eds), Elsevier, New York 1992. p.599.

76. Chambers, W.M., Warren, B.F., Jewell, D.P., Mortensen, N.J.McC. (2005) Cancer surveillance in ulcerative colitis. *British Journal of Surgery* 92: 928-936
77. Nuako KW, Ahlquist DA, Mahoney DW, Schaid DJ, Siems DM, Lindor NM. Familial predisposition for colorectal cancer in chronic ulcerative colitis: a case-control study. *Gastroenterology*. 1998 Nov;115(5):1079-83.
78. Eaden J, Abrams K, Ekbom A, Jackson E, Mayberry J. Colorectal cancer prevention in ulcerative colitis: a case-control study. *Aliment Pharmacol Ther*. 2000 Feb;14(2):145-53.
79. Farmer RG, Michener WM, Mortimer EA. Studies of family history among patients with inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol*. 1980 May;9(2):271-7.
80. Petrelli EA, McKinley M, Troncale FJ. Ocular manifestations of inflammatory bowel disease. *Ann Ophthalmol* 1982 Apr;14(4):356-60.
81. Wordsworth P. Genes in the spondyloarthropathies. *Rheum Dis Clin North Am*. 1998 Nov;24(4):845-63.
82. Holden W, Orchard T, Wordsworth P. Enteropathic arthritis. *Rheum Dis Clin North Am*. 2003 Aug;29(3):513-30, viii.
83. Rasmussen HH, Fallingborg JF, Mortensen PB, Vyberg M, Tage-Jensen U, Rasmussen SN. Hepatobiliary dysfunction and primary sclerosing cholangitis in patients with Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol*. 1997 Jun;32(6):604-10.
84. Irving PM, Pasi KJ, Rampton DS. Thrombosis and inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2005 Jul;3(7):617-28.
85. Solem CA, Loftus EV, Tremaine WJ, Sandborn WJ. Venous thromboembolism in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 2004 Jan;99(1):97-101.
86. Bernstein CN, Blanchard JF, Houston DS, Wajda A. The incidence of deep venous thrombosis and pulmonary embolism among patients with inflammatory bowel disease: a population-based cohort study. *Thromb Haemost*. 2001b Mar;85(3):430-4.
87. Gitkind MJ, Wright SC. Amyloidosis complicating inflammatory bowel disease. A case report and review of the literature. *Dig Dis Sci* 1990 Jul;35(7):906-8.
88. Danese S, Semeraro S, Papa A, Roberto I, Scaldaferrri F, Fedeli G, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Extraintestinal manifestations in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2005 Dec 14;11(46):7227-36.
89. Louis E, Collard A, Oger AF, Degroote E, Aboul Nasr El Yafi FA, Belaiche J. Behaviour of Crohn's disease according to the Vienna classification: changing pattern over the course of the disease. *Gut*. 2001 Dec;49(6):777-82.
90. Freeman HJ. Application of the Vienna Classification for Crohn's disease to a single clinician database of 877 patients. *Can J Gastroenterol*. 2001 Feb;15(2):89-93.
91. Choi PM, Zelig MP. Similarity of colorectal cancer in Crohn's disease and ulcerative colitis: implications for carcinogenesis and prevention. *Gut*. 1994 Jul;35(7):950-4.

92. Lewis JD, Bilker WB, Brensinger C, Deren JJ, Vaughn DJ, Strom BL. Inflammatory bowel disease is not associated with an increased risk of lymphoma. *Gastroenterology*. 2001 Nov;121(5):1080-7.
93. Loftus EV Jr, Tremaine WJ, Habermann TM, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ. Risk of lymphoma in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 2000 Sep;95(9):2308-12.
94. Loftus EV Jr, Sandborn WJ. Lymphoma risk in inflammatory bowel disease: influences of referral bias and therapy. *Gastroenterology*. 2001 Nov;121(5):1239-42.
95. Karlen P, Lofberg R, Brostrom O, Leijonmarck CE, Hellers G, Persson PG. Increased risk of cancer in ulcerative colitis: a population-based cohort study. *Am J Gastroenterol*. 1999 Apr;94(4):1047-52.
96. Palli D, Trallori G, Bagnoli S, Saieva C, Tarantino O, Ceroti M, d'Albasio G, Pacini F, Amorosi A, Masala G. Hodgkin's disease risk is increased in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2000 Sep;119(3):647-53.
97. Persson PG, Karlen P, Bernell O, Leijonmarck CE, Brostrom O, Ahlbom A, Hellers G., Crohn's disease and cancer: a population-based cohort study. *Gastroenterology*. 1994 Dec;107(6):1675-9.
98. Ekbohm A, Helmick C, Zack M, Adami HO. Extracolonic malignancies in inflammatory bowel disease. *Cancer*. 1991b Apr 1;67(7):2015-9.
99. Bernstein CN, Blanchard JF, Kliever E, Wajda A. Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Cancer*. 2001a Feb 15;91(4):854-62.
100. Kiesslich, R., Fritsch, J., Holtmann, M., Köhler, H.H., Stolte, M., Kanzler, S. et al. (2003) Methylene blue-aides chromoendoscopy for the detection of intraepithelial neoplasia and colon cancer in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 124: 880-888
101. Kiesslich, R., Neurath, M.F. (2005) Chromo- and magnifying endoscopy for colorectal lesions. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 17: 793-801
102. Watson AJ, Chu S, Sieck L, et al. Epithelial barrier function in vivo is sustained despite gaps in epithelial layers. *Gastroenterology* 2005;129:902-12.
103. Jung, M., Kiesslich, R. (1999) Chromoendoscopy and intravital staining techniques. *Bailliere's Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 13: 11-19
104. Kiesslich R, Goetz M, Angus EM, et al. Identification of epithelial gaps in human small and large intestine by confocal endomicroscopy. *Gastroenterology* 2007;133:1769e78.
105. Kleessen B, Kroesen AJ, Buhr HJ, et al. Mucosal and invading bacteria in patients with inflammatory bowel disease compared with controls. *Scand J Gastroenterol* 2002;37:1034e41.

106. Swidsinski A, Weber J, Loening-Baucke V, et al. Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Microbiol* 2005;43:3380e9.
107. Kiesslich R, Götz M, Lammersdorf K, et al. The Bacteriology-guided Endomikroskopie increases the Diagnostik Siele of intraepithelial neoplasia in ulcerative Colitis. *Gastroenterologie* 2007; 13:874-02
108. Schultsz C, Van Den Berg FM, Ten Kate FW, et al. The intestinal mucus layer from patients with inflammatory bowel disease harbors high numbers of bacteria compared with controls. *Gastroenterology* 1999;117:1089e97.
109. Swidsinski A, Loening-Baucke V, Lochs H, et al. Spatial organization of bacterial flora in normal and inflamed intestine: a fluorescence in situ hybridization study in mice. *World J Gastroenterol* 2005;11:1131e40.
110. Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, et al. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002;122:44e54.
111. Darfeuille-Michaud A, Neut C, Barnich N, et al. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1998;115:1405e13.
112. Bibiloni R, Mangold M, Madsen KL, et al. The bacteriology of biopsies differs between newly diagnosed, untreated, Crohn's disease and ulcerative colitis patients. *J Med Microbiol* 2006;55:1141e9.
113. Su L, Shen L, Daniel R, et al. Targeted epithelial tight junction dysfunction causes immune activation and contributes to development of experimental colitis. *Gastroenterology* 2009;136:551e63.
114. Barrett JC, Lee JC, Lees CW, et al; The UK IBD Genetics Consortium and the Wellcome Trust Case Control Consortium 2. Genome-wide association study of ulcerative colitis identifies three new susceptibility loci, including the HNF4A region. *Nat Genet* 2009;41:1330e4.
115. Ott C, Obermeier F, Thieler S et al. The incidence of inflammatory bowel disease in a rural region of Southern Germany: a prospective population-based study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008; 20: 917-923
116. Timmer A. Epidemiologie der CED. In: Hoffmann JC, Kroesen AJ, Klump B, Hrsg. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen - Handbuch für die Praxis. 2. Aufl. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2009:8-24
117. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* 2012; 142: 46-54 e42; quiz e30
118. Loftus CG, Loftus EV, Jr., Harmsen WS et al. Update on the incidence and prevalence of

- Crohn's disease and ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-2000. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 254-261
- 119 Fabian Schnitzler, Untersuchung des CARD15-Gens in Patienten mit Morbus Crohn, Colitis ulcerosa und Colitis indeterminata und Korrelation des Genotyps mit dem Phänotyp , *Dis* 2007
- 120 Schaubeck M, Clavel T, Calasan J, et al. Dysbiotic gut microbiota causes transmissible Crohn's disease-like ileitis independent of failure in antimicrobial defence. *Gut* 2016;65:225-237
- 121 Lioba F. Courth, Maureen J. Ostaff, Daniela Mailänder-Sánchez, Nisar P. Malek, Eduard F. Stange, and Jan Wehkamp, Crohn's disease-derived monocytes fail to induce Paneth cell defensins, *PNAS* November 10, 2015 112 (45) 14000-14005; first published October 28, 2015
- 122 Suhal S. Mahid, Kyle S. Minor, Roberto E. Soto, Carlton A. Hornung, Susan Galandiuk, Smoking and Inflammatory Bowel Disease: A Meta-analysis, Elsevier, Mayo Clinic Proceedings, Volume 81, Issue 11, November 2006, Pages 1462-1471
- 123 Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. C-reactive protein as a marker for inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 661-665
- 124 Solem CA, Loftus EV, Jr., Tremaine WJ et al. Correlation of C-reactive protein with clinical, endoscopic, histologic, and radiographic activity in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 707-712
- 125 Mylonaki M, Langmead L, Pantes A et al. Enteric infection in relapse of inflammatory bowel disease: importance of microbiological examination of stool. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 775-778
- 126 Boirivant M, Leoni M, Tariciotti D et al. The clinical significance of serum C reactive protein levels in Crohn's disease. Results of a prospective longitudinal study. *Clin Gastroenterol* 1988; 10: 401-405
- 127 Schoepfer AM, Beglinger C, Straumann A et al. Fecal calprotectin correlates more closely with the Simple Endoscopic Score for Crohn's disease (SES-CD) than RP, blood leukocytes, and the CDAI. *Am J Gastroenterol* 2010; 105: 162-169
- 128 Aadland E, Fagerhol MK. Faecal calprotectin: a marker of inflammation hroughout the intestinal tract. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14: 823-825
- 129 Roseth AG, Aadland E, Jahnsen J et al. Assessment of disease activity in ulcerative colitis by faecal calprotectin, a novel granulocyte marker protein. *Digestion* 1997; 58: 176-180
- 130 Roseth AG, Schmidt PN, Fagerhol MK. Correlation between faecal excretion of indium-111-labelled granulocytes and calprotectin, a granulocyte marker protein, in atients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1999; 34: 50-54

- 131 Schoepfer AM, Beglinger C, Straumann A et al. Fecal calprotectin correlates more closely with the Simple Endoscopic Score for Crohn's disease (SES-CD) than CRP, blood leukocytes, and the CDAI. *Am J Gastroenterol* 2010; 105: 162-169
- 132 D'Inca R, Dal Pont E, Di Leo V et al. Can calprotectin predict relapse risk in inflammatory bowel disease? *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 2007-2014
- 133 Tibble JA, Sigthorsson G, Bridger S et al. Surrogate markers of intestinal inflammation are predictive of relapse in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2000; 119: 15-22
- 134 Costa F, Mumolo MG, Ceccarelli L et al. Calprotectin is a stronger predictive marker of relapse in ulcerative colitis than in Crohn's disease. *Gut* 2005; 54: 364-368
- 135 Van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M et al. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N Engl J Med* 2013; 368: 407–415
- 136 Cammarota G, Ianiro G, Gasbarrini A. Fecal microbiota transplantation for the treatment of *Clostridium difficile* infection: a systematic review. *J Clin Gastroenterol* 2014; 48: 693–702
- 137 Kassam Z, Lee CH, Yuan Y et al. Fecal microbiota transplantation for *Clostridium difficile* infection: systemic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2013; 108: 500–508
- 138 Muñoz M, Pong-Wong R, Canela-Xandri O, Rawlik K, Haley CS, Tenesa A (2016) Evaluating the contribution of genetics and familial shared environment to common disease using the UK Biobank. *Nat Genet* 48(9):980–983. doi:10.1038/ng.3618
- 139 Franke A, Balschun T, Karlsen TH, Sventoraityte J, Nikolaus S, Mayr G, Domingues FS, Albrecht M, Nothnagel M, Ellinghaus D, Sina C, Onnie CM, Weersma RK, Stokkers PC, Wijmenga C, Gazouli M, Strachan D, McArdle WL, Vermeire S, Rutgeerts P, Rosenstiel P, Krawczak M, Vatn MH, BSEN study group, Mathew CG, Schreiber S (2008) Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility. *Nat Genet* 40(11):1319–1323. doi:10.1038/ng.221
- 140 Halme L, Paavola-Sakki P, Turunen U, Lappalainen M, Farkkila M, Kontula K (2006) Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 12(23):3668–3672
- 141 Cleynenl, Boucher G, Jostins L, Schumm LP, Zeissig S, Ahmad T, Andersen V, Andrews JM, Annesse V, Brand S, Brant SR, Cho JH, Daly MJ, Dubinsky M, Duerr RH, Ferguson LR, Franke A, Geary RB, Goyette P, Hakonarson H, Halfvarson J, Hov JR, Huang H, Kennedy NA, Kupcinkas L, Lawrance IC, Lee JC, Satsangi J, Schreiber S, Théâtre E, van der Meulen-de Jong AE, Weersma RK, Wilson DC, International Inflammatory Bowel Disease Genetics Consortium, Parkes M, Vermeire S, Rioux JD, Mansfield J, Silverberg MS, Radford-Smith G, McGovern DP, Barrett JC, Lees CW (2016) Inherited determinants of



- Crohn's disease and ulcerative colitis phenotypes: a genetic association study. *Lancet* 387(10014):156–167. doi:10.1016/S0140- 6736(15)00465- 1
- 142 Roni Nowarski, Ruaidhrí Jackson, Nicola Gagliani, Marcel R. de Zoete, Noah W. Palm, Will Bailis, Jun Siong Low, Christian C.D. Harman, Morven Graham, Eran Elinav, Richard A. Flavell; Epithelial IL-18 Equilibrium Controls Barrier Function in Colitis; *Cell*, Volume 163, Issue 6, 3 December 2015, Pages 1444–1456
- 143 Huang Y, Chen Z. Inflammatory bowel disease related innate immunity and adaptive immunity. *Am J Transl Res*. 2016 Jun 15;8(6):2490-7. PMID: 27398134; PMCID: PMC4931145
- 144 Martinez-Fierro ML, Garza-Veloz I, Rocha-Pizaña MR, Cardenas-Vargas E, Cid-Baez MA, Trejo-Vazquez F, Flores-Morales V, Villela-Ramirez GA, Delgado-Enciso I, Rodriguez-Sanchez IP, Ortiz-Castro Y. Serum cytokine, chemokine, and growth factor profiles and their modulation in inflammatory bowel disease. *Medicine (Baltimore)*. 2019 Sep;98(38):e17208. doi: 10.1097/MD.00000000000017208. PMID: 31567972; PMCID: PMC6756690.
- 145 Geremia A, Biancheri P, Allan P, et al. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *Autoimmu Rev*2014;13:3–10.
- 146 Reissig, S. et al. (2017): Bcl-3 Inhibits NF-κB Gene Activity in Regulatory T cells and Modulates their Suppressive Capacity. *Nature Communications*, DOI: 10.1038/NCOMMS15069
- 147 Driffa Moussata, Confocal laser endomicroscopy is a new imaging modality for recognition of intramucosal bacteria in inflammatory bowel disease in vivo, *Gut* 2011;60:26e33. doi:10.1136/gut.2010.213264