

Diplomarbeit

**Bestimmung von Anti-Infliximab-Antikörpern bei
Kindern und Jugendlichen mit chronisch-
entzündlicher Darmerkrankung und Infliximab
Therapie**

eingereicht von

Minja Koren

Geb.Dat.: 21.11.1989

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktorin der gesamten Heilkunde
(Dr. med. univ.)**

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde

unter der Anleitung von

**OA Dr. med. univ. Jörg Jahnel
Univ. Prof.ⁱⁿ Dr.ⁱⁿ med. univ. Almuthe Hauer**

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, Dezember 2013

Minja Koren

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich besonders bei meinem Diplomarbeitsbetreuer OA Dr. Jörg Janel bedanken, der mir mit viel Geduld und stets mit gutem Rat zur Seite gestanden ist.

Auch möchte ich Univ. Prof.ⁱⁿ Dr.ⁱⁿ Almuthe Hauer danken, dass sie sich als Zweitbetreuerin für meine Diplomarbeit zur Verfügung gestellt hat. Ihre Hilfsbereitschaft und die genauen Korrekturen haben mir sehr geholfen.

Ein besonderer Dank gilt vor allem meiner Familie, die mich in dieser Zeit tatkräftig unterstützt, meine Launen ausgehalten und mich stets motiviert hat. Mama, Papa und Schwesterherz nochmals Danke!

Ich danke meinen Freunden ganz herzlich, die mich während meines ganzen Studiums auf ihre Art und Weise bestmöglich unterstützt und mir immer zur Seite gestanden haben. Danke! ;)

Ich möchte mich noch bei meiner Diplomarbeitsgruppe bedanken. Es war eine tolle Zeit mit euch, in der ich viel Neues gelernt und erlebt habe und die ich keines Falls missen will.

Zusammenfassung

Einleitung: Eine Therapieoption bei kompliziertem Morbus Crohn (MC) stellen TNF- α -Blocker wie Infliximab (IFX; Remicade[®]) dar. In einigen Fällen wird nach primär gutem Ansprechen ein bisher ungeklärter Wirkverlust von IFX beobachtet, wobei die Bildung von Antikörpern gegen IFX („antibodies to IFX“; ATI) eine Rolle spielen könnte. Ziel dieser Arbeit war es, ATI im Serum von Kindern und Jugendlichen mit IFX-Therapie mit oder ohne sekundärem IFX-Wirkverlust nachzuweisen. Die Daten der Arbeit sollen die Grundlage für künftige, prospektive Studien sein, welche Antikörper gegen TNF- α -Blocker als frühzeitige Marker für Wirkverluste dieser Medikamente etablieren könnten.

Methoden: Eingeschlossen wurden Jugendliche mit MC, die aufgrund des Schweregrades der Grunderkrankung eine Therapie mit IFX erhielten, wobei eine Patientin noch IFX-naiv war und somit auch als Kontrolle diente. Alle PatientInnen wurden am GPGE (Gesellschaft für Pädiatrische Gastroenterologie und Ernährung)-Weiterbildungszentrum für pädiatrische Gastroenterologie, Hepatologie und Ernährung der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde Graz betreut. Im Rahmen von Kontrolluntersuchungen wurden Serumproben unabhängig von der Aktivität der Grunderkrankung und jeweils vor der IFX-Gabe teils einmal, teils auch mehrmals entnommen. Mit Hilfe eines ELISA-Kits wurden die Serum-ATI-Konzentrationen bestimmt. Die Ergebnisse wurden mit klinischen Daten und Laborwerten (u.a. Beschwerdeprofile, aktuelle Medikation etc.) verglichen.

Ergebnisse: Die Studienpopulation bestand aus 9 PatientInnen im Alter von 12 bis 18 Jahren (w:m = 7:2). Im Durchschnitt wurden 1-3 Messungen pro PatientIn durchgeführt, sodass insgesamt 20 Messungen erfolgten. Von den 9 PatientInnen hatten 3 einen Wirkverlust auf IFX, 5 waren in Remission und eine Patientin war IFX-naiv. Insgesamt wurden bei 5 PatientInnen positive ATI gemessen. 3 ATI-positive PatientInnen zeigten einen klinischen Wirkverlust, bei den 2 anderen PatientInnen wurde keine erneute Krankheitsaktivität beobachtet. Alle 4 ATI-negativen PatientInnen waren klinisch in Remission.

Diskussion: PatientInnen unter IFX-Therapie können ATI entwickeln, die mit Hilfe eines ELISA-Kits nachweisbar sind. Alle PatientInnen mit IFX-Wirkverlust hatten ATI im Serum, jedoch zeigten auch PatientInnen ohne Wirkverlust positive ATI. Nachgewiesene ATI wiesen daher nicht automatisch auf einen Wirkverlust des Medikaments hin. Längerfristige Beobachtungen sind notwendig, um festzustellen, ob ATI als prädiktive Faktoren für einen drohenden Wirkverlust angesehen werden können.

Abstract

Objectives: TNF- α -blockers such as infliximab (IFX; Remicade[®]) are a therapeutic option in complicated Crohn's disease (CD). In some cases regardless of a good primary response to IFX a loss of response (LOR) to IFX can be observed. This might be due to formation of antibodies to IFX (ATI). The aim of our pilot study was to measure unbound ATI in the serum of adolescents with CD under IFX therapy with or without LOR.

Methods: We included adolescents with histologically proven CD who were receiving IFX due to disease severity at the Medical University Graz. As control served one patient who was still IFX naïve. As a part of routine laboratory tests serum samples for ATI measurements were taken at least once, and sometimes at several time points, independent of disease activity and always just before IFX administration. Unbound ATI concentrations in serum were determined using an ELISA kit (Immundiagnostik, Bensheim, D); an extinction above 0.1 was defined as demonstrating the existence of ATI. Results were compared with clinical data (such as disease activity scores, current medication) and laboratory values.

Results: The study population consisted of 9 patients aged 12 to 18 years (female:male=7:2). 1 to 5 measurements per patient were performed, resulting in 20 measurements in total. 3 of 9 patients exhibited LOR to IFX, 5 were in remission under IFX, and one patient was IFX-naïve. ATI were detected in 5 patients, including the 3 with LOR; extinction values were between 0.14 and 2.9. No disease activity was observed in the other 2 ATI-positive patients. All repeated measurements confirmed the existence of ATI. All 4 ATI-negative patients, including the ATI-naïve patient, were clinically in remission.

Conclusions: Patients under IFX therapy can develop ATI detectable by a commercially available ELISA kit. In our small pilot study ATI were detected in all patients with LOR to IFX; however, some patients without LOR had ATI in serum. Unbound ATI therefore do not automatically indicate a LOR to IFX. Further studies now under way, using newly available ELISA techniques that can measure both unbound ATI and IFX-bound ATI, may give more specific results.

Inhaltsverzeichnis

Danksagungen	ii
Zusammenfassung	iii
Abstract	v
Inhaltsverzeichnis	vi
Glossar und Abkürzungen	viii
Tabellenverzeichnis	x
1 Einleitung	11
1.1 <i>Morbus Crohn (MC)</i>	11
1.1.1 Inzidenz und Ätiologie	11
1.1.2 Pathogenese	12
1.1.3 Klinische Manifestationen.....	13
1.1.4 Diagnose	14
1.1.5 Therapie.....	15
1.2 <i>Biologika und Infliximab</i>	18
1.2.1 TNF- α und Biologika.....	18
1.2.2 Infliximab (IFX; Remicade®).....	19
1.2.3 Wirkungsweise	19
1.2.4 Indikationen und Kontraindikationen	20
1.2.5 Nebenwirkungen.....	21
1.2.6 Anti-IFX-Antikörper (ATI).....	22
2 Material und Methoden	23
2.1 <i>Literatursuche in PubMed</i>	23
2.2 <i>PatientInnen</i>	23
2.3 <i>ATI-Messungen</i>	23
2.3.1 Prozedere der Blutprobengewinnung.....	23
2.3.2 ELISA Kit.....	24
2.4 <i>Statistik</i>	24
2.5 <i>Ethikvotum</i>	24
3 Ergebnisse - Resultate	25
3.1 <i>PatientInnencharakterisierung</i>	25
3.2 <i>Symptome bei Erstdiagnose</i>	25
3.3 <i>Lokalisation bei Diagnose</i>	27

3.4	<i>Medikamente</i>	28
3.5	<i>Antikörpermessung</i>	29
3.6	<i>Einzelbeschreibungen der PatientInnen</i>	30
3.6.1	Patient 1 (P. Ma.).....	30
3.6.2	Patientin 2 (P. Me.).....	30
3.6.3	Patientin 3 (H. K.).....	31
3.6.4	Patientin 4 (M. V.).....	32
3.6.5	Patientin 5 (K. N.).....	32
3.6.6	Patient 6 (R. M.).....	33
3.6.7	Patientin 7 (K. M.).....	33
3.6.8	Patientin 8 (G. S.).....	34
3.6.9	Patientin 9 (P. D.).....	34
4	Diskussion	36
5	Literaturverzeichnis	39
	Anhang I: Projektplan	46
	Anhang II: ATI-ELISA-Kit	47
	a) <i>Reagenzienvorbereitung und Lagerung</i>	47
	b) <i>Probenvorbereitung</i>	47
	c) <i>Pipettierschema</i>	48

Glossar und Abkürzungen

5-ASA	Aminosalicylate
6-MP	6-Mercaptopurine
AIR	Akute Infusionsreaktionen
AK	Antikörper
ASCA	Anti-Saccharomyces Cervisiae-Antikörper
ATI	Anti-Infliximab-Antikörper (antibodies to infliximab)
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CARD 15	Caspase-Rekrutierungs Domänen-Protein 15
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CIN	Cervikale Intraepitheliale Neoplasie
CT	Computertomographie
EEN	Exclusive Enteral Nutrition
EIM	Extraintestinale Manifestationen
et. al.	und andere
GPGE	Gesellschaft für Pädiatrische Gastroenterologie und Ernährung
HACA	Humane Anti-Chimäre Antikörper
IBD	Inflammatory Bowel Disease
IBD 1	Inflammatory Bowel Disease Protein 1
IFX	Infliximab
IL-6	Interleukin-6
KG	Körpergewicht
LOR	Loss of Response
max.	maximal
MC	Morbus Crohn
Mg	Milligramm
mg/kg	Milligramm pro Kilogramm
mL/h	Milliliter pro Stunde
MR	Magnetresonanz
MTX	Methotrexat

nm	Nanometer
NYHA	New York Heart Association
pANCA	perinukleäre Anti-Neutrophile Cytoplasmatische AK
PCDAI	Pediatric Crohn's Disease Activity Index
POD	Peroxidase
St. p.	Status post
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
TNFR	TNF-Rezeptor
TPMT	Thiopurin-Methyltransferase
V.a.	Verdacht auf
$\mu\text{g/ml}$	Mikrogramm pro Milliliter

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: PCDAI-Score	15
Tabelle 2: Indikationen und Kontraindikationen von IFX bei MC	21
Tabelle 3: PatientInnencharakterisierung	25
Tabelle 4: Symptome bei Erstdiagnose	26
Tabelle 5: Lokalisation bei Diagnose	27
Tabelle 6: Medikation (D=Dauermedikation; A=anamnestisch).....	28
Tabelle 7: ATI-Messwerte, Extinktionswerte (Fett gedruckt: positiv; übrige Werte: negativ)	29
Tabelle 8: Interaktion zwischen ATI und IFX-Blutspiegel	38

1 Einleitung

1.1 Morbus Crohn (MC)

Morbus Crohn (MC) zählt neben Colitis ulcerosa zu den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED). Die Krankheit verläuft schubweise mit einander abwechselnden Entzündungs- und Remissionsphasen. Bei MC kann von Mund bis Rektum jeder Abschnitt des Gastrointestinaltraktes betroffen sein. Hierbei kommt es zu einem segmentalen Befall mit einer transmuralen Entzündung. Bevorzugte Entzündungslokalisationen sind das terminale Ileum und das Kolon (1). Studien der letzten Jahre zeigen einen großen Einfluss des Tumor Nekrose Faktors (TNF)- α in der Pathogenese (2). Infliximab (IFX) ist ein monoklonaler Antikörper, der gezielt TNF- α im Serum bindet und somit die Wirkung von TNF- α hemmt. Heute ist IFX eine der vielversprechendsten Therapieoptionen für MC (3-5).

1.1.1 Inzidenz und Ätiologie

Die Inzidenz von MC beträgt bei Kindern und Jugendlichen ca. 11/100.000 Einwohner (6,7), bei Erwachsenen liegt sie bei 6-15/100.000 Einwohnern (8,9). 20 bis 30% aller MC-Fälle werden vor dem 19. Lebensjahr diagnostiziert (10,11), insgesamt erfolgt die Diagnosestellung am häufigsten um das 30. Lebensjahr (12). In den letzten Jahrzehnten wurde ein signifikanter Anstieg der MC-Inzidenz bei Kindern und Jugendlichen beschrieben (6,13). Es gibt bei der Inzidenzrate regionale Unterschiede. So findet man vor allem in Industriestaaten ein häufigeres Vorkommen von MC als in mehr ländlich geprägten Staaten. Beschrieben wird auch eine Nord-Süd-Achse, wobei sowohl im Norden Europas als auch in den USA eine höhere Tendenz an MC zu erkranken beobachtet wird (14-16). Männer und Frauen sind gleichermaßen betroffen (17).

Die Ätiologie basiert auf einer genetischen, einer familiären und auf einer Umwelt/Lebensstil Komponente. Vor allem in der Pädiatrie spielt die Genetik eine wichtige Rolle (18). Bezüglich der genetischen Komponente fanden genomweite Assoziationsstudien mehrere Genloci, die für die Anfälligkeit an MC zu erkranken bedeutend sind (19). Das wichtigste Gen ist das Nukleotid-bindende oligomerisierende Domänen-Protein 2 (NOD2), auch Caspase-Rekrutierungs-

Domänen-Protein 15 (CARD15) oder inflammatory bowel disease protein 1 (IBD1) genannt (20,21).

Ein familiärer Zusammenhang wurde schon vor Jahren erkannt. So ist zum Beispiel bei einer Familie mit positiver CED Anamnese das Risiko an MC zu erkranken 12-mal so hoch wie bei negativer Anamnese (22). Neben Genetik und familiärer Vorbelastung dürften Umweltfaktoren ebenfalls von Bedeutung sein. Zu den Umweltfaktoren als Risikofaktoren zählen eine „sterile“ Umwelt mit strengen Hygienemaßnahmen und übermäßiger Sauberkeit, der Zugang zu heißem Wasser, die Luftverschmutzung, ungesunde Essgewohnheiten und psychosoziale Belastungsfaktoren (23). Der größte bekannte Einzelrisikofaktor ist aber der Nikotinkonsum. Dieser erhöht signifikant die Gefahr, an MC zu erkranken. So haben Raucher ein fast zweimal so hohes Risiko wie Nichtraucher (24,25).

1.1.2 Pathogenese

Die genaue Pathogenese von MC ist nach wie vor nicht bekannt. In der Literatur wurden viele verschiedene pathogenetische Mechanismen untersucht, jedoch ist man heutzutage der Ansicht, dass mehrere Faktoren zusammenkommen müssen, damit das Krankheitsbild des MC manifest wird.

Ein wichtiger Faktor dürfte die Störung der natürlichen Darmflora sein. Jeder menschliche Darm besitzt seine eigene Darmmikrobiota, die sich erst im Laufe der ersten Lebensjahre entwickelt. Die zwei wichtigsten Bakterienstämme sind die Bacteroidetes und Firmicutes (26). Studien zeigen, dass es bei MC zu einer Reduktion der Artenvielfalt genau dieser beiden Stämme kommt (27). Ein Ungleichgewicht der natürlichen Darmflora kann zum Beispiel durch eine geänderte Immunantwort auf Bakterien ausgelöst werden. Bei bestimmten MC Genotypen (28) mit Mutationen in NOD2 und TLR4 (29) kann dies ein möglicher Hinweis für eine genetisch bedingt gestörte Immunantwort sein. Dies spielt vor allem bei Kindern eine große Rolle, da sich ihr Immunsystem und die Darmmikrobiota erst in Entwicklung befinden. Die Studie von Buhner *et al.* zeigt, dass es bei einer NOD2 Mutation zu einer Störung der Darmbarriere kommt (30). Diese Mutation bewirkt auch in Paneth-Zellen eine verminderte Sekretion von

antimikrobiellen Peptiden wie den α -Defensinen (31). Beide Änderungen dieses Gens tragen zur Entstehung von MC bei.

Ein weiterer Ansatzpunkt für die Entstehung von MC ist TNF- α (siehe auch 1.2). Dieser Faktor wird von aktiven Monozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten produziert, die sich im entzündlichen Gewebe der Mukosa und im Darmlumen befinden (32,33). Durch TNF- α kommt es zur Auslösung einer Entzündungskaskade mit weiteren entzündungsfördernden Zytokinen und Faktoren (2,34,35) sowie zu einer Permeabilitäts-erhöhung in Darmepithelien (36). Bei Kindern kann man mittels einer Konzentrationsmessung im Stuhl eine signifikante Erhöhung dieses Faktors messen (34,37).

1.1.3 Klinische Manifestationen

MC ist charakterisiert durch ein schubhaftes Auftreten (38). Zu den drei Hauptsymptomen zählen Bauchschmerzen, Gewichtsverlust und Durchfall, aber nur ein Viertel der Kinder präsentiert sich auch mit diesen (11). Die meisten klagen über diffuse Bauchschmerzen (39), haben Fieber, Unwohlsein, psychische Symptome und fallen durch ihre Wachstumsverzögerung auf. Unter Umständen dominieren die extraintestinalen Manifestationen (EIM) vor allen anderen Symptomen (11). Zu den häufigsten EIM zählen Arthritis, aphtöse Stomatitis, Uveitis, Erythema nodosum, Spondylitis ankylosans, Psoriasis, Pyoderma gangraenosum und primär sklerosierende Cholangitis (40).

Für die klinische Einteilung des MC bei Erwachsenen etablierte sich die sogenannte „Montreal-Klassifikation“, welche das Krankheitsverhalten in einen entzündlichen („nonstricturing-nonpenetrating“), einen verengenden („stricturing“) und in einen penetrierenden („penetrating“) Verlauf unterteilt (41). Bei Kindern und Jugendlichen wird die „Paris-Klassifikation“ verwendet, eine Modifizierung der „Montreal-Klassifikation“. Die einzelnen Punkte wurden speziell auf pädiatrische Besonderheiten des MC abgestimmt. Das Alter zum Zeitpunkt der Diagnose wurde anders unterteilt, die Lokalisation der Entzündung blieb annähernd gleich, das Krankheitsverhalten erhielt zusätzliche Kombinationsmöglichkeiten. Des Weiteren wurde das Körperwachstum als vierter Punkt eingeführt (42).

1.1.4 Diagnose

Um in der Pädiatrie eine CED zu diagnostizieren, verwendet man die Porto-Kriterien (11). Zeichen für das Vorliegen eines MC bei Kindern und Jugendlichen sind häufig Auffälligkeiten in der **körperlichen Untersuchung**. MC kann sich mit Wachstumsverzögerung und Gewichtsverlust präsentieren, was sich in der Perzentilenkurve mit einem „Perzentilenknick“ äußert. Außerdem fallen ein blasses Hautkolorit bei Anämie und typische Hautveränderungen wie das Erythema nodosum auf. Hinweise auf das Vorliegen eines MC können aphtöse Ulzera und eine Gingiva-Hyperplasie sein. Besonders auffällig sind abdominelle Resistenzen, Fisteln oder Abszesse in der Analregion (11). Bei der **Laboruntersuchung** kann eine Erhöhung des C-reaktiven Proteins (CRP), der Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) und der Thrombozytenzahl, sowie eine Reduzierung des Hämoglobins und Serumalbumins auf das Vorliegen eines MC hinweisen (43,44). Spezielle Antikörper wie pANCA (perinukleäre Anti-Neutrophile Cytoplasmatische AK) und ASCA (Anti-Saccharomyces Cervisiae-Antikörper) können getestet werden, sind aber von geringerer Bedeutung (45).

Die wichtigsten Untersuchungen für die Diagnose eines MC sind die **Gastroduodenoskopie** und **Ileokoloskopie** mit gleichzeitiger Biopsie (11). Zu den **bildgebenden Verfahren** zählt die MR-Enterographie, welche ganz ohne Strahlen auskommt und vor allem zur Diagnosestellung bzw. Verlaufskontrolle sehr gut geeignet ist (11,15). Eine weitere Option ist theoretisch die CT-Enterographie, mit hoher Sensitivität bzgl. Dünndarmveränderungen, die aber aufgrund der hohen Strahlenbelastung bei Kindern und Jugendlichen nur sehr selten eingesetzt wird. Die einfachste und am leichtesten verfügbare Methode zur Verlaufskontrolle ist der Abdomen-Ultraschall, mit dem Entzündungsaktivität, Fistel-, Stenosen- oder Abszessbildung ebenfalls erkannt werden können (1,11).

Um die Krankheitsaktivität zu messen, wurden unterschiedliche Score-Systeme entworfen. Der wichtigste pädiatrische Score ist der Pediatric Crohn's Disease Activity Index (**PCDAI**) (46). Dieser setzt sich aus subjektiven Beschwerden und objektiv messbaren (Labor)-Werten zusammen (47). Um ihn zu berechnen, werden folgende Informationen benötigt:

- Anamnese bzgl. abdomineller Beschwerden
- Labor: Hämatokrit, Erythrozyten-Sedimentations-Rate, Albumin
- Status: Gewicht, Größe, Abdomen, perirektale Erkrankung, EIM

Punkte	Krankheitsgrad
0 - 10	Keine Aktivität
11 - 30	Leichte bis mittlere Aktivität
>30	Mittlere bis schwere Aktivität

Tabelle 1: PCDAI-Score

1.1.5 Therapie

Bei Kindern und Jugendlichen gibt es verschiedene Therapie-Optionen, die sich zum Teil von den Erwachsenen unterscheiden. Es gibt theoretisch zwei verschiedene Möglichkeiten: Beim „**Step-up-Prinzip**“ wird mit einer Ernährungstherapie (s.u.) oder mit einer medikamentösen Therapie mittels Glukokortikoiden bzw. 5-Aminosalicylsäure-Präparaten (5-ASA; s.u.) begonnen. Sind diese Medikamente nicht wirksam genug (z.B. steroidabhängiger Verlauf) oder verlieren sie ihre Wirkung, werden zuerst Glukokortikoide, eventuell in Kombination mit Immunsuppressiva und sodann Biologika (s.u.) eingesetzt. Beim „**Top-down-Prinzip**“ wird sofort mit Biologika begonnen, da man sich aufgrund der Ausprägung (z.B. Fistelbildung) einen steroidabhängigen Verlauf erwartet. Diese können einen Therapieerfolg sehr rasch herbeiführen. Die langfristige Therapie mit Biologika ist jedoch aufgrund unklarer Langzeitfolgen und der Kosten (s.u.) umstritten. In der Regel wird bisher das „Step-up-Prinzip“ bevorzugt (48).

In Europa hat sich in der Pädiatrie eine spezielle Ernährungstherapie (die „**ausschließlich enterale Ernährung**“; exclusive enteral nutrition; EEN) als erste Therapieoption bei neu-diagnostiziertem MC etabliert (49,50) Dabei erfolgt die Ernährung über sechs bis acht Wochen lediglich mittels Spezialnahrung (per os

oder per Sonde), wodurch eine Remission induziert werden kann (51-53). Nach der Phase der enteralen Ernährung wird wieder mit einem langsamen Ernährungsaufbau begonnen (43).

Am häufigsten werden bei akuten Schüben **Glukokortikoide** eingesetzt, die aufgrund der zahlreichen Nebenwirkungen jedoch nicht langfristig verabreicht werden sollten (54). Prednisolon wird in der Dosierung 1-2 mg/kg KG (max. 40 mg in der Praxis bis 60 mg) für zwei bis vier Wochen verabreicht und bei Remission langsam wieder ausgeschlichen (43). Eine der vielen Nebenwirkungen von Prednisolon ist die erniedrigte Aufnahme von Kalzium über den Darm und eine erhöhte Ausscheidung über den Harn. Daraus resultiert ein Kalziummangel mit Wachstumsverzögerung und Demineralisierung der Knochen, welcher mit Kalzium- und Vitamin D-Präparaten behandelt werden sollte (50,55). Eine Alternative zu Prednisolon ist das topische Glukokortikoid Budesonid, das aufgrund des hohen First-Pass-Metabolismus eine niedrige systemische Aktivität und dadurch eine geringere Toxizität besitzt. Obwohl die Wirkung konzentriert im Darm auftritt, zeigt die Erfahrung dennoch eine schwächere Wirkung, weswegen es nur bei leichten bis mittleren Verläufen eingesetzt wird (56).

Um einen steroidabhängigen Krankheitsverlauf zu vermeiden, werden häufig frühzeitig **Immunsuppressiva** eingesetzt (57), die sich zur Langzeittherapie eignen. Bei MC werden in Europa bevorzugt Azathioprine (AZA; Imurek[®]) und in den USA 6-Mercaptopurine (6-MP) verwendet (58). Diese Medikamente bewirken durch Blockierung der DNA/RNA-Synthese eine Störung der Lymphozytenfunktion und somit eine Immunsuppression. Die Indikationen sind häufig auftretende Schübe sowie ein steroidabhängiger/resistenter Verlauf. Die Medikamente benötigen einige Wochen bis sie eine ausreichende Wirkdosis im Serum aufbauen, weswegen diese stets überlappend mit anderen Medikamenten eingesetzt werden. Vor Therapiebeginn sollte man einen Thiopurin-Methyltransferase (TPMT)-Test durchführen, um eine erniedrigte Aktivität dieses Enzyms ausschließen zu können, welche mit einem erhöhten Risiko einer Knochenmarkssuppression einhergeht (59). Eine regelmäßige Verlaufskontrolle sollte aufgrund der zahlreichen leichten (Unwohlsein, Durchfall, Übelkeit, Erbrechen, Gelenkschmerzen) und schweren Nebenwirkungen (Pankreatitis,

Blutbildveränderungen, hohe Infektanfälligkeit, Hepatitis, Malignitäten) erfolgen (58,59). Bei Nichtansprechen auf diese Medikamente kann Methotrexat (MTX) als Alternative gewählt werden (60).

Eine weitere Option zur Remissionserhaltung sind **5-Aminosalicylate** (5-ASA). Eine niederländische Studie berichtet über kürzere Remissionserhaltungen, häufigeres Wiederaufflammen des MC und eine länger benötigte Steroidgabe, dennoch wird das Medikament bei leichteren Krankheitsfällen eingesetzt (61). Es wird häufig als überbrückende Therapie bis zum Wirkeintritt der Immunsuppressiva verwendet.

Die **Breitbandantibiotika** Metronidazol und Ciprofloxacin werden bei perirektaler Fistelbildung verwendet (62).

Seit einigen Jahren nehmen **Biologika** (s.u.; 1.2) mehr und mehr einen festen Platz in der Therapie von MC ein. Verwendet werden IFX, Adalimumab und Certolizumab pegol. Es handelt sich hierbei um monoklonale Antikörper gegen TNF- α . IFX (Remicade[®]) war das erste zugelassene und somit auch das bis heute am häufigsten verwendete Biologikum in der pädiatrischen Gastroenterologie. Details zu IFX siehe unter 1.2. Adalimumab (Humira[®]) ist ein rekombinanter humaner monoklonaler Antikörper mit IFX-ähnlichen Eigenschaften. Er wird häufig als Ersatzmedikament bei IFX-Versagen verwendet (63). Der Vorteil von Adalimumab ist die Applikationsform – es wird subkutan verabreicht. Certolizumab-Pegol (Cimizia[®]) ist ein an Polyethylenglykol konjugiertes Fab-Fragment eines rekombinierten humanisierten monoklonalen Antikörpers (64). Es besitzt eine ähnliche Wirkung wie IFX, ist jedoch nur in den USA und in der Schweiz, nicht aber in der EU zugelassen (50).

Die **chirurgische Sanierung** ist je nach Befund erste therapeutische Option bzw. letzter Ausweg. Bei gewissen Indikationsstellungen wie Obstruktionen, komplizierten Fisteln, Abszessen, Perforationen und Malignitäten kommt es zum chirurgischen Eingriff. Bei Kindern und Jugendlichen ist die Hauptindikation die medikamentös nicht beherrschbare Wachstumsverzögerung (65). Am häufigsten werden eine Dünndarm-Resektion (Ileozökalresektion), eine Hemikolektomie

rechts oder eine subtotalen Kolektomie durchgeführt. Ein postoperativer Rückfall ist nicht selten (43).

1.2 Biologika und Infiximab

Im Jahre 1993 berichtete Derkx *et al.* über die erste Patientin, ein 11-jähriges Mädchen, deren steroidabhängiger MC erfolgreich mit IFX therapiert wurde (3). Dies löste eine Welle weiterer Therapieversuche mit IFX bei MC aus (4,5,34).

1.2.1 TNF- α und Biologika

TNF- α ist maßgeblich beteiligt an der Pathogenese von MC (s.o.). Dieser Faktor wird von aktivierten Makrophagen, Monozyten und T-Lymphozyten produziert. Erhöhte Populationen dieser Zellen reichen bis in die Lamina propria der Darmwand hinein. Überschüssiges TNF- α wird bei MC nur in der Mukosa und im Darmlumen gemessen (32,33). Wie bereits erwähnt, weist der Stuhl von Kindern und Jugendlichen auch erhöhte Werte auf (37,66). Es existieren ein Membran-gebundener und ein löslicher TNF- α , sowie zwei TNF- α -Rezeptoren (TNFR1, TNFR2) (67,68). Beide können eine Entzündungskaskade auslösen. Bei MC ist TNF- α ein wichtiger Faktor hinsichtlich der Bildung von Ödemen, der Veranlassung der Migration von Entzündungszellen zum entzündeten Gewebe, der Aktivierung von Gerinnungsfaktoren und der Bildung von Granulomen (34,69).

Aus diesem Grunde wurden verschiedene TNF- α Antikörper entwickelt. Dazu zählen IFX, Adalimumab, Certolizumab-Pegol, Etanercept und Golimumab, wobei nur die ersten drei bei MC eine Wirkung aufweisen bzw. zugelassen sind (s.o.) (67). Dies weist darauf hin, dass die Neutralisation von TNF- α nicht die alleinige therapeutische Wirkung dieser Medikamente ist (70). Da alle Biologika aufgrund ihrer Immunogenität die körpereigene Abwehr schwächen, sollten unbedingt vor Therapiebeginn ein Tuberkulostest und der Ausschluss relevanter Infektionskrankheiten durchgeführt werden (67,71).

1.2.2 Infliximab (IFX; Remicade®)

IFX ist ein monoklonaler chimärer IgG1 Antikörper, der rekombinant hergestellt wird. In diesem Falle bedeutet chimär, dass im selben Antikörper zwei genetisch unterschiedliche Regionen existieren. Prozentuell gesehen besteht IFX zu 75% aus humanem und zu 25% aus murinen Anteilen (72). Der Maus-Anteil ist hierbei bestimmend für die Immunogenität (73).

Es gibt zwei Möglichkeiten der Therapie mit IFX: einerseits eine episodische Gabe, andererseits eine Erhaltungsgabe. Die Erhaltungstherapie weist bessere Ergebnisse als die episodische Gabe auf (74). Bei beiden Applikationsmöglichkeiten werden zu Beginn der Therapie 5 mg/kg KG über zwei Stunden intravenös verabreicht. Bei der Erhaltungstherapie werden in den Wochen 2 und 6 nach der ersten Gabe weitere Dosen mit 5 mg/kg KG verabreicht. Danach erfolgt die Gabe alle acht Wochen. Sollte sich ein Verlust der Wirkung zeigen, wird versucht diesem durch Dosissteigerung oder Verkürzung des Intervalls der Gabe entgegenzuwirken (70). Bei fehlendem Erfolg muss IFX durch Adalimumab ersetzt werden. Bei der episodischen Therapie wird IFX nicht in regelmäßigen Abständen, sondern erst bei Wiederauftreten der Symptome gegeben (70).

IFX ist steroidsparend, reduziert Krankenhausaufenthalte und chirurgische Eingriffe (75). Leider kommt es bei mehr als 30% der PatientInnen zu einem Wirkverlust von IFX bzw. muss die Dosis gesteigert werden, da sie ansonsten nicht mehr auf das Medikament ansprechen (s.o.) (74,76).

1.2.3 Wirkungsweise

IFX besitzt eine hohe Affinität ($K_a=10^{10} \text{ M}^{-1}$) zu TNF- α . Mit der therapeutischen Dosis von 5 mg/kg KG iv. ist nach zwei Stunden die höchste Serumkonzentration mit 118 $\mu\text{g/ml}$ erreicht. Die Clearance ist langsam und beträgt 9,8 mL/h und die Halbwertszeit ist mit 9,5 Tagen lang. Aus diesem Grund ist IFX nach acht Wochen immer noch nachweisbar. Erst nach 12 Wochen beträgt die mittlere Konzentration $< 0,1 \mu\text{g/mL}$ und ist somit nicht mehr messbar.

Die TNF- α Serum-Konzentration steigt erstaunlicherweise nach der Gabe von IFX. Sie bleibt ab 72 Stunden bis 2 Wochen hoch, um danach zu sinken. Dabei handelt es sich um TNF- α -IFX Komplexe, die nicht bioreaktiv sind. Im Gegenteil dazu sinken die Akute-Phase-Proteine CRP und IL-6 bereits nach zwei Wochen auf ihre Normalwerte und bleiben bis zu acht Wochen in diesem Bereich (77).

Der genaue Wirkmechanismus von IFX wird zurzeit noch nicht zur Gänze verstanden. Die primäre Idee war, dass IFX Membran-gebundenes sowie lösliches TNF- α bindet und somit neutralisiert. Doch als Etanercept (ein gentechnisch hergestelltes Fusionsprotein, das TNF- α bindet und inaktiviert) bei MC keine Wirkung zeigte, musste nach einer neuen Erklärung gesucht werden (78). Eine Möglichkeit besteht darin, dass sich IFX besser an Membran-gebundenes TNF- α bindet als Etanercept (79). Dies führt zur Apoptose von Monozyten und T-Lymphozyten (80-83) und somit zu einer signifikanten Verminderung bzw. zum Verschwinden von Entzündungszellen in der betroffenen Mukosa (84). Ein weiterer Ansatzpunkt ist die Blockade entzündungsfördernder Moleküle und Signale, die durch TNF- α reguliert werden. So erfolgt im Blutbild in den Wochen 2 und 14 nach der intravenösen Gabe eine Erhöhung der Monozyten- und Lymphozytenanzahl sowie eine Senkung der neutrophilen Granulozyten (77).

1.2.4 Indikationen und Kontraindikationen

In der Pädiatrie ist IFX bei folgenden therapieresistenten Erkrankungen indiziert: Rheumatoide Arthritis (Juvenile idiopathische Arthritis – JIA), Psoriasis Arthritis, Plaque Psoriasis, Spondylitis ankylosans (Morbus Bechterew) und MC (67,70).

Im Hinblick auf Kontraindikationen müssen vor Therapiebeginn einige Tests durchgeführt werden. Ein Tuberkulin-Hauttest bzw. ein Quantiferon-Test sowie ein Thorax-Röntgen sollten zum Ausschluss einer aktiven Tuberkulose erfolgen (71). Gegebenenfalls sollten Infektionsherde saniert werden. Lebendimpfungen sind vor Beginn der Therapie aufzufrischen und eine Schwangerschaft ist auszuschließen (67,69). In Tabelle 2 sind die Indikationen und Kontraindikationen von IFX speziell für MC angeführt (67,70).

Indikationen	Kontraindikationen
Steroidabhängiger Verlauf	Schwere/chronische Entzündungen
Therapieresistenter schwerer Verlauf	Aktiver Abszess
Therapieresistente Fisteln	Aktive/latente Tuberkulose
Pyoderma gangraenosum	Sepsis
	Demyelinisierende Erkrankungen
	Chronische Herzinsuffizienz (NYHA-Klasse III-IV)
	Maligne Erkrankung
	Schwangerschaft und Stillzeit

Tabelle 2: Indikationen und Kontraindikationen von IFX bei MC

1.2.5 Nebenwirkungen

Die häufigsten Nebenwirkungen von IFX sind akute Infusionsreaktionen (AIR). Eine AIR kann gekennzeichnet sein durch Übelkeit, Juckreiz, Atemlosigkeit, Brustschmerzen, Kopfschmerzen, Gesichtsrötung, Tachykardie und Hypoxämie (35,74). Laut einem Review von Charlotte I. de Bie *et al.* tritt diese Reaktion bei ca. 15% der mit IFX behandelten PatientInnen auf (35). In späterer Folge kann es bei bis zu 8% der Patienten zu einer Hypersensibilitätsreaktion kommen. Diese zeigt sich mindestens einen Tag nach der Infusion mit Gelenkschwellung und Gelenkschmerzen, Urtikaria, Fieber und Müdigkeit (35). Schwere Nebenwirkungen wie Tuberkulose, demyelinisierende Erkrankungen, opportunistische und schwere bakterielle Infekte sowie Lupus erythematodes-ähnliche Reaktionen wurden von Bradley *et al.* beschrieben (2).

Es gibt Berichte, dass Malignome bei Kindern und Jugendlichen unter IFX-Therapie, vor allem Morbus Hodgkin und Non-Hodgkin-Lymphome, auftreten können. Fallberichte gibt es zu Leukämie, Basalzellkarzinomen, malignen Melanomen, Nephroblastomen, Leiomyosarkomen, Lebertumoren, Kolonkarzinomen und Schilddrüsenkarzinomen nach einer IFX-Therapie (85).

1.2.6 Anti-IFX-Antikörper (ATI)

Eine besondere Stellung nehmen die **ATI** ein. In der Literatur werden diese Antikörper auch „Humane anti-chimäre Antikörper“ (HACA) genannt. Diese Antikörper werden bei PatientInnen mit IFX-Therapie beschrieben. Ihre Bedeutung ist noch nicht völlig erkannt. Sie werden in der Literatur mit Infusionsreaktionen und dem sogenannten „loss of response“ (LOR) in Beziehung gebracht. LOR wird bei ca. 30% aller PatientInnen unter IFX nach einer variablen Zeitspanne beobachtet (74,76). Primär wurde angenommen, dass der chimäre Anteil von IFX eine ATI-Bildung indiziert, jedoch traten Antikörper-Bildungen und ähnliche Nebenwirkungen auch bei PatientInnen auf, die mit dem voll-humanisierten Adalimumab therapiert wurden (86,87). Beobachtungen zufolge ist der größte Risikofaktor für die Entwicklung von ATI die episodische Gabe von IFX (74). Andere Risikofaktoren scheinen ein langer Abstand zwischen der ersten und zweiten Infusion, eine bereits vorausgegangene Infusionsreaktion und das weibliche Geschlecht zu sein (86,87). Laut einigen Studien scheint die Gabe von Immunsuppressiva die Bildung von ATI zu verringern (74,86,87).

2 Material und Methoden

2.1 Literatursuche in PubMed

Von Juli 2012 bis Jänner 2013 wurde in regelmäßigen Abständen unter www.PubMed.com mit folgenden Begriffen nach Literatur gesucht: „pediatric crohn’s disease“, „crohn’s disease epidemiology“, „IBD children“, „IBD pediatric“, „IBD pathogenesis“, „therapy crohn’s disease“, „PCDAI“, „ATI“ und weitere mit diesem Thema korrelierende Suchbegriffe.

2.2 PatientInnen

Alle Jugendliche mit MC und IFX-Therapie, die am GPGE-Weiterbildungszentrum für Pädiatrische Gastroenterologie, Hepatologie und Ernährung der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde Graz behandelt worden sind, wurden in diese Arbeit miteinbezogen. Das Alter der PatientInnen war mit 19 Jahren begrenzt. Insgesamt wurden neun Jugendliche für diese Arbeit rekrutiert.

2.3 ATI-Messungen

2.3.1 Prozedere der Blutprobengewinnung.

Bisher konnten am Universitätsklinikum Graz keine ATI bestimmt werden. Parallel zu dieser Arbeit wurde dieses Testverfahren am Klinischen Institut für Medizinische und Chemische Labordiagnostik der Medizinischen Universität Graz etabliert. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte eine Testevaluierung. Bei jeder routinemäßigen Aufnahme der PatientInnen zur IFX-Infusion erfolgten das Legen einer i.v.-Leitung und eine Routine-Blutabnahme. Im Rahmen dieser Blutabnahme wurde Serum zuerst zentrifugiert und daraufhin bei – 24°C gelagert. Die Blutabnahmen erfolgten von April 2012 bis Jänner 2013, im Anschluss wurden alle bisher aufbewahrten Proben aufgetaut und alle ATI zum gleichen Zeitpunkt bestimmt.

2.3.2 ELISA Kit

Zur Bestimmung von ATI wurde ein Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) der Firma Immundiagnostik (Bensheim, Deutschland) verwendet. Dieser Kit bestimmt qualitativ humane ATI, die frei im Serum verfügbar sind. ATI, die an IFX gebunden sind, können mit dem Test nicht erfasst werden. Der Assay besteht aus TNF- α -Antikörpern („Therapieantikörper“; entsprechen IFX), welche auf einer Platte fixiert sind. Diese binden die freien ATI aus der Probe. Nach einer Waschung dieser Platte werden die gebundenen ATI mittels eines Peroxidase-Konjugates („POD-Therapieantikörper“) ermittelt. Als Peroxidase-Substrat dient Tetramethylbenzidin (TMB). Die stattfindende Enzymreaktion wird mit Säure gestoppt. Dies führt zu einem Farbwechsel von blau auf gelb. Mit einem Photometer wird diese chromogene Verbindung bei 450 nm gemessen. Die Farbintensität ist direkt proportional dem Gehalt der ATI im Serum. Der Cut-off-Wert ist die doppelte optische Dichte der Negativ-Kontrolle und dient zur Auswertung der Proben. Reagenzien und Probenvorbereitung sowie das Pipettierschema sind im Anhang angeführt.

2.4 Statistik

Da es sich bei dieser Arbeit um ein Pilotprojekt mit geringen PatientInnen-Zahlen handelt, wurde keine spezielle statistische Analyse durchgeführt. Um den Mittelwert und die Standardabweichung für die PatientInnencharakterisierung zu berechnen, wurde Excel (Microsoft 2011) verwendet.

2.5 Ethikvotum

Es liegt ein positives Votum der Ethikkommission vor (EK-Nummer: 26-077 ex 13/14).

3 Ergebnisse – Resultate

3.1 PatientInnencharakterisierung

Es konnten insgesamt 9 PatientInnen in diese Diplomarbeit eingeschlossen werden (Tab. 3). Unter ihnen gab es mehr weibliche als männliche PatientInnen (w:m = 7:2). Der Altersdurchschnitt lag bei 16 Jahren \pm 2 Jahre. Das Alter bei Diagnose war im Durchschnitt 12 Jahre \pm 3 Jahre. Der Beginn der IFX-Therapie fand im Mittel zwei Jahre \pm 1,5 Jahre nach Diagnose statt.

	<i>Alter (Lebensjahre)</i>	<i>Geschlecht</i>	<i>Alter bei Erstdiagnose (Lebensjahre)</i>	<i>IFX-Beginn nach Erstdiagnose (Jahre/Monate)</i>
Pat. 1	18	m	12	3 Jahre, 3 Monate
Pat. 2	18	w	14	1 Jahr, 11 Monate
Pat. 3	12	w	8	0 Jahre, 9 Monate
Pat. 4	17	w	14	3 Jahre, 0 Monate
Pat. 5	18	w	15	1 Jahr, 10 Monate
Pat. 6	14	m	8	4 Jahre, 3 Monate
Pat. 7	15	w	11	1 Jahr, 0 Monate
Pat. 8	16	w	10	1 Jahr, 6 Monate
Pat. 9	17	w	17	0 Jahre, 0 Monate
Durchschnitt	16	7 w, 2 m	12	2 Jahre

Tabelle 3: PatientInnencharakterisierung

3.2 Symptome bei Erstdiagnose

Die klinische Manifestation des MC war bei den untersuchten PatientInnen unterschiedlich (Tab. 4). Die meisten der eingeschlossenen PatientInnen hatten als erste Symptome abdominelle Beschwerden und rezidivierende Durchfälle mit und ohne Blutbeimengung im Stuhl bzw. Blutauflagerung auf dem Stuhl. Einige PatientInnen wiesen eine Störung des Gedeihens und des Längenwachstums auf

(„Perzentilenknick“). Auch fiel öfters ein Eisenmangel bzw. eine dadurch hervorgerufene Anämie auf. Bei einer Patientin kam es zu Unterschenkelödemen aufgrund einer Hypoalbuminämie.

PatientIn	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Summe der PatientInnen
Abdominelle Beschwerden	x		x		x			x	x	5
Gewichtsverlust/ keine Gewichtszunahme	x	x		x				x		4
Eisenmangel/Anämie	x	x					x	x		3
Rezidivierende Durchfälle	x		x						x	3
Blutbeimengung im/auf Stuhl			x			x				2
Übelkeit, Erbrechen						x		x		2
Blähungen			x							1
Wachstumsstillstand				x						1
Fieber					x					1
Rezidivierende Infekte						x				1
Unterschenkel-Ödeme							x			1

Tabelle 4: Symptome bei Erstdiagnose

3.3 Lokalisation bei Diagnose

Bei allen PatientInnen wurden zum Zeitpunkt der Diagnose eine Gastroduodenoskopie, eine Ileokoloskopie und eine MR-Darstellung des Dünndarms durchgeführt (Tab. 5). Bei unseren PatientInnen waren das Kolon und das Ileum am häufigsten betroffen. Etwa die Hälfte hatte Entzündungsinfiltrate im Magen und im Duodenum. Bei vier PatientInnen gab es jeweils ein entzündliches Geschehen im Ösophagus, eines im Jejunum, eines im Zoekum sowie eines im Sigma. Bei Patientin 9 war die Ulkusbildung im Ösophagus die Indikation zur raschen Einleitung einer IFX-Therapie.

PatientIn	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Summe der PatientInnen
Ösophagus									x	1
Magen		x			x		x	x		4
Duodenum			x			x	x			3
Jejunum							x			1
Ileum	x	x		x	x	x	x		x	7
Zoekum		x								1
Kolon	x	x	x		x	x	x	x	x	8
Sigma				x						1

Tabelle 5: Lokalisation bei Diagnose

3.4 Medikamente

8 von 9 MC PatientInnen in unserem Kollektiv wurden nach einem „Step-up-Prinzip“ (s.o.) behandelt. 5 PatientInnen erhielten nach der Diagnose primär eine Ernährungstherapie, die anderen 4 eine 5-ASA- und/oder Glukokortikoid-Medikation (Tabelle 6). Die Ernährungstherapie unserer PatientInnen konnte aufgrund von Adhärenzproblemen bzw. zunehmender Beschwerden nicht planmäßig beendet werden. Bis auf eine Ausnahme wurde bei allen eine Glukokortikoid-Therapie eingeleitet. Es wurde bei 7 von 9 PatientInnen rasch mit der Gabe eines Immunsuppressivums (Azathioprin oder Methotrexat) begonnen und die Glukokortikoid-Therapie langsam reduziert. Im Verlauf musste bei 8 von 9 PatientInnen aufgrund von Steroidabhängigkeit und unzureichender Immunsuppressionswirkung die Therapie mit einem Biologikum begonnen werden, wobei stets IFX die erste Wahl war. Eine Patientin („Patientin 9“) wurde aufgrund des Schweregrades bei Erstmanifestation nach dem „Top-down-Prinzip“ behandelt. Die Patientin erhielt initial eine IFX-Therapie. In weiterer Folge wurde die Dosis schrittweise verringert.

PatientIn	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Summe der PatientInnen
Ernährungs- therapie		A		A	A		A	A		5
Cortison	A	A	A	A	A	A	A	A		7
Azathioprin	A	D	D	D	A		D	A		7
Methotrexat					A	D		A		3
5-ASA		A	A	A	A					4
IFX	D	D	D	D	D	D	D	D	D	9
Antibiotika	A									1

Tabelle 6: Medikation (D=Dauermedikation; A=anamnestisch)

3.5 Antikörpermessung

Insgesamt wurden 20 ATI-Messungen bei 9 PatientInnen durchgeführt (Tab. 7). 4 PatientInnen hatten nur eine Messung, eine Patientin hatte 2, 3 PatientInnen hatten 3 und eine Patientin hatte 5 ATI-Messungen. Die Anzahl der vorangegangenen IFX-Infusionen war unterschiedlich, bei einer Patientin erfolgte die Messung im Rahmen der Erstgabe (Pat. 9) und eine Patientin hatte bereits 28 IFX-Infusionen zuvor erhalten. Im Durchschnitt waren 11,9 IFX-Infusionen vor der ersten Messung verabreicht worden.

	<i>IFX- Infusionen bis zur 1. Abnahme</i>	<i>1. Abnahme</i>	<i>2. Abnahme</i>	<i>3. Abnahme</i>	<i>4. Abnahme</i>	<i>5. Abnahme</i>
Pat. 1	11	2,874				
Pat. 2	11	0,071	0,047	0,071		
Pat. 3	16	2,634	2,421	2,683	1,902	0,445
Pat. 4	2	2,765	2,666	2,761		
Pat. 5	4	0,047	0,056	0,138		
Pat. 6	5	0,047				
Pat. 7	21	0,055	0,079			
Pat. 8	28	2,866				
Pat. 9	0	0,053				

Tabelle 7: ATI-Messwerte, Extinktionswerte (Fett gedruckt: positiv; übrige Werte: negativ)

Bei 5 von 9 PatientInnen konnten erhöhte ATI-Werte beobachtet werden. Bei 4 PatientInnen (Pat. 1, 3, 4 und 8) wurden bereits bei der ersten Abnahme positive Werte gemessen, nur eine Patientin (Pat. 5) hatte primär 2 unauffällige Bestimmungen und bei der 3. Messung waren ATI im Serum nachweisbar. 2 Patientinnen hatten bei primär positiven Ergebnissen auch bei den folgenden Blutabnahmen ATI im Serum (Patientin 3 und 4). In keinem Fall waren primär ATI

nachweisbar. Bei 3 PatientInnen (Pat. 2, 6 und 7) wurden durchgehend negative Werte gemessen, die mit der klinischen Remission zu diesem Zeitpunkt im Einklang standen (s.u.). Bei der Patientin ohne vorangegangene IFX-Gaben (Pat. 9) konnte gezeigt werden, dass vor einem ersten Kontakt mit IFX ATI-Antikörper nicht nachweisbar sind.

3.6 Einzelbeschreibungen der PatientInnen

3.6.1 Patient 1 (P. Ma.)

Es handelt sich um einen männlichen Patienten, bei dem im Alter von 12 Jahren MC diagnostiziert wurde und der zum Zeitpunkt der ATI-Messung 2012 18 Jahre alt war. Er zeigte bei Diagnose einen Befall des terminalen Ileums und des Kolons, erhielt primär eine Glukokortikoid-Therapie und im Weiteren wurde eine Azathioprin-Therapie begonnen. Ende 2010 wurde aufgrund wiederkehrender Schübe und Steroidabhängigkeit mit IFX begonnen, 2011 wurde Azathioprin aufgrund zunehmender Unverträglichkeit abgesetzt. 2012 musste aufgrund zunehmender Krankheitsaktivität (abdominelle Beschwerden, Gewichtsverlust) das IFX-Intervall verkürzt werden. Genau zu diesem Zeitpunkt erfolgte die einzige ATI-Bestimmung, die einen erhöhten Wert (Extinktion von 2,784; positiver Wert > 0,13) zeigte (Tab. 7). Somit ist in diesem Fall eine Korrelation von Wirkverlust und ATI-Bildung vorhanden.

3.6.2 Patientin 2 (P. Me.)

Bei dieser Patientin wurde die Diagnose MC 2009 im Alter von 14 Jahren gestellt. Zum Diagnosezeitpunkt waren Magen, Ileum, Kolon, Zöekum und terminales Ileum befallen, dort bestand auch eine Stenosesymptomatik. Anfangs wurde mit einer Ernährungstherapie begonnen, die jedoch aufgrund der Erkrankungsausdehnung nicht zur erhofften Remission führte. Daraufhin erhielt die Patientin eine Glukokortikoid-Medikation, welche nach einer überlappenden Therapiephase mit 5-ASA und Azathioprin problemlos beendet werden konnte. Ende 2010 wurde trotz regelmäßiger Medikamenteneinnahme eine sonomorphologische Verschlechterung des Ileo-zöekalbefundes (zunehmende Verdickung der Mukosa) beobachtet, weswegen bei gleichzeitiger

Beschwerdezunahme die Therapie mit IFX begonnen wurde. Nebenbefundlich hatte die Patientin eine intermittierende Eisenmangelanämie, welche mit Eisenpräparaten (Lösferron®) behandelt wurde sowie Auffälligkeiten in den Gerinnungsbefunden (Faktor XII-Mangel, PTT-Verlängerung, Fibrinogenerhöhung). Außerdem wurden ein Selen-, Folsäure- und Zinkmangel festgestellt. Bei dieser Patientin erfolgten dreimalig ATI-Bestimmungen (Juni, August und September 2012), die jeweils keinen Hinweis auf das Vorliegen von ATI ergaben (Extinktionen von 0,047 bis 0,071). Da die Patientin zum Zeitpunkt der ATI-Messungen keinerlei Beschwerden aufwies, stimmten die Messwerte der Antikörper mit der klinischen Beobachtung überein.

3.6.3 Patientin 3 (H. K.)

Bei dieser Patientin wurde 2009 im Alter von 8 Jahren MC mit Befall des Duodenums und des Kolons diagnostiziert. Ihre Therapie bestand anfangs aus Glukokortikoiden. Salizylate konnten aufgrund einer Unverträglichkeit nicht verabreicht werden. Trotz Azathioprin-Dauertherapie seit dem Frühjahr 2012 litt die Patientin weiterhin an Diarrhoe und abdominellen Beschwerden und entwickelte letztlich einen steroidabhängigen Verlauf. Ende 2009 wurde wegen fehlender Remission ihrer Erkrankung mit einer IFX-Therapie begonnen, woraufhin ihre Beschwerden rasch sistierten. In ihrer Anamnese zeigten sich ein latenter Eisenmangel (jedoch ohne Anämiezeichen), eine Neurodermitis, sowie eine Herpes Zoster-Infektion im Jahre 2010. Bei der Patientin wurden insgesamt fünf ATI-Bestimmungen durchgeführt (April, zweimalig im August, Oktober und Dezember 2012). Bei allen fünf Untersuchungen wurden positive Werte gemessen, der höchste im August mit einer Extinktion von 2,683 und der niedrigste im Dezember mit 0,445. Im zeitlichen Verlauf zeigte sich eine kontinuierliche Abnahme der gemessenen Werte. Die Patientin hatte zur Zeit der Bestimmungen keine Beschwerden und somit kann die klinische Symptombefreiheit nicht in Verbindung mit den gemessenen teils positiven Antikörper-Werten gebracht werden. Im weiteren Verlauf zeigte sich letztendlich aber immer wieder eine leichte Aktivität des MC.

3.6.4 Patientin 4 (M. V.)

Es handelt sich hierbei um eine Patientin, bei der in einem anderen Bundesland 2009 im Alter von 14 Jahren MC diagnostiziert wurde. Befallen waren zu diesem Zeitpunkt das Sigma, das Ileum sowie das Rektum, wobei man auch mehrere kurzstreckige Stenosen im Ileum, eine Sigmafistel mit Abszessformation im linken Unterbauch sowie eine Rektumfistel feststellte. Zuerst wurde die Patientin mit 5-ASA und Azathioprin behandelt. Eine IFX-Therapie wurde 2007 begonnen. 2011 war es auf Wunsch der Mutter zu einem IFX-Therapieabbruch gekommen. Ebenfalls kam es auf Wunsch der Eltern zu einem Abbruch der erneut versuchten Ernährungstherapie Anfang 2012. Zu diesem Zeitpunkt musste die Patientin nach Graz überstellt werden und es wurden eine Sigmateilresektion, eine Adhäsioolyse und das Anbringen eines Ileostomas notwendig. Die Patientin reagierte einmalig anaphylaktisch auf Humanalbumin. Ab März 2012 erhielt sie dann IFX, da auch Fisteln und Abszessformationen bestanden. Bei der Aufnahme der nun 16-jährigen Patientin an unserer Klinik waren das Gewicht mit 23 kg und die Körperlänge von 140 cm sehr besorgniserregend. Bei dieser Patientin wurden dreimalig Antikörpermessungen durchgeführt (Juni, August und Oktober 2012), wobei alle Werte positiv waren (Extinktionen von 2,666 bis 2,765). Die Positivität der ATI korreliert mit dem eingeschränkten Wirkungsgrad von IFX bei dieser Patientin.

3.6.5 Patientin 5 (K. N.)

Bei dieser Patientin wurde 2010 im Alter von 15 Jahren die Diagnose MC gestellt, wobei initial Magen, proximales und distales Ileum sowie das Kolon befallen waren. Im terminalen Ileum zeigte sich eine langstreckige Stenose. Nach Diagnosestellung erhielt das Mädchen eine Ernährungstherapie und zusätzlich für zwei Jahre Azathioprin. Ende 2011 wurde die Therapie aufgrund wiederkehrender abdomineller Beschwerden durch Budesonid ergänzt. Zwischenzeitlich hatte die Patientin eine Eisenmangelanämie, ein Erythema nodosum und schließlich einen Ileus bei einer Dünndarm-Stenose, weswegen Anfang 2012 das Jejunum teilreseziert werden musste. Nach der Operation bestand weiterhin ein steroidabhängiger Verlauf, weswegen eine IFX-Therapie eingeleitet wurde. Gynäkologisch fand man eine CIN ersten Grades mit einem PAP-Abstrich dritten

Grades. Bei dieser Patientin wurden drei ATI-Messungen durchgeführt (Juli, September und Oktober 2012). Die ersten beiden ergaben negative Messwerte, wobei der September-Wert höher ausfiel als der Juli-Wert. Im Oktober ergab die Messung einen knapp positiven Wert mit einer Extinktion von 0,138. Hier zeigte sich also ein Anstieg der Antikörper-Werte, wobei sich die Patientin allerdings in Remission befand. Auffällig waren in der Zeit der IFX-Therapie das erstmalige Auftreten einer Hepatopathie und einer Psoriasis – es besteht der Verdacht eines Zusammenhangs im Sinne von IFX-Nebenwirkungen.

3.6.6 Patient 6 (R. M.)

Bei diesem Patienten wurde im Alter von 8 Jahren die Diagnose MC gestellt. Er zeigte einen gleichzeitigen Befall des Duodenums, des terminalen Ileums und des gesamten Kolons (Pankolitis). Bei ihm wurde wie bei den zuvor beschriebenen PatientInnen eine „Step-up“ Therapiestrategie gewählt, jedoch musste aufgrund einer Azathioprin-Unverträglichkeit eine Methotrexat-Therapie eingeleitet werden. 2011 und 2012 mussten bei Krankheitsaktivität trotz Immunsuppressivums immer wieder Glukokortikoid-Präparate verabreicht werden. Schließlich wurde eine Verlangsamung des Gedeihens und Längenwachstums beobachtet, weswegen eine IFX-Therapie begonnen wurde. Daraufhin kam es rasch zur Remission. Auch bei diesem Patienten lag eine Eisenmangelanämie vor. Nebenbefundlich sind rezidivierende Otitiden beidseits und eine Orchitis mit Epididymitis erwähnenswert. Bei diesem Patienten wurden einmalig ATI bestimmt. Der Messwert lag mit einer Extinktion von 0,047 im negativen Bereich. Der Patient befand sich zu diesem Zeitpunkt im guten Allgemeinzustand und in Remission, was mit dem negativen ATI-Messwert gut vereinbar war.

3.6.7 Patientin 7 (K. M.)

Bei Diagnose des MC 2008 war diese Patientin 11 Jahre alt. Bei den initialen Endoskopien wurden Entzündungen des Magens, des Duodenums, des Jejunums, des terminalen Ileums und des Kolons festgestellt und histologisch verifiziert. Nach Diagnosestellung erhielt die Patientin eine acht-wöchige Ernährungstherapie und parallel dazu wurde mit Azathioprin begonnen. Die weitere Monotherapie mit Azathioprin war unzureichend, die Patientin entwickelte

sukzessive einen steroidabhängigen Verlauf woraufhin 2009 mit IFX begonnen wurde. Die Patientin litt ebenfalls an einer Eisenmangelanämie und peripheren Eosinophilie. In der Anamnese findet man ein Pyoderma gangraenosum sowie ein dyshidrosiformes Fußekzem. Es wurden bei dieser Patientin zweimalig ATI-Messungen durchgeführt. Beide Proben ergaben negative Ergebnisse, jedoch stiegen die Extinktionswerte von 0,055 auf 0,079 an. Zu diesem Zeitraum wurde eine suspekta Aktivität der Haut, ein Psoriasis-ähnlicher Schub beobachtet, der aber mit Lokalthherapie behandelt werden konnte.

3.6.8 Patientin 8 (G. S.)

Dies ist eine Patientin, bei der die Diagnose 2007 im Alter von 10 Jahren gestellt wurde. Bei ihr waren zunächst Magen und Kolon betroffen. Mit Diagnosestellung wurden eine Ernährungstherapie für acht Wochen und gleichzeitig eine Azathioprin-Medikation begonnen. Die Patientin entwickelte eine Pankreatitis, was als Azathioprin-Unverträglichkeit interpretiert wurde, sodass man auf MTX wechselte. Auch bei ihr mussten Krankheitsschübe immer wieder mit Steroiden behandelt werden, außerdem wurde ein Sistieren des Gewichts und der Körperlänge beobachtet. Sie erhielt somit 2008 ihre erste IFX-Infusion. Die Patientin litt auch an einer Eisenmangelanämie und an einem für MC typischen Erythema nodosum. Nebenbefundlich wurde unter Immunsuppression eine Episode von Herpes Zoster beobachtet. Bei dieser Patientin wurde einmalig eine ATI-Messung Ende Oktober 2012 durchgeführt. Diese Probe war mit einer Extinktion von 2,866 hoch positiv. Trotz des hohen Wertes war die Patientin zum Abnahmezeitpunkt in klinischer Remission ohne Hinweis auf beginnende Krankheitsaktivität.

3.6.9 Patientin 9 (P. D.)

Hierbei handelt es sich um eine 17-jährige Patientin, welche Anfang 2013 mit MC diagnostiziert wurde. Es zeigten sich ein Befall des Ösophagus mit Ulkusbildung, eine segmentale Pankolitis und eine Ileitis. Da die Patientin von Anfang an einen schweren Verlauf ihrer Erkrankung aufwies, wurde die „Top-down“ Strategie gewählt und IFX primär eingesetzt. In der Anamnese finden sich eine Eisenmangelanämie sowie Zustand nach rezidivierenden Krampfanfällen. Bei

dieser Patientin wurde vor der IFX-Induktionstherapie eine Blutprobe zur Messung der Antikörper eingefroren, die mit einer Extinktion von 0,053 negativ war. Diese Patientin diente uns als „Negativkontrolle“, wobei gezeigt wurde, dass vor einer IFX-Therapie keine ATI nachweisbar sind.

4 Diskussion

Im Jahr 2007 erhielt IFX in Österreich die Zulassung für die Therapie von Kindern und Jugendlichen mit MC (88). Dieses Medikament war eine völlig neue Therapieoption bei der Behandlung von MC-PatientInnen. Besonders PatientInnen mit einem zuvor kaum beherrschbaren therapierefraktären Verlauf profitieren enorm von IFX. Bei diesen PatientInnen kann nicht nur rasch eine Remission herbeigeführt werden, sondern auch die Lebensqualität dieser Kinder und Jugendlichen verbessert sich in der Regel dramatisch (3-5,34). An der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde Graz gab es bisher bei keinem der mit IFX behandelten PatientInnen wesentliche Nebenwirkungen. Das einzige Problem, das sich im klinischen Alltag herausstellte, war eventueller Wirkverlust von IFX nach unterschiedlicher Zeitdauer. Die Ursache des nicht vorhersehbaren Wirkverlustes ist noch unklar, jedoch wird die Bildung von neutralisierenden Antikörpern gegen das Medikament (ATI) als mögliche Ursache vermutet (74,76).

Ziel dieser Arbeit war der erstmalige Nachweis von ATI bei in Graz behandelten Kindern und Jugendlichen mit MC. Primär musste eine Methode gefunden werden, um ATI nachzuweisen. Nach ausführlicher Literaturrecherche zeigte sich, dass weltweit 2 Verfahren verwendet werden: einerseits ein „Radioimmunoassay“ (RIA) und andererseits die ELISA-Methode, wobei die letztgenannte Methode die gängigere ist (89). Wir entschieden uns für den ELISA-Kit. Die Durchführung der Bestimmungen erfolgte komplikationslos am Klinischen Institut für Medizinische und Chemische Labordiagnostik Graz. Prinzipiell gibt es einige Nachteile des aktuell käuflich zu erwerbenden ATI-ELISA-Kits: Erstens können mit diesem Testverfahren nur „freie Antikörper“ nachgewiesen werden, d.h. nur Antikörper, die nicht an IFX gebunden sind. Bei hoher IFX-Serumkonzentration kann kaum eine ATI-Messung durchgeführt werden, da alle freien Antikörper von IFX im Serum gebunden sind. Um diesem Problem möglichst zu begegnen, erfolgten „Talspiegel-Messungen“ vor der IFX-Infusion. Künftig werden „Gesamt-ATI“-ELISA-Kits vorliegen. Der zweite Nachteil der ELISA-Kits sind die methodisch bedingten Ungenauigkeiten beim Messen. Es ist möglich, dass Mehrfachmessungen unterschiedliche Werte zeigen. Somit ist der Test eher verwendbar, um die Aussage zu treffen, ob Antikörper vorliegen oder nicht, die Quantität der Antikörper-Werte kann aber schwanken. Das dritte Problem des

ELISA-Kits ist, dass man aus Kostengründen 23 PatientInnen-Proben sammeln muss, um die Bestimmungsplatte optimal ausnützen zu können. Schließlich muss man sich noch die Frage stellen, ob im Serum ATI überhaupt nachweisbar sind, insofern der Bildungsort wahrscheinlich im Darm ist – nämlich dort, wo die Entzündung lokalisiert ist.

Auch wenn die Messung der ATI aus technischer Sicht unkompliziert ist, bleiben Fragen bezüglich der Interpretation. Wie man bei unseren PatientInnen sieht, korreliert das klinische Erscheinungsbild nicht immer mit den ATI-Werten. Wir konnten bei 5 PatientInnen ATI nachweisen, wovon einige eine Aktivität im Sinne eines IFX-Wirkverlusts zeigten (n=3), andere hatten ATI ohne klinische Korrelation (n=2). Somit kann man das Auftreten von ATI nicht als Marker für einen Wirkverlust mit klinischen Auffälligkeiten verwenden. Längerfristige Beobachtungen werden notwendig sein, um die Hypothese belegen zu können, dass das Auftreten von ATI als Anzeichen eines drohenden Wirkverlusts interpretiert werden kann. Wenn dies so wäre, wäre das Messen von gebundenen ATI sehr interessant, denn dann könnte man sehr früh das Auftreten der Antikörper feststellen. Es wäre wünschenswert, wenn es einen Marker für einen drohenden Wirkverlust gäbe, denn dann könnte ein rechtzeitiger Wechsel auf ein anderes Biologikum erfolgen und der Patient müsste keine klinische Aktivitätszunahme ertragen. Besonders in der Gastroenterologie, wo aktuell nur zwei TNF- α -Blocker zugelassen sind (Remicade[®] und Humira[®]), ist der Wechsel des Biologikums stets gut zu überlegen. Fallberichte zeigten übrigens, dass die Antikörperbildung gegen einen TNF- α -Blocker durch Absetzen des Medikaments nicht nur gestoppt werden kann, sondern dass die Antikörper nach einer gewissen Zeit aus dem Serum wieder verschwinden können und somit das gleiche Präparat nach längerem Zeitraum wieder erfolgreich eingesetzt werden kann.

Aus unserer Sicht reicht die Bestimmung der ATI alleine nicht aus. Es sollte stets der Serumspiegel von IFX gleichzeitig bestimmt und die Werte korreliert werden. Nur so erfolgt die richtige Interpretation der ATI-Werte:

ATI	IFX-Spiegel	Erklärung
niedrig	hoch	<i>Keine ATI</i>
niedrig	niedrig	<i>Entweder positiver ATI-Nachweis oder IFX-Dosierung zu niedrig</i>
hoch	niedrig	<i>Wirkverlust durch ATI</i>

Tabelle 8: Interaktion zwischen ATI und IFX-Blutspiegel

Zusammenfassend konnten wir erfolgreich ATI-Messungen bei Kindern und Jugendlichen mit MC und IFX-Therapie durchführen. Es benötigt noch Erfahrung, um die Werte richtig interpretieren zu können. Es ist also möglich, dass bei verbesserten Testverfahren die ATI eine wichtige Monitor-Funktion während der IFX-Therapie haben werden.

5 Literaturverzeichnis

- (1) Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease. *Lancet* 2012 Aug 17.
- (2) Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* 2008 Jan;214(2):149-160.
- (3) Derkx B, Taminiau J, Radema S, Stronkhorst A, Wortel C, Tytgat G, et al. Tumour-necrosis-factor antibody treatment in Crohn's disease. *Lancet* 1993 Jul 17;342(8864):173-174.
- (4) van Dullemen HM, van Deventer SJ, Hommes DW, Bijl HA, Jansen J, Tytgat GN, et al. Treatment of Crohn's disease with anti-tumor necrosis factor chimeric monoclonal antibody (cA2). *Gastroenterology* 1995 Jul;109(1):129-135.
- (5) Veres G, Baldassano RN, Mamula P. Infliximab therapy in children and adolescents with inflammatory bowel disease. *Drugs* 2007;67(12):1703-1723.
- (6) Chouraki V, Savoye G, Dauchet L, Vernier-Massouille G, Dupas JL, Merle V, et al. The changing pattern of Crohn's disease incidence in northern France: a continuing increase in the 10- to 19-year-old age bracket (1988-2007). *Aliment Pharmacol Ther* 2011 May;33(10):1133-1142.
- (7) Timmer A, Behrens R, Buderus S, Findeisen A, Hauer A, Keller KM, et al. Childhood onset inflammatory bowel disease: predictors of delayed diagnosis from the CEDATA German-language pediatric inflammatory bowel disease registry. *J Pediatr* 2011 Mar;158(3):467-473.e2.
- (8) Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and Natural History of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* 2011 5;140(6):1785-1794.e4.
- (9) Petritsch W, Fuchs S, Berghold A, Bachmaier G, Hogenauer C, Hauer AC, et al. Incidence of inflammatory bowel disease in the province of Styria, Austria, from 1997 to 2007: a population-based study. *J Crohns Colitis* 2013 Feb;7(1):58-69.
- (10) Abraham BP, Mehta S, El-Serag HB. Natural history of pediatric-onset inflammatory bowel disease: a systematic review. *J Clin Gastroenterol* 2012 Aug;46(7):581-589.
- (11) IBD Working Group of the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. Inflammatory bowel disease in children and adolescents: recommendations for diagnosis--the Porto criteria. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005 Jul;41(1):1-7.
- (12) Ramadas AV, Gunesh S, Thomas GA, Williams GT, Hawthorne AB. Natural history of Crohn's disease in a population-based cohort from Cardiff (1986-2003): a study of changes in medical treatment and surgical resection rates. *Gut* 2010 Sep;59(9):1200-1206.
- (13) Urlep D, Trop TK, Blagus R, Orel R. Incidence and Phenotypic Characteristics of Pediatric Inflammatory Bowel Disease in the North-eastern Slovenia, 2002-2010. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2013 Oct 16.
- (14) Hovde O, Moum BA. Epidemiology and clinical course of Crohn's disease: results from observational studies. *World J Gastroenterol* 2012 Apr 21;18(15):1723-1731.
- (15) Torkzad MR, Ullberg U, Nystrom N, Blomqvist L, Hellstrom P, Fagerberg UL. Manifestations of small bowel disease in pediatric Crohn's disease on magnetic resonance enterography. *Inflamm Bowel Dis* 2012 Mar;18(3):520-528.

- (16) Mamula P, Telega GW, Markowitz JE, Brown KA, Russo PA, Piccoli DA, et al. Inflammatory bowel disease in children 5 years of age and younger. *Am J Gastroenterol* 2002 Aug;97(8):2005-2010.
- (17) Vind I, Riis L, Jess T, Knudsen E, Pedersen N, Elkjaer M, et al. Increasing incidences of inflammatory bowel disease and decreasing surgery rates in Copenhagen City and County, 2003-2005: a population-based study from the Danish Crohn colitis database. *Am J Gastroenterol* 2006 Jun;101(6):1274-1282.
- (18) Sun L, Roesler J, Rosen-Wolff A, Winkler U, Koch R, Thurigen A, et al. CARD15 genotype and phenotype analysis in 55 pediatric patients with Crohn disease from Saxony, Germany. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003 Oct;37(4):492-497.
- (19) Franke A, McGovern DP, Barrett JC, Wang K, Radford-Smith GL, Ahmad T, et al. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet* 2010 Dec;42(12):1118-1125.
- (20) Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001 May 31;411(6837):599-603.
- (21) Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001 May 31;411(6837):603-606.
- (22) Weinstein TA, Levine M, Pettei MJ, Gold DM, Kessler BH, Levine JJ. Age and family history at presentation of pediatric inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003 Nov;37(5):609-613.
- (23) Lakatos PL. Environmental factors affecting inflammatory bowel disease: have we made progress? *Dig Dis* 2009;27(3):215-225.
- (24) Helbig KL, Nothnagel M, Hampe J, Balschun T, Nikolaus S, Schreiber S, et al. A case-only study of gene-environment interaction between genetic susceptibility variants in NOD2 and cigarette smoking in Crohn's disease aetiology. *BMC Med Genet* 2012 Mar 14;13:14.
- (25) Tuvlin JA, Raza SS, Bracamonte S, Julian C, Hanauer SB, Nicolae DL, et al. Smoking and inflammatory bowel disease: trends in familial and sporadic cohorts. *Inflamm Bowel Dis* 2007 May;13(5):573-579.
- (26) Mahowald MA, Rey FE, Seedorf H, Turnbaugh PJ, Fulton RS, Wollam A, et al. Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009 Apr 7;106(14):5859-5864.
- (27) Willing BP, Dicksved J, Halfvarson J, Andersson AF, Lucio M, Zheng Z, et al. A Pyrosequencing Study in Twins Shows That Gastrointestinal Microbial Profiles Vary With Inflammatory Bowel Disease Phenotypes. *Gastroenterology* 2010 12;139(6):1844-1854.e1.
- (28) Bloom SM, Bijanki VN, Nava GM, Sun L, Malvin NP, Donermeyer DL, et al. Commensal *Bacteroides* species induce colitis in host-genotype-specific fashion in a mouse model of inflammatory bowel disease. *Cell Host Microbe* 2011 May 19;9(5):390-403.
- (29) Scharl M, Rogler G. Microbial sensing by the intestinal epithelium in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Int J Inflam* 2010 Jun 29;2010:671258.

- (30) Buhner S, Buning C, Genschel J, Kling K, Herrmann D, Dignass A, et al. Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation? *Gut* 2006 Mar;55(3):342-347.
- (31) Wehkamp J, Salzman NH, Porter E, Nuding S, Weichenthal M, Petras RE, et al. Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 Dec 13;102(50):18129-18134.
- (32) Breese EJ, Michie CA, Nicholls SW, Murch SH, Williams CB, Domizio P, et al. Tumor necrosis factor alpha-producing cells in the intestinal mucosa of children with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1994 Jun;106(6):1455-1466.
- (33) Reinecker HC, Steffen M, Witthoef T, Pflueger I, Schreiber S, MacDermott RP, et al. Enhanced secretion of tumour necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-1 beta by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* 1993 Oct;94(1):174-181.
- (34) Van Deventer SJ. Tumour necrosis factor and Crohn's disease. *Gut* 1997 Apr;40(4):443-448.
- (35) de Bie CI, Escher JC, de Ridder L. Antitumor necrosis factor treatment for pediatric inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2012 May;18(5):985-1002.
- (36) Ma TY, Iwamoto GK, Hoa NT, Akotia V, Pedram A, Boivin MA, et al. TNF-alpha-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF-kappa B activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004 Mar;286(3):G367-76.
- (37) Braegger CP, Nicholls S, Murch SH, Stephens S, MacDonald TT. Tumour necrosis factor alpha in stool as a marker of intestinal inflammation. *Lancet* 1992 Jan 11;339(8785):89-91.
- (38) Munkholm P, Langholz E, Davidsen M, Binder V. Disease activity courses in a regional cohort of Crohn's disease patients. *Scand J Gastroenterol* 1995 Jul;30(7):699-706.
- (39) Sawczenko A, Sandhu BK. Presenting features of inflammatory bowel disease in Great Britain and Ireland. *Arch Dis Child* 2003 Nov;88(11):995-1000.
- (40) Vavricka SR, Brun L, Ballabeni P, Pittet V, Prinz Vavricka BM, Zeitz J, et al. Frequency and risk factors for extraintestinal manifestations in the Swiss inflammatory bowel disease cohort. *Am J Gastroenterol* 2011 Jan;106(1):110-119.
- (41) Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott ID, Bernstein CN, Brant SR, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol* 2005 Sep;19 Suppl A:5-36.
- (42) Levine A, Griffiths A, Markowitz J, Wilson DC, Turner D, Russell RK, et al. Pediatric modification of the Montreal classification for inflammatory bowel disease: the Paris classification. *Inflamm Bowel Dis* 2011 Jun;17(6):1314-1321.
- (43) Beattie RM, Croft NM, Fell JM, Afzal NA, Heuschkel RB. Inflammatory bowel disease. *Arch Dis Child* 2006 May;91(5):426-432.
- (44) Cabrera-Abreu JC, Davies P, Matek Z, Murphy MS. Performance of blood tests in diagnosis of inflammatory bowel disease in a specialist clinic. *Arch Dis Child* 2004 Jan;89(1):69-71.

- (45) Khan K, Schwarzenberg SJ, Sharp H, Greenwood D, Weisdorf-Schindele S. Role of serology and routine laboratory tests in childhood inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2002 Sep;8(5):325-329.
- (46) Hyams JS, Ferry GD, Mandel FS, Gryboski JD, Kibort PM, Kirschner BS, et al. Development and validation of a pediatric Crohn's disease activity index. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1991 May;12(4):439-447.
- (47) Turner D, Griffiths A, Walters T, Seah T, Markowitz J, Pfefferkorn M, et al. Mathematical weighting of the pediatric Crohn's disease activity index and comparison with its other short versions. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. Conference: European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition Annual Meeting 2011 Sorrento Italy. Conference Start: 20110525 Conference End: 20110528. Conference Publica(TRUNCATED) 2011 June 2011;52:E17.
- (48) D'Haens G, Baert F, van Assche G, Caenepeel P, Vergauwe P, Tuynman H, et al. Early combined immunosuppression or conventional management in patients with newly diagnosed Crohn's disease: an open randomised trial. *Lancet* 2008 Feb 23;371(9613):660-667.
- (49) Beattie RM, Bentsen BS, MacDonald TT. Childhood Crohn's disease and the efficacy of enteral diets. *Nutrition* 1998 Apr;14(4):345-350.
- (50) Ezri J, Marques-Vidal P, Nydegger A. Impact of disease and treatments on growth and puberty of pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Digestion* 2012 Jun;85(4):308-319.
- (51) Day AS, Whitten KE, Sidler M, Lemberg DA. Systematic review: nutritional therapy in paediatric Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2008 Feb 15;27(4):293-307.
- (52) Heuschkel RB, Menache CC, Megerian JT, Baird AE. Enteral nutrition and corticosteroids in the treatment of acute Crohn's disease in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000 Jul;31(1):8-15.
- (53) Lambert B, Lemberg DA, Leach ST, Day AS. Longer-term outcomes of nutritional management of Crohn's disease in children. *Dig Dis Sci* 2012 Aug;57(8):2171-2177.
- (54) Steinhart AH, Ewe K, Griffiths AM, Modigliani R, Thomsen OO. Corticosteroids for maintaining remission of Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2000;(2)(2):CD000301.
- (55) Homik J, Suarez-Almazor ME, Shea B, Cranney A, Wells G, Tugwell P. Calcium and vitamin D for corticosteroid-induced osteoporosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2000;(2)(2):CD000952.
- (56) Escher JC, European Collaborative Research Group on Budesonide in Paediatric IBD. Budesonide versus prednisolone for the treatment of active Crohn's disease in children: a randomized, double-blind, controlled, multicentre trial. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004 Jan;16(1):47-54.
- (57) Manz M, Vavricka SR, Wanner R, Lakatos PL, Rogler G, Frei P, et al. Therapy of steroid-resistant inflammatory bowel disease. *Digestion* 2012;86 Suppl 1:11-15.
- (58) Barabino A, Torrente F, Ventura A, Cucchiara S, Castro M, Barbera C. Azathioprine in paediatric inflammatory bowel disease: an Italian multicentre survey. *Aliment Pharmacol Ther* 2002 Jun;16(6):1125-1130.

- (59) Nielsen OH, Vainer B, Rask-Madsen J. Review article: the treatment of inflammatory bowel disease with 6-mercaptopurine or azathioprine. *Aliment Pharmacol Ther* 2001 Nov;15(11):1699-1708.
- (60) Turner D, Grossman AB, Rosh J, Kugathasan S, Gilman AR, Baldassano R, et al. Methotrexate following unsuccessful thiopurine therapy in pediatric Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2007 Dec;102(12):2804-12; quiz 2803, 2813.
- (61) Mesker T, van Rheenen PF, Norbruis OF, Uitentuis J, Waalkens HJ, Gonera G, et al. Pediatric Crohn's disease activity at diagnosis, its influence on pediatrician's prescribing behavior, and clinical outcome 5 years later. *Inflamm Bowel Dis* 2009 Nov;15(11):1670-1677.
- (62) Khan KJ, Ullman TA, Ford AC, Abreu MT, Abadir A, Marshall JK, et al. Antibiotic therapy in inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2011 Apr;106(4):661-673.
- (63) Sandborn WJ, Hanauer S, Loftus EV, Jr, Tremaine WJ, Kane S, Cohen R, et al. An open-label study of the human anti-TNF monoclonal antibody adalimumab in subjects with prior loss of response or intolerance to infliximab for Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2004 Oct;99(10):1984-1989.
- (64) Schreiber S, Khaliq-Kareemi M, Lawrance IC, Thomsen OO, Hanauer SB, McColm J, et al. Maintenance therapy with certolizumab pegol for Crohn's disease. *N Engl J Med* 2007 Jul 19;357(3):239-250.
- (65) Wills JS, Lobis IF, Denstman FJ. Crohn disease: state of the art. *Radiology* 1997 Mar;202(3):597-610.
- (66) Nicholls S, Stephens S, Braegger CP, Walker-Smith JA, MacDonald TT. Cytokines in stools of children with inflammatory bowel disease or infective diarrhoea. *J Clin Pathol* 1993 Aug;46(8):757-760.
- (67) Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Menzel S, Ruth P. Teil B Spezieller Teil. **Mutschler Arzneimittelwirkungen** PharmakologieKlinische PharmakologieToxikologie. 10., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage ed. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 2012. p. 245-247.
- (68) Heinrich PC, Haan S, Hermanns HM, Löffler G, Müller-Newen G, Schaper F. Kommunikation zwischen Zellen: Extrazelluläre Signalmoleküle, Rezeptoren und Signaltransduktion. In: Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC, editors. *Biochemie & Pathobiochemie*. 8., völlig neu bearbeitete Auflage ed. Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2007. p. 792-793.
- (69) Parashette KR, Makam RC, Cuffari C. Infliximab therapy in pediatric Crohn's disease: a review. *Clin Exp Gastroenterol* 2010;3:57-63.
- (70) Rutgeerts P, Van Assche G, Vermeire S. Optimizing anti-TNF treatment in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2004 May;126(6):1593-1610.
- (71) Keane J, Gershon S, Wise RP, Mirabile-Levens E, Kasznica J, Schwiertman WD, et al. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N Engl J Med* 2001 Oct 11;345(15):1098-1104.
- (72) Knight DM, Trinh H, Le J, Siegel S, Shealy D, McDonough M, et al. Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody. *Mol Immunol* 1993 Nov;30(16):1443-1453.

- (73) Cassinotti A, Travis S. Incidence and clinical significance of immunogenicity to infliximab in Crohn's disease: a critical systematic review. *Inflamm Bowel Dis* 2009 Aug;15(8):1264-1275.
- (74) Hanauer SB, Feagan BG, Lichtenstein GR, Mayer LF, Schreiber S, Colombel JF, et al. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet* 2002 May 4;359(9317):1541-1549.
- (75) Lichtenstein GR, Yan S, Bala M, Blank M, Sands BE. Infliximab maintenance treatment reduces hospitalizations, surgeries, and procedures in fistulizing Crohn's disease. *Gastroenterology* 2005 Apr;128(4):862-869.
- (76) Gisbert JP, Panes J. Loss of response and requirement of infliximab dose intensification in Crohn's disease: a review. *Am J Gastroenterol* 2009 Mar;104(3):760-767.
- (77) Cornillie F, Shealy D, D'Haens G, Geboes K, Van Assche G, Ceuppens J, et al. Infliximab induces potent anti-inflammatory and local immunomodulatory activity but no systemic immune suppression in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2001 Apr;15(4):463-473.
- (78) Sandborn WJ, Hanauer SB, Katz S, Safdi M, Wolf DG, Baerg RD, et al. Etanercept for active Crohn's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2001 Nov;121(5):1088-1094.
- (79) Scallon B, Cai A, Solowski N, Rosenberg A, Song XY, Shealy D, et al. Binding and functional comparisons of two types of tumor necrosis factor antagonists. *J Pharmacol Exp Ther* 2002 May;301(2):418-426.
- (80) ten Hove T, van Montfrans C, Peppelenbosch MP, van Deventer SJ. Infliximab treatment induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes in Crohn's disease. *Gut* 2002 Feb;50(2):206-211.
- (81) Van den Brande JM, Braat H, van den Brink GR, Versteeg HH, Bauer CA, Hoedemaeker I, et al. Infliximab but not etanercept induces apoptosis in lamina propria T-lymphocytes from patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2003 Jun;124(7):1774-1785.
- (82) Shen C, Maerten P, Geboes K, Van Assche G, Rutgeerts P, Ceuppens JL. Infliximab induces apoptosis of monocytes and T lymphocytes in a human-mouse chimeric model. *Clin Immunol* 2005 Jun;115(3):250-259.
- (83) Ringheanu M, Daum F, Markowitz J, Levine J, Katz S, Lin X, et al. Effects of infliximab on apoptosis and reverse signaling of monocytes from healthy individuals and patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2004 Nov;10(6):801-810.
- (84) Baert FJ, D'Haens GR, Peeters M, Hiele MI, Schaible TF, Shealy D, et al. Tumor necrosis factor alpha antibody (infliximab) therapy profoundly down-regulates the inflammation in Crohn's ileocolitis. *Gastroenterology* 1999 Jan;116(1):22-28.
- (85) Diak P, Siegel J, La Grenade L, Choi L, Lemery S, McMahon A. Tumor necrosis factor alpha blockers and malignancy in children: forty-eight cases reported to the Food and Drug Administration. *Arthritis Rheum* 2010 Aug;62(8):2517-2524.
- (86) Miele E, Markowitz JE, Mamula P, Baldassano RN. Human antichimeric antibody in children and young adults with inflammatory bowel disease receiving infliximab. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004 May;38(5):502-508.

(87) Baert F, Noman M, Vermeire S, Van Assche G, D'Haens G, Carbonez A, et al. Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease. N Engl J Med 2003 Feb 13;348(7):601-608.

(88) **Infliximab (Remicade®) erhält als erste Biologika- Therapie EU-Zulassung für pädiatrischen M. Crohn** . 2007; Available at: <http://reports-news.universimed.com/artikel/infliximab-remicade%C2%AE-erh%C3%A4lt-als-erste-biologika-therapie-eu-zulassung-f%C3%BCr-p%C3%A4di>. Accessed 06.10.2013.

(89) Wang SL, Ohrmund L, Hauenstein S, Salbato J, Reddy R, Monk P, et al. Development and validation of a homogeneous mobility shift assay for the measurement of infliximab and antibodies-to-infliximab levels in patient serum. J Immunol Methods 2012 Aug 31;382(1-2):177-188.

Anhang I: Projektplan

Juni 2012	Erstkontakt mit Betreuer Themenauswahl Konzeptformularerstellung
Juli 2012	Beginn der Literatursuche Beginn mit regelmäßigen wöchentlichen Treffen Laborerklärung und –einführung Famulatur an der Kinderklinik Graz Beginn mit Einleitung der Diplomarbeit Beginn der Patientensuche
Oktober 2012	Fertigstellung der Einleitung Erstellung einer Exceltabelle
März 2013	Erste Ergebnisse vorhanden Auswertung der Ergebnisse Beginn Materialien und Methoden der Diplomarbeit Detaillierte Patientenanamnese
April 2013	Tabellenerstellung Beginn mit Ergebnisse der Diplomarbeit Beginn mit Zusammenfassung der Diplomarbeit
Mai-September 2013	PJ im Ausland
Juni 2013	Präsentation der Diplomarbeit im Rahmen der „Mariatroster Forschungsklausurtagung 2013“
September 2013	Besprechung der letzten Änderungen der Diplomarbeit
Oktober 2013	Korrektur
Dezember 2013	Abgabe

Anhang II: ATI-ELISA-Kit

a) Reagenzienvorbereitung und Lagerung

- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **Waschpufferkonzentrat** (WASHBUF) muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml Konzentrat + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37°C auf. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist bei **2-8°C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Die **lyophilisierten CTRLNEG** und **CTRLPOS** (Kontrollen, negativ bzw. positiv) sind bei 2-8°C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die Kontrollen werden mit **250 µl** Reinstwasser rekonstituiert und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. **Rekonstituierte Kontrollen können nicht gelagert werden.**
- Das **Konjugat** (CONJ) wird unmittelbar vor Gebrauch **1:100** in **Waschpuffer** verdünnt (100 µl CONJ + 10 ml Waschpuffer). Unverdünntes Konjugat ist bei 2-8°C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Verdünntes Konjugat ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2-8°C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

b) Probenvorbereitung

EDTA-Plasma und Serum

EDTA-Plasma- oder Serumproben werden vor dem Einsatz im Test **1:10** verdünnt,

z.B.: **25 µl** Probe + **225 µl** SAMPLEBUF (Verdünnungspuffer), gut mischen.

100 µl der Verdünnung wird im Test eingesetzt.

Frisch abgenommenes EDTA-Plasma bzw. Serum kann einen Tag bei Raumtemperatur (18-26°C) gelagert werden. Bei längeren Aufbewahrungszeiten sind die Proben bei -20°C zu lagern.

c) Pipettierschema

1. Mikrotiterplatte **5x mit je 250 µl Waschpuffer waschen** – über Saugpapier „abklopfen“
2. **100 µl CTRLNEG, CTRLPOS** (Kontrollen) und vorbereitete Proben in die Vertiefungen pipettieren.
3. **Über Nacht (16 - 20 h)** bei 2 - 8°C unter Schütteln inkubieren*
4. Den Inhalt der Platte verwerfen und **5x mit je 250 µl Waschpuffer waschen**. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
5. **100 µl verdünnten CONJ** (Konjugat) pro Vertiefung pipettieren.
6. **1 Std.** bei Raumtemperatur (18 – 26°C) unter Schütteln inkubieren.
7. Den Inhalt der Platte verwerfen und **5x mit je 250 µl Waschpuffer waschen**. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
8. **100 µl TMB-Substratlösung** pro Vertiefung pipettieren.
9. **10 – 20 Minuten** bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.**
10. **50 µl** Stopplösung zusetzen und kurz mischen.
11. **Extinktion** sofort im Mikrotiterplattenphotometer mit einer Messwellenlänge von **450 nm** messen. Sofern die höchste Extinktion der Standards (**STD**) den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte die Messung sofort bei einer Messwellenlänge von **405 nm** wiederholt und diese Ergebnisse für eine Auswertung herangezogen werden. Wenn möglich, sollten bei jeder Messung die Extinktionen einer Referenzwellenlänge verglichen werden. Zulässige Referenzwellenlängen sind z.B.: 595 nm, 620 nm, 630 nm, 650 nm und 690 nm.

*Der oben genannte Inkubationsschritt unter Schütteln bei 2-8°C ist vom Hersteller empfohlen. Besteht keine Möglichkeit bei 2-8°C zu schütteln, empfehlen wir die Inkubation bei 2-8°C ohne schütteln.

**Die Intensität der Farbentwicklung ist temperaturabhängig. Es wird empfohlen, den Farbumschlag während der Inkubationszeit zu beobachten und entsprechend der Farbentwicklung die Reaktion zu stoppen.