

Serologiske markører ved inflammatorisk tarmsykdom

Prosjektoppgave, medisinstudiet i Oslo, april '07
av stud.med. Beate Benestad, V-02

Veileder: Camilla Solberg,
Gastromedisinsk avd., UUS

Sensor: Idar Lygren,
Gastromedisinsk avd., UUS

Takk for god hjelp til Per Ivar Gaarder,
Immunologisk seksjon, Patol. avd., UUS!

ABSTRACT

SEROLOGICAL MARKERS IN INFLAMMATORY BOWEL DISEASES

Background – Correct diagnosis of inflammatory bowel disease (IBD), especially the differentiation between Crohn`s disease (CD) and ulcerative colitis (UC), is highly important toward treatment and prognosis. Serological markers are noninvasive diagnostic tools that could be of value in differentiating CD from UC, and in the identification of IBD cases. Perinuclear antineutrophil cytoplasmic autoantibodies (pANCA) have been suggested as a serological marker for UC, and anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies (ASCA) have been suggested as a serological marker for CD. Variable prevalences have been reported from different countries. The prevalence of these markers has not yet been studied in a Norwegian cohort of patients with established IBD.

Aims – To examine the prevalence and diagnostic value of serologic markers in a Norwegian cohort of patients with established IBD, using a group of patients with non-IBD illnesses as controls. In addition, we wanted to examine whether these antibodies could be related to a specific clinical phenotype or course of disease in IBD.

Methods – Sera from 173 patients with established IBD and 170 patients with non-IBD illnesses were evaluated for the presence of ASCA and pANCA. Immune marker status was determined by investigators blinded to clinical characteristics, and all clinical variables were extracted retrospectively from hospital records by one investigator.

Results – ASCA was positive in 48% of CD vs. 17% in UC, $p < 0.001$. On the other hand pANCA was positive in 43% of UC as compared to 16% of CD, $p < 0.001$. These figures are lower compared to most previous studies. The highest specificity for differentiating CD from UC was achieved using the combination of both markers. The combination of ASCA+/pANCA-, had a specificity for CD of 89%, whereas pANCA+/ASCA- had a specificity for UC of 88%. Using multiple regression analyses, ASCA in CD patients were shown to be independently associated with early age of disease onset and small bowel disease as well as fibrostenosing and penetrating disease behaviours.

Conclusions – pANCA and ASCA testing are specific but not sensitive for UC and CD. We found prevalences of the serological markers that were lower than in most studies from other countries. ASCA seems to be a prognostic risk factor for complications in CD. Thus ASCA may prove useful in determining subgroups that would benefit from a more aggressive medical treatment early in the course of CD.

Introduksjon

Inflammatorisk tarmsykdom, dvs. ulcerøs colitt (UC) og Crohns sykdom (CD), er beslektede kroniske betennelsestilstander i gastrointestinaltractus av ukjent årsak. Sykdommene rammer unge voksne, og er preget av betydelig variasjon når det gjelder initialt sykdomsbilde og forløp. Det kliniske forløpet har vært vanskelig å forutsi ut fra symptomer ved diagnostetidspunktet, og det har vært vanskelig å finne sikre prognostiske faktorer. Selv om UC og CD har kliniske likhetstrekk, kan de ha svært ulik prognose, noe som kan ha stor betydning for behandlingen, spesielt i forbindelse med kirurgi. Det er derfor viktig å skille mellom tilstandene, helst på et tidlig tidspunkt i forløpet.

Tradisjonelt er UC og CD blitt diagnostisert etter klinisk sykdomsbilde, endoskopiske og/eller radiologiske funn samt histologi fra tarmslimhinnen.¹ I enkelte tilfeller kan det være problematisk å differensiere mellom UC og CD. Spesielt er dette vanskelig der betennelsen kun affiserer tykktarmen (colitt). Hos ca 10 % klarer man ikke å skille mellom UC og Crohns colitt med de overfor nevnte undersøkelsene, og disse pasientene får diagnosen uklassifiserbar colitt (indeterminate colitis, IC).² Ytterligere 8-10 % av pasientene med inflammatorisk tarmsykdom (inflammatory bowel disease, IBD) feildiagnostiseres, og får endret diagnose i løpet av sykdomsperioden.³ Det har derfor lenge vært ønskelig å finne supplerende metoder for å fastslå en sikrere diagnose tidlig i sykdomsforløpet.

Det er påvist flere sirkulerende antistoffer hos pasienter med IBD. De mest kjente er perinukleære antinøytrifile cytoplasma-antistoffer (pANCA) og anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies (ASCA). ASCA og pANCA har i tidligere studier vært foreslått som serologiske markører for hhv. CD og UC.⁴ ASCA ble for første gang beskrevet ved CD av Main et al. på slutten av 1980-tallet.⁵ Dette er en gruppe antistoffer mot mannosekomponenter i celleveggen til gjærcellen *Saccharomyces cerevisiae*.⁶ Prevalensen av ASCA har vært rapportert fra 48 til 69% ved CD, og fra 5 til 15% ved UC.⁷ Studier har vist en sammenheng mellom positiv ASCA ved CD og sykdom i tynntarm, ung alder ved sykdomsdebut, og komplikasjoner som stenoserende og penetrerende sykdom.^{8,9} ASCA-titre har dessuten vist seg relativt stabile over tid, og endres trolig ikke med sykdomsaktivitet.¹⁰

ANCA er en gruppe antistoffer mot cytoplasmatiske proteiner i nøytrifile granulocytter. Etter fargingsmønsteret i indirekte immunfluorescenssteknikk deles ANCA inn i pANCA, som farger granulocyttytoplasma perinukleært, og cANCA, som farger hele cytoplasmaet. Hovedantigenet for pANCA er myeloperoxidase (MPO), men en rekke andre cytoplasmaproteiner er også beskrevet som antigene mål for pANCA, f.eks. elastase, katepsin G og laktoferrin. pANCA er assosiert med organbegrensede vaskulitter, spesielt raskt progredierende glomerulonefritt.¹¹ pANCA, hovedsakelig med en annen spesifisitet enn anti-MPO, er beskrevet i serum hos 45 til 82% av pasientene med UC, men bare hos 2 til 28% av pasientene med CD.⁷ pANCA-produksjon ved UC er i en studie vist å finne sted i mucosa i colon.¹²

Studier fra flere land har vist nokså stor variasjon i prevalens av ASCA og pANCA i de ulike IBD-populasjonene.¹³⁻¹⁷

Det er ikke tidligere publisert studier som beskriver forekomst og betydning av serologiske markører ved IBD i Norge. Hovedformålet med denne studien er derfor å undersøke prevalensen av pANCA og ASCA i en norsk sykehusbasert kohorte. Studien er gjort som en kvalitetssikringsstudie, for å se på nytteverdien av disse serologiske testene for å skille

mellom UC og CD i en pasientkohorte med kjent IBD, samt for å skille mellom inflammatorisk tarmsykdom og ikke-IBD. I tillegg ville vi undersøke om pANCA og ASCA er assosiert med spesiell klinisk presentasjon og -forløp av IBD.

Materiale og metode

Pasientpopulasjon

Alle pasienter som tok blodprøver for serologisk testing av ANCA og ASCA ved gastromedisinsk poliklinikk ved Ullevål universitetssykehus i perioden 01.01.2003 til 31.12.2005 utgjør studiepopulasjonen. Dette inkluderer pasienter med kjent IBD-diagnose (UC, n=64, CD, n=93, IC, n=16) som tok prøver i forbindelse med rutinekontroller. I tillegg inkluderer det 170 pasienter som viste seg å ikke ha IBD. Disse fungerte som en kontrollgruppe. Indikasjon for henvisning av ikke-IBD-pasienter er gitt i tabell 1. Hos ni pasienter ble det tatt flere sett med prøver, hvor verdiene var ulike. Hos disse valgte vi konsekvent å bruke den prøven som var tatt nærmest opptil median sykdomsvarighet ved prøvetakning.

En undersøker (B.B.) har gått gjennom pasientenes journaler retrospektivt, for å registrere demografiske og kliniske data. Dette inkluderte diagnose, alder ved diagnose, kjønn, sykdomsvarighet før serologiske prøver, dato for siste konsultasjon ved poliklinikken, ekstraintestinale manifestasjoner og komplikasjoner som perianale og intestinale abscesser og fistler. Anatomisk lokalisasjon av sykdommene ble registrert, slik den var beskrevet i journalen ut fra endoskopiske og/eller radiologiske undersøkelser.

Lokalisasjon av sykdommen ble gruppert etter internasjonalt aksepterte kriterier. CD ble klassifisert i hht. Wienerklassifikasjon (tabell 2), og den mest alvorlige utbredelsen og sykdomstypen i observasjonsperioden ble brukt.¹⁸ UC ble klassifisert til proctitt, venstresidig colitt eller totalcolitt. Proctitt ble definert som sammenhengende betennelsesforandringer i mucosa opptil 15 cm fra anus, venstresidig colitt som betennelsesforandringer opp til venstre fleksur, og totalcolitt ble definert som forandringer over venstre fleksur.¹ For IC er det benyttet samme klassifikasjon som ved UC.

Antall, tidspunkt og type kirurgisk inngrep forbundet med IBD ble også registrert. Det samme ble intervensjon med immunmodulerende behandling (azatioprin, methotrexat, cyclosporin og anti-Tumor Nekrose Faktor- α).

Klinisk og serologisk vurdering ble gjort uavhengig av hverandre og før analyse av data. Resultatet av demografisk og klinisk vurdering er gjengitt i tabell 3. Serologiske prøver ble bestilt av leger ved gastromedisinsk avdeling i forbindelse med rutinekontrollene. De som analyserte prøvene var blindet for diagnose ved tidspunkt for vurdering. Analysene ble utført ved immunologisk institutt ved Ullevål universitetssykehus.

Serologiske analyser

Bestemmelse av pANCA i serum

ANCA ble bestemt med indirekte immunfluorescenssteknikk på humane granulocytter (NOVA LiteTM ANCA, Inova Diagnostics Inc., San Diego, California, USA). 20-25 μ l av serumprøve fortynnet 1:20 i PBS (fosfatbufret saltvann, pH 7.4) tilsettes et avgrenset område ("brønn")

med granulocytter på objektglass. I to av brønnene tilsettes 20-25 µl av hhv. positivt og negativt kontrollserum. Objektglasset inkuberes i 30 minutter i et fuktig kammer. Så vaskes serum av, og en dråpe fluoresceinmerket kaninantistoff mot humant immunglobulin G (IgG) tilsettes i hver brønn før det hele settes tilbake i fuktammeret i 30 minutter. Objektglasset vaskes igjen, dekkglass legges på, og så kan brønnene betraktes i fluorescensmikroskop. Her belyses preparatet med blått lys. Bundet fluoresceinmerket kaninantistoff, som indikerer bundet pasient-IgG, vil ses som grønn fluorescens. Ved pANCA vil fluorescensen ses perinukleært, ved cANCA i hele cytoplasma. Prøvene som er positive for pANCA testes for ANA (antinukleære antistoffer), siden disse antistoffene også kan reagere med etanolfikserte humane nøytrofile granulocytter, og det kan være umulig å se sikker forskjell på kjernefarging og perinukleær farging. Dersom prøven inneholder ANA, kan man ikke si med sikkerhet om pANCA også er til stede, og man får derfor ikke et konklusivt svar.

Anti-MPO (MPO-ANCA) og anti-PR3 (PR3-ANCA) ble bestemt kvantitativt med ELISA-kits (Wieslab™ MPO-ANCA semi quantitative kit/ Wieslab™ PR3-ANCA semi quantitative kit, Euro-Diagnostica, Lund, Sverige) med prosedyre som angitt av fabrikanten. I testen brukes mikrotitrerplater hvor veggen i brønnene er dekket med hhv. rensset MPO og rensset PR3. Brønnene inkuberes først i 30 minutter med 100 µl serumprøve fortynnet 1:80 i kitets fortynningsbuffer. Eventuelle anti-MPO- eller anti-PR3-antistoffer vil da binde seg spesifikt til vedkommende antigen i brønnen. I noen brønner på hver plate tilsettes i stedet løsning med kjent mengde antistoffer for å kunne lage en standardkurve. Deretter vaskes brønnene for å fjerne alt ubundet immunglobulin. Så tilsettes 100 µl av et enzymmerket kaninantistoff mot humant IgG, og platen inkuberes igjen i 30 minutter. Etter en ny vask av brønnene, nå for å fjerne alt ubundet kaninantistoff, inkuberes brønnene med substrat-løsning som inneholder pNPP (p-nitrophenol phosphatase) i 60 minutter. Enzymet kaninantistoffet er merket med er alkalisk fosfatase, som spalter pNPP til en farget forbindelse. Mengden bundet pasient-IgG korrelerer med fargeintensiteten og måles i absorbans (OD, optical density). Absorbansen leses av ved 405 nm, regnes ut mot en standardkurve, og resultatene gis i enheter pr ml (U/ml). For anti-MPO ble verdier >25 U/ml regnet som positive, 20-25 U/ml som grenseverdi og <20 U/ml som negative. For anti-MPO var grensene hhv. >20 U/ml, 10-20 U/ml og <10 U/ml.

Bestemmelse av IgA- og IgG-ASCA i serum

IgA- og IgG-ASCA ble bestemt kvantitativt med ELISA-kits (Wieslab™ ASCA IgA/IgG semi quantitative kit, Euro-Diagnostica, Lund, Sverige), med prosedyre som angitt av fabrikanten. I testen brukes mikrotitrerplater hvor veggen i brønnene er dekket med rensset mannan fra *Saccharomyces cerevisiae*. Testingen foregår som for anti-MPO og -PR3, bortsett fra at konjugatet består av alkalisk fosfatase-merkede antistoffer mot hhv. humant IgA og humant IgG. IgA-ASCA ble regnet som positiv ved verdi >10 U/ml, grenseverdi ved 8-10 U/ml og som negativ ved verdi <8 U/ml. For IgG-ASCA var grensene >25 U/ml, 20-25 U/ml og <20 U/ml.

Statistisk analyse

Statistisk analyse ble utført ved hjelp av SPSS (Statistical software package, Chicago, Illinois), versjon 14.0. Sammenlikning mellom frekvenser av kategoriske variabler ble analysert ved hjelp av Pearson's chi square test (χ^2), eller Fisher's exact test der antallet i en av gruppene var under fem. Kontinuerlige variabler ble sammenliknet ved hjelp av non-parametrisk Mann-Whitney Wilcoxon's test.

Sensitivitet ble regnet som sannsynligheten for at en som var syk testet positivt på prøven. Spesifisitet ble regnet som sannsynligheten for at en som var frisk testet negativt. Positiv prediktiv verdi (PPV) ble definert som sannsynligheten av å være affisert av sykdommen hos en pasient med positivt prøveresultat. ($PPV = \frac{\text{sant positive}}{\text{sant positive} + \text{falskt positive}} \times 100$.) Negativ prediktiv verdi (NPV) ble definert som sannsynligheten for å ikke være affisert av sykdommen hos en pasient med negativ prøve. ($NPV = \frac{\text{sant negative}}{\text{sant negative} + \text{falskt negative}} \times 100$.) Dette avhenger av prevalensen i populasjonen som testes, og kan bestemmes ved hjelp av Bayes teorem om avhengige sannsynligheter.

Multipel logistisk regresjonsanalyse ble utført for å undersøke hvilke kategoriske variabler som var uavhengig assosiert med forekomst av ASCA ved CD. Resultatene er oppgitt som korrigerte odds ratio (OR) med 95 % konfidensintervall (KI). P-verdier <0.05 ble regnet som statistisk signifikante.

Resultater

343 pasienter ble inkludert i studien. pANCA ble testet hos alle pasientene, men ikke alle prøver var konklusive (se tabell 4). Årsaken til dette er sannsynligvis at prøvene inneholdt ANA. Andelen med konklusive pANCA-prøver var 73 % i UC-, 82 % i CD-, 94 % i IC- og 94 % i ikke-IBD-gruppen. Pasientene med konklusive prøver danner grunnlaget for analysene av prevalenstallene, mens ikke-konklusive prøver er medregnet ved utregning av sensitivitet, spesifisitet, PPV og NPV.

ASCA var tatt hos 94 % av UC-, 100 % av CD-, 94 % av IC- og 60 % av ikke-IBD-pasientene (se tabell 4). Når det gjelder kliniske opplysninger (tabell 3), manglet det informasjon angående alder ved diagnose for tre pasienter med UC, én med CD, én med IC og tre pasienter med ikke-IBD. Videre manglet det informasjon om sykdomslokalisasjon for fire pasienter med UC og tre pasienter med IC. En av pasientene med CD manglet dessuten informasjon om sykdomstype.

Prevalens av ASCA og pANCA

Figur 1 viser prevalens av total-ASCA (IgA, IgG eller begge) i pasientkohorten. Det var signifikant flere ASCA-positive pasienter med CD enn med UC (48 % vs. 17 %, $p<0.001$) og ved CD sammenliknet med ikke-IBD (48 % vs. 14 %, $p<0.001$). Det var også flere ASCA-positive blant CD- enn blant IC-pasientene (48 % vs. 20 %, $p=0.051$), men antallet pasienter i IC-gruppen var lavt ($n=15$).

Figur 2a og 2b viser kvantitative verdier av IgA- og IgG-ASCA i pasientkohorten. Det var signifikant høyere medianverdi av IgA-ASCA ved CD i forhold til UC ($p=0.001$) og i forhold til ikke-IBD ($p<0.001$). For IgG-ASCA var det signifikant høyere medianverdi ved CD i forhold til UC ($p<0.001$) og ikke-IBD ($p<0.001$). Når det gjelder medianverdi av IgA-/IgG-ASCA ved CD i forhold til IC, fant vi ingen statistisk forskjell mellom gruppene, ($p=0.100$ for begge).

Figur 3 viser prevalens av pANCA i pasientkohorten. Det var signifikant flere pANCA-positive ved UC enn ved CD (43% vs. 16%, $p=0.001$). Det var også signifikant flere pANCA-positive ved UC enn ved IC (43% vs. 7%, $p=0.001$) og ikke-IBD (43% vs. 4%, $p<0.001$).

ASCA og pANCA som diagnostiske markører

Tabell 5 viser den prediktive verdien til ASCA og pANCA, både enkeltvis og i kombinasjon, for å skille pasienter med IBD fra ikke-IBD. Spesifisiteten var minst 86 % for alle prøvene, men sensitiviteten var gjennomgående lav (31 % -53 %). Den høyeste positive prediktive verdien (PPV) for å skille UC fra ikke-IBD ble funnet ved kombinasjonen pANCA+/ASCA- (89 %), mens for CD var det høyest PPV (76 %) for ASCA alene.

Tabell 6 viser den prediktive verdien til hver av testene når det gjelder å skille mellom UC og CD. pANCA hadde en sensitivitet på 31 % og en spesifisitet på 87 % for å skille UC fra CD, mens ASCA hadde sensitivitet på 53 % og spesifisitet på 82 % for å skille CD fra UC. Høyest spesifisitet (89 %) og PPV (88 %) for å skille CD fra UC ble oppnådd ved å bruke kombinasjonene av ASCA og pANCA.

ASCA og pANCA i forhold til klinisk presentasjon av CD

Tabell 7 viser en oversikt over kliniske karakteristika ved CD i forhold til ASCA-positivitet. Det var ingen signifikant forskjell mellom menn og kvinner når det gjaldt forekomsten av ASCA, 54% vs. 45%. Av dem som fikk diagnosen innen fylte 40 år var det flere ASCA-positiv enn blant dem med diagnose etter 40 år, (54 % vs. 27 %, $p=0.027$).

Videre var ASCA positiv hos 58 % av pasienter med ren tynntarmssykdom, 21 % av dem med ren tykktarmssykdom (colitt) og 63 % av dem med både tynn- og tykktarmssykdom (ileocolitt). Det var signifikant flere ASCA-positiv i gruppen med ren tynntarmssykdom enn i gruppen med colitt, ($\chi^2=7.9$, $p=0.005$). Det var også signifikant flere ASCA-positiv i ileocolitt- enn i colittgruppen, ($\chi^2=11.9$, $p=0.001$). Forskjellen mellom ren tynntarmssykdom og ileocolitt var ikke signifikant (se tabell 7).

Av dem med ren inflammatorisk sykdom hadde 33 % positiv ASCA, mot 62 % av dem med strikturerende sykdom og 68% av dem med penetrerende sykdom. Det var signifikant flere ASCA-positiv blant pasienter med hhv. strikturerende ($\chi^2=5.2$, $p=0.023$) og penetrerende sykdom ($\chi^2=7.8$, $p=0.005$) enn blant dem med ren inflammatorisk sykdom. Det var derimot ingen signifikant forskjell i forekomst av ASCA mellom gruppen med strikturerende i forhold til penetrerende sykdom (se tabell 7).

ASCA var positiv hos 62 % av dem med perianale abscesser eller fistler, mot 78 % av dem med interne abscesser eller fistler. Denne forskjellen var ikke statistisk signifikant ($p=0.318$), men på grunn av små grupper, er risikoen for type II-feil stor. Kvantitative verdier av IgG hos CD-pasienter i forhold til lokalisasjon, sykdomstype og alder ved diagnose er vist i figurene 3a til 3c.

Når det gjelder pANCA ved CD var prøven positiv hos 5 % (1/22) av dem med ren tynntarmssykdom, 13 % (4/32) av dem med ileocolitt og 32 % (7/22) av dem med colitt. Det var ingen signifikante forskjeller mellom gruppene.

pANCA i forhold til klinisk presentasjon av UC

Det var ingen statistisk forskjell mellom kvinner og menn med UC når det gjelder forekomst av pANCA. pANCA var positiv hos 39 % (9/23) av kvinnene og 46 % (11/24) av mennene, ($\chi^2=0.22$, $p=0.770$). Det var ingen forskjell i median alder ved diagnose i forhold til forekomst av pANCA, (negativ prøve 37 år vs. positiv prøve 32 år, $p=0.294$).

Ingen av UC-pasientene (0/4) med proctitt hadde positiv pANCA, mens 31% (4/13) av dem med venstresidig colitt hadde positiv prøve, og 54% (15/28) av dem med totalcolitt. Det var imidlertid ingen statistisk signifikant forskjell mellom gruppene.

ASCA og pANCA som prognostiske markører

ASCA var positiv hos 82 % (23/28) av CD-pasienter som fikk gjort minst én tarmreseksjon, mot 34 % (22/64) av pasienter som ikke ble operert, ($\chi^2=16.1$, $p<0.001$). Derimot var det ingen statistisk forskjell i forekomst av pANCA mellom opererte og ikke-opererte CD-pasienter, (11 % (3/27) vs. 18 % (9/49), $p=0.521$).

Av CD-pasienter som fikk immunsuppressiv behandling (azatioprin eller methotrexate) var 58 % (28/48) ASCA-positiv, mot 36 % (16/44) av dem som ikke fikk slik behandling, ($\chi^2=4.4$, $p=0.040$). Blant CD-pasienter som fikk behandling med anti-TNF- α var 65 % (11/17) ASCA-positiv, mot 44 % (33/75) som ikke fikk slik behandling, ($\chi^2=2.4$, $p=0.179$).

Når det gjelder UC var pANCA positiv hos 33 % (2/6) av pasienter som fikk utført colectomi, mot 45 % (17/38) av dem som ikke fikk utført et slikt inngrep, ($p=0.684$). Det var ingen forskjell mellom UC-pasienter som fikk immunsuppressiv behandling (16/64) og dem som ikke fikk det, (46 % vs. 41 %, $p=1.000$). I dette materialet var det kun én UC-pasient som fikk behandling med anti-TNF- α , og denne pasienten var pANCA-negativ.

Tabell 8 viser variabler uavhengig assosiert med positiv ASCA ved CD. Pasienter som var under 40 år gamle ved diagnosetidspunktet ($p=0.045$) og pasienter som fikk utført tarmreseksjon ($p=0.003$) hadde forhøyet risiko for ASCA-positivitet. Pasienter med ren tykktarmssykdom hadde derimot lavere risiko for ASCA-positivitet, ($p=0.012$). På grunn av signifikant korrelasjon mellom strikturerende/penetrerende sykdom og tarmreseksjon ($p<0.001$), ble sykdomstype ekskludert som uavhengig risikofaktor i denne multiple regresjonsanalysen.

Diskusjon

Det er tidligere vist stor variasjon i forekomsten av serologiske markører ved inflammatorisk tarmsykdom mellom ulike land (se tabell 9). Vår studie er så langt vi har kunnskap om den første som beskriver forekomst av ASCA og pANCA i en norsk IBD-kohorte. Et av hovedfunnene i denne studien er at vi finner lavere prevalens av pANCA ved UC (43 %) enn i de fleste andre materialer (45 % til 82 %), mens prevalensen av ASCA (48 %) ligger i nedre område i forhold til tidligere studier (48 % til 69 %).⁷ Dette funnet kan ikke forklares ut fra forskjeller i forekomst av IBD i befolkninger, idet Norge har en av de høyeste forekomstene av IBD i verden.^{2;19} Variasjoner i prevalens av serologiske markører mellom befolkningsgrupper kan derimot skyldes forskjeller i genetiske- og/eller miljøfaktorer. I en tidligere studie har det vært påvist ulik prevalens av mutasjon i NOD 2-genet, som er assosiert

med disposisjon for CD, i en norsk vs. en tysk kohorte.²⁰ Én av forklaringene på dette kan nettopp være at det foreligger genetiske forskjeller mellom CD-populasjoner. Som nevnt kan også miljøfaktorer spille en viktig rolle for prevalensen av serologiske markører, spesielt gjelder dette ASCA, som finnes i en rekke matvarer, deriblant bakegjær. Variasjon i serologiske markører kan også skyldes ulikheter i analysemetoder og cut-off-verdier. Sandborn et al. har undersøkt samsvar mellom ulike laboratorier når det gjelder pANCA- og ASCA-bestemmelse. De konkluderte med at laboratoriene varierte mye i forekomsten av pANCA, mens det var relativt godt samsvar mellom funnene når det gjaldt ASCA.⁴

Det er tidligere antydnet at spesifisiteten for ASCA og pANCA bør ligge over 85 % for at de skal ha nytteverdi som diagnostiske markører ved IBD.⁴ I vår studie hadde ASCA og pANCA, både enkeltvis og i kombinasjon, spesifisitet på minst 86 % for å skille IBD fra ikke-IBD. Imidlertid viste begge prøvene lav sensitivitet og positiv prediktiv verdi for å skille pasienter med IBD fra dem som ikke har IBD. Våre resultater bekrefter dermed konklusjoner som er trukket i tidligere studier, at ASCA og pANCA ikke er egnet som screeningverktøy i befolkningen. Lav positiv prediktiv verdi av prøvene kombinert med lav prevalens av IBD i befolkningen ville ha medført mange falske positive prøveresultater.

Sensitiviteten for ASCA og pANCA for å skille mellom CD og UC var lav i denne studien. Imidlertid var spesifisiteten for hhv. ASCA ved CD (82 %) og pANCA ved UC (87 %) relativt god, slik at prøvene har en viss nytteverdi for å skille mellom UC og CD hos pasienter med kjent IBD. Våre resultater understøtter tidligere studier som har vist at spesifisiteten blir høyest ved å kombinere prøvene.⁷ Dette gav i vår studie en spesifisitet for kombinasjonen ASCA+/pANCA- på 89 % for CD, og en spesifisitet for pANCA+/ASCA- på 88 % for UC.

For å hindre utvikling av komplikasjoner har det i den senere tiden vært fokusert på tidlig, aggressiv behandling av CD. Imidlertid har det vært vanskelig å identifisere hvilke pasientgrupper som kan ha nytte av slik tidlig intervensjon. Vi fant en høyere forekomst av ASCA blant CD-pasienter med sykdomsdebut i ung alder og ved sykdom i tyntarm. I tillegg var ASCA assosiert med stenoserende og penetrerende sykdom, og med behov for tarmreseksjon. Våre resultater bekrefter dermed tidligere studier som indikerer at ASCA kan være én prognostisk markør for komplisert CD.^{8;9}

Vi fant en negativ assosiasjon mellom ASCA og sykdom i tykktarm ved CD. Dette understøtter tidligere funn som tyder på at ASCA er lite egnet i differentialdiagnostikken mellom Crohns colitt og ulcerøs colitt. I praksis er denne problemstillingen viktig, spesielt i tvilstilfeller hvor det er aktuelt med colectomi. Tidligere studier har videre vist at positiv pANCA ved CD er assosiert med en mer UC-liknende fenotype²¹, men vår studie var for liten til å undersøke pANCA i forhold til subgrupper ved CD.

Ved UC fant vi ingen signifikant sammenheng mellom pANCA og alder ved sykdomsdebut eller alvorlighetsgrad av sykdom. Dette er i overensstemmelse med tidligere studier^{22;23}, men på grunn av et relativt begrenset pasientmateriale og få positive prøver, er det risiko for type II-feil i våre statistiske beregninger.

En av årsakene til at pasientmaterialet ble så begrenset, er at pANCA ikke var konklusiv i en stor andel av våre prøver. Dette skyldes vanligvis funn av ANA i prøven. ANA kan ikke med sikkerhet skilles fra pANCA, og prøven blir derfor ikke konklusiv. Dette kan påvirke prevalenstallet noe, i og med at det er sannsynlig at noen pasienter med ANA også vil være pANCA-positive. I enkelte tidligere studier har det blitt brukt formalinfiksering på prøver der man har funnet ANA, fordi dette gjør den nøytrofile cellemembranen permeabel for

antistoffer, men ikke for proteiner.¹⁰ Ved litteraturgjennomgang er det få studier som har beskrevet hvorvidt de har foretatt slik testing. Dette kan vanskeliggjøre sammenlikning av resultater fra ulike studier.

Vår kontrollgruppe med ikke-IBD omfatter pasienter med gastrointestinale sykdommer som infektøs colitt, divertikulitt og liknende. En studie av Peeters et al. viste en økt forekomst av ASCA hos pasienter med ikke-IBD-relaterte diaréesykdommer (10.8%) sammenliknet med friske kontrollpersoner (3.2%).²³ Det kan derfor tenkes at vår kontrollgruppe har en høyere forekomst av ASCA og pANCA enn befolkningen for øvrig. På den annen side er det en slik pasientgruppe man i praksis undersøker med tanke på IBD.

En av svakhetene ved vår studie er at vi ikke kan si noe om pasientene med IC, fordi det var for få pasienter i denne gruppen (n=16). Og selv om pasientantallet var høyere i de andre gruppene, ble antallet i hver gruppe begrenset da vi delte dem opp i forskjellige undergrupper. Dette øker risikoen for å ikke påvise sammenhenger som faktisk er til stede (statistisk type II-feil). Det at vi allikevel fant en sammenheng mellom ASCA og de forskjellige subgruppene av CD, styrker dette resultatet. Andre begrensninger ved vår studie er at den er sykehusbasert og at den ikke består av nydiagnostiserte tilfeller (median alder fra sykdomsdebut til prøvetakning var tre år for både UC- og CD-gruppen). Dette kan blant annet medføre at vi har en selektert pasientkohorte med mer aktiv sykdom.

Konklusjon

Vår studie antyder at prevalensen av ASCA og pANCA hos norske IBD-pasienter er lavere enn i de fleste andre populasjoner, noe som kan skyldes forskjeller i genetikk og/eller miljø. ASCA og pANCA ser derfor ut til å ha mer usikker betydning for differentialdiagnostiseringen mellom UC og CD i denne kohorten. Den negative assosiasjonen mellom ASCA og tykktarmssykdom ved CD gjør dessuten prøven lite egnet der man i praksis har størst behov for den; for å skille mellom Crohn- og ulcerøs colitt. Positiv ASCA var sterkt assosiert med ung debutalder og tarmreseksjon ved CD. Dette antyder at ASCA er en prognostisk risikofaktor, og at den kan brukes i vurderingen av hvilke pasienter som trenger mer aggressiv medikamentell behandling tidlig i forløpet. I og med at vår studie er basert på et noe begrenset pasientmateriale, bør funnene bekreftes med en større studie i Norge.

Indikasjon for serologisk prøve, ikke-IBD (n= 170)	
Magesmerter eller diaré	144 (85%)
Symptomer fra hud eller ledd	29 (17%)
Vekttap	10 (6%)
Jernmangelanemi eller B12-mangel eller positiv Hemofec	8 (5%)
Familiær forekomst av IBD	2 (1%)
Annen indikasjon	1 (1%)
Ukjent indikasjon	14 (8%)

Tabell 1.

Årsak til henvisning til gastromedisinsk poliklinikk og serologisk prøvetakning hos ikke-IBD-pasientene. En pasient kan være registrert i flere kategorier.

Alder ved diagnose	A1, < 40 år A2, ≥ 40 år
Lokalisasjon	L1, terminale ileum L2, colon L3, ileocolon L4, øvre gastrointestinal-tractus
Sykdomstype	B1, ikke-strikturerende, ikke-penetrerende B2, strikturerende B3, penetrerende

Tabell 2.

Wienerklassifikasjon, klassifikasjonssystem for Crohns sykdom.

VARIABLER	UC (n=64)	CD (n=93)	IC (n=16)	Ikke-IBD (n=170)
Sykdomsvarighet (år)				
Median	3	3	0	0
Range	0-42	0-49	0-12	0-38
Kjønn				
Kvinne	31 (48,4%)	56 (60,2%)	11 (68,8%)	95 (55,9%)
Mann	33 (51,6%)	37 (39,8%)	5 (31,3%)	75 (44,1%)
Alder ved diagnose (år)				
Median	32	30	30	33
Range	18-82	10-83	25-88	12-88
Manglende data	3	1	1	3
Alder ved diagnose (Wienerklassifikasjon)				
<40 år		70 (75,3%)		
≥ 40 år		22 (23,7%)		
Manglende data		1 (1,0%)		
Sykdomslokalisasjon				
L1 (term.ileum)		17 (18,3%)		
L2 (colon)		29 (31,2%)		
L3 (Ileocolon)		40 (43,0%)		
L4 (Øvre GI)		7 (7,5%)		

Proctitt	18 (28,1%)	-		
Ve.sidig colitt	20 (31,3%)	8 (50,0%)		
Totalcolitt	22 (34,4%)	5 (31,3%)		
Manglende data	4 (6,2%)	-	3 (18,7%)	
Sykdomstype (Wienerklassifikasjon)				
B1 (ikke strikturerende eller penetrerende)		49 (52,7%)		
B2 (strikturerende, men ikke penetrerende)		21 (22,6%)		
B3 (penetrerende; fistel eller abscess)		22 (23,7%)		
Manglende data		1 (1,0%)		
Fistel/abscess				
Perianal	2 (3,1%)	13 (14%)	2 (12,5%)	1 (0,6%)
Intestinal	-	9 (9,7%)	-	-

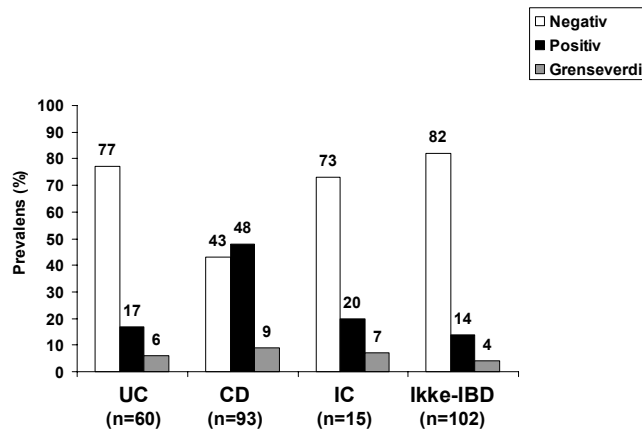
Tabell 3.

Kliniske og demografiske data for studiepopulasjonen.

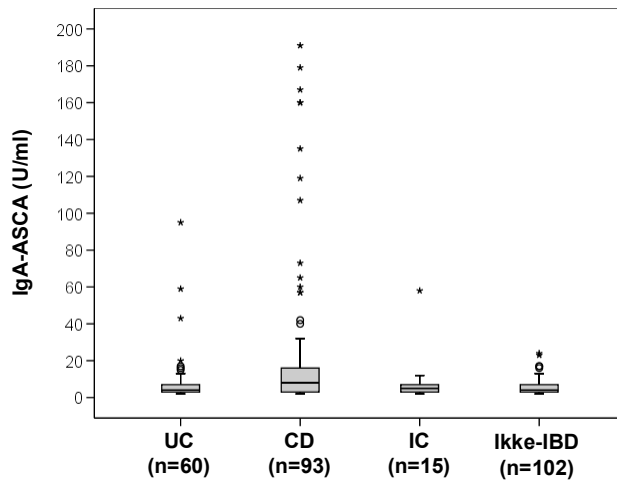
	Tatt prøve	Konklusive prøver
UC(n=64)		
ASCA	94% (60/64)	Alle
pANCA	Alle	73% (47/64)
CD (n=93)		
ASCA	Alle	Alle
pANCA	Alle	82% (76/93)
IC (n=16)		
ASCA	94% (15/16)	Alle
pANCA	Alle	94% (15/16)
Ikke-IBD (n=170)		
ASCA	60% (102/170)	Alle
pANCA	Alle	94% (159/170)

Tabell 4. Andelen av de ulike sykdomsgruppene som hadde tatt ASCA(IgA og IgG-) og pANCA-prøver. Andel vurderbare prøver.

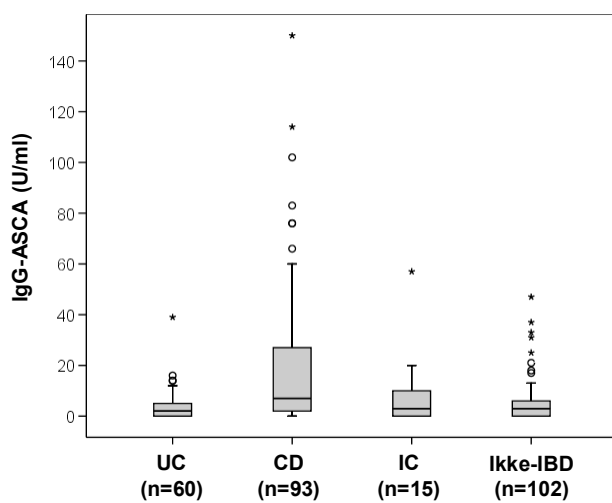
Figur 1. Prevalens av total-ASCA (IgA, IgG eller begge) i studiepopulasjonen.



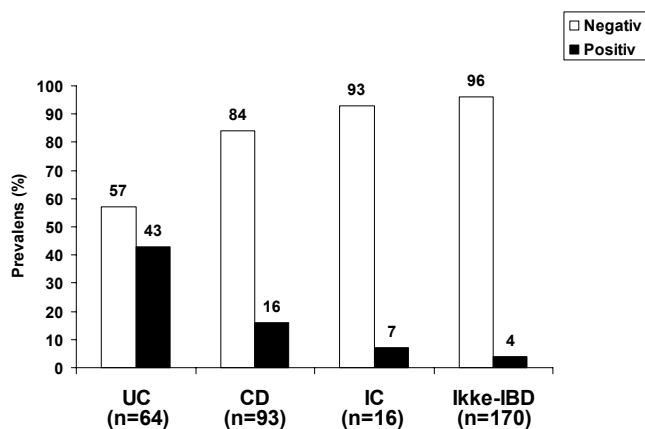
Figur 2a. Kvantitativ verdi av IgA-ASCA i de ulike pasientgruppene.



Figur 2b. Kvantitativ verdi av IgG-ASCA i de ulike pasientgruppene.



Figur 3. Prevalens av pANCA i studiepopulasjonen.



	Sensitivitet	Spesifisitet	PPV	NPV
ASCA+ (CD)	0.53	0.86	0.76	0.68
pANCA+ (UC)	0.31	0.96	0.74	0.79
ASCA+/pANCA- (CD)	0.47	0.86	0.72	0.68
pANCA+/ASCA- (UC)	0.38	0.98	0.89	0.77

Tabell 5.

Nøyaktigheten ved ANCA og ASCA for å skille UC (n= 64) eller CD (n=93) fra kontrollgruppen (ikke-IBD, n=170).

	Sensitivitet	Spesifisitet	PPV	NPV
ASCA+ (CD)	0.53	0.82	0.82	0.53
pANCA+ (UC)	0.31	0.87	0.63	0.65
ASCA+/pANCA – (CD)	0.47	0.89	0.88	0.50
pANCA+/ASCA- (UC)	0.38	0.88	0.65	0.71

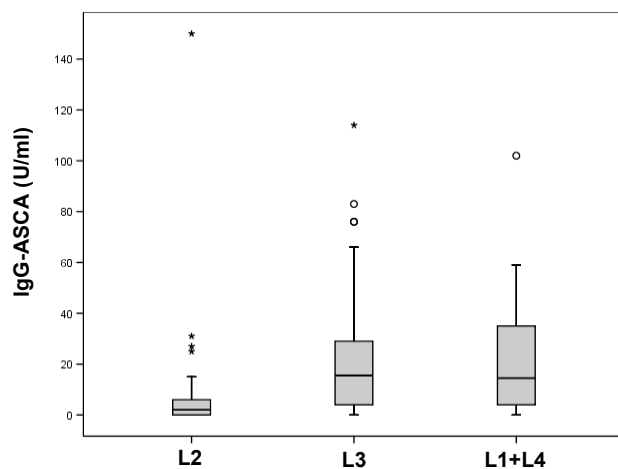
Tabell 6.

Nøyaktigheten ved ANCA og ASCA for å skille mellom UC (n=64) og CD (n=93).

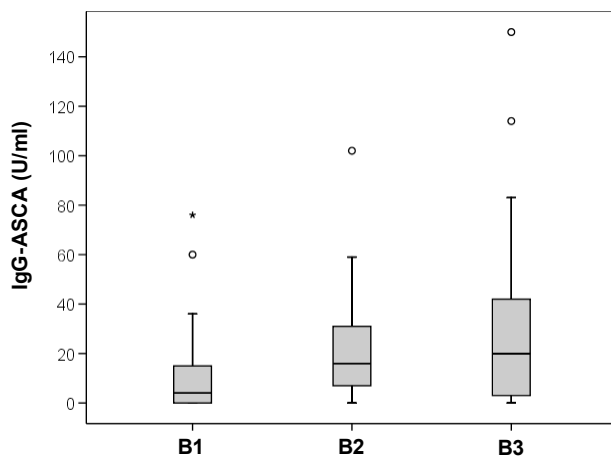
Variabel	Totalt antall pasienter	ASCA (IgA, IgG eller begge) +	p-verdi
Kjønn			
Kvinne	56	25 (45%)	Ikke signifikant
Mann	37	20 (54%)	
Alder			
< 40 år ved diagnose (A1)	70	38 (54%)	0.027
> 40 år ved diagnose (A2)	22	6 (27%)	
Lokalisasjon			
Ren tykktarm (L2)	29	6 (21%)	Ref.
Ren tynntarm (L1 og L4)	24	14 (58%)	0.005
Tynntarm og tykktarm (L3)	40	25 (63%)	0.001
Sykdomstype			
Ren inflammatorisk (B1)	49	16 (33%)	Ref.
Strikturerende (B2)	21	13 (62%)	0.023
Penetrerende (B3)	22	15 (68%)	0.005
Fisteltype			
Intern	9	7 (78%)	Ikke signifikant
Perianal	13	8 (62%)	

Tabell 7. Klinisk karakteristikk av pasienter med Crohns sykdom i forhold til ASCA-positivitet. Ref. = referanseverdi.

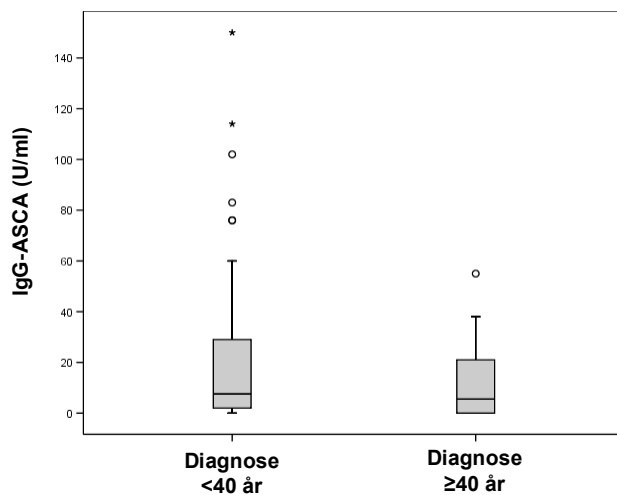
Figur 3a. Kvantitativ verdi av IgG-ASCA hos pasienter med CD i forhold til sykdomslokalisasjon etter Wienerklassifikasjonen. L2: Kun tykktarm, L3: Både tynn- og tykktarm, L1+L4: Kun tynntarm.



Figur 3b. Kvantitativ verdi av IgG-ASCA hos pasienter med CD i forhold til sykdomstype etter Wienerklassifikasjonen. B1: Ren inflammatorisk sykdom, B2: Strikturerende, men ikke penetrerende sykdom, B3: Penetrerende sykdom.



Figur 3c. Kvantitativ verdi av IgG-ASCA hos pasienter med CD i forhold til alder ved diagnose, Wienerklassifikasjonen. Diagnose <40 år : A1, diagnose ≥40 år: A2.



Variabel	Odds Ratio	95% KI	p-verdi
Alder			
<40 år ved diagnose (A1)	1	Ref.	
≥40 år ved diagnose (A2)	0.30	0.09-0.97	0.045
Lokalisasjon			
Ren tynntarm (L1 og L4)	1	Ref.	
Ren tykktarm (L2)	0.18	0.05-0.68	0.012
Tynn- og tykktarm (L3)	0.96	0.30-3.07	Ikke signifikant
Tarmreseksjon			
Nei	1	Ref.	
Ja	6.2	1.90-20.44	0.003

Tabell 8. Uavhengige risikofaktorer for positiv ASCA ved CD med korrigerede odds ratio (OR) og 95% konfidensintervall (KI). Ref. = referanseverdi.

	Forfattere	Sensitivitet (%)	Spesifisitet (%)	PPV (%)
pANCA+ ved UC	Quinton et al. (Frankrike) ²⁴	65	85	74
	Peeters et al. (Belgia) ²³	50	94	76
	Koutrobakis et al. (Hellas) ¹⁴	67	84	93
	Sandborn et al. (USA) ⁴	63	75	72
ASCA+ ved CD	Quinton et al. (Frankrike) ²⁴	61	88	89
	Peeters et al. (Belgia) ²³	60	86	92
	Koutrobakis et al. (Hellas) ¹⁴	39	89	54
	Sandborn et al. (USA) ⁴	44	87	76

Tabell 9. Forekomst av ASCA og pANCA i ulike studier.

Reference List

1. Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand.J.Gastroenterol Suppl* 1989;170:2-6.
2. Moum B, Vatn MH, Ekbom A, Aadland E, Fausa O, Lygren I et al. Incidence of ulcerative colitis and indeterminate colitis in four counties of southeastern Norway, 1990-93. A prospective population-based study. The Inflammatory Bowel South-Eastern Norway (IBSEN) Study Group of Gastroenterologists. *Scand.J.Gastroenterol* 1996;31:362-66.
3. Moum B, Ekbom A, Vatn MH, Aadland E, Sauar J, Lygren I et al. Inflammatory bowel disease: re-evaluation of the diagnosis in a prospective population based study in south eastern Norway. *Gut* 1997;40:328-32.
4. Sandborn WJ, Loftus EV, Jr., Colombel JF, Fleming KA, Seibold F, Homburger HA et al. Evaluation of serologic disease markers in a population-based cohort of patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm.Bowel Dis.* 2001;7:192-201.
5. Main J, McKenzie H, Yeaman GR, Kerr MA, Robson D, Pennington CR et al. Antibody to *Saccharomyces cerevisiae* (bakers' yeast) in Crohn's disease. *BMJ* 1988;297:1105-06.
6. Sendid B, Colombel JF, Jacquinet PM, Faille C, Fruit J, Cortot A et al. Specific antibody response to oligomannosidic epitopes in Crohn's disease. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* 1996;3:219-26.

7. Reumaux D, Sendid B, Poulain D, Duthilleul P, Dewit O, Colombel JF. Serological markers in inflammatory bowel diseases. *Best.Pract.Res.Clin.Gastroenterol.* 2003;17:19-35.
8. Vasiliasuskas EA, Kam LY, Karp LC, Gaiennie J, Yang H, Targan SR. Marker antibody expression stratifies Crohn's disease into immunologically homogeneous subgroups with distinct clinical characteristics. *Gut* 2000;47:487-96.
9. Walker LJ, Aldhous MC, Drummond HE, Smith BR, Nimmo ER, Arnott ID et al. Anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies (ASCA) in Crohn's disease are associated with disease severity but not NOD2/CARD15 mutations. *Clin.Exp.Immunol.* 2004;135:490-96.
10. Vermeire S, Peeters M, Vlietinck R, Joossens S, Den Hond E, Bulteel V et al. Anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies (ASCA), phenotypes of IBD, and intestinal permeability: a study in IBD families. *Inflamm.Bowel Dis.* 2001;7:8-15.
11. Hagemo JS, Aasarod K, Moen T. [Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in systemic vasculitis]. *Tidsskr.Nor Laegeforen.* 2002;122:1185-88.
12. Targan SR, Landers CJ, Cobb L, MacDermott RP, Vidrich A. Perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies are spontaneously produced by mucosal B cells of ulcerative colitis patients. *J.Immunol.* 1995;155:3262-67.
13. Kim BG, Kim YS, Kim JS, Jung HC, Song IS. Diagnostic role of anti-Saccharomyces cerevisiae mannan antibodies combined with antineutrophil cytoplasmic antibodies in patients with inflammatory bowel disease. *Dis.Colon Rectum* 2002;45:1062-69.
14. Koutroubakis IE, Petinaki E, Mouzas IA, Vlachonikolis IG, Anagnostopoulou E, Castanas E et al. Anti-Saccharomyces cerevisiae mannan antibodies and antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in Greek patients with inflammatory bowel disease. *Am.J.Gastroenterol* 2001;96:449-54.
15. Linskens RK, Mallant-Hent RC, Groothuismink ZM, Bakker-Jonges LE, van de Merwe JP, Hooijkaas H et al. Evaluation of serological markers to differentiate between ulcerative colitis and Crohn's disease: pANCA, ASCA and agglutinating antibodies to anaerobic coccoid rods. *Eur.J.Gastroenterol Hepatol.* 2002;14:1013-18.
16. Moore MM, Fabricatorian D, Selby WS. Assessment and relevance of enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to Saccharomyces cerevisiae in Australian patients with inflammatory bowel disease. *Intern.Med.J.* 2002;32:349-52.
17. Saibeni S, Folli C, de FR, Borsi G, Vecchi M. Diagnostic role and clinical correlates of anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies (ASCA) and anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (p-ANCA) in Italian patients with inflammatory bowel diseases. *Dig.Liver Dis.* 2003;35:862-68.
18. Gasche C, Scholmerich J, Brynskov J, D'Haens G, Hanauer SB, Irvine EJ et al. A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflamm.Bowel Dis.* 2000;6:8-15.

19. Moum B, Vatn MH, Ekbom A, Aadland E, Fausa O, Lygren I et al. Incidence of Crohn's disease in four counties in southeastern Norway, 1990-93. A prospective population-based study. The Inflammatory Bowel South-Eastern Norway (IBSEN) Study Group of Gastroenterologists. *Scand.J.Gastroenterol* 1996;31:355-61.
20. Hampe J, Grebe J, Nikolaus S, Solberg C, Croucher PJ, Mascheretti S et al. Association of NOD2 (CARD 15) genotype with clinical course of Crohn's disease: a cohort study. *Lancet* 2002;359:1661-65.
21. Vasilias EA, Plevy SE, Landers CJ, Binder SW, Ferguson DM, Yang H et al. Perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies in patients with Crohn's disease define a clinical subgroup. *Gastroenterology* 1996;110:1810-19.
22. Lindgren S, Floren CH, Lindhagen T, Starck M, Stewenius J, Nassberger L. Low prevalence of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in ulcerative colitis patients with long-term remission. *Eur.J.Gastroenterol Hepatol.* 1995;7:563-68.
23. Peeters M, Joossens S, Vermeire S, Vlietinck R, Bossuyt X, Rutgeerts P. Diagnostic value of anti-Saccharomyces cerevisiae and antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease. *Am.J.Gastroenterol.* 2001;96:730-34.
24. Quinton JF, Sendid B, Reumaux D, Duthilleul P, Cortot A, Grandbastien B et al. Anti-Saccharomyces cerevisiae mannan antibodies combined with antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease: prevalence and diagnostic role. *Gut* 1998;42:788-91.