

Aus der Kinderklinik und Poliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

**Der Nachweis von Endomysium- und Transglutaminase-Antikörpern
in der Diagnostik der Zöliakie**

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

Vorgelegt von
Verena Oberhammer
aus Tübingen
2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H.K. Harms

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. P. Lohse
Prof. Dr. med. K.Parhofer

Dekan: Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 6. Oktober 2005

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. H.K. Harms sehr herzlich dafür danken, dass er mir diese Doktorarbeit ermöglicht hat und mich über die gesamte Zeit geduldig unterstützt und betreut hat. Durch seine produktiven, kritischen Anmerkungen und raschen Korrekturen hat er mich vor allem in der Schlußphase sehr motiviert und viel zu einem raschen Abschluß dieser Arbeit beigetragen.

Ein großer Dank gilt Frau Heilig, Mitarbeiterin des gastroenterologischen Labors. Sie hat mich geduldig und kompetent in die Methoden eingearbeitet und stand mir stets mit Rat und Tat zur Seite.

Bei meinen Eltern möchte ich mich dafür bedanken, dass sie mir mein Studium und somit diese Arbeit ermöglicht haben. Ihre moralische Unterstützung und ihre nicht nachlassenden Interessensbekundungen haben mir beim Abschluß dieser Arbeit sehr geholfen.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG.....	5
1.1. Historische Aspekte zur Zöliakie	
1.2. Aktuelle Erkenntnisse über das Krankheitsbild Zöliakie	
1.2.1. Antikörpernachweis bei der Zöliakie	
1.3. Aufgabenstellung	
2. PATIENTEN, MATERIAL & METHODEN.....	14
2.1. Patienten	
2.1.1 Patienten mit florider Zöliakie: (Gruppe 1)	
2.1.2 Patienten ohne Zöliakie, aber auffälligen Gliadin-Antikörper-Tests:(Gruppe 2)	
2.1.3 Patienten ohne Zöliakie und negativen Antikörpertests: (Gruppe 3)	
2.2. Materialien	
2.2.1 Endomysium-Antikörper-Test	
2.2.2 Transglutaminase-Antikörper-Test	
2.3. Methoden	
2.3.1. Enzyme Linked Immunosorbent Assays für Gewebstransglutaminase:	
2.3.1.1 . Arbeitsablauf:	
2.3.1.1.a Medipan /Selchow – anti-tTG-IgA:	
2.3.1.1.b Medipan /Selchow – anti-tTG-IgG:	
2.3.1.1.c Biolisa für tTG-IgA von Biomed/ Oberschleißheim:	
2.3.1.1.d Bindazyme™ –anti-tTG-IgA von Binding Site/Birmingham:	
2.3.2. Indirekter Immunfluoreszenz-Test für Endomysiumantikörper:	
2.3.2.1 Arbeitsablauf	
2.3.2.2 Auswertung	
2.3.3. Statistik	
3 ERGEBNISSE.....	26
3.1 Vergleich von 3 verschiedenen kommerziellen Kits zum Nachweis von tTG-IgA- Antikörpern: Spezifität und Sensitivität; Korrelationen:	

3.1.1	Spezifität, Sensitivität, positiver und negativer Prädiktionswert der einzelnen tTG-IgA-Tests	
3.1.2	Korrelationen	
3.2	Vergleich von 3 verschiedenen kommerziellen Kits zum Nachweis von tTG-IgA-Antikörpern mit dem IFT zum Nachweis von EmA-IgA-Antikörpern: Spezifität und Sensitivität; Korrelationen:	
3.2.1	Spezifität, Sensitivität, positiver und negativer Prädiktionswert	
3.2.2	Korrelationen	
3.3	Vergleich von EMA-IgG und tTG-IgG	
3.3.1	Spezifität, Sensitivität, positiver und negativer Prädiktionswert vom tTG-IgG-Test und vom EmA-IgG-Test in der Diagnostik der Zöliakie	
3.4.	Verhalten von EmA IgG und tTG IgG bei Patienten mit IgA-Mangelsyndrom	
3.5.	Altersverteilung der erhaltenen Werte	
4	DISKUSSION.....	39
4.1	Vergleich von 3 verschiedenen kommerziellen Kits zum Nachweis von tTG-IgA-Antikörpern: Spezifität und Sensitivität; Korrelationen	
4.1.1	Spezifität, Sensitivität, positiver und negativer Prädiktionswert	
4.1.2	Korrelation	
4.2	Vergleich von 3 verschiedenen kommerziellen Kits zum Nachweis von tTG-IgA-Antikörpern mit dem IFT zum Nachweis von EmA-IgA-Antikörpern: Spezifität und Sensitivität; Korrelationen	
4.2.1	Spezifität, Sensitivität, positiver und negativer Prädiktionswert	
4.2.2	Korrelationen	
4.3	Vergleich von EMA-IgG- und tTG-IgG-Test	
4.3.1	Spezifität, Sensitivität, positiver und negativer Prädiktionswert	
4.4.	Verhalten von EmA IgG und tTG IgG bei Patienten mit IgA-Mangelsyndrom	
4.5.	Verhalten der verschiedenen Antikörper nach Beginn einer glutenfreien Diät	
4.6.	Altersverteilung der erhaltenen Werte	
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	54
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	56

1. EINLEITUNG

Die Zöliakie, die bei erwachsenen Patienten auch einheimische Sprue genannt wird (international: coeliac disease), ist eine chronische Erkrankung des Dünndarms. Sie tritt erstmalig überwiegend im Kleinkindesalter auf. Sie ist gekennzeichnet durch eine lebenslange Glutenunverträglichkeit, die ihr morphologisches Korrelat in einer Zottenatrophie und Kryptenhyperplasie der Dünndarmschleimhaut hat. Dadurch kommt es zu den Symptomen eines Malabsorptionssyndroms.

1.1. Historische Aspekte zur Zöliakie:

Die Erstbeschreibung des Krankheitsbildes Zöliakie wird Aretaeus von Kappadocien (2.Jahrhundert n.Chr.) zugeschrieben. Den Begriff wählte er nach dem griechischen Wort „koiliakos“, das so viel wie „den Bauch betreffend“ bedeutet. Aretaeus beschrieb bereits die charakteristischen Stühle und den abgemagerten und atrophischen körperlichen Zustand des Patienten (2,8,46).

1888 veröffentlichte Samuel Gee die erste detaillierte Beschreibung der Zöliakie: „On the coeliac affection“. Gee erkannte, daß die Krankheit „...bei Personen aller Altersgruppen gefunden wird, aber besonders dazu neigt, Kinder zwischen dem ersten und fünften Lebensjahr zu befallen..“. Er stellte schon Vermutungen auf, daß die Krankheitsursache nahrungsbedingt sei. (8,46). Diese Vermutungen wurden von Dicke, einem holländischen Pädiater, bestätigt, der 1950 in seiner Dissertation erstmals den Zusammenhang zwischen einer glutenhaltigen Ernährung und dem Auftreten der typischen Symptomatik zeigte. (8,16,46,55) 1953 isolierte er dann Gluten als das toxische Agens der Zöliakie. (20,55,68).

In dieser Zeit basierte die Diagnosestellung fast ausschließlich auf klinischen Symptomen. In erster Linie sind hier die Gedeih- und Entwicklungstörungen zu nennen, die auf eine Malabsorption von Nahrungsbestandteilen zurückzuführen sind. Die Kinder nehmen nicht mehr so zu wie vorher. Es fällt ein blasses, abgemagertes Kind mit großem geblähten Leib auf. Typisch sind voluminöse, übelriechende Stühle. Weitere Symptome bestehen in einer Mißlaunigkeit und psychischen Reizbarkeit.(25) 1954 jedoch beschreibt Paulley erstmals aus intraoperativ gewonnenem Biopsiematerial den Zottenschwund und die Kryptenhyperplasie als morphologisches Korrelat der Krankheit.(8,45,55). Mit den kurz darauf von Royer et al. und Shiner et al. ersten erfolgreich durchgeführten Dünndarmbiopsien konnte nun die

Diagnostik auf den mikroskopisch-histologischen Bereich ausgedehnt werden.(46) Optimierte wurde diese diagnostische Methode durch die von Crosby und Kugler erfundene „Crosby Kapsel“, eine Methode, die in leicht abgewandelter Form der noch heute gebräuchlichen röntgenologisch kontrollierten Dünndarmsaugbiopsie entspricht.(15,46). Die für die Zöliakie charakteristischen, jedoch nicht pathognomonischen histopathologischen Veränderungen sehen wie folgt aus: Marsh (41,55) vermutet 1992 ein progredientes Fortschreiten. Als erstes Ereignis kann eine intraepitheliale Lymphozytenzunahme beobachtet werden, gefolgt von einer Lymphozyteninfiltration der Lamina propria (Stadium 1). Eine Kryptenhyperplasie (Stadium 2) geht dann einer Zottenatrophie (Stadium 3) voraus. Differentialdiagnostisch muss bei diesen Befunden auch an tropische Sprue, Milcheiweißintoleranz, AIDS und Sojaproteinintoleranz der Säuglinge gedacht werden. (26,49). Die ESPGHAN (European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition) schlug 1970 folgende Kriterien zur Diagnosestellung der Zöliakie vor: Der Nachweis der Dünndarmschleimhautveränderungen mit Verbesserung oder Normalisierung unter glutenfreier Diät. Eine Reexposition mit glutenhaltiger Kost führt erneut zu morphologischen Veränderungen der Dünndarmschleimhaut.(8,40,43) 1990 wurden diese Kriterien von der ESPGHAN leicht modifiziert. Eine zweite Biopsie nach Wiederbelastung ist nun nicht mehr erforderlich, wenn die spezifischen Antikörper nicht erneut ansteigen. (71). Diese Definitionen haben sich bis heute gehalten. Eine Dünndarmbiopsie ist das sicherste Kriterium zur Diagnosestellung einer Zöliakie, serologische Tests können das Ergebnis der Biopsie bestätigen, sind aber nicht so zuverlässig.

1.2 Aktuelle Erkenntnisse über das Krankheitsbild Zöliakie:

Definition:

Langjährige Beobachtungen haben ergeben, dass das Spektrum der Manifestationsformen der Glutenüberempfindlichkeit sehr breit ist. Verdeutlicht werden soll dies am sogenannten Eisbergmodell nach Mäki (Abb.1.1) (40).

So stellt die klassische Verlaufsform mit histologisch abgeflachter Dünndarmschleimhautmukosa lediglich die extreme Form der Glutenüberempfindlichkeit, die Spitze des Eisberges, dar. Häufiger sieht man „atypische“ mono- oder oligosymptomatische Verlaufsformen, die durch ausschließlich extraintestinale Symptome in Erscheinung treten können. Von einer *klinisch manifesten Sprue* spricht man, wenn bei typischen oder atypischen

Verlaufsformen histopathologische Schleimhautveränderungen vorhanden sind, die sich unter glutenfreier Nahrung zurückbilden. Sieht man jedoch histologische Zeichen einer Sprue bei Fehlen jeglicher klinischer Symptome, spricht man - bei Positivität der serologischen Parameter und Ausschluß anderer Gründe für die histologischen Veränderungen sowie bei

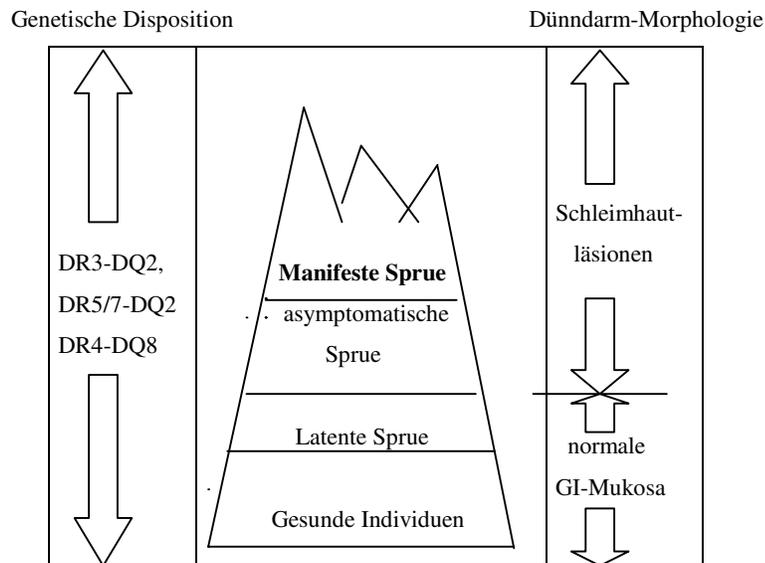


Abb.1.1: Eisbergmodell nach Mäki (40) (modifiziert von Stüber (63))

Besserung auf glutenfreie Ernährung – von einer *asymptomatischen Sprue*. Eine weitere, sehr viel kompliziertere Form ist die *latente Sprue*. Hierbei handelt es sich um eine Glutenüberempfindlichkeit ohne morphologisches Korrelat, aber erhöhten Transglutaminase-Antikörper-Titern. Definitionsgemäß wiesen jedoch diese Patienten bereits in der Vergangenheit einen zöliakie-typischen histopathologischen Befund auf bzw. wird ein solcher Befund in der Zukunft zu erwarten sein. (40, 49, 63).

Epidemiologie:

Aufgrund dieser verschiedenen Manifestationsweisen ist es sehr schwierig, Angaben über die Häufigkeit der Erkrankung zu machen. Die epidemiologischen Daten, die sich noch auf die ESPGAN-Kriterien von 1970 stützen, schließen wahrscheinlich einen Großteil der betroffenen Patienten aus. Die Prävalenzen zeigen große Unterschiede innerhalb der europäischen Länder und schwanken zwischen 1:300 (Italien/ Irland), 1:2000 (Deutschland), und 1:5000. Nimmt man die Personen mit erhöhten Endomysium- oder Transglutaminase-Antikörpern hinzu, so erhöht sich die Häufigkeit der Zöliakie, unabhängig vom

morphologischen Status der Dünndarmschleimhaut, auf 1:200 bis 1:400. (10, 25, 28, 39, 40, 49, 58, 65, 71).

Ätiologie:

Für die Genese der Zöliakie spielen zum einen genetische Merkmale, wie ein gehäuftes Vorkommen unter Verwandten ersten Grades und die Assoziation mit HLA B8, DR3, DR7, DQ2, DQ8, zum anderen Umweltfaktoren wie eine frühe und hohe Glutenbelastung eine Rolle. (8, 21, 40, 46, 49, 58).

Pathogenese:

Der Schädigungsmechanismus läuft, nach aktuellem Forschungsstand, grob etwa folgendermaßen ab: mit der Nahrung aufgenommenes Gliadin (= die alkohollösliche Form von Gluten) überschreitet die intestinale Epithelgrenze und kommt mit dem Calcium-abhängigen Enzym Gewebstransglutaminase (tTG) in Kontakt, die erst kürzlich als das hochspezifische Endomysium-Autoantigen identifiziert worden ist (17). Dieses Enzym wird von einer Vielzahl von Zellen, insbesondere Fibroblasten, Endothelzellen und Lymphozyten synthetisiert und vor allem bei bakteriellen und viralen Infektionen vermehrt freigesetzt. Gliadin-Peptide dienen als Substrat der tTG und werden von ihr auf verschiedenartige Weisen umgewandelt: durch Deamidierung, durch Knüpfen von kovalenten Bindungen oder durch Bildung eines tTG-Gliadinkomplexes. Durch diese neu entstandenen Verbindungen scheint die Antigenpräsentierung noch potenziert zu werden. Diese Verbindungen werden nun durch Antigen-präsentierende Zellen - mit dem Krankheits-assoziierten Antigen HLA-DQ2 - T-Lymphozyten präsentiert. CD4+-T-Zellen erkennen die dargebotenen Verbindungen mit ihren komplementären T-Zellrezeptoren und initiieren eine Th1- oder Th2-Antwort mit der Ausschüttung von Zytokinen. Die Th1-Zytokine (v.a. TNF α) stimulieren intestinale Fibroblasten, die zu einem Matrixabbau und somit einer Schleimhautschädigung führen. Die Th2-Antwort führt zur Reifung von B-Zellen und Vermehrung von Plasmazellen, die IgA-Antikörper gegen Gliadin, die tTG und gegen Gliadin-tTG-Komplexe bilden. (44, 49, 54, 55, 63). Die Abbildung 1.2. verdeutlicht den pathogenetischen Vorgang.

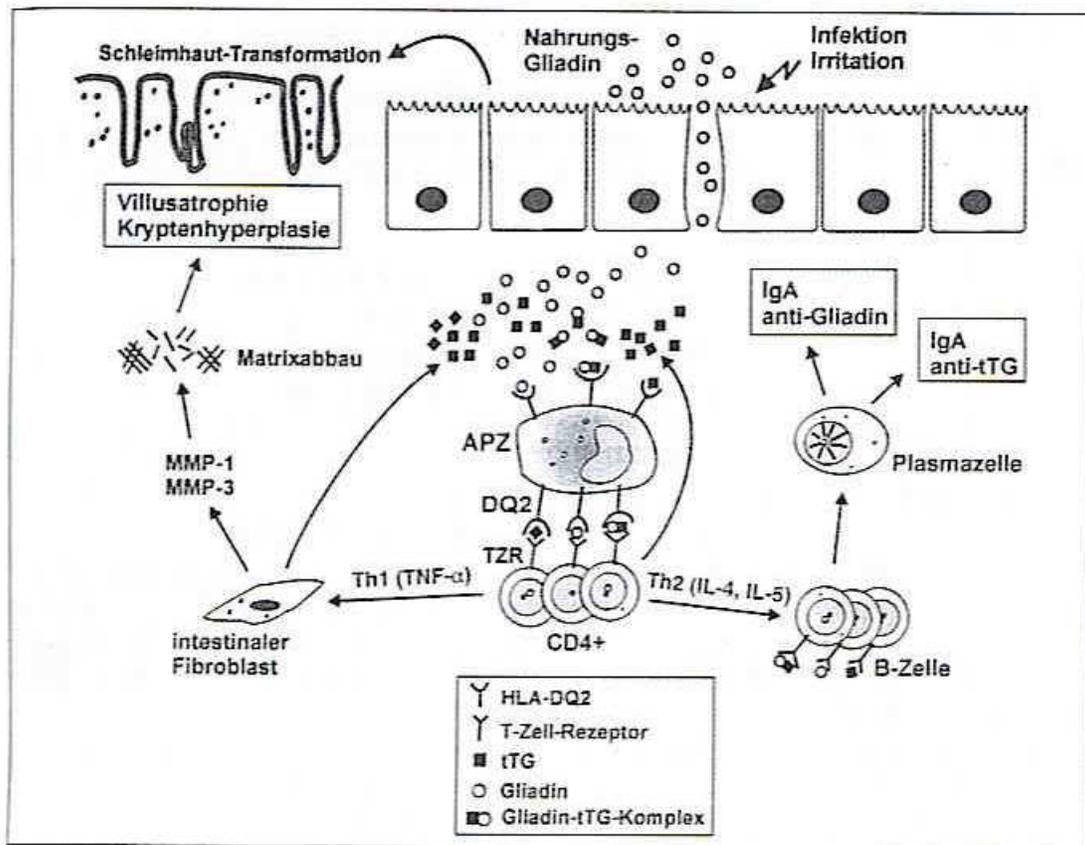


Abb.1.2: Mechanismen der immunologischen Vorgänge und der Gewebszerstörung bei der einheimischen Sprue.
 (übernommen von DMW 1998, 123.Jg., Nr.48)

Klinik:

Die Krankheit beginnt meist um das zweite Lebensjahr ca. 3-4 Monate nach Einführung von getreidehaltiger Beikost. Inappetenz, fehlende Gewichtszunahme, gereizte Grundstimmung sowie in zunehmender Häufigkeit auftretende übelriechende, voluminöse, fetthaltige Stühle sind zu Beginn auftretende Krankheitssymptome. In den folgenden Monaten entwickeln sich die typischen Leitsymptome: großes vorgewölbtes Abdomen, magere Extremitäten mit Tabaksbeutelgesäß, Blässe aufgrund einer Eisenmangelanämie, Muskelhypotonie, hypoproteinämische Ödeme und Mißlaunigkeit. Eine längerfristige Schädigung der Dünndarmschleimhaut führt zu einer schweren Malassimilation (Maldigestion und Malabsorption) aller Nährstoffe, und neben oben bereits genannten Symptomen können chronische Folgesymptome wie eine Störung des Calciumstoffwechsels mit der Folge einer Osteomalazie, Hypoproteinämie, erhöhten Blutungsneigung aufgrund Vitamin K-Mangels, Minderwuchs und eine verzögerte Entwicklung entstehen. (25, 58). Des weiteren werden bei der Zöliakie häufig assoziierte Krankheiten wie z.B. Diabetes mellitus Typ I, Neurodermitis

und andere Autoimmunerkrankungen beobachtet, die das eigentliche Krankheitsbild mit ihren Symptomen verschleiern.(40,49).

Diagnostik:

Für die Diagnose stehen heute serologische Antikörpertests im Vordergrund, die später ausführlich besprochen werden, da sie Thema dieser Arbeit sind. Dennoch ist die Dünndarmbiopsie bis heute der Goldstandard geblieben. Allerdings beschränkt man sich heute auf eine einmalige Biopsie zur Diagnosestellung und verzichtet auf weitere Biopsien unter glutenfreier Ernährung bzw. erneuter Glutenbelastung.(25, 43, 71). Methoden wie der d-Xylosetest, Laktose-H₂-Atemtest und die Stuhlfettbestimmung sind nur unspezifisch und haben keine Bedeutung mehr.

Die Therapie der Wahl

ist eine dauerhafte streng glutenfreie Ernährung. Alle Lebensmittel, die auf den Getreidearten Weizen, Roggen, Hafer und Gerste basieren, müssen gemieden werden. Unter dieser Diät kommt es bei 90% der Betroffenen zu einer klinischen Besserung. (25,40,58,63). Patienten, die die glutenfreie Diät nicht strikt einhalten, haben nachgewiesenermaßen ein erhöhtes Risiko, an einem T-Zell Lymphom oder einem gastrointestinalen Karzinom zu erkranken. (25, 38, 49).

1.2.1 Antikörpernachweis bei der Zöliakie:

Die Geschichte der Zöliakie-Serologie begann 1957 mit der Erstbeschreibung der Gliadinantikörper (AGA) durch E.Berger aus Basel. Der Nachweis der Antikörper kann mit verschiedenen Methoden erfolgen. Durchgesetzt hat sich derzeit jedoch das ELISA-Verfahren (Enzyme linked immuno sorbent assay) für den Nachweis von IgA- und IgG-AGA. Weitere mögliche Methoden sind die Immundiffusion, Hämagglutination, FIST (fluorescence immuno sorbent test), RIFT (red cell immuno fluorescence test) und das Radioimmunoassay. (30, 59). Nach unterschiedlichen Studien besitzen diese Antikörper eine Sensitivität von 31-100% und eine Spezifität von 85 –100%. (14, 27, 40, 61, 63). Vor allem Anti-Gliadin Antikörper vom Typ IgG zeigen eine recht schlechte Sensitivität und Spezifität. Sie können aber bei Patienten mit IgA-Mangelsyndrom, bei denen zehnmal häufiger als im Normalkollektiv eine Glutenunverträglichkeit auftritt, hilfreiche Informationen liefern, da hier die Bestimmung der Antikörper vom Typ IgA negativ ausfallen. Das weite Spektrum der Testergebnisse kann

neben fehlender Standardisierung der Testdurchführung auch darauf zurückgeführt werden, dass Gliadinantikörper gehäuft auch bei Patienten mit anderen gastrointestinalen Beschwerden wie Malabsorption verschiedener Ursachen, Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, aber auch in selteneren Fällen bei gesunden Patienten vorkommen. (52, 59, 60).

Seah et al. beschrieben 1971 Retikulinantikörper für die Diagnostik der Zöliakie. Der Sub-Typ (R1-ARA) zeigte Kreuzreaktionen mit menschlichem Gewebe, die sich als charakteristisch für Zöliakie und Dermatitis herpetiformis erwiesen. Heute besitzt der Test eine hohe Spezifität bei nur geringer Sensitivität, so dass er heute nicht mehr sehr gebräuchlich ist und hier nicht weiter darauf eingegangen werden soll.(3, 40, 56, 67). Ebenfalls nicht näher eingegangen werden soll auf die Anti-Jejunum- Antikörper (AJA), die 1986 erstmals von Karpati et al. beschrieben wurden. Sie weisen nahezu identische Werte wie die Endomysiumantikörper (EmA) auf. Studien lassen vermuten, dass die EmA und die AJA sowie auch die ARA ein und diesselben Antikörper sind. (29, 32, 33).

Die Anti-endomysialen Antikörper wurden von Chorzelski und Mitarbeiter 1983 erstmals beschrieben als hochspezifische IgA-Antikörper im Serum von Patienten mit Dermatitis herpetiformis Duhring und Zöliakie (13). Sie sind gegen ein Antigen innerhalb der endomysialen Strukturen der Lamina muscularis mucosae des Affenösophagus gerichtet. Das Endomysium ist ein retikulärer Bindegewebsbestandteil, der sich nur wenig von den bindegewebigen Retikulinfasern unterscheidet. Es umhüllt die glatten Muskelzellen als Membran. (1, 12, 13, 35, 63) Im Immunfluoreszenztest (IFT) sieht man bei positivem anti-endomysialem-Antikörper-Nachweis das charakteristische „Honigwabenmotiv“. Nachgewiesen konnten die EmA auch bei Ratten, Affen- oder menschlichem Ösophagus, Niere, Leber, Magen, Dünn- und Dickdarm. (34). In den kommerziell erhältlichen Kits wird Affenösophagus als Substrat verwendet. Da diesem jedoch aus ökologischen, ökonomischen und ethischen Gründen Grenzen gesetzt sind, ist man dazu übergegangen, alternativ oder parallel menschliche Nabelschnur als Substrat einzusetzen. Vergleiche haben eine gleichwertige Sensitivität und Spezifität beider Testmethoden bei hoher Kostenersparnis und Vermeidung ethischer Diskussionen ergeben (34, 63, 70, 72). Der Nachweis von IgG-Antikörper gegen Endomysium ist ebenfalls möglich, hat sich bis jetzt in der Routinediagnostik noch nicht durchgesetzt. Gründe dafür werden in dieser Arbeit unter anderem diskutiert.

1997 ist von der Arbeitsgruppe um Dieterich und Schuppan (17) die Gewebstransglutaminase als das Haupt-Autoantigen der anti-endomysialen Antikörper identifiziert worden, wie bereits unter 1.2. schon beschrieben worden ist. Diese Entdeckung ist nicht nur für das Verständnis

der Pathogenese der Zöliakie sehr bedeutend, sondern sie hat auch die Entwicklung eines neuartigen Antikörpertestverfahrens möglich gemacht. Dieterich et al. entwickelten einen ELISA-Test (enzyme linked immunosorbent assay) mit tTG aus Meerschweinchenleber (GP von engl. Guinea pig = Meerschweinchen) zur Messung von anti- tTG IgA-Antikörpern. (17, 18). In zahlreichen Studien wurde diese neue Methode für die Diagnostik der Zöliakie geprüft und mit den herkömmlichen Methoden verglichen. Ein weiterer Vergleich wurde auch in dieser Arbeit durchgeführt. Miklós Sárdy und seine Arbeitsgruppe entwickelten 1999 einen tTG-ELISA mit einer rekombinierten menschlichen Gewebstransglutaminase als Antigen (51). Obwohl zwischen der h-tTG (humane Gewebstransglutaminase) und der GP-tTG eine 80% Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen besteht, ist dennoch die Frage aufgetaucht, ob sich die Testergebnisse mit Verwendung eines humanen Antigens nicht verbessern lassen. Zu Grunde liegt die Hypothese, daß Patientenserum, die vom GP-tTG-ELISA als negativ erkannt werden, Antikörper gegen Epitope der h-tTG enthalten, die wiederum der GP-tTG fehlen.(51) Tatsächlich konnten die Sensitivität und die Spezifität mit der humanen Gewebstransglutaminase als Antigen erhöht werden. Der tTG-ELISA kann auch auf IgG-Antikörper durchgeführt werden. Die Bewertung der tTG-IgG-Antikörper wird jedoch sehr kontrovers diskutiert. Einig ist man sich jedoch über die wichtige diagnostische Rolle bei Patienten mit IgA-Mangelsyndrom.

1.3 Aufgabenstellung

Aufgrund neuerer epidemiologischer Daten gewinnt die Diagnostik der Zöliakie zunehmend an Bedeutung. Es gibt viele oligo- bzw. monosymptomatische Patienten, die sehr schwer zu entdecken sind. Die Inzidenz nimmt zu. Daher ist es erforderlich geworden, hohe Patientenzahlen in Bezug auf Zöliakie zu screenen. Dies bewegt viele neue Firmen dazu, einen idealen Testkit zum Nachweis von Antikörpern gegen die Gewebstransglutaminase zu entwickeln.

Ziel dieser Arbeit ist es den geeignetsten Test für eine Screeninguntersuchung auf Zöliakie zu finden. In dieser Arbeit werden drei verschiedenen kommerziellen Kits zum Nachweis von tTG-IgA-Antikörpern untereinander und mit dem Endomysium-IgA-Antikörper-Test verglichen. Es wird außerdem beobachtet, wie sich Werte im Graubereich eines Tests in den anderen Tests verhalten und wie sich die Werte jeweils nach Beginn einer glutenfreien Diät

verhalten. Durch die zusätzlichen Bestimmung von EmA- und tTG-IgG-Antikörpern soll weitgehend ausgeschlossen werden, dass Patienten mit unerkanntem IgA-Mangel übersehen werden.

2. PATIENTEN, MATERIALIEN UND METHODEN:

2.1 Patienten:

Die Seren in der vorliegenden Studie lassen sich in drei Hauptgruppen einteilen. Die erste stammt von Patienten mit bioptisch gesicherter florider Zöliakie zum Zeitpunkt der Biopsie, die zweite von Patienten mit auffälligen Gliadin-Antikörper-Werten, aber negativen Endomysium-Antikörpern, und die dritte aus Patienten mit negativen Testergebnissen für alle Zöliakie typischen Antikörper-Tests. Die Blutentnahmen und die Untersuchungen, die zu dieser Einteilung geführt haben, wurden im Zeitraum 1995-2000 im gastroenterologischen Labor des Von Haunerschen Kinderspitals München durchgeführt. Anhand dieser bereits vorhandenen Daten wurden die folgenden Patientengruppen zusammengestellt und die zugehörigen, bei -20°C gelagerten Seren, herausgesucht. Gründe für die Blutentnahmen zur serologischen Diagnostik waren Symptome wie Dystrophie, Minderwuchs, rezidivierende Durchfälle, Anämie und andere zöliakieverdächtige Zeichen.

2.1.1 Patienten mit florider Zöliakie: (Gruppe 1)

Diese Patienten hatten zum Zeitpunkt der serologischen Untersuchung alle eine floride Zöliakie, die durch eine subtotale bis totale Villusatrophie in der bioptische gewonnenen Schleimhaut bestätigt worden ist. Die Seren dieser Hauptgruppe wurden ungefähr zum Zeitpunkt der Biopsie entnommen, an dem diese Patienten unter Glutenbelastung standen. Die Zahl der Patienten dieser Gruppe beläuft sich auf 36. Bei zwei dieser Patienten wurde ein IgA-Mangelsyndrom nachgewiesen. Vier weitere Patienten standen zum Zeitpunkt der Probenentnahme bereits unter glutenfreier Diät und sollen hier nur am Rande berücksichtigt werden. Die Gruppe setzt sich aus 19 weiblichen und 17 männlichen Patienten zusammen. Das Durchschnittsalter der Patienten lag knapp über 6 Jahren bei einer Spanne von 1 Jahr bis 15 Jahren.

2.1.2 Patienten ohne Zöliakie, aber auffälligen Gliadin-Antikörper-Tests: (Gruppe 2)

Diese Gruppe (Gr.2) setzt sich aus 34 Patienten (m=13; w=21) zusammen, die stark erhöhte Gliadin IgG- Antikörper aufwiesen, bei denen jedoch keine erhöhten IgA- Gliadin Antikörpern gefunden wurden und das Ergebnis der Endomysium-IgA-Antikörper- Suche

ebenfalls negativ ausfiel. Alle diese Personen hatten dabei Zöliakie-verdächtige Symptome wie rezidivierende Durchfälle, Bauchweh, Minderwuchs und Gedeihstörungen. Aufgrund der negativen Testergebnisse wurde auf eine invasive Dünndarmbiopsie verzichtet. Das Durchschnittsalter in dieser Gruppe betrug ebenfalls ca. 6 Jahre, der Jüngste war 1,5 Jahre alt, die Älteste 15 Jahre.

2.1.3 Patienten ohne Zöliakie und negativen Antikörpertests: (Gruppe 3)

In dieser Gruppe (Gr.3) sind die Seren von 20 Patienten enthalten, von denen zwölf weiblich und acht männlich sind. Alle diese Seren wurden Ende des Jahres 2000 entnommen und bei -20°C aufbewahrt. Die serologischen Tests für Gliadin IgA- und IgG- und Endomysium IgA-Antikörper sind negativ ausgefallen und eine Zöliakie somit mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde auf eine Dünndarmsaugbiopsie verzichtet. Diese Patienten wurden trotz auffälliger Symptome wie Bauchschmerzen, Durchfälle und Wachstumsverzögerung als Zöliakie-negative Patienten geführt und dienen somit als negative Kontrollgruppe. Das Durchschnittsalter in dieser Gruppe betrug ca. 7 Jahre und 4 Monate, der Jüngste war 8 Monate alt, der Älteste 14,5 Jahre.

Altersverteilung der Patienten

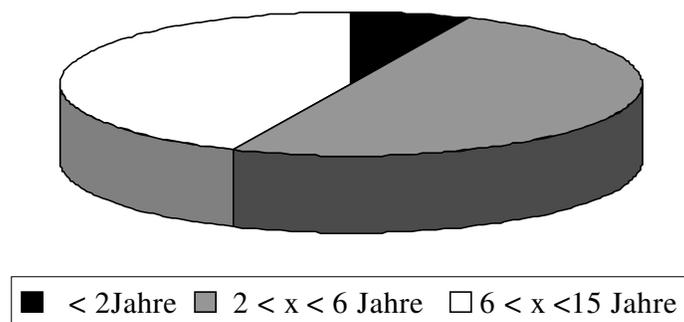


Abb. 2.1: Altersverteilung aller Patienten (n = 90)

2.2 Materialien

2.2.1 Endomysium-Antikörper-Test:

Für den Nachweis von IgA- und IgG-Endomysium Antikörper wird der indirekte Immunfluoreszenztest verwendet, der in Grundzügen von Chorzelski und Mäki et al. beschrieben wurde. (12,13) Sie haben 1983 erstmals Antikörper des Typs IgA im Serum von Patienten mit glutensensitiver Enteropathie entdeckt, die gegen ein Antigen innerhalb der endomysialen Strukturen der Lamina muscularis mucosae des Affenösophagus gerichtet sind. (13).

Seren/Kontrollseren:

Alle für die Untersuchung verwendeten Seren wurden zwischen der Blutabnahme und dem Testzeitpunkt in Eppendorfhütchen bei -20°C im Gefrierschrank gelagert und zur jeweiligen Untersuchung aufgetaut. Die EmA-IgA- und IgG positiven und negativen Kontrollseren wurden gebrauchsfertig von der Firma Binding Site / Birmingham übernommen:

Defibriniertes humanes Plasma, gewonnen von einem einzigen geeigneten Spender, preserviert mit:

- 0,1 % sodium Azide
- 0,1 % E-amino-capronsäure
- 0,01 % Benzamid
- 1mM EDTA

Antigen:

Als Antigen dienten Affenösophagus-Querschnitte, welche Endomysiumstrukturen aufweisen. Sie werden als $4\mu\text{m}$ dicke Gefrierschnitte auf Objektträger aufgetragen. Je nach Charge kann die Stärke der Ausbildung der Muskelfaserbündel variieren. Die Objektträger wurden gebrauchsfertig von der Firma Binding Site, Birmingham, bezogen.

Antiserum:

Zum Nachweis der im indirekten IFT an Endomysium gekoppelten IgA- und IgG-Antikörper wurden Fluoreszein-isothiocyanat (FITC)-Konjugate verwendet.

Dabei wurde für den Nachweis von IgG-Antikörpern das gebrauchsfertige Konjugat der Firma Binding Site mit folgender Zusammensetzung verwendet: Goat F(ab')₂ anti-Human-IgG FITC plus normales Ziegenserum; Conc.= 0,5 mg/ml.

Für die Darstellung von Anti-Endomysium-IgA-Antikörpern wurde das FITC-konjugierte IgA-Antiserum wie folgt hergestellt: 600µl Goat F(ab')₂ Anti-Human-IgA-FITC

600µl Ziegenantiserum normal

4800µl PBS-Puffer

Nach 30 min Dunkelinkubation wurde das Antiserum gefiltert um störende Antikörperkomplexe zu entfernen.

Verdünnungsmedien für Serum/Antiserum:

Zur Verdünnung aller Patientenseren und der Antiseren, sowie zum Waschen der Objektträger wurde der PBS-Puffer verwendet. Zur Herstellung von 1 Liter PBS-Puffer benötigt man:

- Natriumchlorid: 8,5g
- Di-Natriumhydrogenphosphat: 1,07g
- Natriumdihydrogenphosphat: 0,39g
- Aqua Dest.: ~ 1000ml

Eindeckmaterial:

Um die fertig getesteten Affenösophagusschnitte einzudecken, benutzten wir Glycerin, das mit PBS-Puffer 1:10 verdünnt worden ist.

Fluoreszenzmikroskop:

Das Fluoreszenzmikroskop ist ein Auflichtmikroskop, das zur Sichtbarmachung fluoreszierender bzw. fluorchromisierter Objekte dient. Diese Objekte werden mit kurzwelligem oder UV-Licht bestrahlt und strahlen infolge einer Anregung der Fluorochrome Licht einer längeren Wellenlänge ab und leuchten so, nachdem das anregende Licht abgefiltert worden ist, auf dunklem Hintergrund auf.

2.2.2 Transglutaminase-Antikörper-Test:

Die Gewebstransglutaminase wurde als eines der Hauptantigene für die Entstehung der Zöliakie identifiziert (17).

Zur quantitativen Bestimmung der IgA- und IgG-Antikörper gegen die Gewebstransglutaminase dient ein ELISA-Test (enzyme linked immuno sorbent assay). Die Antikörper in den verdünnten Patientenseren reagieren im ersten Reaktionsschritt mit der an die feste Phase gebundenen Gewebstransglutaminase. Nicht gebundene Komponenten werden nach Inkubation durch Waschen entfernt. Im zweiten Reaktionsschritt reagieren die gebundenen Antikörper spezifisch mit anti-human-IgA bzw. IgG-Antikörpern, die an die Peroxidase als Enzym gebunden sind. Durch Waschen werden wiederum überschüssige Konjugatmoleküle entfernt. Im letzten Schritt wird eine Substratlösung zugegeben, die von dem Enzym mit einem Farbumschlag umgesetzt wird, der dann photometrisch im ELISA - Reader bei 450nm gemessen werden kann. Anhand einer Standardkurve kann der jeweiligen Antikörperkonzentration ein quantitativer Wert zugeordnet werden.

Seren:

Die Patientenseren wurden nach der Entnahme bei -20°C im Gefrierschrank gelagert und kurz vor dem Einsatz auf Raumtemperatur gebracht. Die Patientenproben müssen mit dem gebrauchsfertig gelieferten Probenverdünner 1:50 bzw 1:100 (Medipan und Biomed bzw. Binding Site) verdünnt werden. Die Kalibratoren für die Standardkurve sowie die Positiv- und Negativ-Kontrollen sind bereits vorverdünnt.

Antigen:

Als Antigen dient bei Medipan, Binding Site und Biomed aus technischen Gründen noch die Gewebstransglutaminase des Meerschweinchens. Die Mikrotiterplatten sind bereits mit dem Calcium-aktivierten Gewebstransglutaminase Antigen beschichtet.

Antiserum:

Das Konjugat enthält Anti-human-IgA bzw. IgG-Antikörper, die mit Meerrettichperoxidase gekoppelt sind.

Substrat:

Die Substratlösung besteht aus 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in Citratpuffer mit Wasserstoffperoxid.

Sie wird von dem an das Antiserum gekoppelt Enzym Meerrettichperoxidase in ein blaues Endprodukt umgesetzt. Diese Reaktion wird nach einer Inkubationszeit durch Zugabe einer sauren Stopplösung (Schwefelsäure) abgebrochen, wodurch ein Farbumschlag der blauen Lösung zu gelb auftritt.

Waschpuffer:

Zum Waschen wird ein konzentrierter vorgefertigter PBS-Waschpuffer verwendet.

ELISA-Reader:

Der ELISA-Reader ist ein Mikrotiterplatten-Photometer mit optischen Filtern von 450 nm und 620 bzw. 690 nm, der die optische Dichte (OD) des Endprodukts mißt. OD ist zur Konzentration der spezifisch gebundenen Antikörper direkt proportional.

2.3 Methoden:

Die Auswahl der Patienten wurde anhand von Daten getroffen, die im Von Haunerschen Kinderspital im Zeitraum von 1995-2000 gesammelt worden sind. Relevant waren, soweit vorhanden, die Ergebnisse der Dünndarmsaugbiopsie, der Anti-Gliadin (AGA) IgA- und IgG-Antikörperteste und des Endomysium-IgA-Antikörper-Tests (EmA). Die Werte der AGA-Teste wurden übernommen, die Werte für EmA-IgA, soweit sie in der Voruntersuchung negativ waren, ebenfalls, der Test für EmA-IgA, der in der Voruntersuchung positiven Patienten sowie alle weiteren Teste wurden neu durchgeführt. Die quantitativen Ergebnisse der neu durchgeführten EmA-IgA-Tests entsprachen denjenigen, die bereits mit den gleichen Proben schon zu einem früheren Zeitpunkt durchgeführt worden sind. Somit kann davon ausgegangen werden, dass durch die längeren Lagerungszeiten beziehungsweise durch wiederholtes Auftauen der Seren die Testergebnisse nicht beeinflußt worden sind.

Die Seren der Patienten aus allen drei Patientengruppen wurden zuerst auf IgA-Antikörper gegen die Gewebstranstransglutaminase (tTG) untersucht. Verwendet wurden hierfür die kommerziellen Test-Kits der Firmen Medipan /Selchow, The Binding Site / Birmingham und Biomed /Oberschleißheim. Für jeden Wert wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt und

dann der Mittelwert beider Werte als Endwert genommen. Die Auswertung fand nach den Vorgaben und Empfehlungen der jeweiligen Firma statt. Sind Werte nach oben hin aus dem Meßbereich herausgefallen, wurde für diese Seren der Test in höheren Verdünnungsstufen wiederholt, bis ein Wert im Meßbereich zu erhalten war. Anschließend wurde alle Seren auf IgG-Antikörper gegen die tTG untersucht. Verwendet wurde hierfür ein kommerzieller Test-Kit der Firma Medipan / Selchow. Auch hier wurden die Werte anhand der vom Anbieter vorgegebenen Formel berechnet. Die Einzelheiten der Auswertung wird weiter unten ausführlich aufgeführt. Als nächstes wurde der EmA-Test zuerst für IgA durchgeführt bei den Patienten, die sich schon in der Voruntersuchung als positiv erwiesen hatten. War im Fluoreszenzmikroskop eine Positivität in den Eingangstitrierstufen 1:2,5 bzw. 1:5 zu sehen, wurden die Proben solange auftitriert, bis keine Fluoreszenz mehr erkennbar war. Anschließend wurde der EmA-Test zum Nachweis von IgG-Antikörper bei allen Patienten durchgeführt. Positive Proben wurden ebenfalls wieder solange auftitriert, bis keine Fluoreszenz mehr erkennbar war.

2.3.1. Enzyme Linked Immunosorbent Assays für Gewebstransglutaminase:

2.3.1.1. Arbeitsablauf:

2.3.1.1.a Medipan /Selchow – anti-tTG-IgA:

Die Testdurchführung wird hier anhand des Test-Kits Medizym® anti-TransG der Fa. Medipan dargestellt. Abweichungen bei den anderen Kits werden weiter unten aufgeführt:

- (1) Patientenproben 1 + 50 vorverdünnen.
- (2) Testreagenzien und die benötigte Anzahl an Kavitäten auf Raumtemperatur bringen und alle Reagenzien vor Gebrauch schütteln.
- (3) Pipettieren von - 100 µl Probenverdünner als Negativ-Kontrolle,
 - 100 µl Kalibratoren (1-4) für die Standardkurve,
 - 100 µl der vorverdünnten Patientenserum in die vorgesehenen Kavitäten.
- (4) Streifen mit selbstklebender Folie abdecken, 60 min bei 37°C inkubieren.
- (5) Dekantieren und 5 mal mit 300 µl Waschpuffer, der 1 +9 mit destilliertem Wasser vorverdünnt worden ist, waschen.
- (6) 100 µl Konjugat in jede Kavität pipettieren.
- (7) Streifen mit selbstklebender Folie abdecken, 30 min bei 37°C inkubieren.

- (8) Dekantieren und 5 mal mit 300 µl Waschpuffer waschen.
- (9) 100 µl Substrat in jede Kavität pipettieren und 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
- (10) 100 µl Stopplösung in jede Kavität pipettieren und kurz schütteln.
- (11) Messen der Extinktion bei 450 nm gegen 620 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer innerhalb von 30 min.

Auswertung: Die Extinktionsmittelwerte der Kalibratoren 1-4 werden auf der Ordinate (lin.) gegen die entsprechende anti-tTG-Konzentration (Abszisse, log. Maßstab) aufgetragen. Daraus wird eine Standardkurve gezeichnet, aus der sich über die Extinktionsmittelwerte die jeweiligen anti-tTG-Konzentrationen der unbekannt verdünnten Patientenproben direkt in U/ml ablesen lassen. Der Referenzwert liegt bei 25 U/ml: *Positiv* bei > 25U/ml, *negativ* bei < 25 U/ml.

2.3.1.1.b Medipan /Selchow – anti-tTG-IgG:

Der **Testablauf** ist der gleiche wie der unter 2.3.1.1.a.

Auswertung: Die bei 450nm gemessene optische Dichte (OD) des Endprodukts ist zur Konzentration der spezifische gebundenen Antikörper direkt proportional. Über die Berechnung eines cut-offs erfolgt die Bewertung der ermittelten OD der Proben. Anstatt einer Standardkurve mit Kalibratoren 1-4 werden hier eine vorgegebene tTG-IgG- Negativ- und eine Positiv-Kontrolle zur Ermittlung der Referenzwerte herangezogen. Die *Entscheidungsgrenze* errechnet sich aus : Extinktionswert der Negativ-Kontrolle + 0,15 OD-Einheiten.

Negativ : Werte < 0,8 x Entscheidungsgrenze.

Positiv : Werte > Entscheidungsgrenze.

Da die Entscheidungsgrenze für jeden Testansatz erneut bestimmt wird und somit für verschiedene Testansätze verschiedene Entscheidungsgrenzen erhalten werden, ist der direkte Vergleich aller tTG-IgG-Werte nicht möglich.

2.3.1.1.c Biolisa für tTG-IgA von Biomed/ Oberschleißheim:

Die **Testdurchführung** entspricht exakt dem unter 2.3.1.1.a.

Testauswertung: Die Auswertung entspricht im Prinzip derjenigen von 2.3.1.1.a. Extinktionen der Standards werden auf der Y-Achse (lin.) aufgetragen, die jeweiligen bekannten Konzentrationen der Standards auf der X-Achse (log.) in U/ml. Durch die erhaltenen Punkte wird eine Standardkurve konstruiert, an der jedem Extinktionswert einer unbekannt verdünnten Probe die entsprechende tTG-IgA Antikörperkonzentration in U/ml zugeteilt werden kann. Die Referenzwerte liegen bei *positiv*: > 30U/ml, *negativ*: < 25 U/ml.

2.3.1.1.d Bindazyme™ –anti-tTG-IgA von Binding Site/Birmingham:

Die **Testdurchführung** weicht in Einzelheiten von dem von 2.3.1.1.a ab:

Zu (1) Die Patientenproben werden 1:100 verdünnt (10 µl auf 1000 µl).

Zu (4) Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur.

Zu (5) Das Waschpufferkonzentrat wird 1:20 mit destilliertem Wasser verdünnt.

Zu (7) Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur.

Zu (9) 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.

Testauswertung:

Die Standardkurve wird wie unter 2.3.1.1.c erzeugt. Die Werte für die tTG-IgA-Antikörperkonzentrationen können direkt in U/ml abgelesen werden. Für die Ergebnisinterpretation gelten folgende **Referenzwerte**:

Negativ: < 4 U/ml

Schwach Positiv: 4-10 U/ml

Positiv: > 10 U/ml.

2.3.2. Indirekter Immunfluoreszenz-Test für Endomysiumantikörper:

2.3.2.1 Arbeitsablauf:

Die Testdurchführung zum Nachweis von EmA IgA- und von EmA IgG- Antikörpern ist derselbe. In jedem Testansatz wird eine Positiv- und eine Negativ-Kontrolle als Qualitätskontrolle mit angelegt. Dafür werden Seren von in früheren Tests

nachgewiesenermaßen hochpositiven bzw. sicher negativen Patienten verwendet. Zuerst wird der PBS-Puffer zum Verdünnen der Proben und zum Waschen mit den unter 2.2.1.4 aufgeführten Materialien angesetzt. Anschließend stellt man das Antiserum gegen humanes IgA ,wie unter 2.2.1.3 beschrieben, her. Hier beginnt nun der eigentlich Testablauf:

- (1) Verdünnen der Patientenproben mit PBS-Puffer im Verhältnis 1:10.
- (2) Je einen Tropfen der Negativ- und Positiv-Kontrollen und 50µl der verdünnten Patientenproben auf die vorgesehenen Auftragsstellen auf den beschrifteten Substrat-Objektträgern auftragen.
- (3) Objektträger 30 min bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubieren.
- (4) Objektträger mit PBS-Puffer (Spritzflasche) waschen, dabei nicht direkt auf die Auftragsstellen spritzen. Dann Objektträger in Halterung geben in für 3 mal 10 min in PBS-Puffer eintauchen. Dazwischen Pufferwechsel.
- (5) Vor dem Auftragen des Konjugats Objektträger um Auftragsstellen mit saugfähigem Papier trocknen. Anschließend Auftragen von je einem Tropfen des Fluoreszenz-Konjugats auf jede Auftragsstelle.
- (6) Objektträger 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubieren.
- (7) Waschen wie unter (4) beschrieben und Objektträger abtupfen.
- (8) Auf jeden Objektträger nach 2.2.1.5 hergestelltes Glycerin auftragen und mit Objektgläschen eindecken. Dabei sollte darauf geachtet werden, so wenig wie möglich Licht an die Objektträger zu lassen und diese im Dunkeln zu lagern.
- (9) Auswertung der Objektträger unter dem Fluoreszenzmikroskop.

2.3.2.2 Auswertung:

Die Positivkontrolle sollte ein leuchtend-äpfelgrünes Fluoreszenzmuster zeigen. Anfärben sollen sich die retikulin-ähnlichen Fasern, die die glatte Muskulatur im Bindegewebe der Lamina muscularis mucosae umgeben und somit sollte das typische Bild des Honigwabenmusters entstehen. Die Negativkontrolle zeigt eine matt-grüne Anfärbung des Gewebes ohne erkennbare Fluoreszenz. Schwache milchige Fluoreszenz des kompletten Substrats wurde als negativ gewertet.

2.3.3 Statistik:

Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer Vorhersagewert:

Für die Auswertung der Versuche wurde für jeden Test die Sensitivität und Spezifität berechnet und miteinander verglichen. Die Sensitivität beschreibt den Anteil der durch den Test richtig positiv erkannten Kranken zur Gesamtzahl aller untersuchten Personen mit dieser Krankheit. Die Spezifität beschreibt dagegen den Anteil der durch den Test richtig negativ erkannten Gesunden und an anderen Krankheiten erkrankten zur Gesamtzahl aller gesunden und an anderen Erkrankungen erkrankten Testpersonen. Der positive Vorhersagewert ist der Quotient aus der Anzahl richtig positiver Testergebnisse und der Anzahl aller positiver Testergebnisse. Der negative Vorhersagewert ist der Quotient aus der Anzahl richtig negativer Testergebnisse und der Anzahl aller negativer Testergebnisse. Die unten anstehende Tabelle soll dies noch einmal verdeutlichen.

Der Patient ist....	<i>Test positiv</i>	<i>Test negativ</i>	<i>Summe</i>	
krank	a	b	a + b	Sensitivität: $a / (a+b)$
gesund / oder andersartig erkrankt	c	d	c + d	Spezifität: $d / (c+d)$
<i>Summe</i>	a + c	b + d		
	Positive Prädiktion: $a / (a + c)$	negative Prädiktion: $d / (b + d)$		

Tab. 2.1: Vier-Felder-tafel zur Errechnung von Sensitivität, Spezifität, positivem und negativem Vorhersagewert:

Abhängigkeitsmaße: Regression und Korrelation:

Regression: Die Regression untersucht die Abhängigkeit zweier beobachteter quantitativer Merkmale. Bei der hier vorliegenden linearen Regression kann versucht werden die Abhängigkeit durch eine Gerade, die Regressionsgerade, zu beschreiben. Zunächst stellt man

die Daten beider Merkmale als Punktwolke in einem Koordinatensystem dar, z.B. die Werte für die EmA-Antikörper auf der y-Achse, die Werte für die tTG-Antikörper auf der x-Achse. Die Regressionsgerade ist diejenige Gerade, die dem Gesamttrend aller Punkte am ehesten entspricht. Der Regressionskoeffizient ist die Steigung dieser Geraden.

Korrelation: Der Korrelationskoeffizient r ist ein Maß für den Grad der linearen Abhängigkeit zweier Merkmale. Er kann nur Werte zwischen $+1$ und -1 annehmen. Je näher der Koeffizient betragsmäßig bei 1 liegt, desto enger schmiegt sich die Punktwolke an die Regressionsgerade. Je näher er bei 0 liegt, desto bauchiger ist sie. r hat das gleiche Vorzeichen wie der Regressionskoeffizient, d.h. aus dem Vorzeichen von r kann man ablesen, ob die Regressionsgerade steigt oder fällt. Wenn $r = 0$ ist, verläuft die Gerade parallel zur x-Achse. In diesem Fall nennt man die beiden Merkmale unkorreliert.(4)

Der Pearsonschen Korrelationskoeffizient r ist ein dimensionsloser Index mit dem Wertebereich $-1,0 < r < 1,0$ und ist ein Maß dafür, inwieweit zwischen zwei Datensätzen eine lineare Abhängigkeit besteht.

3. ERGEBNISSE:

3.1 Vergleich von 3 verschiedenen kommerziellen Kits zum Nachweis von tTG-IgA-Antikörpern: Spezifität und Sensitivität; Korrelationen:

Es gibt mittlerweile zahlreiche Firmen, die kommerzielle, bereits vorgefertigte Testkits zum Nachweis von Transglutaminase-Antikörpern anbieten. Alle diese drei Testkits beruhen auf dem ELISA-Verfahren. Der Testablauf ist im Wesentlichen bei allen Anbietern nach dem gleichen Schema aufgebaut. Der Unterschied der verschiedenen Testkits liegt in der Auswertung der erhaltenen Extinktionen. Jedem Testkit sind definierte Proben zur Ermittlung einer Standardkurve, bzw. eines Cut-Off-Wertes beigelegt, die bei jedem Testansatz mitgetestet werden müssen. Anhand dessen können schließlich die erhaltenen Extinktionen in quantitative Testergebnisse umgewandelt und somit ausgewertet werden. Die Kits der Firmen Medipan/Selchow, Biomed /Oberschleißheim und von Binding Site/ Birmingham werden hier im Hinblick auf Spezifität und Sensitivität in der Diagnostik der Zöliakie miteinander verglichen, des Weiteren werden ihre Testergebnisse miteinander korreliert.

Bei der ersten Berechnung der Spezifität und der Sensitivität wurden zu den Erkrankten alle die Patienten gerechnet, die zum Untersuchungszeitpunkt bioptisch nachgewiesene Dünndarmschleimhautveränderungen im Sinne einer Zöliakie aufwiesen. Die zwei Patienten mit nachgewiesenem IgA-Mangel wurden ausgeschlossen. Daraus ergibt sich $n=33$ für die Erkrankten, $n=55$ für die Gesunden und somit $n_{\text{gesamt}}=88$ Patienten. Bei der zweiten Berechnung wurden die Patienten, die zum Zeitpunkt der Untersuchung zwar noch Dünndarmschleimhautveränderungen aufwiesen, bereits aber unter glutenfreier Diät standen, sowie ein Patient, dessen Dünndarmschleimhautveränderungen auf eine Kuhmilchproteinintoleranz zurückzuführen sind, ausgeschlossen. Zu den Zöliakie-negativen wurden auch die Patienten aus der Gruppe 3 dazugenommen, bei denen serologisch keine Zöliakie nachgewiesen werden konnte.

Bei der Erstellung der Korrelationen wurden alle Patienten in der Statistik belassen, auch diese, die zum Zeitpunkt der Probeentnahme unter glutenfreier Diät standen bzw. solche, bei denen ein IgA-Mangel-Syndrom vorliegt. Die Korrelationen wurden für die einzelnen Patientengruppen separat berechnet.

3.1.1 Spezifität, Sensitivität, positiver und negativer Prädiktionswert der einzelnen tTG-IgA-Tests

Test der Fa. Medipan /Selchow:

Der Patient ist....	Test positiv	Test negativ	Summe
krank	28	5	33
gesund	1	54	55
	29	59	88

Tab. 3.1: Vierfeldertafel zur Errechnung unten genannter Werte. Krank / gesund bezieht sich auf Zöliakie, Test positiv sind alle die, die im tTG-IgA-Ak- Test der Fa. Medipan positive Werte aufweisen.

$$\text{Sensitivität} = 28 / 33 = 84,8 \%$$

$$\text{Spezifität} = 54 / 55 = 98,2 \%$$

$$\text{Positiver Vorhersagewert} = 28 / 29 = 96,6 \%$$

$$\text{Negativer Vorhersagewert} = 54 / 59 = 91,5 \%$$

Nach Ausschluß von Patienten unter GFD bzw. mit Kuhmilchproteinintoleranz

Bei den primär fünf Patienten mit Nachweis von Dünndarmschleimhautveränderungen aber negativen Testergebnissen werden drei wegen GFD und einer wegen Nachweis von Kuhmilchintoleranz ausgeschlossen . Die Zahl der falsch-negativen reduziert sich damit auf einen, die Gesamtzahl reduziert sich auf n= 84.

Der Patient ist....	Test positiv	Test negativ	Summe
krank	28	1	29
gesund	1	54	55
	29	55	84

Tab. 3.2: Vierfeldertafel zur Errechnung unten genannter Werte. Krank / gesund bezieht sich auf Zöliakie, Test positiv sind alle die, die im tTG-IgA-Ak- Test der Fa. Medipan positive Werte aufweisen.

$$\text{Sensitivität} = 28 / 29 = 96,6 \%$$

$$\text{Spezifität} = 54 / 55 = 98,2 \%$$

$$\text{Positiver Vorhersagewert} = 28 / 29 = 96,6 \%$$

$$\text{Negativer Vorhersagewert} = 54 / 55 = 98,2 \%$$

Test der Fa.Biomed / Oberschleißheim:

Der Patient ist....	Test positiv	Test negativ	Summe
krank	31	2	33
gesund	3	52	55
	34	54	88

Tab. 3.3: Vierfeldertafel zur Errechnung unten genannter Werte. Krank / gesund bezieht sich auf Zöliakie, Test positiv sind alle die, die im tTG-IgA-Ak- Test der Fa. Biomed positive Werte aufweisen.

$$\text{Sensitivität} = 31 / 33 = 93,9 \%$$

$$\text{Spezifität} = 52 / 55 = 94,5 \%$$

$$\text{Positiver Vorhersagewert} = 31 / 34 = 91,1 \%$$

$$\text{Negativer Vorhersagewert} = 52 / 54 = 96,3 \%$$

Nach Ausschluß von Patienten unter GFD bzw. mit Kuhmilchproteinintoleranz

Beide Patienten mit Nachweis von Dünndarmschleimhautveränderungen aber negativen Testergebnissen werden wegen GFD ausgeschlossen . Die Zahl der falsch-negativen reduziert sich damit auf null, die Gesamtzahl reduziert sich auf n= 86.

Der Patient ist....	Test positiv	Test negativ	Summe
krank	31	0	31
gesund	3	52	55
	34	52	86

Tab. 3.4: Vierfeldertafel zur Errechnung unten genannter Werte. Krank / gesund bezieht sich auf Zöliakie, Test positiv sind alle die, die im tTG-IgA-Ak- Test der Fa. Biomed positive Werte aufweisen.

$$\text{Sensitivität} = 31 / 31 = 100 \%$$

$$\text{Spezifität} = 52 / 55 = 94,5 \%$$

$$\text{Positiver Vorhersagewert} = 31 / 34 = 91,1 \%$$

$$\text{Negativer Vorhersagewert} = 52 / 52 = 100 \%$$

Test der Fa.Binding Site / Birmingham:

Der Patient ist....	Test positiv	Test negativ	Summe
krank	27	6	33
gesund	0	55	55
	27	61	88

Tab. 3.5: Vierfeldertafel zur Errechnung unten genannter Werte. Krank / gesund bezieht sich auf Zöliakie, Test positiv sind alle die, die im tTG-IgA-Ak- Test der Fa. Binding Site positive Werte aufweisen.

$$\text{Sensitivität} = 27 / 33 = 81,8 \%$$

$$\text{Spezifität} = 55 / 55 = 100 \%$$

$$\text{Positiver Vorhersagewert} = 27 / 27 = 100 \%$$

$$\text{Negativer Vorhersagewert} = 55 / 61 = 90,2 \%$$

Nach Ausschluß von Patienten unter GFD bzw. mit Kuhmilchproteinintoleranz

Bei den initial sechs Patienten mit Nachweis von Dünndarmschleimhautveränderungen aber negativen Testergebnissen werden drei wegen GFD und einer wegen Nachweis von Kuhmilchintoleranz ausgeschlossen . Die Zahl der falsch-negativen reduziert sich damit auf zwei, die Gesamtzahl reduziert sich auf n= 84.

Der Patient ist....	Test positiv	Test negativ	Summe
krank	27	2	29
gesund	0	55	55
	27	57	84

Tab. 3.6: Vierfeldertafel zur Errechnung unten genannter Werte. Krank / gesund bezieht sich auf Zöliakie, Test positiv sind alle die, die im tTG-IgA-Ak- Test der Fa. Binding Site positive Werte aufweisen.

$$\text{Sensitivität} = 27 / 29 = 93,1 \%$$

$$\text{Spezifität} = 55 / 55 = 100 \%$$

$$\text{Positiver Vorhersagewert} = 27 / 27 = 100 \%$$

$$\text{Negativer Vorhersagewert} = 55 / 57 = 96,5 \%$$

3.1.2 Korrelationen

Korrelation von Medipan / Selchow mit Biomed / Oberschleißheim

Bei dem Vergleich der Testergebnisse von dem Testkit der Fa. Medipan mit dem der Fa. Biomed ergibt sich im Pearson-Korrelations-Test eine Korrelationskoeffizient von $r = 0,796$ für die Patientengruppe 1, $r = - 0,03$ für die Patientengruppe 3 und $r = 0,658$ für die Patientengruppe 2. In Abb. 3.1 ist die Abhängigkeit der in den Tests der Fa. Medipan (x-Achse) und der Fa. Biomed (y-Achse) erhaltenen Werte durch eine Gerade beschrieben. Die Gerade gibt den Gesamttrend aller Punkte am ehesten wieder und wird Regressionsgerade genannt. Je näher die Punkte um die Regressionsgerade verteilt sind, desto größer ist die Korrelation zwischen den Werten der zwei verschiedenen Tests. In dieser Abbildung sind die Werte im niedrigeren Wertebereich tendenziell näher um die Regressionsgerade verteilt als im mittleren Wertebereich. Im hohen Wertebereich sind nur vereinzelte Werte gemessen worden.

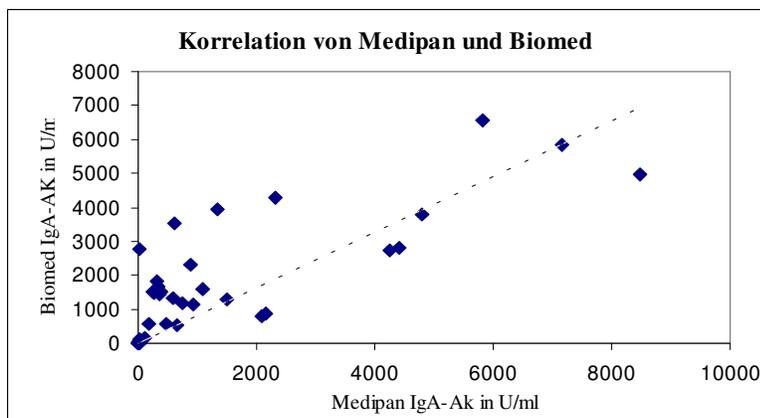


Abb. 3.1: Korrelation der tTG-IgA-AK- Werte von Gruppe 1, die bei der Durchführung der Teste der Fa. Medipan und der Fa. Biomed erhalten werden. Die Einheit der Werte ist jeweils U/ml.

Korrelation von Medipan /Selchow mit Binding Site / Birmingham

In der Patientengruppe der Biopsie-positiven Kinder mit $n=36$ korrelieren diese beiden Tests mit $r = 0,884$. In Abbildung 3.2. entspricht dies einer vor allem im niedrigen Wertebereich deutlich zu erkennenden sehr engen Gruppierung der Wertepaare um die Regressionsgerade. Bei der Patientengruppe 2 errechnet man eine niedrige Korrelation mit $r = 0,205$. Ebenfalls eine negative Korrelation erhält man bei der Patientengruppe mit $r = 0,248$. Die letzten beiden Korrelationen sind nicht signifikant.

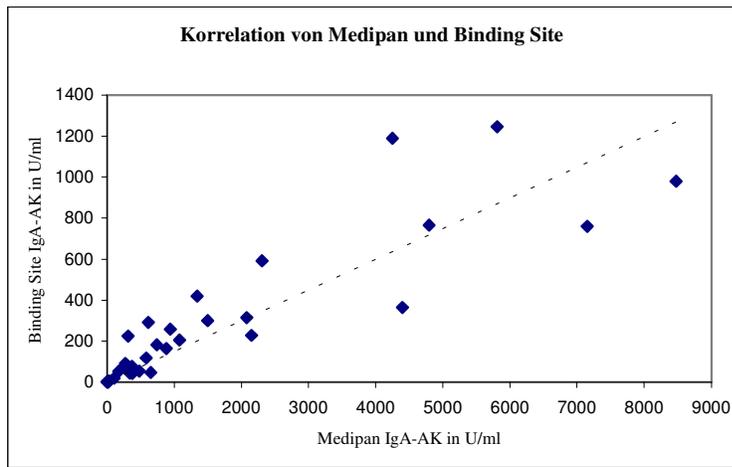


Abb. 3.2: Korrelation der tTG-IgA-AK- Werte von Gruppe 1, die bei der Durchführung der Teste der Fa. Medipan und der Fa. Binding Site erhalten werden. Die Einheit der Werte ist jeweils U/ml.

Korrelation von Biomed / Oberschleißheim mit Bindings Site / Birmingham

Bei dem Vergleich der Testergebnisse von dem Testkit der Fa. Binding Site mit dem der Fa. Biomed ergibt sich im Pearson-Korrelations-Test eine Korrelationskoeffizient von $r = 0,826$ für die Patientengruppe 1. In Abbildung 3.3. ist im Gegensatz zu den Abbildungen 3.1

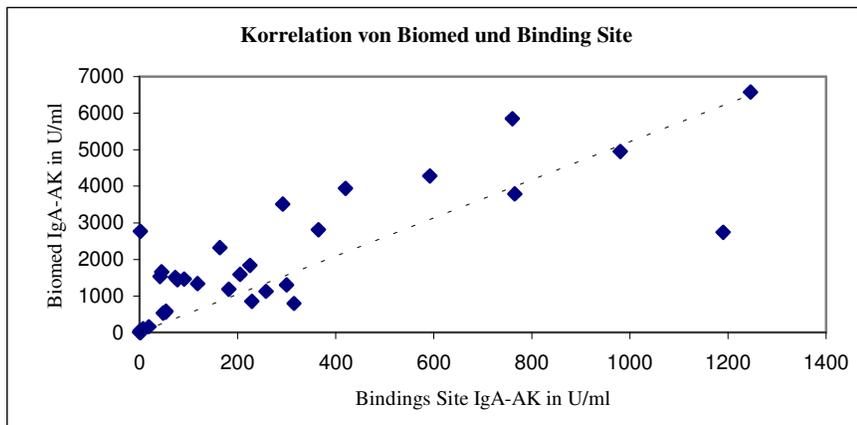


Abb. 3.3: Korrelation der tTG-IgA-AK- Werte von Gruppe 1, die bei der Durchführung der Teste der Fa. Biomed mit der Fa. Binding Site erhalten werden. Die Einheit der Werte ist jeweils U/ml.

und 3.2 die Gruppierung der Wertepaare um die Regressionsgerade in allen Wertebereichen ähnlich und nicht, wie bei den anderen Wertebereichen eher auffallend, im niedrigen Wertebereich größer. Für die Patientengruppe 3 ergibt sich $r = 0,379$ und für die Patientengruppe 2 ist $r = -0,133$.

3.2 Vergleich von 3 verschiedenen kommerziellen Kits zum Nachweis von tTG-IgA- Antikörpern mit dem IFT zum Nachweis von EmA-IgA-Antikörpern: Spezifität und Sensitivität;Korrelationen:

3.2.1 Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer Vorhersagewert für den EmA-IgA-Antikörper-Test:

In der Patientengruppe 1 gibt es 2 Patienten, die falsch-negativ waren für EmA-IgA-Antikörper, aber in dieser Tabelle nicht berücksichtigt worden sind, weil sie unter einem IgA-Mangel-Syndrom leiden.

Der Patient ist....	Test positiv	Test negativ	Summe
krank	30	3	33
gesund	0	55	55
	30	58	88

Tab. 3.7: Vierfeldertafel zur Errechnung untenenannter Werte. Krank / gesund bezieht sich auf Zöliakie, Test positiv sind alle die, die im EmA-IgA-Ak- Test positive Werte aufweisen.

$$\text{Sensitivität} = 30 / 33 = 90,9 \%$$

$$\text{Spezifität} = 55 / 55 = 100 \%$$

$$\text{Positiver Vorhersagewert} = 30 / 30 = 100 \%$$

$$\text{Negativer Vorhersagewert} = 55 / 58 = 94,8 \%$$

Nach Ausschluß von Patienten unter GFD bzw. mit Kuhmilchproteinintoleranz

Drei weitere Patienten, die negative EmA-IgA- Antikörper aufwiesen trotzdem noch Dünndarmschleimhautveränderungen nachweisbar waren, wurden wegen Einhaltens einer

GFD aus der Statistik herausgenommen. Die Zahl der „ Falsch-Negativen“ reduziert sich somit auf null, die Gesamtzahl auf n= 85.

Der Patient ist...	Test positiv	Test negativ	Summe
krank	30	0	30
gesund	0	55	55
	30	55	85

Tab. 3.8: Vierfeldertafel zur Errechnung untengenannter Werte. Krank / gesund bezieht sich auf Zöliakie, Test positiv sind alle die, die im EmA-IgA-Ak- Test positive Werte aufweisen.

Sensitivität = $30 / 30 = 100 \%$

Spezifität = $55 / 55 = 100 \%$

Positiver Vorhersagewert = $30 / 30 = 100 \%$

Negativer Vorhersagewert = $55 / 55 = 100 \%$

3.2.2 Korrelationen

Bei Biopsie-positiven Patienten

Um den Pearson-Korrelationstest anwenden zu können, braucht man zwei Datensätze mit quantitativen Werten. Da die EmA-Antikörper in Verdünnungsstufen angegeben werden, werden hier die Kehrwerte $1/x$ von der jeweiligen Verdünnungsstufe genommen um quantitative Werte zum vergleichen zu erhalten.

Bei Anwendung des Pearsons Korrelations-Testes erhält man bei Korrelation der Testwerte des EmA-IgA-Antikörper-Test mit denen des tTG-IgA-Antikörper-Testes der Fa. Medipan einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,776$. Die Korrelation der EMA IgA-Antikörper mit den Werten aus dem Testkit für tTG-IgA- Antikörper der Firma Biomed beträgt $r = 0,787$, mit den Werten aus dem Testkit für tTG-IgA-Antikörper der Firma Binding Site mit dem Faktor $r = 0,905$. Der Test ist hochsignifikant mit $p \leq 0,01$.

Bei Zöliakie-negativen Patienten:

Alle Patienten, die im EMA-IgA- Test negativ sind, sind auch in den verschiedenen Testkits für den Nachweis von tTG-IgA-Antikörpern negativ.

Bei der Patientengruppe zwei:

Die Patienten, die nach dem Kriterium erhöhte Gliadin IgG-Antikörper bei normalen Gliadin IgA-Antikörpern ausgewählt worden sind, haben in wiederholten Untersuchungen negative Ergebnisse für EMA IgA-Antikörper. In der Untersuchung auf IgA-tTG-Antikörper mit den Testkits verschiedener Anbieter sind die meisten Patienten ebenfalls negativ. Bei dem IgA-tTG-Antikörper-Test der Fa. Binding Site sind alle 36 Patienten negativ. Bei dem Test der Fa. Medipan ist ein Patient mit dem Anti-tTG-IgA-Antikörpertiter von 33,2 U/ml minimal über dem Grenzwert von 25 U/ml, während im Test der Fa. Biomed vier Patienten Werte im Graubereich zwischen 25 –30 U/ml aufweisen und zwei Patienten mit Werten von 32 bzw. 45 U/ml schon im schwach positiven Bereich liegen. Der zweite Patient ist derselbe, der schon bei Medipan einen schwach positiven Wert aufwies.

3.3 Vergleich von EMA-IgG und tTG-IgG

Bei Biopsie-positiven Patienten

Der Antikörper-Nachweis für tTG-IgG-Antikörper erfolgte nur mit dem Testansatz der Fa. Medipan. Die Auswertung dieses Testes erfolgt anhand eines Cut-off Wertes, der sich für jeden Testansatz individuell ergibt. Da nicht alle 36 Seren dieser Patientengruppe in einem Testansatz durchgeführt werden konnten, ergaben sich mehrere verschiedene Cut-off-Werte, was den direkten Vergleich der Werte unmöglich macht. Somit ist eine Errechnung der linearen Abhängigkeit der EmA-IgG-Antikörper und der tTG-IgG-Antikörper anhand des Pearsons Korrelationstests nicht möglich. 16 Patienten waren positiv für EmA-IgG-Antikörper, 18 Patienten hatten im tTG-Test IgG-Antikörpertiter, die über dem Grenzwert lagen.

Bei Zöliakie-negativen Patienten

Im Immunfluoreszenz-Test zum Nachweis von EmA-IgG-Antikörpern war bei allen 20 Negativ-Patienten keine Fluoreszenz erkennbar, das heißt es waren keine EmA-IgG-Antikörper nachweisbar. Im Transglutaminase-IgG-Antikörper-Test der Fa. Medipan waren 2 der 20 Patienten positiv. Bei einer Wiederholung des Tests bei diesen 2 Patienten ergaben

sich erneut positive Testwerte. Mit 0,435 bzw. 0,502 U/ml liegen diese Werte deutlich über dem für diesen Testansatz errechneten positiven Cut-off-Wert von 0,33 U/ml.

Bei der Patientengruppe 2:

In dieser Patientengruppe sind alle Patienten negativ für Endomysium-IgG-Antikörper. Es gibt einen Patienten, der für tTG-IgG-Antikörper deutlich positiv ist. Bei diesem Patienten liegen die Anti-Gliadin-IgG Antikörper mit 100 U/ml auch im deutlich positiven Bereich. Alle Tests auf IgA-Antikörper waren negativ. Bei vier weiteren Patienten liegen die Werte für tTG-IgG-Antikörper im schwach positiven Bereich. Auch bei diesen Patienten sind die Anti-Gliadin-IgG-Antikörper deutlich erhöht, aber alle weiteren Tests auf IgA-Antikörper waren auch hier negativ.

3.3.1 Spezifität, Sensitivität, positiver und negativer Prädiktionwert vom tTG-IgG-Test und vom EmA-IgG-Test in der Diagnostik der Zöliakie

Nimmt man alle Biopsie-positiven Patienten (hier kann man nun auch die Patienten mit IgA-Mangel einschliessen), $n = 36$, und alle Zöliakie-negativen Patienten, $n = 54$, (hier wird auch die Gruppe 2 dazugenommen, siehe auch 4.2) und betrachtet ihre Testergebnisse für EmA-IgG-Antikörper und tTG-IgG-Antikörper, erhält man jeweils die Spezifität und Sensitivität, den positiven und negativen Prädiktionwert der beiden Tests. Anhand der Tabellen 3.5 und 3.6 kann man die einzelnen Werte errechnen.

Der Patient ist....	Test positiv	Test negativ	Summe
krank	18	18	36
gesund	7	47	54
	25	65	90

Tab. 3.5.: Vierfeldertafel zur Errechnung unten genannter Werte. Krank / gesund bezieht sich auf Zöliakie, Test positiv sind alle die, die im tTG -IgG-Ak- Test positive Werte aufweisen.

$$\text{Sensitivität} = 18 / 36 = 50\%$$

$$\text{Spezifität} = 47 / 54 = 87 \%$$

$$\text{Positiver Vorhersagewert} = 18 / 25 = 72 \%$$

Negativer Vorhersagewert = $47 / 65 = 72,3 \%$

Der Patient ist....	Test positiv	Test negativ	Summe
krank	16	20	36
gesund	0	54	54
	16	74	90

Tab. 3.6: Vierfeldertafel zur Errechnung unten genannter Werte. Krank / gesund bezieht sich auf Zöliakie, Test positiv sind alle die, die im EmA-IgG-Ak- Test positive Werte aufweisen.

Sensitivität = $16 / 36 = 44,4 \%$

Spezifität = $54 / 54 = 100 \%$

Positiver Vorhersagewert = $16 / 16 = 100 \%$

Negativer Vorhersagewert = $54 / 74 = 73 \%$

3.4 Verhalten von EmA IgG und tTG IgG bei Patienten mit IgA-Mangelsyndrom

Unter allen Patienten befinden sich zwei Patienten mit einem IgA-Mangelsyndrom, d.h. diese Patienten bilden keine Immunglobuline der Klasse A. In einer Dünndarmsaugbiopsie wurde bei ihnen die Diagnose einer Zöliakie gesichert. Für diese zwei Patienten fallen die Ergebnisse im Test zum Nachweis von EmA-IgA-Antikörper und in allen drei Tests zum Nachweis von tTG-IgA-Antikörper erwartungsgemäß negativ aus. In den jeweiligen Tests für den Nachweis von IgG-Antikörpern wiesen beide Patienten hochpositive Werte auf.

3.5 Alterseinteilung der erhaltenen Werte

tTG-IgA-Antikörper:

Die tTG-IgA-Antikörper wurden von allen 90 Patienten in drei unterschiedlichen Tests von verschiedenen Anbietern gemessen. Alle drei Tests beruhen auf dem ELISA-Prinzip. Die Spannweite der Messwerte reichte im Medipan-Test von 1 – 8474 U/ml, im Binding Site Test von 1 – 1246 U/ml und im Biomed-Test von 1 – 6574 U/ml. In den Abbildungen 3.4. bis 3.6. sind die jeweiligen Testergebnisse in Bezug auf das Alter aufgetragen. Es wurden hierbei nur

die Ergebnisse der Patienten aus der Gruppe 1 mit $n = 36$ verwendet. In der Altersklasse bis zu 4 Jahren ist $n = 13$, von 4 bis 6 Jahren $n=10$, von 6 bis 10 Jahren $n= 8$ und in der Altersklasse aller Patienten älter als 10 Jahre $n = 5$.

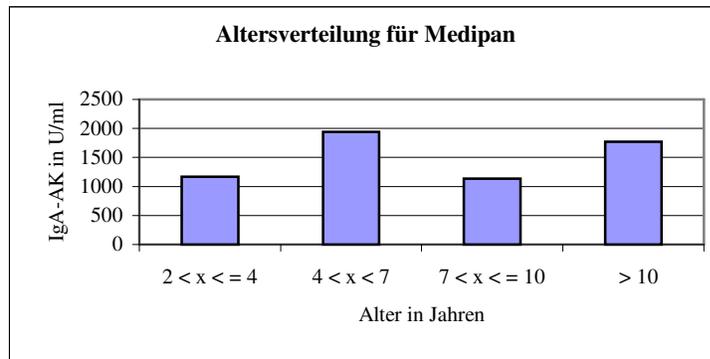


Abb. 3.4: Altersverteilung der Medipan tTG-IgA-Antikörper in der Gruppe 1. ($n=36$)

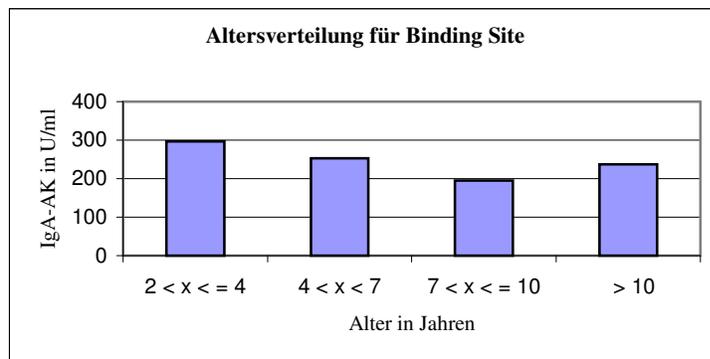


Abb. 3.5: Altersverteilung der Binding Site tTG-IgA-Antikörper in der Gruppe 1. ($n=36$)

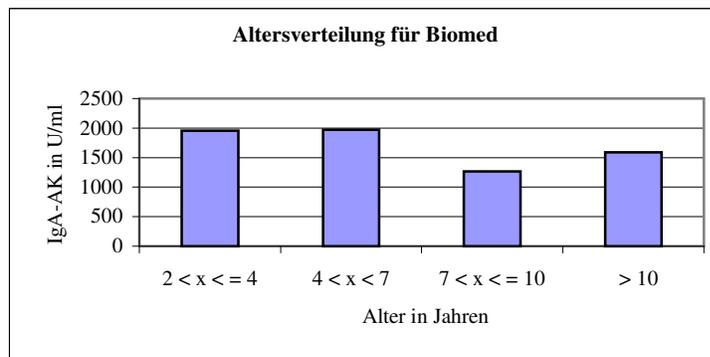


Abb. 3.6: Altersverteilung der Biomed tTG-IgA-Antikörper in der Gruppe 1. ($n=36$)

Endomysium IgA-Antikörper:

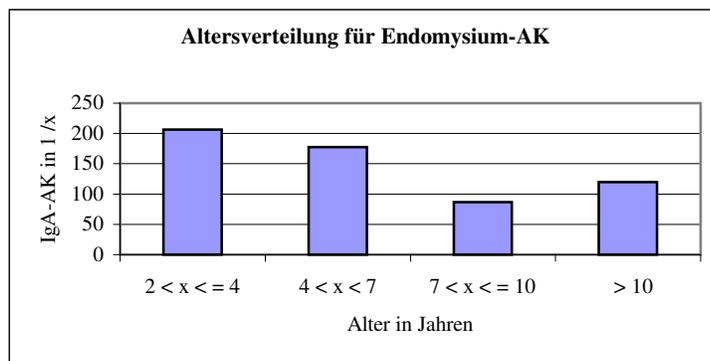


Abb. 3.7: Altersverteilung der EmA-IgA-Antikörper in der Gruppe 1. (n=30)

Bei der Aufstellung der Altersverteilung der EmA-IgA-Werte (Abb 3.7) wurden zwei Patienten mit IgA-Mangelsyndrom sowie vier Patienten, die zum Untersuchungszeitpunkt schon unter glutenfreier Diät standen, nicht berücksichtigt. Diese sechs Patienten sind alle negativ für EmA-IgA-Antikörper. Somit erhalten wir $n = 30$.

4. DISKUSSION:

Die Entdeckung der Gewebstransglutaminase als Autoantigen der Zöliakie im Jahre 1997 durch W. Dieterich et al. (17) ist nicht nur ein bedeutender Fortschritt im Verständnis der Pathogenese der einheimischen Sprue, sondern sie hat auch die Entwicklung eines neuartigen Antikörpertest-Verfahrens möglich gemacht (63). Neben den etablierten Tests zum Nachweis von Anti-Gliadin-Antikörpern und Anti-Endomysium-Antikörpern hat sich der neu entwickelte ELISA-Test zum Nachweis von Antikörpern gegen die Gewebstransglutaminase bereits in zahlreichen Studien durch eine hohe Sensitivität und Spezifität ausgezeichnet. (6, 11, 18, 23, 50, 64, 66). In weiteren Studien wird die noch bessere Sensitivität und Spezifität des tTG- ELISA-Test mit einem humanen rekombinierten Antigen gegenüber dem, der die Transglutaminase der Meerschweinchen als Antigen verwendet, beschrieben. (7,23). Diese Studien belegen auch eine sehr gute Konkordanz der Anti-Transglutaminase-Antikörper (anti-tTG-AK) mit den EmA-Antikörpern.. Der neu geschaffene ELISA-Test beinhaltet einige Vorteile gegenüber dem Immunfluoreszenztest (IFT), der bei der serologischen Untersuchung auf EmA-Antikörper angewandt wird. Der EmA-IFT ist ein laborintensiver Test und daher auch nicht zu der Durchführung einer hohen Serien-Anzahl geeignet. Seine Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop erfordert ein erfahrenes, gut geschultes Auge. Die Beurteilung kann durch andere anwesende Antikörper erschwert werden. Der Test unterliegt somit einer subjektiven Interpretation und beinhaltet eine mögliche Variabilität in der Auswertung durch verschiedene Beobachter. Des weiteren gibt es ethische Bedenken, was den Gebrauch von Affenösoophagus als Antigen betrifft. (11, 50, 53, 62, 66, 69). Daher ist man dazu übergegangen, alternativ oder parallel menschliche Nabelschnur als Substrat einzusetzen. Sensitivität und Spezifität beider Testmethoden sind annähernd gleichwertig, so dass ethische Diskussionen vermieden werden können (34, 63, 70, 72). Der ELISA-Test, der die tTG-IgA (IgG) – Antikörper mißt, ist in der Durchführung schneller, billiger und einfacher. Auch hohe Serien-Anzahlen lassen sich recht schnell parallel durchführen. Deswegen wäre auch der ELISA - Test als Screening Test für Zöliakie gut geeignet (69). Die photometrische Ermittlung der Testergebnisse erlaubt eine gute internationale Standardisierung der Werte. Die erhaltenen Werte sind quantitative Werte, was gegenüber dem EmA-IFT, dem eine semiquantitative Evaluation zugrunde liegt, Vorteile mit sich bringt. So erlaubt der tTG-Antikörper-Test eine effektivere Kontrolle darüber, ob ein Patient die glutenfreie Diät einhält. Die tTG-Antikörper

reagieren bereits früh mit einem Abfall der Werte nach Beginn der glutenfreien Diät, während die EmA-Werte immer noch positiv sind.(24,50).

Eine einheitliche Schlußfolgerung, welches der beiden Testverfahren das bessere ist, bzw. ob man den etablierten Endomysium-Antikörper-Test durch den weniger aufwendigen ELISA-Test zum Nachweis der Gewebstransglutaminase-Antikörper ersetzen kann, läßt sich aus den Studien nicht entnehmen. Silvia Martini et al. (42) kommen zu dem Schluß, dass der tTG-Antikörper-Test den herkömmlichen EmA-Test nicht ersetzen kann, sondern nur als Eingangstest genutzt werden kann. Positive Ergebnisse müssen anschließend durch den EmA-Test bestätigt werden. Die Mehrheit der Studien sehen dagegen den tTG-Test als Alternative zum EmA-Test, der die oben genannten Vorteile mit sich bringt.(7, 24, 50, 53, 66, 69). Während für Stern et al. (62) und Chan et al. (11) die Dünndarmsaugbiopsie in der Diagnostik der Zöliakie nach wie vor der Goldstandard bleibt, gehen Hanson et al.(24) und Trevisiol et al. (66) sogar soweit, zu erwägen, ob die Notwendigkeit für eine Biopsie durch die Einführung des tTG-Antikörper-Tests in der nahen Zukunft überhaupt noch besteht und sie vielleicht nicht ganz ersetzt werden kann.

In dieser Arbeit sollten anhand von verschiedenen Patientengruppen die Testergebnisse vom EmA-Antikörper-Test mit denen des tTG-Antikörper-Tests verglichen werden. Für den Nachweis von IgA-Antikörpern wurden Gewebstransglutaminase-Tests von drei verschiedenen kommerziellen Anbietern angewandt. Die Ergebnisse werden jeweils mit denen vom IFT für EmA-IgA-Antikörper verglichen sowie innerhalb der verschiedenen Anbieter. Zusätzlich wurden alle Patienten auf IgG-Antikörper gegen Endomysium bzw. Transglutaminase getestet und auch diese Werte sollen miteinander verglichen werden. Die Vergleiche werden für jede Patientengruppe separat durchgeführt. In der Gruppe 2, den Patienten mit hohem Gliadin-IgG- bei niedrigen Gliadin-IgA-Antikörpern und negativen EmA-IgA-Antikörper, die aber zöliakieverdächtige Symptome aufwiesen, soll ein besonderes Augenmerk auf das Verhalten der Transglutaminase-IgA- und IgG-Antikörper sowie der EmA- IgG-Antikörper geworfen werden.

4.1 Vergleich von 3 verschiedenen kommerziellen Kits zum Nachweis von tTG-IgA-Antikörpern: Spezifität und Sensitivität; Korrelationen;

4.1.1 Spezifität, Sensitivität, positiver und negativer Prädiktionswert

Der Testkit der Fa. Medipan zum Nachweis von tTG IgA- Antikörpern hat eine Sensitivität von 84,8 % und eine Spezifität von 98,2 %. Es wurden 5 Patienten mit nachgewiesenen Dünndarmschleimhautveränderungen im Sinne einer Zöliakie falsch-negativ getestet. Bei genauerer Betrachtung dieser Patienten wurde nur einer mit florider Zöliakie negativ getestet. Bei diesem Patienten waren trotz ausgeprägter Schleimhautveränderungen die tTG-IgA-Antikörper im Test der Fa. Binding Site und Medipan unter dem Grenzwert, der Test der Fa. Biomed und der Nachweis für EmA-IgA-Antikörper waren je mäßig positiv. Die Blutentnahme war zum Zeitpunkt der Diagnosestellung durchgeführt worden. Drei weitere falsch-negative Patienten hatten zum Zeitpunkt der serologischen Untersuchung bereits eine glutenfreie Diät (GFD) begonnen. Einer davon hält erst seit 4 Monaten eine GFD ein, die anderen zwei schon seit mehr als einem Jahr, wobei einer davon Diätfehler beging, die zu erneuten Schleimhautveränderungen führten, und der andere unter einer therapierefraktären Zöliakie mit immer wieder auftretenden Schleimhautveränderungen leidet. Somit waren die Schleimhautveränderungen, das Kriterium zur Eingruppierung der an Zöliakie Erkrankten, noch vorhanden. Bei dem letzten falsch-negativen Patienten stellten sich die Schleimhautveränderungen als Reaktion auf eine Kuhmilchprotein-Intoleranz heraus, eine Zöliakie wurde bei diesem Patienten im Nachhinein ausgeschlossen. Der im Test als positiv erkannte Patient, d.h. der im Medipan-Test erhöhte tTG-IgA-Antikörper hatte, leidet unter Morbus Crohn.

Wenn man aufgrund dieses Hintergrundwissens die Ergebnisse bereinigt und die Patienten mit GFD bzw. den Patienten mit Kuhmilchproteinintoleranz aus der Statistik herausnimmt, ergibt sich für den tTG-IgA-Antikörper-Test der Fa. Medipan eine verbesserte Sensitivität von 96,9% bei einer gleichbleibenden Spezifität von 98,2% (Tab. 3.2).

Im Testansatz der Fa. Biomed war bei zwei definitionsgemäß erkrankten Patienten der Nachweis für tTG-IgA-Antikörper negativ. Beide Patienten standen bereits unter GFD, beide seit über einem Jahr (s.o.). Daraus ergibt sich eine Sensitivität von 93,9 %. Die Spezifität beträgt hier 94,5%. Drei zöliakie-gesunde Patienten wiesen positive Ergebnisse für tTG-IgA-

Antikörper auf. Einer davon ist der Patient mit Morbus Crohn, der schon im Test der Fa. Medipan positiv war. Der zweite Patient leidet unter Diabetes mellitus Typ 1 und Morbus Basedow. Bei dem dritten Patienten gibt es keine nachvollziehbare Begründung für das auch nur schwach positive Ergebnis. Wenn man auch hier die zwei Patienten mit GFD aus der Statistik (s.Tab 3.4) nimmt, erreicht man eine verbesserte Sensitivität von 100% von gleichbleibender Spezifität von 94,5%.

Bei der Untersuchung mit dem Testkit der Fa. Binding Site betrug die Sensitivität 81,8%, die Spezifität 100%. Die im Verhältnis geringe Sensitivität ist darauf zurückzuführen, dass bei diesem Testkit 6 Patienten falsch-negativ gemessen wurden. Fünf dieser Patienten wurden bereits im Testansatz der Fa. Medipan negativ getestet und sind dort schon näher beschrieben worden. Ein weiterer Patient war bei Binding Site erstmalig und allein falsch-negativ. In allen weiteren Zöliakie typischen serologischen Test zeigte er positive Ergebnisse. Eine Spezifität von 100% bedeutet, dass wir hier keine Falsch-Positiven haben. Schließt man wiederum die Patienten unter GFD bzw. mit Kuhmilchintoleranz aus, bleiben nur zwei falsch-negative Patienten übrig. Somit erreicht man eine Sensitivität von 93,1% und eine Spezifität von 100%.

Betrachten wir die uns oben aufgefallenen Patienten nun im Bezug auf alle drei angewendeten Tests zum Nachweis von IgA-Antikörpern gegen die Gewebstransglutaminase kommt man zu folgenden Ergebnissen: Die drei Patienten, die zum Untersuchungszeitpunkt unter GFD standen hatten bis auf einen, der bei Biomed IgA-Antikörper im schwach positiven Bereich aufwies, bei allen drei Tests übereinstimmend negative Testergebnisse. Der Patient mit den bei der Fa. Biomed gering positiven tTG-IgA-Antikörpern hält seit 5 Monaten GFD, während die zwei anderen Patienten sich schon seit über einem Jahr glutenfrei ernähren. In diesem Zeitraum sind die Antikörper kontinuierlich gefallen. Über das Verhalten der IgA-Antikörper nach Beginn einer GFD wird ausführlicher unter 4.5 diskutiert.

Der Patient mit der Kuhmilchproteinintoleranz wurde beim Test der Fa. Biomed nicht negativ getestet wie es bei Binding Site und Medipan der Fall war. An sich ist das Ergebnis nach Ausschluß einer Zöliakie falsch-positiv. Umgekehrt jedoch wurde die Patientin mit nachgewiesener Zöliakie, mit aber von vornherein nur mäßiggradig erhöhten Antikörpern bei Biomed eindeutig als positiv erkannt, während die tTG-IgA-Antikörper bei Binding Site und Medipan im Normbereich lagen und eine Zöliakie in diesen Tests übersehen worden wäre. Bis auf den Test der Fa. Binding Site wurde der Patient mit Morbus Crohn mäßig positiv auf tTG-IgA-Antikörper getestet. Von den zwei der Patienten, die einzig im Biomed-Test über

der Norm liegende tTG-IgA-Antikörper zeigten, leidet einer unter einem juvenilen Diabetes mellitus.

Gesunde oder andersweitig erkrankte Patienten mit erhöhten tTG-IgA-Antikörpern wurden schon in mehreren anderen Studien zu diesem Thema beschrieben. Diese definitionsgemäß falsch-positiven Ergebnisse wurden bei Patienten mit anderen gastrointestinalen Erkrankung beschrieben, bei Patienten, die nahe Verwandte von an Zöliakie-erkrankten Personen sind und selbst an einer latenten asymptomatischen Form der Zöliakie leiden. (11, 24, 42, 50, 66, 73). Hierzu passt unser Patient mit Morbus Crohn, der in zwei Tests positive Ergebnisse aufwies. Ein falsch-positives Testergebnis bei negativem Nachweis von EmA-Antikörpern kann eventuell auch durch Unterschiede in der Spezifität der verschiedenen Antikörper erklärt werden und das könnte bedeuten, dass die Gewebstransglutaminase nicht das einzigste Antigen für Zöliakie-assoziierte Antikörper ist, sondern dass diese auch noch gegen andere Antigene gerichtet sein können. (24, 42). Die falsch-negativen Ergebnisse sind am ehesten dadurch zu erklären, dass diese Patienten zum Zeitpunkt der Untersuchung schon eine glutenfreie Diät (GFD) begonnen hatten. Die Tatsache, dass nicht sie nicht in allen Testkits zum Nachweis von tTG-IgA-Antikörpern negativ waren und auch die EmA-Antikörper positiv waren, läßt sich darauf zurückführen, dass nach Beginn einer GFD nicht alle Werte gleich schnell abfallen und negativ werden. Die Sensitivität und Spezifität von Gewebstransglutaminase-Antikörper-Tests ist bereits in zahlreichen Studien beschrieben worden und erreichten Werte für die Sensitivität von 86-98% und für die Spezifität von 91-98%. (6, 18, 24, 31, 37, 42, 50, 51, 64, 69, 73, 74) . In dieser Arbeit sind ausschließlich Antikörper-Tests verwendet worden, die als Antigen die Gewebstransglutaminase aus der Meerschweinchenleber benutzt haben. Es wurde jedoch schon in einigen späteren Studien gezeigt, dass die auf Meerschweinchenleber-Transglutaminase basierenden ELISA-Tests eine geringere Sensitivität und auch Spezifität haben, als die neueren, die humane rekombinierte Gewebstransglutaminase als Antigen benutzen. (6, 7, 18, 42, 53, 64).

Nach Ausschluß aller Patienten, von denen wir wissen, dass sie entweder unter IgA-Mangel leiden, dass sie zum Zeitpunkt der Untersuchung unter GFD standen oder dass die beobachteten Dünndarmschleimhautveränderungen anderer Genese waren, erhalten wir die bereinigten und reellen statistischen Werte. Damit hat in dieser Arbeit der Test der Fa. Biomed die sensitivsten Testergebnisse mit einer Sensitivität von 100% geliefert, d.h. er hat alle Erkrankten erkannt. Auch die Spezifität mit 94,5% ist sehr gut, auch wenn sie im Vergleich zu den anderen Tests die niedrigste ist. Da die Sensitivität des Tests der Fa. Biomed jedoch denjenigen der Fa. Binding Site (93,1%) und der Fa. Medipan (96,9%) überlegen ist,

empfeht sich zur weiteren Diagnostik der Gewebstransglutaminase-IgA-Antikörper die Verwendung des Testkits der Fa. Biomed.

Der positive und negative Vorhersagewert der drei durchgeführten Test, das heißt die Abschätzbarkeit, dass jemand mit einem positiven beziehungsweise negativen Testergebnis tatsächlich krank beziehungsweise gesund ist, erreichen mit 91,1 -100% bzw. 90,2 - 100% jeweils sehr gute Ergebnisse.

4.1.2 Korrelationen:

Korrelation mißt inwieweit zwischen zwei Tests eine lineare Abhängigkeit besteht. In diesem Zusammenhang bedeutet das, wie gut die einzelnen Tests in den quantitativen Messergebnissen miteinander übereinstimmen, ob ein hoher Antikörpertiter in einem Test auch einen entsprechend hohen Titer in einem anderen Test entspricht, beziehungsweise ob ein niedriger, gar unter dem Grenzwert liegender Antikörpertiter in einem anderen Test relativ gesehen ähnlich niedrig ist.

Die Testkits der Firmen Medipan und Biomed korrelieren in der Gruppe 1 mit $r = 0,796$ gut miteinander, das heißt, dass bei den an Zöliakie Erkrankten die aus je zwei Tests erhaltenen Wertepaare eines jeden Patienten sich insgesamt nahe um die in Abb.3.1 eingezeichneten Trendlinie gruppieren und somit eine hohe lineare Abhängigkeit repräsentieren. Die Übereinstimmung der quantitativen Messergebnisse ist im Bereich der niedrigeren Antikörpertiter am größten, bei sehr hohen Antikörpertitern ist die Überstimmung z.T. sehr schlecht, was daran zu erkennen ist, dass dort die Punkte weit von der Trendlinie entfernt liegen, z.T. aber auch direkt darauf, was einer fast 100% -igen Übereinstimmung entspricht. Insgesamt haben wir eine recht gute Korrelation. In der Gruppe 3 besteht mit $r = - 0,03$ keine Korrelation zwischen den beiden Tests und bei Gruppe 2 mit $r = 0,658$ eine mittelmäßige Übereinstimmung. Bei Antikörpertitern, die unter dem Grenzwert liegen, wie sie bei Zöliakie-Negativen meist auftreten, ist kaum eine lineare Abhängigkeit der Werte festzustellen.

Die Testkits der Firmen Medipan und Binding Site korrelieren in der Gruppe 1 mit $r = 0,884$ sehr gut miteinander. Auch hier ist die relative Übereinstimmung der Titer im unteren bis mittleren positiven Wertebereich am größten, während sehr hohe Antikörper in beiden Tests eher schlecht miteinander korrelieren. In den Patientengruppen 3 mit $r = 0,248$ und 2 mit $r = 0,205$ gibt es keine Übereinstimmung der Werte. Beim Vergleich der Testkits der Firmen Biomed und Binding Site erhält man in der Gruppe 1 eine Korrelationskoeffizienten von $r =$

0,826, was wiederum in dieser Patientengruppe für eine gute Übereinstimmung der Messergebnisse einzelner erkrankter Patienten spricht. Die Wertepaare gruppieren sich hier über alle Wertebereiche verteilt sehr gleichmäßig um die in Abb. 3.3 eingezeichnete Trendlinie, und korrelieren in allen Bereichen ähnlich gut miteinander. Für die Patientengruppe 3 ergibt sich mit $r = 0,379$ eine kaum vorhandene Übereinstimmung und für die Patientengruppe 2 mit $r = - 0,133$ keine Übereinstimmung in der Quantität der Antikörpertiter.

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass in der Patientengruppe 1 zwischen den einzelnen Testkits insgesamt eine gute quantitative Übereinstimmung der Testwerte vorliegt. In den Gruppen 3 und 2 ist diese Übereinstimmung in allen Vergleichen nicht signifikant.

4.2 Vergleich von 3 verschiedenen kommerziellen Kits zum Nachweis von tTG-IgA- Antikörpern mit dem IFT zum Nachweis von EmA-IgA-Antikörpern: Spezifität und Sensitivität; Korrelationen:

4.2.1 Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer Vorhersagewert:

Anhand der Tabelle 3.7 lassen sich Spezifität und Sensitivität des Endomysium-IgA-Antikörper-Tests errechnen. Die Sensitivität beträgt 90,9%. Zwei der falsch-negativen Testergebnisse, d.h. negative EmA-IgA-Antikörper bei noch nachweisbaren zöliakietyptischen Dünndarmschleimhautveränderungen, lassen sich am ehesten darauf zurückführen, dass diese Patienten zum Zeitpunkt der Untersuchung bereits eine glutenfreie Diät begonnen hatten. Bei einem der Patienten liegt die Zeitspanne zwischen positiver Biopsie, anschließendem Beginn einer GFD und der nächsten hier vorliegenden Blutentnahme bei 2 Monaten, was die noch vorliegenden Dünndarmschleimhautveränderungen bei negativem EmA-IgA-Antikörper-Nachweis erklärt. Bei dem zweiten Patienten liegt, wie schon weiter oben besprochen, eine therapierefraktäre Zöliakie vor, und er hat trotz histologischem Nachweis einer totalen Atrophie der Schleimhaut keine EmA-IgA-Antikörper im Blut. Bei dem dritten falsch-negativen Patienten wurden die Dünndarmschleimhautveränderungen fälschlicherweise primär als Zöliakie interpretiert. Der Patient leidet, wie schon weiter oben beschrieben, an einer Kuhmilchproteinintoleranz. Das negative Testergebnis für Ema-IgA- Antikörper ist also durchaus richtig. Unter Betrachtung dieser Hintergrundinformationen und nach Ausschluß dieser Patienten erhalten wir eine Sensitivität von 100%. Die Tatsache, dass die

Patienten in den Gruppen 2 und 3 nach dem Kriterium selektiert wurden, dass sie negative Testergebnisse im Endomysium-IgA-Antikörper-Test aufwiesen, läßt keinen Rückschluß auf die Spezifität vom EmA-IgA-Antikörper-Test zu.

In der Literatur gibt es bereits mehrere vergleichende Untersuchungen über Sensitivität und Spezifität vom EmA-IgA-Antikörper-Test und tTG-IgA-Antikörpertest. Die Sensitivität von EmA-IgA liegt hier bei 95-100% , bei Kindern, die jünger als 2 Jahren sind, wurde sie allerdings nur mit 80-85% angegeben. (22,63). Die Spezifität wird altersunabhängig in vielen Studien mit ca. 100% angegeben. (14, 22, 34, 36, 61, 62). Der tTG-ELISA erreichte eine Sensitivität von 86-98% und eine Spezifität von 91-98%. (6,18,24,31,37,42, 50,51,64,69,73,74).

Im Vergleich der drei Testansätze zum Nachweis von IgA-Antikörpern gegen die Gewebstransglutaminase und gegen Endomysium haben insgesamt der Test der Fa. Biomed und der EmA-Test die beste Sensitivität mit jeweils 100%. Die Tatsache, dass der EmA-Test in der Sensitivität im Bereich einer der drei tTG-IgA-Antikörpertests an der Spitze liegt, die anderen zwei tTG-IgA-Antikörper-Tests aber eine niedrigere Sensitivität erreichen, läßt keine eindeutige Aussage darüber zu, ob der tTG-IgA-Antikörper Test oder der EmA-IgA-Antikörper-Test generell der bessere ist. Diskussionen darüber, welche der beiden Testmethoden nun die bessere sei, werden zahlreich geführt. Ihre Inhalte sind bereits weiter oben aufgeführt worden.

4.2.2 Korrelationen:

Da in den Patientengruppen 2 und 3 der Test auf EmA-IgA-Antikörper bei allen Patienten negativ war und wir dafür keine quantitativen Werte, sondern den Wert null erhalten, läßt sich für diese Gruppen der Pearson-Korrelations-Test nicht durchführen. Folgende Korrelationen beziehen sich folglich auf die Patientengruppe 1. Der EmA-IgA-Antikörper-Test korreliert mit dem tTG-IgA-Antikörper-Test der Fa. Medipan mit $r = 0,776$ und mit dem Test für tTG-IgA- Antikörper der Firma Biomed mit $r = 0,787$ und mit dem Testkit für tTG-IgA-Antikörper der Firma Binding Site mit dem Faktor $r = 0,905$. Daraus kann man ersehen, dass der Gewebstransglutaminase- und der Endomysium-Antikörper-Test in der Quantität der Antikörpertiter für jeden einzelnen Patienten sehr nahe beieinander liegen. Hohe Antikörpertiter in einem der Gewebstransglutaminasetests entsprechen im Endomysium-Antikörper-Test noch in sehr großen Verdünnungen nachweisbaren Antikörpern.

Beim Vergleich von EMA-IgA und tTG-IgA bei der Patientengruppe 2 ist aufgefallen, dass alle Patienten für EmA-IgA negativ waren, im Gewebstransglutaminase-Antikörper-Test aber dennoch ein paar schwach positive Testwerte aufgefallen sind. Erklärungen hierzu wurden bereits unter 4.1.2 besprochen.

4.3 Vergleich von EMA-IgG- und tTG-IgG-Test:

In der Gruppe 3 waren bei keinem Patienten IgG-Antikörper gegen Endomysium nachzuweisen. Bei drei Patienten waren jedoch die IgG-Antikörper gegen die Gewebstransglutaminase erhöht. Bei einer dieser Patienten waren zudem die tTG-IgA-Antikörper im Test der Fa. Binding Site im Graubereich. Ansonsten war bei diesen Patienten jeder serologische Nachweis hinsichtlich der Zöliakie wiederholt negativ. Zwei dieser Patienten leiden jedoch an einem Diabetes mellitus Typ I, einer zusätzlich noch an einem Morbus Basedow mit hyperthyreoter Stoffwechsellage. Dies ist der oben genannte Patient mit den in nur einem Test latent erhöhten tTG-IgA-Antikörpern. Die dritte Patientin klagte unter rezidivierenden Bauchschmerzen. Neben einer Zöliakie konnte auch ein Morbus Crohn mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Auch ein Mangel an Immunglobulin IgA bestand nicht. Die Diagnose wurde schließlich auf ein Colon irritabile festgelegt.

Dies bestätigt das Ergebnis einiger Studien, dass IgG-Antikörper gegen die Gewebstransglutaminase nicht nur bei Zöliakie entdeckt werden können, sondern auch bei entzündlichen und Autoimmun-Erkrankungen vorkommen können. (9, 17, 18).

Die Patienten der Gruppe 2 haben definitionsgemäß eindeutig positive Anti-Gliadin-IgG-Antikörper (AGA-IgG) bei normalen Anti-Gliadin-IgA-Antikörpern (AGA-IgA) und negativen EmA-IgA-Antikörpern.

Einer der Fragestellungen dieser Arbeit ist es, einen Anhalt dafür zu finden, ob die Patienten der Gruppe 2 mit dieser Antikörper-Konstellation und mit Zöliakie-typischen Symptomen Tendenz zu einer latenten Verlaufsform der Zöliakie haben, ob sie vielleicht unter einem latenten IgA-Mangelsyndrom leiden und ihre IgA-Werte deswegen negativ sind, oder ob die Erhöhung der AGA-IgG-Antikörper doch nur unspezifisch ist und die Verdachtsdiagnose einer Zöliakie nicht bestätigen kann. Um dem nachzugehen, wurden zur weiteren Diagnostik die tTG-IgA- und -IgG-Antikörper sowie die EmA-IgG-Antikörper gemessen.

Alle Patienten waren negativ für EmA-IgG. Im tTG-IgG-Antikörpertest waren vier Patientenserum leicht positiv, ein Serum deutlich positiv. Dieser Patient stellte sich mit den Symptomen Bauchschmerzen, Blähungsneigung und einer persistierenden Eisenmangelanämie in der gastroenterologischen Ambulanz vor. Es wurden in drei aufeinanderfolgenden Jahren die Anti-Gliadin Antikörper bestimmt. Das Ergebnis war jedes Mal annähernd dasselbe, obwohl seit der ersten Untersuchung eine GFD eingehalten wurde, was vorübergehend auch eine Besserung der Symptome zur Folge hatte: Eindeutig erhöhte AGA-IgG Antikörper bei negativen AGA-IgA-Antikörpern. Die Testergebnisse für EmA-IgA und IgG-Antikörper, sowie für tTG-IgA-Antikörper waren alle stets negativ. Eine durchgeführte Dünndarmbiopsie zeigte eine intakte Schleimhaut, womit die Diagnose Zöliakie endgültig verworfen werden konnte. Ein Mangel an Immunglobulin IgA konnte ebenfalls ausgeschlossen werden. Dieser Fall wurde ohne eine Diagnosestellung abgeschlossen.

Bei zwei der Patienten mit schwach-positiven tTG-IgG-Antikörpern waren die tTG-IgA-Antikörper im Test der Fa. Biomed im Graubereich, alle weiteren gemessenen Werte aber negativ. Sbattero et al. (53) beschreiben in ihrer Arbeit Fälle von Patienten, die negativ auf Endomysium-IgA-Antikörper getestet wurden und niedrige tTG-IgA-Antikörper aufwiesen. Alle diese Patienten zeigten jedoch hohe Titer von spezifischen tTG-IgG-Antikörpern. Sbattero et al. (53) kamen somit zum Schluß, dass der tTG-Test für IgG-Antikörper in der Lage ist, Patienten mit Zöliakie, die im EmA-IgA- und tTG-IgA-Test übersehen wurden, doch noch zu identifizieren. Widersprechen tun dieser Annahme Cataldo et al. (9), die die tTG-IgG-Antikörper als eher unspezifisch und nicht beweisend für eine Zöliakie beschreiben.

In unseren Fällen ist ein IgA-Antikörper-Mangel in den meisten Fällen nicht ausgeschlossen worden. Es muss über die Zeit beobachtet werden, ob bei den Patienten die Symptome, die zur Untersuchung geführt haben, anhalten und tatsächlich eine latente Zöliakie vorliegt und die Antikörperkonstellation im Verlauf deutlich positiv wird, oder ob die Erhöhung der tTG-IgG-Antikörper unspezifisch ist und der Patient doch an einer entzündlichen Gastrointestinalerkrankung oder Autoimmunerkrankung leidet. Schlußendlich kann, was wir aufgrund der Invasivität meist nicht durchgeführt haben, eine Biopsie von Dünndarmgewebe die endgültige Diagnose sichern.

Bei den Patienten mit Zöliakie (Gruppe 1) hatten mit 16 Patienten nicht mal die Hälfte IgG-Antikörper gegen Endomysium. 17 Patienten wiesen positive IgG-Antikörpertiter gegen die Gewebstransglutaminase auf, ein weiterer zeigte IgG-Antikörper im schwach positiven

Bereich. Von den Patienten mit positiven EmA-IgG-Antikörpern war nur einer nicht auch positiv für tTG-IgG-Antikörper, 2 Patienten mit positiven tTG-IgG-Antikörpern waren negativ für EmA-IgG-Antikörper. Cataldo et al. (9) beschreiben eine 100% Übereinstimmung der EmA-IgG- und tTG-IgG-Werte, die bei uns nicht ganz, aber annähernd auch vorliegt. Da eine direkte Korrelation nicht möglich ist (siehe 3.3.), kann eine quantitative Übereinstimmung der Werte, d.h. ob zum Beispiel der in einem Patientenserum gemessene hochpositive tTg-IgG-Antikörpertiter auch noch in sehr großen Verdünnungen nachweisbaren EmA-IgG-Antikörpern entspricht, nur sehr ungenau beschrieben werden. Bei 4 Patienten sind bis zur Verdünnungsstufe 1:1280 bzw. 1:640 EmA-IgG-Antikörper nachweisbar. Im tTG-IgG-Test haben alle vier IgG-Antikörper im hochpositiven Bereich, deren quantitativen Werte miteinander vergleichbar sind. Das bedeutet, dass im hochpositiven Bereich eine hohe lineare Abhängigkeit der Testergebnisse beider Tests für jeden einzelnen Patienten besteht. Im mittleren Wertebereich gibt es 6 Patienten, bei denen ein EmA-IgG-Antikörpertiter von 1:80 gemessen wurde. Da alle 6 Patienten in einem Testansatz des tTG-IgG-Tests untersucht wurden, sind die für jeden dieser Patienten entsprechenden quantitativen tTG-IgG-Werte miteinander vergleichbar. Die jeweiligen tTG-IgG-Werte liegen jedoch in einer sehr breiten Spannweite, so dass die Korrelation in diesem Bereich sehr schlecht ist. Auch bei den schwach positiven EmA-IgG-Antikörpertiter ist keine lineare Abhängigkeit mit den tTG-IgG-Werten zu beobachten.

4.3.1 Spezifität, Sensitivität, positiver und negativer Prädiktionwert

Für den IgG-tTG-Test ergibt sich eine Spezifität von 87% und ein Sensitivität von 50%. Beim IgG-EmA-Test erhalten wir eine Spezifität von 100% und eine Sensitivität von 44,4%. Der positive und negative Vorhersagewert liegen bei 72% und 72,3% bei tTG-IgG beziehungsweise bei 100% und 73% bei EmA-IgG. In zu diesem Thema durchgeführten Arbeiten, bei denen bei der Mehrheit der Patienten kein IgA-Mangel-Syndrom – wie es auch bei uns der Fall ist – vorlag, wird eine breite Spannweite an erlangter Spezifität und Sensitivität berichtet. Für EmA-IgG-Antikörper wurde von Beutner et al. 1989 nur eine Sensitivität von 15% berichtet. Waren die EmA-IgG-Antikörper positiv, dann aber in mindestens zwei Verdünnungsstufen geringer, als die EmA-IgA-Antikörper (5). Für die IgG-Antikörper gegen die Gewebstransglutaminase erreicht die Spezifität hohe Werte von 91% (24) bis 100% (9). Die Sensitivität hingegen reicht von 23% -100% (19, 24, 74). Diese Werte können durch unsere Studie unterstützt werden. Ursache für die variablen Werte für die

Sensitivität könnte das Ergebnis technischer Schwierigkeiten sein, da der IFT einer subjektiven Interpretation unterliegt.(9) Diese großen Schwankungen der Sensitivität haben zur Konsequenz, dass der Nachweis von IgG-Antikörpern gegen Endomysium und die Gewebstransglutaminase keine Anwendung in der Primärdiagnostik findet, sondern bei unklaren Antikörperkonstellationen oder bei Verdacht auf IgA-Mangelsyndrom ergänzend angewendet wird und hier eventuell sogar der Primärdiagnostik entgangene Zöliakie-Erkrankungen aufdecken kann. Die kombinierte Anwendung von tTG-IgA und tTG-IgG erreichte eine Sensitivität von 100% in der Diagnostik der Zöliakie (31, 48). Auf die spezielle Bedeutung der IgG-Antikörper-Bestimmung bei IgA-Mangel wird weiter unten ausführlich eingegangen.

4.4. Verhalten von EmA IgG und tTG IgG bei Patienten mit IgA-Mangelsyndrom

In dieser Arbeit gibt es 2 Patienten mit IgA-Mangel. Aufgefallen sind sie mit hohen AGA-IgG bei negativen AGA-IgA und negativen EmA-IgA. Bei zöliakietyppischen Symptomen und klinischem Verdacht auf IgA-Mangel wurde der EmA-Test auch auf IgG-Antikörper durchgeführt, wo sich dann hoch positive Werte zeigten. Auch der tTG-IgG-Test zeigte hoch positive Werte. Die Diagnose konnte histologisch bestätigt werden.

Für Patienten mit IgA-Mangel-Syndrom (IgAD) wurde eine Sensitivität für IgG-EmA und IgG-anti-tTG von 100% beschrieben (9, 64). Die Spezifität erreichte ebenfalls hohe Werte, bei Cataldo et al. sogar 100%.(9) Die Übereinstimmung der Resultate von EmA-IgG und tTG-IgG ist annähernd perfekt (47). Während bei Patienten mit normalem Serum-IgA nur geringen oder gar keine EmA-IgG-Titer nachgewiesen worden sind (Sensitivität von 44,4%), sind bei Patienten mit IgAD die Antikörpertiter unwahrscheinlich hoch. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass bei IgA-Mangel die IgG-Antikörper eine kompensatorische Rolle übernehmen. (5, 9). Als hochempfindliche und spezifische Methode zum Nachweis von Zöliakie bei IgAD wird EmA-IgG und tTG-IgG als ergänzende Diagnostik zur Standard-IgA-Diagnostik empfohlen. (9, 24, 47, 53, 64, 74)

4.5. Verhalten der verschiedenen Antikörper unter glutenfreier Diät

In der Patientengruppe 1 kann man bei insgesamt 6 Patienten nur gering positive bzw. schon negative Antikörper- Werte beobachten. Die Blutproben dieser Patienten wurden ungefähr in einem Zeitraum von zwei Wochen vor bzw. nach der positiven Biopsie abgenommen und

untersucht. Bei näherer Betrachtung der Patienten, wie bereits unter 4.1.2. geschehen, leiden 2 der 6 Patienten jedoch an IgAD und bei einem Patienten wurde eine Fehldiagnose gestellt. So bleiben noch 3 Patienten, deren Antikörper-Konstellationen tatsächlich auf eine GFD zurückzuführen sind.

Leider ist nur bei einem der Patienten anhand der vorliegenden Akten ein Verlauf der Werte zu verfolgen. Der EmA-IgA-AK-Titer betrug zum Zeitpunkt der Diagnosestellung 1:160. Zwei Monate nach Beginn einer GFD betrug der Titer noch 1:5. Ein halbes Jahr nach Beginn einer GFD waren die Endomysium-Antikörper erstmals nicht mehr nachweisbar. Die hochpositiven tTG-IgA-Antikörper im Test der Fa. Medipan fielen schnell nach Diätbeginn und waren 6 Monate danach nicht mehr nachweisbar. Zu diesem Zeitpunkt waren jedoch die tTG-IgA-Antikörper im Test der Fa. Biomed noch nachweisbar. Bei Binding Site waren die Antikörper ebenfalls nicht mehr nachweisbar. Bei einem weiteren Patienten, der sich bereits seit 1,5 Jahren glutenfrei ernährt, waren alle Tests zum Nachweis von tTG-Antikörpern negativ, wenn auch die tTG-IgA-Antikörper im Test der Fa. Biomed nur knapp unter dem Grenzwert lag, der Nachweis von EmA-Antikörper fiel jedoch mit einem Titer von 1:5 positiv aus. Die Erklärung hierfür sind Diätfehler. Das würde bedeuten, dass der EmA-Test am sensibelsten auf eine auch noch so geringfügige Glutenbelastung reagiert, während die Transglutaminase-Tests keine Reaktion zeigen. Der Patient zeigt, wie unter 2.1.1. definiert, Zöliakie-typische Schleimhautveränderungen. Diese werden in diesem Fall nur durch positive EmA-IgA-Antikörper repräsentiert. Der Dritte hat in allen Untersuchungen keinen positiven Nachweis von EmA- oder tTG- Antikörpern, trotz der auch hier noch vorhandenen Schleimhautveränderungen. Auch eine weitere spätere Biopsie unter GFD zeigt eine partielle subtotale Zottenatrophie. Dieser Patient leidet unter einer therapierefraktären Form der Zöliakie.

Diese Ergebnisse bestätigen nicht unbedingt die Aussage von Sardy et al. (50), daß der tTG-IgA-ELISA einen schnellen Effekt der GFD zeigen kann, ehe die EmA-IgA negativ geworden sind. Demnach bietet der quantitative tTG-ELISA einen offensichtlichen Vorteil gegenüber dem semiquantitativen EmA-IFT. Die Werte fallen unter glutenfreier Diät schnell ab und es besteht eine enge Korrelation mit den histologischen Veränderungen in der Duodenalschleimhaut. (23, 24, 51, 53, 66, 69, 73). (Dies war in unserem einem Fall genau gegenteilig der Fall.) Der Gastroenterologe kann effektiver die GFD- Compliance des Patienten überprüfen. Es wurden allerdings aber auch schon Patienten beschrieben, die nach einem Jahr GFD noch tTG-IgA-positive Werte aufwiesen. Nach erneuter Glutenbelastung steigen die tTG- IgA wieder rasant an (24). Zur Kontrolle des Krankheitsverlaufes und der

Einhaltung der glutenfreien Diät ist die Bestimmung der EMA eher ungeeignet. Zwar sinken die Antikörper-Werte unter Diät ab und steigen bei Belastung wieder an, das geschieht aber in einer großen zeitlichen Variationsbreite und nur sehr unzuverlässig. (36, 50, 62, 63). In unserem eine Fall hat sich der EmA-IgA-Antikörper Test als der sensibelste erwiesen. Mangels Verlaufsbeobachtungen kann jedoch zu den anderen hier beschriebenen Studienergebnissen keine Stellung bezogen werden. Einzig auffallend in unseren Untersuchungen war, dass im Testansatz der Fa. Biomed der Patient noch nach 6 Monaten unter GFD positive Werte aufwies und die Werte bei dem Patienten, der bereits seit 1,5 Jahren unter GFD steht, nur knapp negativ ausfielen. Hypothetisch könnte man nun hier eine geringere Sensibilität des Testkits der Fa. Biomed im Vergleich zu den Firmen Binding Site und Medipan hinsichtlich der Reaktion auf glutenfreie Nahrung aufstellen. Nur weitere Untersuchungen und Verlaufsbeobachtungen könnten dieses Ergebnis bestätigen. Schlußfolgernd können wir anhand der hier beschriebenen Beobachtungen der Werte unter GFD keinen der Tests als eindeutig vor-oder nachteilig bewerten.

4.6. Altersverteilung der erhaltenen Werte :

In den Abbildungen 3.4.-3.6. sind, nach Testanbieter separiert, in je einem Diagramm das Verhalten der Transglutaminase-Antikörper in Abhängigkeit zum Alter des Patienten zum Untersuchungszeitpunkt dargestellt.

Anhand der Abbildung 3.4 sieht man, dass im Test der Fa. Medipan die Patienten in der Altersklasse von 4 bis 7 Jahren im Schnitt die höchsten IgA-Antikörper-Werte aufwiesen. die Werte in den Gruppen bis 4 Jahre und von 7- 10 Jahren sind auf gleichem Niveau niedriger. Bei der Fa. Binding Site (Abb. 3.5) zeigen die an Zöliakie-erkrankten Patienten mit zunehmendem Alter bis zu 10 Jahren abnehmende Titer an tTG-IgA-Antikörpern. Das bedeutet, daß im Test der Fa. Binding Site Zöliakie-erkrankte Kinder mit 2 Jahren im Durchschnitt die höchsten Transglutaminase- IgA-Antikörper aufweisen. Bei der Fa. Biomed ist keine eindeutige Altersabhängigkeit der IgA-Antikörper-Werte zu beobachten. Die Patienten bis 7 Jahre wiesen im Schnitt höhere Werte auf als die älteren Patienten. Hansson et. al. (24) sind in einer Patientenstudie zu dem Ergebnis gekommen, dass Zöliakie-erkrankte Kinder jünger als 5 Jahre die höchsten Titer sowohl an IgA- als auch an IgG-Transglutaminase aufweisen. Dies kann durch die Abbildungen 3.5. und 3.6. im Wesentlichen bestätigt werden.

In der Abb. 3.7. ist die Alterverteilung der EmA-IgA-Antikörper in der Gruppe 1 in einem Diagramm dargestellt. Der mit steigendem Alter abnehmende Verlauf der Trendlinie ist hier deutlich zu erkennen. Das bedeutet, daß in dieser Studie die Antikörper-Titer gegen Endomysium bei Kleinkindern am höchsten sind und anschließend mit zunehmendem Alter linear abfallen.

5. ZUSAMMENFASSUNG:

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Vergleich von Endomysium-Antikörpern mit Antikörpern gegen die Gewebstransglutaminase. Verglichen wurden das Verhalten der Ergebnisse bei verschiedenen Patientengruppen, des weiteren das Verhalten unter glutenfreier Diät, bei Patienten, die einen IgA-Antikörpermangel haben, das Verhalten bei unklaren Fällen und zum Schluß die Altersabhängigkeit der Ergebnisse. Anhand von im gastroenterologischen Labor des Von Haunerschen Kinderspitals München durchgeführten Blutentnahmen und Untersuchungen wurden drei verschiedene Patientengruppen gebildet: Gruppe 1 hat eine bioptisch gesicherte floride Zöliakie, die Patienten der Gruppe 2 haben auffällige Gliadin-Antikörper-Werte, bei aber negativen Endomysium-Antikörpern, und Gruppe 3 sind nicht an Zöliakie-erkrankte Patienten. Zum Nachweis von IgA-Antikörpern gegen die Gewebstransglutaminase wurden drei ELISA-Testkits von verschiedenen kommerziellen Anbietern angewendet, die nicht nur jeweils mit den mittels indirektem Immunfluoreszenz ermittelten Endomysium-Antikörpern, sondern auch miteinander verglichen wurden. Zur Untersuchung der IgG-Antikörper wurde der Endomysium-Antikörper-Test und mangels Anbieter nur ein Testkit zum Nachweis von IgG-Antikörpern gegen die Gewebstransglutaminase durchgeführt.

Beim Vergleich der Spezifität, Sensitivität und des positiven und negativen Vorhersagewertes ergaben sich nach Ausschluß aller Patienten, von denen wir wissen, dass sie entweder unter IgA-Mangel leiden, dass sie zum Zeitpunkt der Untersuchung unter GFD standen oder dass die beobachteten Dünndarmschleimhautveränderungen anderer Genese waren, folgende Ergebnisse: In dieser Arbeit hat der Test der Fa. Biomed die höchste Sensitivität mit 100% und liegt damit deutlich über denjenigen der Fa. Binding Site (93,1%) und der Fa. Medipan (96,9 %). Die Spezifität liegt bei Biomed bei 94,5% und ist im Vergleich zu den anderen Tests die niedrigste (Binding Site 100%, Fa. Medipan 98,2 %). Aufgrund der eindeutig überlegenen Sensitivität des Test der Fa. Biomed empfiehlt sich zur weiteren Diagnostik der Gewebstransglutaminase-IgA-Antikörper jedoch am ehesten die Verwendung dieses Testkits. Der positive und negative Vorhersagewert der drei durchgeführten Tests erreichen mit 91,1 - 100% bzw. 90,2 - 100% jeweils sehr gute Ergebnisse. Im Vergleich dazu hat der EmA-Test nach Ausschluß oben genannter Patienten ebenfalls eine Sensitivität von 100%.

Beim Vergleich von dem Endomysium-Test und dem tTG-Test zu Nachweis von IgG-Antikörpern ergibt sich für den IgG-tTG-Test eine Spezifität von 87% und ein Sensitivität

von 50%. Beim IgG-EmA-Test erhalten wir eine Spezifität von 100% und eine Sensitivität von 44,4%. Der positive und negative Vorhersagewert liegen bei 72% und 72,3% bei tTG-IgG beziehungsweise bei 100% und 73% bei EmA-IgG. Aufgrund der niedrigen Sensitivität beider Tests hat sich der Nachweis von IgG-Antikörper in der Primärdiagnostik nicht durchgesetzt, sondern dient als ergänzende Untersuchung bei IgA-Mangel oder unklaren Fällen. Bei zöliakietyrischen Symptomen und IgA-Mangel zeigten sich in beiden Tests hoch positive IgG-Werte bei negativen IgA-Antikörpern. Die Diagnose konnte histologisch bestätigt werden.

Anhand der Korrelation wurden die tTG-IgA-Antikörper-Testkits miteinander verglichen, ob die erhaltenen AK-Titer vergleichbar hoch sind: In der Patientengruppe 1 lag zwischen den einzelnen Testkits insgesamt eine gute Übereinstimmung der Testwerte vor. In den Gruppen 3 und 2 ist diese Übereinstimmung in allen Vergleichen nicht signifikant. Mit dem EmA – Test korrelieren die jeweiligen tTG-Testkits in der Gruppe 1 ebenfalls sehr gut, so dass im EmA-Test ein AK-Nachweis noch in sehr großen Verdünnungen einem hohen quantitativen Testwert aus dem tTG-Antikörper-Test entspricht.

Das hier beobachtete Verhalten der verschiedenen Antikörper nach Beginn einer glutenfreien Diät ist nicht repräsentativ, weil nur drei Patienten beobachtet werden konnten. Bis auf einen Patienten sind die Werte nicht im Verlauf beobachtet worden, sondern waren nur Momentaufnahmen. Bei dem einzigsten Patient, bei dem eine Verlaufsbeobachtung des Antikörper-Verhaltens nach Beginn einer GFD vorlag, fielen die EmA- und tTG-Antikörper schnell ab und waren nach 6 Monaten negativ.

Nach Hansson et. al. (24) weisen an Zöliakie-erkrankte Kinder jünger als 5 Jahre die höchsten Titer sowohl an IgA- als auch an IgG-Transglutaminase aufweisen. Dies kann bei den Testkits der Fa. Biomed und Binding Site (Abbildungen 3.5. und 3.6.) im Wesentlichen bestätigt werden. Bei der Fa. Medipan haben die 4- bis 7- jährigen im Schnitt die höchsten Antikörpertiter. Die Antikörper-Titer gegen Endomysium sind in dieser Studie bei Kleinkindern am höchsten und fallen anschließend mit zunehmendem Alter linear ab.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Transglutaminase-Antikörper heute in der Zöliakiediagnostik einen hohen Stellenwert haben und auf dem Wege sind, zum Goldstandard der Erkrankung zu werden und die Dünndarmbiopsie aus dieser Stellung zu verdrängen.

6. LITERATURVERZEICHNIS:

1. Acceta , Kumar V, Beutner EH, Chorzelski TP, Helm F.
Anti-Endomysial Antibodies.
Arch Dermatol 1986; 122: 459- 462.
2. Aretaeus.
On the Coeliac affection, quoted by RH Major.
In: Classic descriptions of Disease, Charles C. Thomas, Springfield, III., 1945: 600-601.
3. Ascher H, Hahn-Zoric M, Hanson LA et al.
Value of serologic markers for clinical diagnosis and population studies of coeliac disease.
Scan J Gastroenterol 1996; 31: 61-67.
4. Baur, Greschner, Schaaf.
Praktische Tips für die Medizinische Doktorarbeit.
Springer, 2000.
5. Beutner EH, Kumar V, Chorzelski TP, Szaflarska-Czerwionka M.
IgA Endomysial Antibodies in IgA-Deficient Patient with Coeliac Disease.
Lancet 1989; 1:1261-1262.
6. Biagi F, Ellis HJ, Yiannakou JY, Brusco G, Swift GL, Smith PM, Corazza GR, Ciclitira PJ.
Tissue Transglutaminase Antibodies in Celiac Disease.
Am J Gastroenterol 1999; 94: 2187-2192.
7. Bürgin-Wolff A, Dahlbom I, Hadziselimovic F, Petersson CJ.
Antibodies Against Human Tissue Transglutaminase and Endomysium in Diagnosing and Monitoring
Coeliac Disease.
Scand J Gastroenterol 2002; 6: 685-691.
8. Caspary, W.F.
Zöliakie /Sprue –100 Jahre nach der detaillierten Erstbeschreibung durch Samuel Gee.
Z Gastroenterologie 1989; 27: 344-351.
9. Cataldo F, Lio D, Marino V, Picarelli A, Ventura A, Corazza GR, the Working Groups on Celiac
Disease of SIGEP and Club del Tenue.
IgG1 antiendomysium and IgG antitissue transglutaminase (anti-tTG) antibodies in coeliac patients
with selective IgA deficiency.
Gut 2000; 47: 366-369.
10. Catassi C, Räscht IM, Fabiani E, et al.
Coeliac Disease in the year 2000: exploring the iceberg.
Lancet 1994;343:200-203.
11. Chan AW, Decker-Butzner J, McKenna R, Fritzler MJ.
Tissue Transglutaminase Enzyme-Linked Immunosorbent Assay as a Screening Test for Celiac
Disease in Pediatric Patients.
Pediatrics 2001, 107: e8.
12. Chorzelski TP, Beutner EH, Sulej J, Tchorzewska, Jablonska S, Kumar V and Kapuscinska A.
IgA anti-endomysium antibody. A new immunological marker of dermatitis herpetiformis and coeliac
disease.
British J of Dermatology 1984; III: 395-402.

13. Chorzelski TP, Sulej J, Tchorzewska H.
IgA class endomysium antibodies in dermatitis herpetiformis and coeliac disease.
Ann NY Acad Sci 1983; 420: 325-334.
14. Corrao G, Corazza GR, Andreani ML et al.
Serologic screening of coeliac disease: choosing the optimal procedure according to various prevalence values. Gut 1994; 35: 771-775.
15. Crosby WH, Kugler HW.
Intraluminal biopsy of the small intestine.
American Journal of Digestive Diseases. 1957;2:236-41.
16. Dicke, WK.
Investigation of the harmful effects of certain types of cereal on patients with coeliac disease [doctoral thesis]. University of Utrecht, the Netherlands, 1950.
17. Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, Schuppan D.
Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease.
Nat Med 1997; 3: 797-801.
18. Dieterich W, Laag E, Schöpfer H, Volta U, Ferguson A, Gillet H, Riecken EO, Schuppan D.
Autoantibodies to Tissue Transglutaminase as Predictors of Celiac Disease.
Gastroenterology 1998;115:1317-1321
19. Fasano A.
Tissue Transglutaminase: The Holy Grail for the diagnosis of Celiac Disease, at last?
J Pediatr. 1999; 134:134-135.
20. Godkin, Andrew, Jewell, Derek.
The Pathogenesis of Celiac Disease.
Gastroenterology 1998; 115: 206-210.
21. Greco L, Romino R, Coto I, Di Cosmo N, et al.
The first large population based twin study of coeliac disease.
Gut 2002; 50: 624-628.
22. Grodzinsky E, Jansson G, Skogh T, Stenhammer L, Falth-Magnusson K.
Anti-endomysium and anti-gliadin antibodies as serologic markers for coeliac disease in childhood.
Acta Paediat. 1995; 84: 294-298.
23. Hansson T, Dahlbom I, Hall J, Holtz A, Elfman L, Dannaeus A, Klareskog L.
Antibody Reactivity Against Human and Guinea Pig Tissue Transglutaminase in Children with Celiac Disease.
J Pediatr Gastroenterol Nutr 2000; 30: 379-384.
24. Hansson T, Dahlbom I, Rogberg S, Dannaeus A, Höpfl P, Gut H, Kraaz W, Klareskog L.
Recombinant Human Tissue Transglutaminase for Diagnosis and Follow-Up of Childhood Coeliac Disease.
Pediatr Res 2002; 51 (6): 700-705.
25. Harms, H.K., Caspary, W.
Zöliakie /Sprue.
Deutsche Zöliakie-Gesellschaft e.V. Nov. 1998.

26. Henker J.
Ergebnisse dünn darmbiopischer Untersuchungen im Kindesalter und ihre Korrelation zu anderen paraklinischen Befunden unter besonderer Berücksichtigung der Zöliakie.
Dtsch Zöliakie Verdau Stoffwechselkr 1986; 46: 282-286.
27. Holtmeier W, Caspary WF.
Antikörperdiagnostik bei Sprue / Zöliakie.
Z Gastroenterologie 1998; 36 :587-597.
28. Juto P, Meuwisse G, Mincheva-Nilson L.
Why has coeliac disease increased in Swedish children? (Letter).
Lancet 1994; 343:1372.
29. Karpati S, Bürgin-Wolff A, Krieg T, Meuer M, Stolz W, Braun-Falco O.
Binding to human jejunum of serum IgA antibody from children in coeliac disease.
Lancet 1990; 336: 1335-1338.
30. Keller KM.
Glutensensitive Enteropathie (Zöliakie) –ein Krankheitsbild im Wandel.
Medizinimdialog MID 3 /01.
31. Kocna P, Vanickova Z, Perusicova J, Dvorák M.
Tissue Transglutaminase- Serology Markers of Coeliac Disease.
Clin Chem Lab Med 2002; 40 (5): 485-492.
32. Korponay-Szabo IR, Sulkanen A, Halttunen T, Maurano F, Rossi M, Mazzarella G, Laurila K, Troncone R, Mäki M.
Tissue Transglutaminase ist the target in both rodent and primate tissue for celiac disease-specific autoantibodies.
J Pediatr.Gastroenterology Nutr; 31: 520-527.
33. Korponay-Szabo IR, Sulkanen S, Haitunen T. Mäki K et al.
Complete overlapping of tissue staining patterns of anti-transglutaminase antibodies and coeliac disease specific IgA antibodies.
J Pediatr Gastroenterol Nutr 1998; 26, 553.
34. Ladinser B, Rossipal E, Pittschieler K.
Endomysium antibodies in coeliac disease: an improved method.
Gut 1994; 35:776-778.
35. Light N, Champion AE.
Characterization of muscle epimysium, perimysium and endomysium collagens.
Biochem J 1984; 219: 1017-1026.
36. Lindquist BL, Rogozinski T, Moi H, Danielson D, Olcén P.
Endomysium and gliadin IgA antibodies in children with coeliac disease.
Scand J Gastroenterol 1994; 29: 452-456.
37. Lock RJ, Pitcher MCL, Unsworth DJ.
IgA anti-tissue transglutaminase as a diagnostic marker of gluten sensitive enteropathy.
J Clin Pathol 1999; 52: 274-277.
38. Logan RFA, Rifkind EA, Turner ID, Ferguson A.
Mortality in Celiac Disease.
Gastroenterology 1989; 97: 265-271.

39. Logan RFA.
Screening for coeliac disease – has the time come for mass screening?
Acta Paediatr. 1996; Suppl 412: 15-19.
40. Mäki Markku, Collin Pekka.
Coeliac disease.
Lancet 1997; 349: 1755-59.
41. Marsh MN.
Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine: a molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity (,celiac sprue').
Gastroenterology 1992;102:330-354.
42. Martini S, Mengozzi G, Aimo G, Giorda L, Pagni R, Guidetti CS.
Comparative Evaluation of Serologic Tests for Celiac Disease Diagnosis and Follow-Up.
Clin Chem 2002; 6: 960-963.
43. Meuwisse GW. Europea Society for Paediatric Gastroenterolgy and Nutrition –Meeting in Interlaken-
Diagnostic criteria in coeliac disease.
Acta Paediat. Scand 1970; 59: 461-463.
44. Molberg O, McAdam SN, Körner R, Quarsten H, Kristiansen C, et al.
Tissue Transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized but gut-derived T cells in celiac disease.
Nat Med 1998; 4: 713-16.
45. Paulley LW.
Observations on the aetiology of idiopathic steatorrhoea.
Br Med J 1954;2:1318-1321.
46. Paveley William F.
From Aretaeus to Crosby: a history of coeliac disease.
Br Med J 1988; 297: 1646-49.
47. Picarelli A, Di Tola M, Sabbatella L, Mastracchio A, Trecca A, Gabrielli F, Di Cello T, Anania MC, Torsoli A. Identification of a new coeliac disease subgroup: antiendomysial and anti-transglutaminase antibodies of IgG-class in the absence of selective Ig A deficiency.
J Int Med 2001; 249: 181-188.
48. Reeves GE, Burns C, Hall ST, Gleeson M, Lemmert K, Clancy RL.
The measurement of IgA and IgG transglutaminase antibodies in celiac disease: a comparison with current diagnostic methods.
Pathology 2000; 32: 181-185.
49. Riecken E.O., Daum S., Schulzke J-D., Dieterich W., Schuppan D.
Gewebsstransglutaminase als Autoantigen bei der einheimischen Sprue.
Dtsch.med.Wschr. 1998; 123:1454-1460.
50. Sárdy M, Kárpáti S, Péterfy F, Rásky K, Tomsits E, Zágoni T, Horváth A.
Comparison of tissue transglutaminase ELISA with the endomysium antibody test in the diagnosis of gluten-sensitive enteropathy.
Z Gastroenterol 2000; 38: 357-364.

51. Sárdy M, Odenthal U, Kárpáti S, Paulson M, Smyth N.
Recombinant Human Tissue Transglutaminase ELISA for the Diagnosis of Gluten-sensitive Enteropathy.
Clin Chem 1999; 45: 2142-2149.
52. Savilahti E, Perkkiö M, Kalimo K et al.
IgA Antigliadin Antibodies: A marker of mucosal damage in childhood coeliac disease.
Lancet 1983, Febr.12: 320-322.
53. Sbattero D, Berti I, Trevisiol C, Marzari R, Tommasini A, Bradbury A, Fasano A, Verntura A.
Human Recombinant Tissue Transglutaminase ELISA: An Innovative Diagnostic Assay for Celiac Disease.
Am J Gastroenterol. 2000; 95:1253-1257.
54. Schuppan D, Dieterich W, Riecken EO.
Exposing gliadin as a tasty food for lymphocytes.
Nat Med. 1998, 4:666-667.
55. Schuppan D.
Current Concepts of Celiac Disease Pathogenesis.
Gastroenterology 2000; 119: 234-242.
56. Seah PP, Fry L, Rossiter MA, Hoffbrand AV, Holborow EJ.
Anti reticulín antibodies in childhood coeliac disease.
Lancet 1971; 2: 681-682.
57. Seissler J, boms S, Wohlrab U, Morgenthaler N G, Mothes T, Boehm B O, Scherbaum W A.
Antibodies to Human Rekombinant Tissue Transglutaminase Measured bei Radioligand Assay: Evidence for High Diagnostic Sensitivity for Celiac Disease.
Horm Metab Res 1999; 31: 375-79.
58. Sitzmann, CF (Hrsg.), mit Beitr. Von C.-P. Bauer...-
Pädiatrie.
Hippokrates Verl. Stuttgart, 1995.
59. Stern M, Fischer K, Grüttner R.
Immunofluorescent Serum Gliadin Antibodies in Children with Coeliac Disease and Various Malabsorptive Disorders.
Eur J Pediatr 1979; 130:155-164.
60. Stern M, Fischer K, Grüttner R.
Immunofluorescent Serum Gliadin Antibodies in Children with Coeliac Disease and Various Malabsorptive Disorders: II. Specificity of Gliadin Antibodies.
Eur J Pediatr 1979; 130:165-172.
61. Stern M, Teuscher M, Wechmann T.
Serological screening for coeliac disease: methodological standards and quality control.
Acta Paediatr 1996; Suppl 412; 49-51.
62. Stern M. for the Working Group on Serologic Screening for Celiac Disease.
Comparative Evaluation of Serologic Tests for Celiac Disease: A European Initiative Toward Standardization.
J Pediatr Gastroenterol Nutr 2000 Nov; 31(5): 513-9.

63. Stüber E, Fölsch UR.
Die glutensensitive Enteropathie (Sprue, Zöliakie) :aktuelle Aspekte der Epidemiologie, Diagnostik und Therapie.
Dtsch. Med. Wschr. 1999, 124: 1462-1467.
64. Sulkanen S, Halttunen T, Laurila K, Kolho KL, et al.
Tissue Transglutaminase Atuoantibody Enzyme-linked Immunosorbent Assay in Detecting Celiac Disease. Gastroenterology 1998; 115: 1322-1328.
65. Swinson C, Levi A.
Is coeliac disease underdiagnosed?
Brit Med J 1980; 281: 1258-1260.
66. Trevisiol C, Ventura A, Baldas V, Tommasini A, Santon D et al,
A Reliable Screening procedure for Coeliac Disease in Clinical Practice.
Scand J Gastroenterol 2002; 6: 679-684.
67. Unsworth DJ, Walker-Smith JA, Holborow EJ.
Gliadin and Antireticulin Antibodies in Childhood Coeliac Disease.
Lancet 1983, I: 874-875.
68. Van de Kramer JH, Weyers HA, Dicke WK. Coeliac Disease IV.
An investigation into the injurious constituents of wheat in connection with their action on patients with coeliac disease.
Acta Paediatr.Scand. 1953; 42; 223-27
69. Vitoria JC, Arrieta A, Arranz C, Ayesta A, Sojo A, Maruri N, García-Masdevall MD.
Antibodies to Gliadin, Endomysium and Tissue Transglutaminase for the Diagnosis of Celiac Disease.
J Pediatr Gastroenterol Nutr; 29: 571-574.
70. Volta U, Molinaro N, De Fansceschi L, Fratangelo D, Bianchi FB.
IgA-anti-endomysial antibodies on human umbilical cord for coeliac disease screening. Save both money and monkeys.
Dig.Dis.Sci. 1995;40: 1902-1905.
71. Walker-Smith JA, Guandalini S, Schmitz J, Shmerling DH, Visakorpi JK.
Revised criteria for diagnosis of coeliac disease.
Arch Dis Child 1990; 65: 909-911.
72. Wechmann T.
IgA-Endomysium-Antikörpertest bei Zöliakiepatienten: Untersuchung zur Methodik.
Medizinischen Dissertation 1999. Universität Tübingen.
73. West J, Lloyd CA, Hill PG, Holmes GKT.
IgA-Antitissue Transglutaminase: Validation of a Commercial Assay for Diagnosing Coeliac Disease.
Clin Lab. 2002; 48: 241-246.
74. Wolters V, Vooijs-Moulaert AF, Burger H, Brooimans R, De Schryver J, Rijkers G, Houwen R.
Human tissue transglutaminase enzyme linked immunosorbent assay outperforms both the guinea pig based tissue transglutaminase assay and anti-endomysium antibodies when screening for coeliac disease.
Eur J Pediatr 2002; 161: 284-287.

LEBENS LAUF

Name: Verena Oberhammer

Geburtstag: 17. März 1976

Geburtsort: Tübingen

Schulausbildung: 1982 - 1986 Grundschule Innenstadt, Tübingen

1986 - 1995 Uhland-Gymnasium, Tübingen

1995 Abitur

Medizinstudium: 1996-1998 Eberhard-Karls-Universität Tübingen

1998 Physikum

1998-2002 Ludwig-Maximilians-Universität München

1999 Erstes Staatsexamen

2001 Zweites Staatsexamen

2002 Drittes Staatsexamen

Weiterbildung:

1/03 bis 6/04 Ärztin im Praktikum in der Abteilung für Anästhesiologie
und operative Intensivmedizin des Städtischen Krankenhauses
München Harlaching

seit 7/2004 Assistenzärztin in der Abteilung für Anästhesie und operative
Intensivmedizin des Rotkreuz-Krankenhauses München